

УДК 576.893.161.13 : 595.754.1

© 1990

**PROTEOMONAS INCONSTANS N. GEN., N. SP. (KINETOPLASTIDA:  
TRYPANOSOMATIDAE) — ПАРАЗИТ КЛОПА CALOCORIS SEXGUTATUS  
(HEMIPTERA: MIRIDAE)**

**С. А. Подлипаев, А. О. Фролов, А. А. Колесников**

Описывается новый род трипаносоматид, характеризующийся оригинальным ходом клеточного цикла и наличием стадий, обладающих длинным жгутиковым карманом, в ряде случаев огибающим ядро.

Систематика трипаносоматид далека от совершенства. Бедность клетки представителей сем. Trypanosomatidae информативными признаками делает систему этой группы в значительной степени субъективной и рождает неопределенность как в видовой, так и в родовой систематике (Wallace, 1966; Подлипаев, 1985, и др.).

**МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА**

Методы исследования насекомых, изготовления препаратов, биометрической обработки, получения аксеничной культуры паразитов, культивирования на жидких и плотных питательных средах, приготовления препаратов для электронной микроскопии и методы выделения кинетопластной ДНК (кпДНК) и условия расщепления кпДНК рестриктазами описаны нами ранее (Подлипаев, 1982, 1985; Подлипаев, Фролов, 1987; Фролов, Скарлато, 1987; Маслов и др., 1982). Ранее описываемый вид обозначался как *Crithidia* sp. — изолят ЗК.

**РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ**

При исследовании кишечника пойманного в Псковской обл. клопа *Calocoris sexguttatus* была обнаружена инвазия жгутиконосцами, относящимися к сем. Trypanosomatidae, которых удалось перевести в аксеничную лабораторную культуру.

Клетки паразитов в кишечнике насекомого имеют округлую или эллипсоидальную форму, у большинства есть свободный жгутик (рис. 1, а). Среди них можно выделить три морфологических типа: 1) клетки с промастиготной организацией — кинетопласт находится впереди ядра или на уровне его переднего края, форма клеток от эллипсоидальной до цилиндрической; 2) кинетопласт перед ядром, рядом с ним или за ядром, жгутик образует изгиб в теле клетки, часто огибая ядро, форма клеток эллипсоидальная; 3) кинетопласт расположен близко к переднему краю клетки, свободный жгутик укорочен, форма клеток округлая. Встречаются формы переходные между этими типами.

На жидкой питательной среде часть клеток принимает удлиненную форму, ядро занимает более заднее положение, кинетопласт в среднем смещается



Рис. 1. *Proteomonas inconstans*.

*a* — жгутиконосцы из кишечника хозяина; *б* — жгутиконосцы из лабораторной культуры.

к ядру, почти в 25 % случаев заходя за его край. У некоторых клеток отсутствует свободный жгутик, внутриклеточная часть его часто имеет петлеобразную укладку (рис. 1, *б*, табл. 1). При высушивании мазка клетки сразу же теряют жизнеспособность.

При электронно-микроскопическом исследовании клеток, культивируемых на жидкой среде, обнаружено три типа организации: промастиготы (рис. 2, 1; см. вкл.), крупные округлые эндомастиготы с коротким жгутиком (рис. 2, 2), мелкие овальные эндомастиготы с петлеобразной укладкой жгутика (рис. 2, 3, 4), а также формы переходные от последних к промастиготам. Основные различия всех типов клеток связаны со строением их жгутикового кармана и взаиморасположением ядра и кинетопласта. Поверхность жгутиконосцев покрыта плазматической мембраной, под которой проходят субпелликулярные микротрубочки. Цитоплазма содержит многочисленные рибосомы, причем в крупных эндомастиготах (рис. 2, 2) их количество значительно уменьшено. Митохондрии сильно разветвлены. В апикальной части клетки его ветви заходят в складки, обрамляющие жгутиковый карман. Кресты пластинчатые, реже грубчатые (рис. 3, 1; см. вкл.). Компактная капсула кинетопласта может быть повернута на 180°, тогда кинетосомы обращены к заднему концу клетки и жгути-

Т а б л и ц а 1

Значение морфологических признаков *Proteomonas inconstans*  
Values of morphological characters of *Proteomonas inconstans*

Жгутиконосцы	Значения признаков, мкм, $\bar{X} \pm s_{\bar{x}}$				
	Д	ПК	КЯ	ПЯ	Я
Из хозяина	5.71±0.15	1.95±0.12	0.59±0.12	2.55±0.10	1.59±0.06
Из культуры	6.97±0.22	2.69±0.14	0.08±0.12	2.74±0.12	1.59±0.05

Т а б л и ц а 1 (продолжение)

Жгутиконосцы	Значения признаков, мкм, $\bar{X} \pm s_{\bar{x}}$			
	ЗЯ	Ш	ПК/КЯ	ПЯ/ЯЗ
Из хозяина	1.66±0.12	3.65±0.19	2.17±0.43	1.81±0.22
Из культуры	2.70±0.21	2.68±0.07	1.45±1.18	1.14±0.09

Примечание. Д — длина клетки; ПК — расстояние от переднего конца тела до кинетопласта; КЯ — расстояние от кинетопласта до края ядра; ПЯ — расстояние от переднего конца тела до края ядра; Я — ядро; ЗЯ — расстояние от заднего конца тела до края ядра; Ш — ширина клетки; кинетопластный индекс — ПК/КЯ; ядерный индекс — ПЯ/ЯЗ.

Т а б л и ц а 2

Клеточный состав колоний *Proteomonas inconstans*  
(типы клеток, как на рис. 4)Cellular composition of *P. inconstans* colonies  
(types of cells as in Fig. 4)

Морфотип колоний	Клеточный состав колоний		
	типы клеток, % от общего числа:		
	1	2	3
Мелкие	80.4	Единичные	19.6
Амебоидные	51.3	3.7	45.0
Крупные	12.4	54.5	33.1
«Бляшки» на амебоидных	45.9	31.8	22.3

ковый карман огибает ядро (рис. 2, 3, 4). В ядре типичного строения имеется одно крупное центральное ядрышко. В интерфазном ядре конденсированный хроматин прилегает к внутренней ядерной мембране, однако отдельные его скопления находятся и возле ядрышка (рис. 2, 1, 4). Микротрубочки, армирующие жгутиковый карман, объединены в две группы, одна из которых включает 4, а другая до 8 микротрубочек (рис. 3, 2). В остальном ультраструктура исследуемых клеток сходна со строением клеток большинства других трипаносоматид.

При клонировании на плотной агаризованной питательной среде можно выделить три типа колоний, фенотипы которых наследуются: правильные полусферические крупные (рис. 3, 3) со средним диаметром первых субклонов  $2.13 \pm 0.09$ ; правильные полусферические мелкие (рис. 3, 4) со средним диаметром первых субклонов  $0.36 \pm 0.09$  и амебоидные (рис. 3, 5) со средним диаметром первых субклонов  $2.04 \pm 0.11$  мм. Клеточный состав колоний различных фенотипов оказался неодинаковым (табл. 2). При исследовании живых клеток оказалось, что мелкие колонии образованы подвижными удлиненными клетками, амебоидные — сходными подвижными клетками и крупными округлыми, лишенными свободного жгутика. Крупные колонии сформированы неподвижными, округлыми клетками без свободного жгутика, часто с бульбообразным образованием на переднем конце и вакуолью у основания жгутика. Подвижных клеток в крупных колониях 10—15%. На окрашенных по Романовскому—Гимза препаратах можно выделить несколько типов клеточной органи-

Т а б л и ц а 3

Размеры фрагментов максиколецевой кпДНК *Proteomonas inconstans*, образуемые при обработке кпДНК рестриктазами  
(в тысячах пар нуклеотидов)Sizes of fragments of maxi-circular kpDNA produced  
at the treatment of associate kpDNA with restrictases

Рестриктаза (узнаваемая последовательность)	Размер фрагментов							Сумма размеров фрагментов
BamHI (GGATCC)	30	3.7						34
Cfr131 (GGNAC)	25	6.8	6.0					38
MvaI (CCA/TGG)	27	5.6	4.6					37
Eco471 (GGA/TCC)	27	5.6	4.9					38
MspI (CCGG)	16	6.8	4.2	4.1	3.5	2.5	2.3	39.5
AluI (AGCT)	12—15	7.0	4.0	3.3	2.7	2.25	+	31—35

Примечание. + размер фрагментов точно не определен.

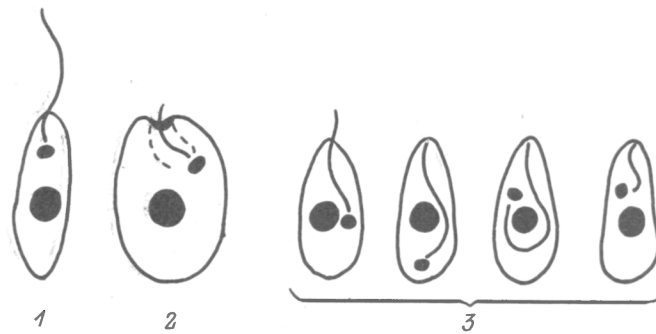


Рис. 4. Основные типы клеточной организации *P. inconstans*.

1 — промастигота; 2 — крупная эндомастигота; 3 — мелкие эндомастиготы и переходные стадии с изменчивым положением кинетопласта.

Fig. 4. Main types of cellular organization of *P. inconstans*.

зации (рис. 4, табл. 2): 1) промастиготная (рис. 4, 1); 2) эндомастиготная — крупные округлые клетки, лишённые свободного жгутика (рис. 4, 2); 3) клетки овальной формы, мелкие, с нестабильным положением кинетопласта, находящегося рядом с ядром или в задней части клетки (опистомастиготная организация), или жгутик делает петлю в теле клетки, в ряде случаев огибая ядро, при этом свободный жгутик может отсутствовать (эндомастиготы) (рис. 4, 3). Таким образом, исследуемая культура трипаносоматид характеризуется полиморфизмом клеточного состава, изоморфно отражающим полиморфизм исходной популяции жгутиконосцев из кишечника насекомого, причем этот полиморфизм находит свое выражение и в полиморфизме типов колоний на плотной питательной среде. Крупные колонии в серии последовательных субклонирований сохраняют свой фенотип неизменным, сходным образом ведут себя и мелкие колонии. В субклонах, ведущих свое начало от амeboидных колоний, могут образовываться правильные округлые сгущения клеток (так называемые «бляшки»), в которых резко увеличено (в 10—15 раз) количество крупных безжгутиковых эндомастигот.

Размер миникольцевых кпДНК, определенный на основании расщепления ассоциата кпДНК рестриктазами BamHI и EcoRV, составляет 1550 пар нуклеотидов. В табл. 3 представлены размеры фрагментов максикольцевой кпДНК, образуемые при обработке ассоциата различными рестриктазами. С учетом погрешности определения размеров фрагментов, особенно крупных, размер максикольцевой кпДНК составляет около 38 т. п. н.

В систематике низших трипаносоматид нет ясности как с установлением сущности таксономических критериев, так и с определением их иерархии. Видовые критерии расплывчаты, носят в основном полукачественный, полуколичественный характер и весьма субъективны. Широко применявшееся ранее представление об узкой специфичности низших трипаносоматид не нашло подтверждения в целом ряде исследований, более того, необходимо признать, что, вероятно, многие виды имеют широкую, по крайней мере на уровне семейств хозяев, специфичность (Wallace, 1966; Подлипаев, Фролов, 1987). Качественные, дискретные признаки: наличие или отсутствие ундулирующей мембраны, положение кинетопласта относительно ядра и другие применяются лишь для родовой диагностики. При этом число надежных дискретных признаков невелико и, очевидно, не позволяет с их помощью достаточно адекватно описать имеющееся у трипаносоматид разнообразие типов клеточной организации, реализующихся в их жизненных циклах. В систематике высших трипаносоматид в последнее время с успехом применяются характеристики кпДНК, в том числе в каче-

стве родовых критериев используется размер миникольцевых молекул кинетопласта. Применение этого критерия к нашей коллекции культур низших трипаносоматид показало, что виды, относимые по морфологическим признакам к трем разным родам, разделяются на 4 группы (Kolesnikov e. a., 1990), в связи с чем было высказано предположение о возможности введения новых родов или подродов для низших трипаносоматид. В последнее время появились новые, оригинальные сведения о жизненных циклах низших трипаносоматид. Так, при описании *Crithidia allae* и *C. brevicula* было обнаружено, что сложный клеточный цикл этих жгутиконосцев, характеризующийся чередованием четырех морфологически различных стадий, включает стадию эндомастиготы, ранее для рода *Crithidia* неизвестную. Это позволило авторам также высказать предположение о возможном существовании неизвестных пока надвидовых групп у низших трипаносоматид (Фролов, Малышева, 1989а, 1989б). Характерные для указанных видов эндомастиготы с коротким жгутиковым карманом и эндомастиготы с петлеобразной укладкой жгутика очень похожи на аналогичные клетки трипаносоматид из *Calocoris*, причем клетки первого типа характерны для крупных колоний как у *C. allae*, так и у описываемого здесь вида, а мелкие колонии сформированы в основном промастиготами и эндомастиготами второго типа и у *C. brevicula*, и у жгутиконосцев из *Calocoris*. Различия заключаются в том, что большинство клеток со жгутиком, огибающим ядро, у *C. brevicula* не имеют свободной его части, а у вида из *Calocoris* имеют, у *C. allae* среди эндомастигот в крупных колониях встречаются лишь единичные подвижные клетки, а у описываемого здесь вида их число составляет 10—15 %. Отсутствие или наличие жгутика в данном случае вряд ли принципиально, так как установлено, что мелкие эндомастиготы могут в течение короткого времени выпускать или втягивать жгутик внутрь клетки (Фролов, Малышева, 1989а, 1989б).

Ранее было показано (Фролов, Малышева, 1989б), что в культуре *C. brevicula* происходит закономерная смена типов клеточной организации от промастигот, через парамастиготы, в результате деления которых образуются эндомастиготы, снова к промастиготам.

Ультраструктура большинства трипаносоматид весьма сходная (Vickerman, Preston, 1976). Встречающиеся различия либо индивидуальны, либо отражают признаки надвидовых групп. В этой связи заслуживает внимания организация клеток трипаносоматид из *Calocoris*, а именно: морфология их жгутикового кармана у клеток с петлеобразной укладкой жгутика. Такой длинный жгутиковый карман известен только у представителей рода *Herpetomonas* (Janovy e. a., 1974), однако в этом случае он всегда прямой и армируется одной, а не двумя, как у описываемого паразита, группой микротрубочек. Поскольку петлеобразный жгутиковый карман, армируемый двумя группами микротрубочек, отмечен и у жгутиконосцев *C. brevicula* и *C. allae*, можно полагать, что этот признак имеет надвидовой характер.

Анализ структуры кпДНК показал, что по размеру миникольцевых компонентов (1550 пар оснований) обсуждаемые виды сходны между собой и отличаются как от *Leptomonas*, так и от *Crithidia* (Kolesnikov e. a., 1990).

Таким образом, *C. allae*, *C. brevicula* и трипаносоматиды из *Calocoris* образуют обособленную группу, характеризующуюся рядом специфических признаков, что, по нашему мнению, позволяет объединить этих трипаносоматид в отдельный род.

#### Род **PROTEOMONAS** gen. n.

Диагноз. Паразиты насекомых. Промастиготы, эндомастиготы, клетки с варьирующим положением кинетопласта. Эндомастиготы двух типов: первый — с кинетопластом перед ядром и коротким жгутиковым карманом; второй — с длинным, петлеобразным, часто огибающим ядро жгутиковым

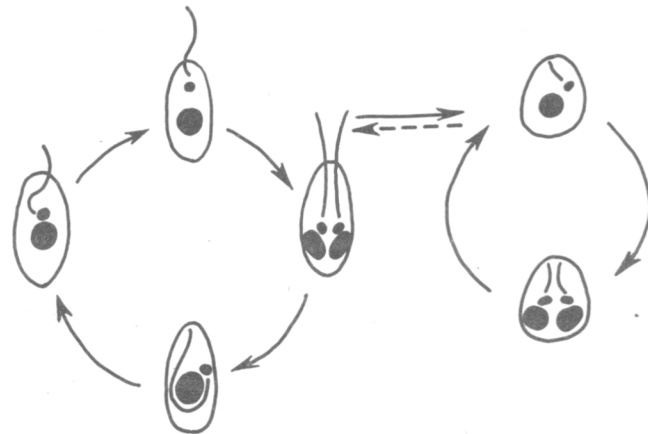


Рис. 5. Схема жизненного цикла представителей рода *Proteomonas*.

Объяснение в тексте.

Fig. 5. Pattern of life cycle of the genus *Proteomonas* members.

карманом, свободный жгутик может присутствовать. Жгутиковый карман армируется двумя группами микротрубочек. Деление клеток осуществляется на стадии парамасиготы или эндомасиготы.

Дифференциальный диагноз. От близкого рода *Crithidia* резко отличается оригинальным строением эндомасигот, а также наличием клеток с длинным петлеобразным или изогнутым жгутиковым карманом, армируемым двумя группами микротрубочек. От рода *Herpetomonas* отличается длинным, изогнутым жгутиковым карманом, подстилаемым двумя группами микротрубочек, часто огибающим ядро. Клетки с задним положением кинетопласта в роде *Proteomonas* являются, видимо, промежуточными стадиями миграции кинетопласта вокруг ядра.

Типовой вид: *Proteomonas inconstans* Podlipaev, Frolov et Kolesnikov sp. n.  
Х о з я и н: *Calocoris sexguttatus* F. (Hemiptera, Miridae) — типовой.

М е с т о н а х о д к и: РСФСР, Псковская обл., пос. Ляды.

Л о к а л и з а ц и я: кишечник.

Типы: голотип, ксенотип, типовая культура хранятся в лаборатории протозоологии ЗИН АН СССР.

Диагноз. Морфология жгутиконосцев соответствует диагнозу рода. На плотной питательной среде образуют колонии трех типов: правильные полусферические мелкие, амeboидные и правильные крупные. Колонии первого типа образуются промасиготами и клетками со жгутиком, огибающим ядро, в колониях второго типа, кроме того, присутствуют эндомасиготы с коротким жгутиковым карманом, колонии третьего типа образованы в основном именно этими эндомасиготами, а также клетками с варьирующим положением кинетопласта. Средние размеры клеток представлены в табл. 1.

*Proteomonas brevicula* (Frolov et Malysheva, 1989) comb. n.

*Crithidia brevicula* Frolov et Malysheva, 1989.

*Crithidia allae* Frolov et Malysheva, 1989 syn. n.

Диагноз. Морфология клеток соответствует диагнозу рода. Колонии на плотной питательной среде двух типов: крупные и мелкие правильные полусферические. Первый тип колоний формируется эндомасиготами с коротким жгутиковым карманом и единичными промасиготами, второй — промасиготами и эндомасиготами с петлеобразным жгутиковым карманом.

Дифференциальный диагноз. *P. brevicula* отличается от *P. inconstans* отсут-

ствием опистомастигот, а также промастигот и клеток с длинным жгутиковым карманом в крупных колониях и отсутствием амeboидных колоний. Рестрикционный спектр кпДНК отличен у этих двух видов по ряду ферментов. Приуроченность к различным семействам хозяев кажется нам дополнительным свидетельством различия этих видов.

Схему жизненного цикла представителей рода *Proteomonas* можно представить следующим образом (рис. 5). Жгутиконосцы проходят свой клеточный цикл от стадии промастиготы к парамастиготе, на которой претерпевают деление, формируя эндомастиготы с длинным петлеобразным жгутиковым карманом, вновь трансформирующиеся в промастиготы через ряд промежуточных стадий. При этом возможно образование эндомастигот с коротким жгутиковым карманом, способных в ряде случаев формировать самостоятельную клеточную популяцию. Примером этому служат клеточные популяции в естественно инвазированных хозяевах и клетки, формирующие амeboидные колонии у *P. inconstans*.

Мы пока не в состоянии однозначно объяснить отсутствие переходов от крупных колоний к мелким или, что то же самое, от эндомастигот с коротким жгутиковым карманом к эндомастиготам с петлеобразной укладкой жгутика и промастиготам. Возможны предположения о детерминированной последовательности двух клеточных циклов в ходе жизненного цикла паразитов или о направленном характере отбора отдельных генотипов в условиях культивирования и т. п.

Истинное разнообразие жизненных циклов пока еще, вероятно, недостаточно полно отражается в системе трипаносоматид. Дальнейшие исследования фауны и биологии этих организмов, особенно многочисленных и слабоизученных паразитов беспозвоночных, безусловно, многое изменят в систематике этой группы.

#### Список литературы

- Маслов Д. А., Энтелис Н. С., Метт И. Л., Резепкина Л. А., Колесников А. А., Зайцева Г. Н. Организация ДНК кинетопласта низших трипаносоматид // Современные проблемы протозоологии. Вильнюс, 1982. С. 223.
- Подлипаев С. А. Выделение из природы и культивирование трипаносоматид — паразитов насекомых // Современные проблемы протозоологии. Вильнюс, 1982. С. 289.
- Подлипаев С. А. Новые виды низших трипаносоматид из полужесткокрылых (Heteroptera) семейств Gerridae и Nabidae: стадии их жизненных циклов в природе и при культивировании в лаборатории // Жизненные циклы простейших. Л., 1985 (Тр. ЗИН АН СССР. Т. 129. С. 35—47).
- 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.
- Фролов А. О., Скарлато С. О. Свето- и электронно-микроскопические исследования *Leptomonas rughcoris* Z. (Trypanosomatidae) // Паразитология. 1987. Т. 21, вып. 1. С. 3—9.
- Фролов А. О., Малышева М. Н. Описание *Crithidia allae* sp. n. и *Crithidia brevicula* sp. n. (Protozoa, Trypanosomatidae) из хищного клопа *Nabis brevis* Scholtz (Hemiptera, Miridae) // Зоол. журн. 1989а. Т. 68, вып. 7. С. 5—10.
- Фролов А. О., Малышева М. Н. Цикл развития паразитического жгутиконосца *Crithidia brevicula* (Trypanosomatidae) в лабораторной культуре // Цитология. 1989б. Т. 31, № 8. С. 971—973.
- Janovy J. J., Lee K. W., Grumbach J. A. The differentiation of *Herpetomonas megaseliae*: ultrastructural observations // J. Protozool. 1974. Vol. 21, N 1. P. 53—59.
- Vickerman K., Preston T. M. Comparative cell biology of the kinetoplastid flagellates // Biology of Kinetoplastida. London; N. Y.; San Francisco: Acad. press, 1976. Vol. 1. P. 36—113.
- Wallace F. G. The trypanosomatid parasites of insects and arachnids // Exptl. parasitol. 1966. Vol. 18. P. 124—193.

ЗИН АН СССР, Ленинград

Поступила 6.10.1989

PROTEOMONAS INCONSTANS N. GEN., N. SP. (KINETOPLASTIDA, TRYPANOSOMATIDAE),  
A PARASITE OF THE BUG CALOCORIS SEXGUTTATUS (HEMIPTERA, MIRIDAE)

S. A. Podlipaev, A. O. Frolov, A. A. Kolesnikov

*Key words:* *Proteomonas inconstans* n. gen., n. sp., Kinetoplastida, Trypanosomatidae, Kinetoplast DNA

S U M M A R Y

A new genus *Proteomonas* is distinguished in the family Trypanosomatidae. The presence of the endomastigote stage is a peculiarity of the genus as well as the presence of the cells with a long curved intracellular part of the flagellum. Members of the genus form polymorphous colonies of different cell composition on the solid media. The ultrastructure and kinetoplast DNA structure are described.

---



Вклейка к ст. С. А. Подлипаева и др.  
Inset to the paper of S. A. Podlipaev et al.

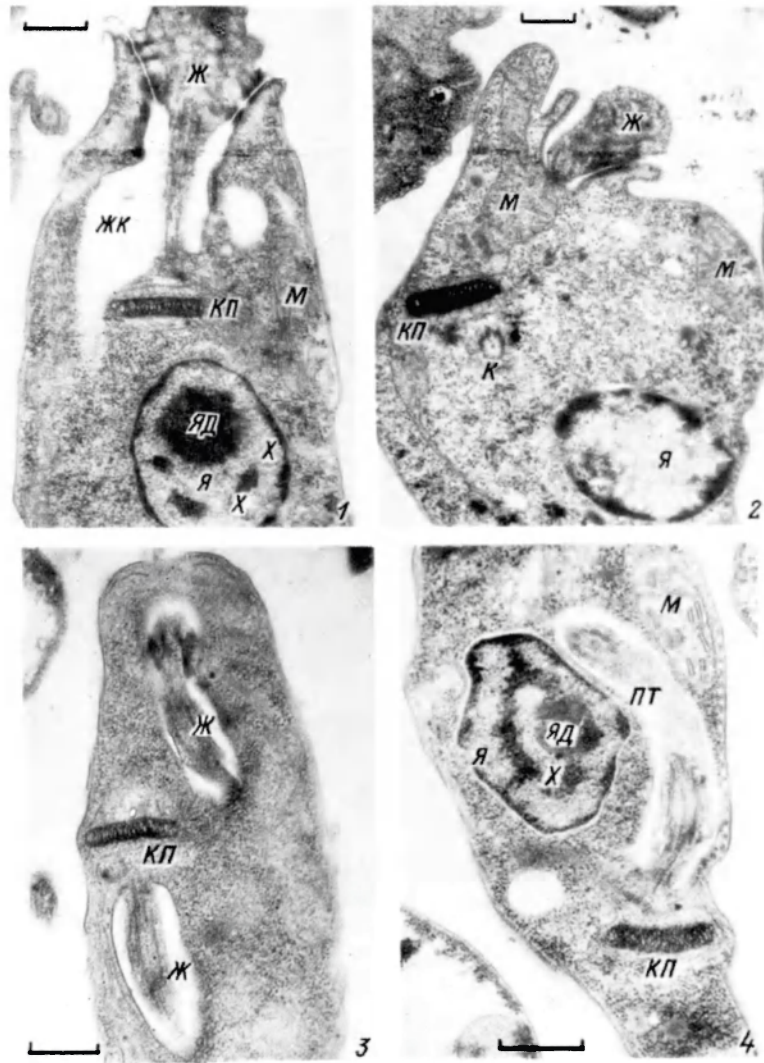


Рис. 2. Ультраструктура *Proteomonas inconstans*.  
1 — промастигота; 2 — крупная эндомастигота; 3, 4 — мелкие эндомастиготы с петлеобразной укладкой жгутика. Масштаб 0.5 мкм. Ж — жгутик; ЖК — жгутиковый карман; К — кинетосома; КП — кинетопласт; М — митохондрия; ПТ — параксиальный тяж; Х — хроматин; Я — ядро; ЯД — ядрышко.

Fig. 2. Ultrastructure of *Proteomonas inconstans*.

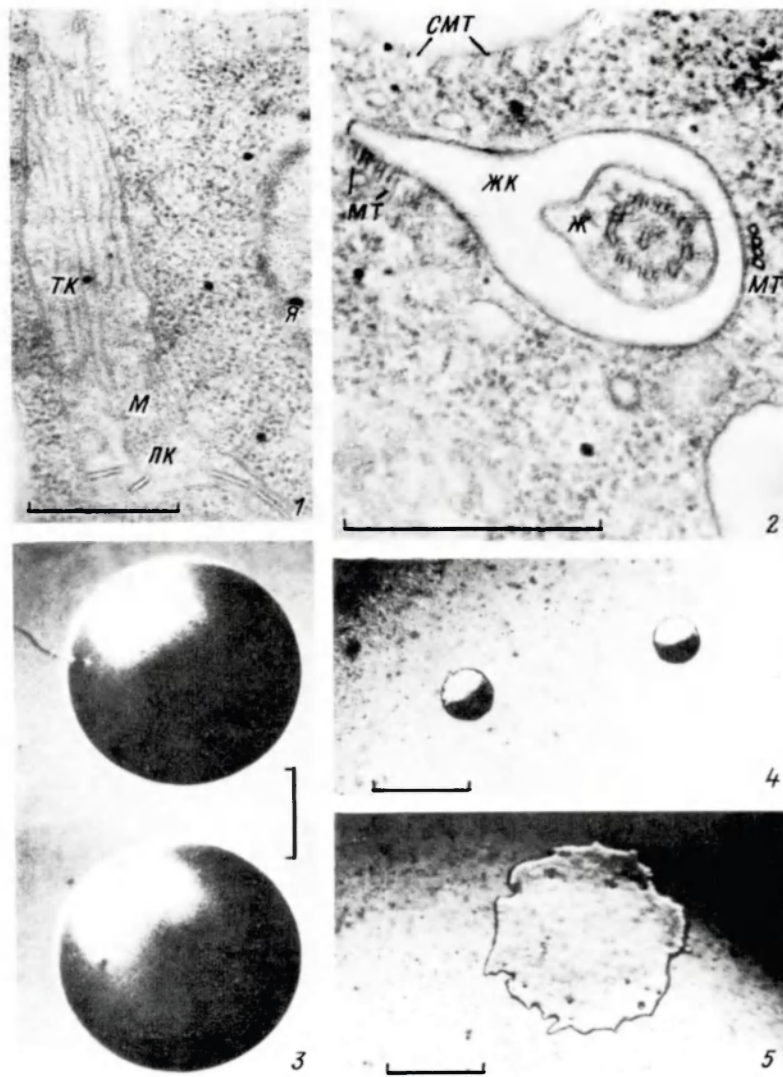


Рис. 3. Ультраструктура *Proteomonas inconstans*.

1 — ветвь митохондрия; 2 — жгутиковый карман. Масштаб: 0,5 мкм. 3—5 — колонии *P. inconstans* на плотной агаризованной среде; 3 — правильные крупные; 4 — правильные мелкие; 5 — амёбовидные. Масштаб 1 мм. МТ — группы микротрубочек, подстилающие жгутиковый карман; ЛК — пластинчатые кристы; СМТ — субпелликулярные микротрубочки; ТК — трубчатые кристы. Остальные обозначения, как на рис. 2.

Fig. 3. Ultrastructure of *Proteomonas inconstans*.