

УДК 576.893.161.13 + 577.21

СПЕЦИФИЧНОСТЬ ГОМОКСЕННЫХ ТРИПАНОСОМАТИД

© С. А. Подлипаев

В статье рассмотрены трудности корректного использования понятия специфичность для паразитических простейших — трипаносоматид. Отмечен высокий уровень субъективности, особенно в эколого-паразитологических исследованиях, когда необходимая для установления специфичности таксономическая идентификация организма сама по себе ненадежна из-за отсутствия четких дискриминирующих признаков, как это и имеет место для трипаносоматид.

Подведены итоги исследования специфичности трипаносоматид классическими методами и критически рассмотрены имеющиеся данные. Показано, что подходы, традиционно используемые при обсуждении этой проблемы, в значительной мере себя исчерпали. Это связано с крайней бедностью клеток всех трипаносоматид информационно значимыми морфологическими признаками вообще и невозможностью использовать эти признаки для систематики гомоксенных трипаносоматид в частности. Лишь использование молекулярных маркеров позволяет объективно без привлечения собственно таксономических данных идентифицировать и сравнивать паразитов и тем самым более объективно судить об их специфичности. Обсуждается необходимость адекватного и достаточного набора лабораторных культур, обязательного для подобных исследований, а также проблема неспецифической и/или случайной инвазии, способной существенно исказить полученные данные. С использованием нескольких молекулярных маркеров разной разрешающей способности было исследовано около пятидесяти лабораторных культур (изолятов) трипаносоматид насекомых и сделан вывод о чрезвычайно широкой специфичности гомоксенных трипаносоматид к своим хозяевам. Ни одна естественная группа трипаносоматид (группа сходных генотипов) не демонстрирует преимущественного распространения в каком-либо таксоне хозяев: роды, виды или изоляты трипаносоматид из насекомых не приурочены к видам, родам или семействам хозяев, а возможно, и к их отрядам.

ИСТОРИЯ И СОСТОЯНИЕ ВОПРОСА

Трипаносоматиды характеризуются исключительным таксономическим разнообразием своих хозяев (Подлипаев, 1990), уступая по этому показателю среди паразитических эукариот только нематодам (Vickerman, 1994). Естественно, что специфичность столь универсальных паразитов вызывает особый интерес.

Если у нематод существенную, а возможно, и главную роль в обеспечении широких приспособительных возможностей играет уникальная кутикула, присущая всем представителям таксона, то одноклеточные трипаносоматиды, не имеющие общих для группы защитных образований, вынуждены каждый раз заново решать проблему биохимической и физиологической адаптации при освоении новой группы хозяев.

Специфичность является одной из ключевых характеристик паразито-хозяйинных систем. Это понятие отражает, с одной стороны, степень взаимной приспособленности различных организмов в настоящий момент, а с другой — позволяет интерпретировать эту приспособленность во времени в терминах филогенетики.

При всей важности этого явления достаточно трудно дать строгое определение специфичности, в общем понимаемой как адаптация паразита к определенному,

ограниченному кругу хозяев (Шульман, Добровольский, 1977). В предельных случаях совокупность хозяев или могла бы быть безграничной, что мало вероятно по экологическим (невозможность встречи организмов) и биохимическим (несовместимость процессов метаболизма) причинам, или ограничиваться одной популяцией либо внутрипопуляционной группой хозяев. Этот вариант возможен, но не может быть частым явлением, так как ставит репродукцию и, соответственно, существование паразита в абсолютную зависимость от выживания конкретной и, как правило, относительно малочисленной группы организмов-хозяев. В реальной практике при обсуждении проблемы специфичности речь чаще всего идет о выявлении наиболее крупной таксономической категории хозяев, с которой закономерно связана та или иная группа паразитов.

Не вдаваясь в дискуссию по вопросу о дефинициях (Шульман, Добровольский, 1977), подчеркнем лишь, что главным компонентом специфичности представляется именно адаптированность паразита к определенному кругу хозяев. Критериями коадаптации служат, с одной стороны, уровень патогенности паразита для своего хозяина, а также тип и степень ответа хозяина на инвазию, а с другой стороны — нормальный онтогенез паразита, заканчивающийся продукцией достаточного для воспроизводства вида количества инвазионных стадий (Шульман, Добровольский, 1977).

Широко известен ярко выраженный патогенный эффект некоторых паразитов из родов *Leishmania*, *Trypanosoma* и *Phytomonas* для человека, домашних животных и культурных растений, что породило распространенное мнение о высокой патогенности гетероксенных трипаносоматид позвоночных и растений (Shaub, 1994). Однако обзор имеющихся данных показывает, что из почти 600 видов рода *Trypanosoma*, 32 видов *Leishmania* и 36 видов и неидентифицированных находок *Phytomonas* (Подлипаев, 1990) только 14 видов *Trypanosoma*, 14 — *Leishmania* и 3 — *Phytomonas* вызывают в той или иной мере выраженный патогенный эффект у своих хозяев (позвоночных животных или растений) (Крылов, 1996). На переносчиков большинства известных гетероксенных трипаносоматид не оказывает существенного воздействия (Shaub, 1992, 1994).

Патогенность большинства видов трипаносоматид специально не исследовалась, однако явный эффект вряд ли был бы пропущен в случаях, когда хозяевами служат позвоночные животные или культурные растения. Таким образом, следует признать, что трипаносоматиды позвоночных животных и растений в основном непатогенны или слабо патогенны для своих хозяев.

Из более чем 170 видов и 150 неидентифицированных находок гомоксенных трипаносоматид (Подлипаев, 1990) патогенный эффект отмечен лишь для пяти видов (Shaub, 1994). Следует, однако, иметь в виду, что для трипаносоматид насекомых, у которых, с одной стороны, в большинстве случаев не известен характер влияния, оказываемого на хозяев, а с другой — не удается выделить четко диагностируемые этапы онтогенеза самого паразита, оценка адаптированности (и связанной с ней специфичности) затруднена и/или избыточно субъективна.

В случае трипаносоматид насекомых и растений мы реально определяем приуроченность паразита к определенному кругу хозяев — «встречаемость», по Б. Е. Быховскому (1957), являющуюся одним из проявлений специфичности. Дабы не усложнять и без того непростой вопрос, мы будем использовать термин «специфичность» именно в этом смысле, причем в 2 вариантах: «широкая» или «узкая» специфичность в зависимости от круга хозяев и их систематической принадлежности.

Исследования специфичности неразрывно связаны и в значительной степени определяются уровнем практической систематики данной группы паразитических организмов. Если таксономические критерии разработаны недостаточно и определение ненадежно, то и представления о специфичности будут носить субъективный и в значительной степени случайный характер. Для организмов, богатых информативными морфологическими признаками, этап субъективной оценки специфичности является в большей или меньшей степени давней историей. Для трипаносоматид вообще, а для паразитов насекомых и растений в особенности, исключительно бедных ясными

диагностическими признаками, этот период заканчивается только сейчас, что связано с появлением доступных молекулярных методов, позволяющих без привлечения собственно таксономических данных установить идентичность или продемонстрировать различия между организмами, паразитирующими у определенных хозяев.

Представления о специфичности той или иной группы паразитов традиционно складывались из двух основных источников: данных фаунистических исследований и результатов экспериментов по заражению хозяев в контролируемых лабораторных условиях.

В фаунистических работах представления о специфичности целиком зависят от достоверности определения паразитов, то есть в конечном итоге от надежности используемых систематических признаков. До последнего времени основными и практически единственными таксономическими критериями для трипаносоматид являлись морфологические признаки клетки (Hoare, Wallace, 1966; Molyneux, Ashford, 1983), недостаточность которых для систематики этих простейших стала очевидной к настоящему времени (Подлипаев, Лобанов, 1996; Camargo e. a., 1982; Dollet, 1994; Merzlyak e. a., 2001; Podlipaev, 2000; Vickerman, 1994; Wallace e. a., 1983, и др.).

В то же время однажды постулированный уровень специфичности какой-либо группы паразитических организмов влияет и на результаты фаунистических исследований. А именно, при исследовании паразитофауны, особенно в эколого-паразитологических работах, специфичность служит часто используемым на практике признаком, помогающим в установлении видовой принадлежности найденных паразитов.

Возникает порочный круг: то, какие представления о специфичности приняты для той или иной группы паразитических животных, во многом определяет результаты фаунистических исследований, а последние автоматически подкрепляют и принятые перед началом исследования представления о специфичности паразитов. Например, для трипаносоматид насекомых долгое время *a priori* подразумевалась узкая специфичность, и большинство старых авторов (да и многие современные) из каждого нового хозяина описывало соответственно и новые виды паразитов (Подлипаев, 1990; Wallace, 1966). Напротив, трипаносоматиды растений, также без видимых причин, считались широкоспецифичными, и в большинстве случаев один и тот же вид паразита описывался из большинства или всех исследованных представителей одного семейства растений-хозяев (например, *Phytomonas davidi* из почти 40 видов семейства Euphorbiaceae; *Ph. elmassiani* — из 21 вида Asclepiadaceae; Подлипаев, 1990).

О специфичности гетероксенных паразитов позвоночных животных известно больше, чем о специфичности гомоксенных трипаносоматид членистоногих, однако и среди них разные виды изучены далеко не в равной мере. Один из наиболее исследованных представителей трипаносоматид — возбудитель болезни Чагаса *Trypanosoma cruzi* — использует в качестве позвоночных хозяев более 100 видов млекопитающих из 28 семейств, относящихся к 8 отрядам, и даже может развиваться в рептилиях. Другие наиболее изученные трипаносомы млекопитающих также имеют очень широкий круг позвоночных хозяев, часто включающий представителей разных отрядов. Исключения составляют *Trypanosoma lewisi*, зарегистрированная лишь в 3 родах одного семейства грызунов, *T. suis* — в 2 родах сем. Suidae, и *T. equiperdum* — развивающийся без переносчика паразит ослов и лошадей (Подлипаев, 1990).

Трипаносомы млекопитающих имеют узкий круг переносчиков, ограниченный, как правило, организмами, принадлежащими к одному виду, роду или семейству. Так, *Trypanosoma cruzi* в качестве беспозвоночного хозяина использует разные виды клопов подсемейства Triatominae (сем. Reduviidae) (Подлипаев, 1990; Brener, 1973). В эксперименте удается заразить представителей как других семейств полужесткокрылых, так и других отрядов насекомых, а также иксодовых клещей, однако возможность нормального завершения жизненного цикла в экспериментально зараженных членистоногих требует дополнительных исследований (Brener, 1973).

Исключения составляют немногие случаи, связанные с механическим переносом инвазии, когда развития трипаносом в беспозвоночном хозяине не происходит и переносчик выполняет функцию «живого шприца» (Molyneux, Ashford, 1983), а также

с участием одного вида вшей в жизненном цикле *Trypanosoma lewisi*, для которой обычно переносчиками являются блохи (Подлипаев, 1990).

Судить о специфичности трипаносом птиц, вероятно, преждевременно, так как их жизненные циклы исследованы пока явно недостаточно. Правда, для *Trypanosoma avium* в качестве позвоночных хозяев зарегистрированы представители разных отрядов птиц. Переносчиками трипаносом птиц служат комары, мошки и, для домашних кур, клещи (Крылов, 1996; Подлипаев, 1990).

Еще меньше данных о трипаносомах рыб, амфибий и особенно рептилий. Следует заметить, что для большинства видов хозяев из этих групп указывается один вид трипаносом, а для паразитов — один вид хозяина (Подлипаев, 1990). Однако такое распределение не следует считать достоверным, отражающим узкую специфичность паразитов. Большинство описаний трипаносоматид сделано при проведении фаунистических работ, зачастую попутно и, как правило, давно. Большинство хозяев, из которых описывались паразиты, никогда больше не исследовались, в качестве сравнительного материала можно использовать только изображения паразитов (да и то не всегда), лабораторные культуры получены лишь для немногих видов. Таким образом, для нашего анализа пригодны лишь немногочисленные, наиболее изученные виды.

Среди трипаносоматид рыб таких видов всего два: *Trypanosoma carassii* и *T. murmanense*. Оба паразита зарегистрированы во многих рыбах, относящихся к разным отрядам, а в качестве переносчиков имеют по одному виду пиявок (Подлипаев, 1990), причем для второго вида роль переносчика доказана экспериментально (Khan, 1976).

Для амфибий больше всего данных о широко распространенных паразитах лягушек *Trypanosoma ranarum*, *T. rotatorium* и *T. sanguinis*. Первый паразитирует в 6 видах рода *Rana*, второй отмечен в нескольких десятках видов из 11 родов бесхвостых амфибий, третий — в десяти видах родов *Bufo*, *Hyla* и *Rana*; в качестве переносчиков для второго вида указываются пиявки и комары (Подлипаев, 1990).

Трипаносомы найдены в представителях всех отрядов пресмыкающихся, кроме клювоголовых, в качестве переносчиков отмечены москиты, мухи цеце и пиявки (Подлипаев, 1990), однако имеющиеся данные пока недостаточны для обсуждения. Можно сказать лишь, что они не противоречат изложенному выше для птиц и амфибий.

Представители рода *Leishmania* имеют узкий круг беспозвоночных хозяев и используют в качестве переносчиков только москитов из родов *Phlebotomus*, *Sergentomyia* и *Lutzomyia* (Подлипаев, 1990; Сафьянова, 1982; Molynieux, Ashford, 1983), причем обычно паразит настолько строго приурочен к насекомому, что специфичность к нему используется как определительный признак (Крылов, 1996). Напротив, в качестве позвоночного хозяина один вид паразита обычно использует представителей нескольких отрядов млекопитающих (*Leishmania*) или нескольких подотрядов и семейств пресмыкающихся (*Sauroleishmania*) (Подлипаев, 1990; Сафьянова, 1982).

Основываясь на изложенном выше, мы можем охарактеризовать специфичность гетероксенных *Leishmania* и *Trypanosoma* к позвоночным хозяевам как широкую, а к беспозвоночным хозяевам (переносчикам) как узкую.

Данные о трипаносоматидах насекомых и растений были настолько отрывочны, что, например, в классическом обзоре, посвященном этим паразитам (McGhee, Cosgrove, 1980), вопросы специфичности вовсе не рассматривались.

Специфичность трипаносоматид насекомых и растений определялась разными авторами совершенно произвольно: от описания новых видов практически из каждого вновь исследованного хозяина (большинство описаний прошлого века и первой половины нынешнего, а также ряд современных описаний; Подлипаев, 1990) до представлений о специфичности на уровне семейств хозяев (Подлипаев, Фролов, 1987; Wallace, 1966). В конечном счете это выразилось в признании узкой специфичности большинства трипаносоматид насекомых, за исключением некоторых видов, которые могут заражать широкий круг хозяев (Wallace e. a., 1983).

Экспериментальные исследования специфичности трипаносоматид насекомых не дали окончательного ответа на поставленный вопрос. Значительное количество иссле-

дований по лабораторному заражению насекомых, сделанных 30—40 лет тому назад (Wallace, 1966), как и немногочисленные более поздние исследования (Mogaes e. a., 1994), продемонстрировали специфичность на уровне семейства хозяев. Однако сами эти работы не были методически безупречными, что связано как с их трудоемкостью, так и с уже упомянутым отсутствием достаточно четких морфологических признаков для сравнения экспериментальной инвазии с природным заражением. Таким образом, конечные результаты, как и сделанные на их основе выводы, недостаточно надежны. Эта серия исследований скорее выявила лишь способность трипаносоматид насекомых переживать то или иное время в широком круге хозяев, чем свидетельствовала об их специфичности.

В ряде работ (Hanson, McGhee, 1963; McGhee, 1970; McGhee, Hanson, 1963) было показано, что в экспериментальном хозяине морфология жгутиконосцев может изменяться и что зараженные в лаборатории насекомые не могут служить источником паразитов для новых особей хозяев. Таким образом, экспериментальная инфекция не эквивалентна естественной инвазии. Использование клонов паразитов для экспериментальных заражений показало, что в хозяине могут появляться морфотипы, не свойственные исходному клону (Hanson e. a., 1968). Таким образом, морфологические признаки клетки не позволяют судить о нормальном ходе жизненного цикла в экспериментально зараженном хозяине. Соответственно, на основе таких данных невозможно обсуждать и проблему специфичности.

Возможно длительное переживание трипаносоматид в хищных клопах при заражении последних от жертв (Carvalho, Deane, 1974). Было установлено, что трипаносоматиды насекомых могут переживать в неспецифических хозяевах от 7—10 дней (Фролов, 1987) до 1.5—2 месяцев (Hanson e. a., 1968; Hupperich e. a., 1992), а при инъекции паразитов в гемоцель хозяина и дольше (Shmittner, McGhee, 1970).

Экспериментальное заражение растительноядных насекомых трипаносоматидами растений было безуспешным (Mogaes e. a., 1994; Sbravate e. a., 1989), за исключением случая, когда насекомое являлось, очевидно, естественным переносчиком этих жгутиконосцев (Dollet e. a., 1997).

Вопрос о специфичности трипаносоматид растений собственно к растениям еще менее ясен, так как исследовано недостаточное количество хозяев, а попытки экспериментальных заражений единичны. Принято считать, что принадлежность хозяев к разным семействам растений имеет таксономическую ценность для трипаносоматид (Wallace e. a., 1992). В экспериментах по искусственному заражению растений *Allamanda nereifolia* и *Plumeria rubra* (сем. Аросупасеае) из порядка горечавковых (Gentianales) трипаносоматидами из *Asclepias curassavica* (сем. Asclepiadaceae) было показано изменение формы и размеров паразитов, а также появление в новом хозяине морфотипов, не встречающихся в исходном материале (McGhee, Hanson, 1971). Это можно рассматривать как свидетельство неспецифического характера инвазии.

Таким образом, классические подходы к решению проблемы специфичности трипаносоматид насекомых и растений оказались в значительной степени исчерпанными. Применение биохимических и иммунохимических методов исследования позволило получить ценные групповые критерии (Camargo e. a., 1978; Petry e. a., 1989; Sanchez-Moreno e. a., 1995; Teixeira e. a., 1995, и др.), однако их разрешающая способность оказалась недостаточной для идентификации конкретных организмов, что является необходимым для суждений о специфичности.

ПРОБЛЕМА ЛАБОРАТОРНЫХ КУЛЬТУР

Упомянутые выше однообразие морфологии клетки трипаносоматид и почти полное отсутствие дискриминирующих морфологических признаков (Подлипаев, Лобанов, 1996) привели к тому, что исследования трипаносоматид практически превратились в исследования их лабораторных культур. 20 лет тому назад в мировой лабораторной практике использовалось около 10—15 культур гомоксенных трипаносоматид

(Wallace e. a., 1983), в настоящее время их количество не превышает 25—35. Очевидно, что такой набор недостаточен для описания биоразнообразия паразитов столь многочисленных и разнообразных хозяев, как насекомые. Каждая новая изученная культура существенно изменяет наши представления о многообразии трипаносоматид и зачастую заставляет пересматривать их эволюционное древо (Merzlyak e. a., 2001). Трипаносоматиды насекомых и связанные с ними трипаносоматиды растений формируют наиболее разнообразную группу трипаносоматид, и их изучение является ключом к выяснению филогении и построению непротиворечивой системы этих паразитов (Maslov e. a., 2001; Podlipaev, 2000, 2001).

Набор лабораторных культур (изолятов), используемых в работе, становится чрезвычайно важным параметром, во многом определяющим достоверность полученных результатов. Однако некоторые, в том числе и наиболее популярные, классические изоляты, такие как *Crithidia oncopelti* и *Crithidia fasciculata*, порождают сомнения в их чистоте и соответствии первоначальному описанию (Крылов и др., 1985; Podlipaev, 2000). Кроме того, сама процедура выделения культур и последующее лабораторное культивирование оказывают селективное воздействие. Это приводит к тому, что лабораторная культура может не соответствовать естественной инвазии в хозяине и некорректно отражает реальную структуру популяции паразита (Podlipaev, Naumov, 2000). Все эти сомнения в первую очередь адресуются к старым изолятам с длительным временем лабораторного культивирования. Чем моложе лабораторная культура, тем она предпочтительней для исследования.

Коллекция лабораторных культур гомоксенных трипаносоматид Зоологического института собиралась по стандартной методике, минимально уменьшающей генетическое разнообразие изолята. Она включает в себя как культуры, выделенные из разных насекомых одного региона, так и изоляты, полученные от насекомых одного и того же вида, обитающих в разных регионах (Malysheva e. a., 2001). У большинства использованных культур исследованы морфология на светооптическом и ультраструктурном уровнях, особенности культивирования и жизненные циклы в природе и при экспериментальном заражении. Наличие разнообразной и хорошо охарактеризованной коллекции культур позволило нам попытаться использовать молекулярные маркеры для изучения специфичности моноксенных трипаносоматид.

ИССЛЕДОВАНИЕ СПЕЦИФИЧНОСТИ С ПОМОЩЬЮ МОЛЕКУЛЯРНЫХ МАРКЕРОВ

Проблему массового и достоверного разделения и идентификации изолятов и видов удается разрешить лишь молекулярными методами, надежно идентифицирующими конкретные организмы.

Методы с высокой разрешающей способностью (мультилокусный электрофорез изоферментов — MLEE и ПЦР-типирование — RAPD и UP-PCR) показали, что классическое подразделение трипаносоматид растений на паразитов млечного сока, флоэмы и плодов слишком приблизительно. Существует как минимум 3 группы трипаносоматид, обитающих в латексе, и 2 группы интрафлоэмных паразитов (Guertini e. a., 1992; Muller e. a., 1995, 1997), не коррелирующие с таксономической принадлежностью хозяев. Так, например, хорошо очерченная группа сильно патогенных интрафлоэмных паразитов пальм (пор. Arecales) включает и изолят из растений *Alpinia purpurata*, относящихся к другому порядку (Gingiberales). Внутри этой группы жгутиконосцы из кокосовой пальмы распадаются на две достоверные подгруппы, одна из которых включает помимо изолята из *Alpinia* и культуры из масличной пальмы. Группы жгутиконосцев из молочаев (сем. Euphorbiaceae) также никак не связаны с видами своих хозяев (Muller e. a., 1997). Таким образом, следует признать широкую специфичность *Phytomonas* к растениям.

О приуроченности паразитов растений к определенным регионам пока что-либо сказать трудно, хотя в нескольких случаях трипаносоматиды, полученные в одном

месте из разных видов хозяев (изоляты из *Euphorbia pinea* и *E. characias*, выделенные в Монпелье), формируют собственные кластеры (Muller e. a., 1997).

Судить о специфичности трипаносоматид растений к насекомым-переносчикам по молекулярным данным пока невозможно, так как вывод о том, что насекомые являются переносчиками, основан лишь на находках неидентифицированных трипаносоматид в клопах, питающихся на растениях. Выполнить триаду Коха удалось только для представителя наименее специфичной группы трипаносоматид растений — паразита плодов томатов *Phytomonas serpens* (Jankevicius e. a., 1989). После многих неудачных попыток было, наконец, успешно проведено экспериментальное заражение потенциального переносчика лабораторной культурой специализированного паразита флоэмы (Dollet e. a., 1997). Очевидно, список известных переносчиков не полон и в значительной степени случаен, что делает преждевременными выводы о специфичности *Phytomonas* к насекомым. Можно лишь сказать, что по крайней мере представители разных родов одного семейства и разных семейств могут подходить для этой роли (Подлипаев, 1990).

Имеется лишь несколько работ, в которых с применением RAPD и MLEE были исследованы единичные трипаносоматиды насекомых, в основном использовавшиеся для сравнения с трипаносоматидами растений. Однако ограниченный по местам выделения и хозяевам набор культур не позволил даже поднять вопрос о специфичности жгутиконосцев из насекомых (Muller e. a., 1995, 1997).

Таким образом, использование молекулярно-биологических методов принесло много новых данных, однако отсутствие достаточно разнообразного и, что особенно важно, адекватного для обсуждаемой проблемы набора исследованных культур не позволяет корректно обсуждать проблему специфичности трипаносоматид насекомых и растений.

Используя нашу коллекцию трипаносоматид, мы постарались осуществить более адекватный подбор культур для исследования, который бы позволил выразить специфичность в терминах приуроченности конкретных организмов (генотипов) к тем или иным хозяевам или их группам, что особенно важно, учитывая достаточно высокую вероятность неспецифической (случайной) инвазии (см. ниже).

В общей сложности 48 культур гомоксенных трипаносоматид насекомых и три изолята из растений были исследованы с помощью рестрикционного анализа кинетопластной ДНК, мультилокусного электрофореза ферментов (MLEE), полимеразной цепной реакции (ПЦР) со случайными (RAPD) и универсальными (UP-PCR) праймерами и с использованием перекрестной гибридизации ПЦР-продуктов (Подлипаев, Ракицкая, 1999; Подлипаев и др., 1998; Bulat e. a., 1999; Kolesnikov e. a., 1990; Podlipaev, Bulat, 1998; Подлипаев, Vanuls, Dollet, неопубликованные данные). Большинство культур было выделено в России (Malysheva e. a., 2001), 12 изолятов были получены из лабораторий Франции (prof. M. Dollet), Бразилии (prof. E. Camargo) и США (prof. D. Maslov).

Культуры трипаносоматид были изолированы из насекомых одного и того же вида, рода, семейства или отряда, так же как и из различных видов одного рода, различных родов одного семейства и различных семейств одного отряда, собранных как в одном месте, так и в разных районах. Такой подбор культур позволяет судить и о степени специфичности паразитов, и о географическом распределении инвазии.

Основное внимание уделялось паразитам полужесткокрылых насекомых — было исследовано 42 культуры из 9 видов хозяев, относящихся к 6 родам 4 семейств отряда Hemiptera. 7 изолятов были выделены из клопов семейства Nabidae, из них 5 — из *Nabidula flavomarginata*, 1 — из близкого вида *Nabidula limbata* и еще 1 — из представителя рода *Nabis* (*Nabis brevis*), очень близкого к роду *Nabidula* (Кержнер, 1981).

Паразиты двукрылых (Diptera) были представлены 5 изолятами, и 1 культура была выделена из *Panorpa communis* — единственный изолят из представителей отряда Mecoptera в коллекциях мира.

Насекомые-хозяева были собраны в 4 различных районах на Северо-Западе России — в Ленинградской (несколько точек), Псковской и Калининградской областях,

а также в Карелии и на побережье Белого моря. В одном пункте выделялись как культуры из насекомых, относящихся к разным семействам одного отряда полужесткокрылых, так и к представителям разных отрядов насекомых.

Поскольку основной технической задачей при изучении специфичности является объективная идентификация паразитов, населяющих одного и того же хозяина в разных пунктах и разных хозяев, добытых из одной местности, то для этих целей наиболее пригодны методы тотальной оценки геномов с высокой разрешающей способностью. Такое генотипирование должно в первую очередь выявлять не только и не столько глубокие различия, являющиеся предметом филогенетического анализа, а разрешать межвидовой и внутривидовой полиморфизм. Для этих целей наиболее пригодны модификации полимеразной цепной реакции (RAPD и UP-PCR), а также анализ изоферментов (MLEE). Эти методы справедливо признаны «золотым стандартом» популяционной генетики и исследований межвидового и внутривидового полиморфизма (Muller e. a., 1997).

Мы применили эти методы не только для описания разнообразия и идентификации организмов, но и для решения вопросов специфичности (Подлипаев и др., 1998; Подлипаев, Ракицкая, 1999; Bulat e. a., 1999; Podlipaev, Bulat, 1998), стараясь объективизировать достаточно субъективное понятие специфичности. Дополнительно использовался и основной для одноклеточных животных филогенетический маркер — ген рРНК малой субъединицы рибосомы. Построенная молекулярная филогения (Merzlyak e. a., 2001) включила многие из изолятов, исследованных нами другими методами. Таким образом, мы получили возможность сравнить результаты использования методов, характеризующихся различной разрешающей способностью — от применения крупномасштабного филогенетического маркера до высокочувствительных способов генотипирования, выявляющих различия низкого ранга. Сразу скажем, что с точки зрения исследования специфичности все использованные методы дают практически идентичные результаты. При этом следует особенно подчеркнуть высокую степень совпадения данных, полученных методами ПЦР-типирования и MLEE, с классической молекулярной филогенией, построенной на основе гена рРНК.

Рестрикционный анализ кинетопластной ДНК (и собственно митохондриального генома, и миниколецевого компонента) показал, что группы изолятов как с одинаковым размером миниколец кпДНК, так и сходные по картине рестрикции максиколец не коррелируют с таксономическим положением хозяев, что заставило нас усомниться в специфичности трипаносоматид насекомых на уровне семейств хозяев (Kolesnikov e. a., 1990). Однако особенности методов, а также материал, использованный нами в этих исследованиях, были недостаточны для более детальных выводов.

Результаты перекрестной гибридизации ДНК, MLEE и RAPD — UP-PCR четко демонстрируют очень широкую специфичность трипаносоматид насекомых (Подлипаев и др., 1998; Bulat e. a., 1999; Podlipaev, Bulat, 1998; Подлипаев, Ракицкая, 1999). Не выявляется никакого соответствия между естественными группами трипаносоматид (группами сходных генотипов) и таксонами хозяев. Роды, виды или изоляты трипаносоматид насекомых не приурочены к семействам, родам или видам хозяев и, возможно, даже к их отрядам. Жгутиконосцы, найденные в представителях разных семейств полужесткокрылых, могут быть RAPD-идентичны, как это было показано для *Leptomonas* sp. PicB из клопа *Picromerus bidens* (Pentatomidae: Asopinae) и *Leptomonas* sp. Nfm из клопа *Nabicula flavomarginata* (Nabidae) (Подлипаев, Vanuls, Dollet, неопубликованные данные). Паразиты из хозяев, принадлежащих к различным отрядам насекомых, могут быть ближе на дендрограммах сходства, построенных по ПЦР-полиморфизмам (как *Leptomonas* sp. P из *Panorpa communis*, Mecoptera и *Leptomonas nabicalae* из *Nabicula flavomarginata*, Hemiptera), чем трипаносоматиды из одного и того же вида хозяев (как *Leptomonas nabicalae* и *L. peterhoffi* из клопа *Nabicula flavomarginata*) (Подлипаев и др., 1998; Bulat e. a., 1999; Podlipaev, Bulat, 1998).

Распределение трипаносоматид насекомых среди их хозяев показывает, что культуры, изолированные из одного хозяина (*Nabicula flavomarginata*) в одном регионе, не формируют собственного кластера на дендрограммах сходства. Изоляты из того же

хозяина, выделенные в разных пунктах, могут располагаться на дендрограммах как близко, так и далеко друг от друга.

Не родственны между собой культуры, выделенные из разных видов рода *Gerris*. В разных частях дендрограмм располагаются также изоляты, полученные в одном и том же пункте из клопов сем. *Miridae*. В целом культуры из полужесткокрылых, составляющие основной массив исследованного материала, не образуют группы, обособленной от изолятов из двукрылых или культуры из *Mecoptera*. В разных группах расположены культуры, выделенные из представителей отряда *Diptera*. Молекулярная филогения по гену рРНК также подтверждает эти данные (Merzlyak e. a., 2001).

Распределение трипаносоматид среди насекомых очень неравномерно: из 2 отрядов — *Hemiptera* и *Diptera* — известно более 300 видов и находок трипаносоматид, в то время как в семи других отрядах насекомых отмечено всего около 20 случаев паразитирования этих простейших (Подлипаев, 1990). Такая диспропорция, очевидно, определяется происхождением и эволюционной историей трипаносоматид и широко обсуждается в литературе (Фролов, 1993; Vickerman, 1994).

В настоящее время нет достаточных данных для того, чтобы заключить, имеется ли выраженная коэволюция (коккладогенез) у трипаносоматид из *Diptera*. Очень широкая специфичность трипаносоматид из полужесткокрылых (*Hemiptera*) свидетельствует об отсутствии или слабой выраженности коэволюционных процессов — нет никакой приуроченности любой естественной группы трипаносоматид к какому-либо таксону клопов (Podlipaev, Bulat, 1998; Bulat e. a., 1999; Подлипаев, Ракицкая, 1999).

Сходные выводы следуют и из фаунистических данных. Например, в монофилетической (Andersen, 1981) и экологически достаточно однородной группе полужесткокрылых клопов (подотряд *Gerrhomoirpha*) водомерки (сем. *Gerridae*) заражены трипаносоматидами обильно и повсеместно (они претендуют на роль максимально зараженных трипаносоматидами насекомых). Для сем. *Veliidae* имеются только три старых упоминания, и нам никогда не удавалось найти трипаносоматид в этих насекомых. У представителей сем. *Hydrometridae* эти паразиты и вовсе неизвестны (Wallace, 1966; Подлипаев, 1985, 1990; Podlipaev, 1999).

Вероятно, приуроченность инвазии к месту обитания хозяина имеет большее значение: часто изоляты, выделенные в одном месте, или близки, или неотличимы друг от друга (Подлипаев и др., 1998; Bulat e. a., 1999). ПЦР-типирование подтвердило наличие достаточно гомогенной группы изолятов, выделенных на Белом море (Подлипаев, неопубликованные данные), что ранее уже было показано методом изоферментного анализа (Подлипаев, Ракицкая, 1999).

Таким образом, все полученные данные демонстрируют чрезвычайно широкую специфичность трипаносоматид насекомых. По сути дела, мы можем говорить лишь о весьма относительной приуроченности некоторых родов трипаносоматид к определенным семействам насекомых.

Напротив, многие трипаносомы и особенно лейшмании проявляют узкую специфичность к насекомым переносчикам (см. выше). Паразито-хозяйинные системы гетероксенных трипаносоматид позвоночных имеют ряд особенностей, которые мы не будем здесь обсуждать за недостатком места. Отметим лишь, что разный уровень специфичности гомоксенных и гетероксенных трипаносоматид к насекомым, вероятно, обусловлен наличием у вторых более сложного жизненного цикла. Для реализации таких циклов необходимо развитие в переносчике специализированных стадий (Vickerman, 1994), обеспечивающих инвазию позвоночного хозяина. Это относится и к трипаносомам, и особенно к лейшманиям («обеспечивающая» функция гаптомонад).

НЕСПЕЦИФИЧЕСКАЯ ИНВАЗИЯ

Проблема, тесно связанная с предыдущей темой, — неспецифическая и/или смешанная инвазия. Поскольку, как уже говорилось, исследование трипаносоматид во многом, если не в основном, является исследованием их лабораторных культур,

вероятность выделения в культуру смешанной инвазии или случайного паразита может привести к неверной трактовке результатов, полученных сложными инструментальными методами. Эта вероятность может быть достаточно велика — по нашим оценочным данным, около 17 % клопов-водомеров на Кавказе и в Центральной Азии имеют смешанную инвазию.

Достаточно удивительно, но только в этой работе мы впервые в мировой практике можем считать, что по меньшей мере два изолята — *Wallaceina brevicula* Nbr и *Leptomonas rigidus* Ib — представляют специфических паразитов. Культура *Wallaceina brevicula* Nbr была выделена из клопа ранней весной, когда непитающееся насекомое находилось под толстым слоем снега в состоянии зимней имагинальной диапаузы (Фролов, Малышева, 1989). То, что паразит был жизнеспособен в конце зимней диапаузы, может являться свидетельством специфической инвазии. Культура *Leptomonas rigidus* была выделена из клопа *Salda littoralis* на побережье Белого моря, где хозяин населяет достаточно необычный биотоп и встречается только под штормовыми выбросами в верхней литорали, будучи изолированным от всех остальных полужесткокрылых насекомых, обитающих в этих местах. Сам паразит обладает весьма оригинальными особенностями ультраструктуры и необычными характеристиками кинетопластной ДНК (Podlipaev e. a., 1991).

Вероятность неспецифической инвазии возрастает, когда хозяин является хищником, как это, скорее всего, имело место в случае выделения *Herpetomonas muscarum* и *Crithidia lucilia* из хищного клопа *Zelus leucogrammus* (Carvalho, Deane, 1974), который мог получить паразитов от своих жертв — мух. Для всех насекомых нельзя исключить и возможность заражения случайными паразитами через цистоподобные клетки из внешней среды.

В нашем материале имеются случаи, заставляющие предположить возможность выделения в культуру не основного паразита, как нам казалось при изучении морфологии, а сопутствующего, немногочисленного и не имеющего характерных особенностей, выявляющихся при морфологическом анализе.

Представители рода *Wallaceina*, по данным, полученным с использованием всех упоминавшихся выше методов, формируют очень тесную группу, образующую крону филогенетического древа трипаносоматид, куда наряду с собственно видами этого рода входит и изолят, определенный по морфологическим критериям как *Blastocrithidia* (Подлипаев и др., 1998; Bulat e. a., 1999; Merzlyak e. a., 2001; Podlipaev, Bulat, 1998). Но этот изолят (*Blastocrithidia gerricola*) был получен на расстоянии около 1000 км от места выделения типичных *Wallaceina* и из другого семейства клопов (Подлипаев, 1985; Подлипаев и др., 1990). Данные кросс-гибридизации ПЦР-продуктов показывают высокую степень гомологии ДНК всех видов, входящих в обсуждаемую группу (Bulat e. a., 1999).

B. gerricola была отнесена к роду *Blastocrithidia* на основании того, что подавляющее большинство (около 98 %) жгутиконосцев в кишечнике хозяина было представлено эпимастиготами — морфотипом, диагностирующим род *Blastocrithidia* (Подлипаев, 1985). Однако тогда же было высказано предположение, что в хозяине имела место смешанная инвазия. Основанием для этого послужили особенности морфологии клеток в культуре и наличие редких промастигот в хозяине. Именно этот минорный компонент, оказавшийся близким к *Wallaceina*, и образовал лабораторную культуру.

Были исследованы и две другие имеющиеся у нас культуры, изолированные из насекомых, трипаносоматиды в которых были представлены эпимастиготами и единичными, хотя и постоянно присутствующими промастиготными клетками. По классическим таксономическим критериям (Hoare, Wallace, 1966) эти паразиты должны были бы принадлежать к роду *Blastocrithidia*. Однако сейчас, основываясь на полученных дендрограммах, где все три культуры расположены в достоверно различных кластерах, представляется, что все три хозяина несли смешанную инвазию и иные, чем *Blastocrithidia*, паразиты были выделены в культуру. Это тем более вероятно, что известные *Blastocrithidia* весьма отличаются по условиям культивирования (Peng, Wallace, 1981) от наших изолятов.

Был сделан морфологический анализ культур и соответствующей природной инвазии для выделенных в нашей лаборатории изолятов, у которых исследовались молекулярные маркеры. Более чем в половине случаев в инвазированном насекомом присутствовали клетки нескольких морфотипов. Исходя из общей паразитологической закономерности — достаточно малой частоты двойных инвазий, а также на основании сказанного ранее о полиморфизме клеток трипаносоматид, мало вероятно подозревать наличие смешанной инвазии во всех этих случаях. Сравнение результатов морфологического исследования и положения культур на дендрограммах сходства не противоречит этой точке зрения. Таким образом, высказанная ранее (Wallace e. a., 1983) и поддержанная нами (Kolesnikov e. a., 1990) точка зрения на инвазию хозяина клетками разных морфотипов как на свидетельство смешанной инвазии представляется в настоящее время слишком категоричной.

Существует еще одна возможность, прямо противоположная рассмотренной выше. Речь идет о выделении в самостоятельные культуры разных стадий жизненного цикла, воспринимаемых впоследствии как разные таксоны. Так, характерным признаком рода *Wallaceina* является наличие резкого клеточного полиморфизма как в хозяине, так и в культуре. При этом клетки разных морфотипов могут образовывать разные по морфологии колонии и как самостоятельные изоляты независимо поддерживаться на искусственной питательной среде (Подлипаев и др., 1990). Исследование жизненного цикла *Wallaceina* в искусственно зараженных насекомых показало, что и в кишечнике хозяина жгутиконосцы представлены двумя морфологически различающимися линиями (субпопуляциями), соответствующими двум штаммам, выделяемым из лабораторной культуры (Малышева, Фролов, 1995). Можно предположить, что одна линия клеток (субпопуляция) создает в кишечнике хозяина условия, необходимые для успешного развития другой части популяции, формирования инвазионных стадий и завершения жизненного цикла паразита. Такие взаимоотношения известны у паразитических организмов, в том числе и у трипаносоматид (Vickerman, 1994). В результате в разные культуры выделяются различные стадии жизненного цикла трипаносоматид. При отсутствии экспериментальных исследований такие стадии могут быть легко приняты за отдельные виды паразитов, как это и произошло в случае описания *Crithidia allae* и *Crithidia brevicula* (Фролов, Малышева, 1989), оказавшихся, при более подробном изучении, разными стадиями жизненного цикла *Wallaceina brevicula* (Подлипаев и др., 1990).

Таким образом, только комплексное исследование лабораторной культуры может ответить на вопрос о том, какой именно паразит был изолирован. Если данные по морфологии жгутиконосцев из насекомого противоречат сведениям, полученным при изучении лабораторного изолята, то именно последние должны считаться приоритетными для определения таксономического положения организма.

Сложившаяся ситуация порождает, помимо прочего, интересные номенклатурные проблемы. Концепция «типа» является ядром зоологической номенклатуры. В качестве типового материала для мелких паразитических простейших используется препарат с множеством клеток. Если, как в случае с *Blastocrithidia gerricola*, практически все клетки имеют признаки определенного рода, организм должен быть к этому роду и отнесен. В процессе исследований может выясниться, что в культуру был изолирован какой-то другой организм. В случае с мелкими трипаносоматидами мы не можем быть уверены, что вообще возможно обнаружить на исходном препарате какие-то клетки, к которым хотя бы формально может быть привязана лабораторная культура. Даже если будут найдены клетки каких-то других морфотипов, мы не будем иметь основания считать, что лабораторный изолят получил начало именно от таких клеток. В результате нет ничего, что могло бы считаться типом. Выходом в данном случае может служить наличие типовой культуры, с которой и должны сравниваться все новые находки. Практика исследования трипаносоматид, собственно, и привела к такому результату. Объективной единицей изучения и носителем научного названия в обиходе исследователей является именно изолят — лабораторная культура. Естественно, пассирование изолята в лаборатории неизбежно приведет к селекции определен-

ных генотипов и обеднению уровня генетического разнообразия, однако широкое распространение криобанков позволяет считать, что грамотно хранящаяся культура будет в достаточной степени соответствовать природной инвазии.

Представленная работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проекты 95-04-11837, 99-04-49572) с использованием оборудования центра коллективного пользования «Таксон» (проект РФФИ 00-04-55007).

Список литературы

- Быховский Б. Е. Моногенетические сосальщики, их система и филогения. М.; Л.: Изд-во АН СССР, 1957. 509 с.
- Кержнер И. М. Полужесткокрылые семейства Nabidae // Фауна СССР. Насекомые хоботные. 1981. Т. 13, вып. 2. 326 с.
- Крылов М. В. Определитель паразитических простейших. ЗИН РАН, 1996. 602 с.
- Крылов М. В., Подлипаев С. А., Хаецкий А. С., Белова Л. М., Фролов А. О., Ниязбекова Б. Я. Один ли вид содержится в культуре *Crithidia oncopelti* (Kinetoplastozoa, Trypanosomatidae)? // Зоол. журн. 1985. Т. 64. С. 165—171.
- Малышева М. Н., Фролов А. О. Цикл развития жгутиконосца *Proteomonas brevicula* (Trypanosomatidae) в хищных клопах семейства Nabidae (Hemiptera) // Паразитология. 1995. Т. 29, вып. 4. С. 289—297.
- 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. Тр. ЗИН АН СССР. 1985. Т. 129. С. 35—47.
- Подлипаев С. А. Каталог мировой фауны простейших семейства Trypanosomatidae (Protozoa) // Тр. ЗИН РАН. 1990. Т. 217. 177 с.
- Подлипаев С. А., Лобанов А. Л. Использование размерных признаков для дифференциации низших трипаносоматид // Паразитология. 1996. Т. 30, вып. 4. С. 324—332.
- Подлипаев С. А., Ракицкая Т. А. Классификация изолятов трипаносоматид насекомых: использование анализа изоферментов // Паразитология. 1999. Т. 33, вып. 4. С. 350—357.
- Подлипаев С. А., Фролов А. О. Описание и лабораторное культивирование *Blastocrithidia miridarum* sp. n. (Mastigophora, Trypanosomatidae) // Паразитология. 1987. Т. 21, вып. 4. С. 545—552.
- Подлипаев С. А., Мокроусов И. В., Булат С. А. К молекулярной геносистематике трипаносоматид из насекомых с помощью полимеразной цепной реакции с универсальными праймерами (УП-ПЦР) // Паразитология. 1998. Т. 32, вып. 4. С. 317—326.
- 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.
- Сафьянова В. М. Проблема таксономии лейшманий // Лейшмании (Протозоология, вып. 7) Л.: Наука, 1982. С. 5—109.
- Фролов А. О. Жизненные циклы низших трипаносоматид — паразитов полужесткокрылых насекомых: Автореф. дис. ... канд. наук. Л., 1987. 19 с.
- Фролов А. О. Происхождение трипаносоматид // Паразитология. 1993. Т. 27, вып. 2. С. 97—107.
- Фролов А. О., Малышева М. Н. *Crithidia allae* sp. n. и *Crithidia brevicula* sp. n. (Protozoa, Trypanosomatidae) из клопа *Nabis brevis* // Зоол. журн. 1989. Т. 68, вып. 7. С. 5—10.
- Шульман С. С., Добровольский А. А. Паразитизм и смежные с ним явления // Паразитол. сб. 1977. Т. 27. С. 230—249.
- Andersen N. M. Adaptations, ecological diversifications and the origin of higher taxa of semiaquatic bugs (Gerromorpha) // Rostris. 1981. Suppl. P. 3—16.
- Brener Z. Biology of *Trypanosoma cruzi* // Ann. Rev. Microbiol. 1973. Vol. 27. P. 347—382.
- Bulat S. A., Mokrousov I. V., Podlipaev S. A. Classification of trypanosomatids from insects and plants by the UP-PCR (universally primed PCR) technique and cross dot blot hybridization of PCR products // Europ. J. Protistol. 1999. Vol. 35. P. 319—327.
- Camargo E. P., Coelho J. A., Moraes G., Figueiredo E. N. *Trypanosoma* spp., *Leishmania* spp. and *Leptomonas* spp.: enzymes of the ornithine-arginine metabolism // Exp. Parasitol. 1978. Vol. 46. P. 141—144.

- Camargo E. P., Mattei D. M., Barbieri C. L., Morel C. M. Electrophoretic analysis of endonuclease-generated fragments of kDNA, of esterase isoenzymes and surface proteins as aids for species identification of insect trypanosomatids // *J. Protozool.* 1982. Vol. 29. P. 251—258.
- Carvalho A. L. M., Deane M. P. Trypanosomatidae isolated from *Zelus leucogrammus* (Perty, 1834) (Hemiptera, Reduviidae), with a discussion on flagellates of insectivorous bugs // *J. Protozool.* 1974. Vol. 21. P. 5—8.
- Dollet M. Identification and characterization of pest organisms: a plant trypanosomes case study // *The Identification and Characterization of Pest Organisms*. Ed. Hawksworth D. L. Wallingford: CAB INTERNATIONAL, 1994. P. 415—426.
- Dollet M., Gargani D., Muller E., Veziar K. Development of a method for the acquisition of in vitro cultured plant trypanosomes (*Phytomonas* spp.) by *Lincus croupius* (Pentatomidae) // 4 Intern. Conf. Agricultural. Pests. Montpellier, 1997.
- Guerrini F., Segur C., Gargani D., Tibayrenc M., Dollet M. An isoenzyme analysis of the genus *Phytomonas*: genetic, taxonomic and epidemiological significance // *J. Protozool.* 1992. Vol. 39. P. 516—521.
- Hanson W. L., McGhee R. B. Experimental infection of the hemipteron *Oncopeltus fasciatus* with trypanosomatidae isolated from other hosts // *J. Protozool.* 1963. Vol. 10, N 2. P. 233—238.
- Hanson W. L., McGhee R. B., DeBoe J. H. Experimental infection of *Triatoma infestans* and *Rodnius prolixus* with trypanosomatidae of the genera *Crithidia* and *Blastocrithidia* // *J. Protozool.* 1968. Vol. 15, N 2. P. 346—349.
- Hoare C. A., Wallace F. G. Developmental stages of trypanosomatid flagellates: a new terminology // *Nature*. 1966. Vol. 212. P. 1385—1386.
- Hupperich K., Camargo E. P., Milder R. Ultrastructural study of the host-parasite relationship of trypanosomatids in the housefly // *Parasitol. Res.* 1992. Vol. 78. P. 48—55.
- Jankevicius J. V., Jankevicius S. I., Campaner M., Conchon I., Maeda L. A., Teixeira M. M. G., Freymuller E., Camargo E. P. Life cycle and culturing of *Phytomonas serpens* (Gibbs), a trypanosomatid parasite of tomatoes // *J. Protozool.* 1989. Vol. 36. P. 265—271.
- Khan R. A. The life cycle of *Trypanosoma murmanensis* // *Can. J. Zool.* 1976. Vol. 54, N 11. P. 1840—1849.
- 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. Protistenk.* 1990. Bd 138. S. 239—250.
- Malysheva M. N., Podlipaev S. A., Frolov A. A. List of living cultures of homoxenous trypanosomatids in the collection of the laboratory of protozoology, Zoological Institute, St. Petersburg (Kinetoplastida) // *Zoosystem. Ros.* 2001. Vol. 9. P. 245—246.
- Maslov D. A., Podlipaev S. A., Luke J. Phylogeny of the Kinetoplastida: taxonomic problems and insights into the evolution of parasitism // *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 2001. Vol. 96. P. 397—402.
- McGhee R. B. The relation of contiguity of host and parasite life cycles to survival of species of Trypanosomatidae // *J. Parasitol.* 1970. Vol. 56. P. 231—232.
- McGhee B., Cosgrove W. Biology and physiology of the lower Trypanosomatidae // *Microbiol. Rev.* 1980. Vol. 44. P. 140—173.
- McGhee R. B., Hanson W. L. Experimental infection of the hemipteran *Oncopeltus fasciatus* with Trypanosomatidae isolated from other hosts // *J. Protozool.* 1963. Vol. 10. P. 233—238.
- McGhee R. B., Hanson W. L. Changes in structure of *Phytomonas elmassiani* in experimental infection of Apocynaceae, a presumable foreign plant host // *J. Protozool.* 1971. Vol. 11. P. 555—562.
- Merzlyak E., Yurchenko V., Kolesnikov A., Alexandrov K., Podlipaev S., Maslov D. Diversity and phylogeny of insect trypanosomatids based on small subunit rRNA genes: polyphyly of *Leptomonas* and *Blastocrithidia* // *J. Euk. Microbiol.* 2001. Vol. 48. P. 163—171.
- Molyneux D. H., Ashford R. W. The biology of *Trypanosoma* and *Leishmania*, parasites of man and domestic animals. London: Taylor and Francis, 1983. 294 p.
- Moraes M. M., Freymuller E., Camargo E. P., Milder R. Development of trypanosomatids in the phytophagous insect *Dysdercus peruvianus* (Hemiptera: Pyrrhocoridae). A light and electron microscopic study // *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 1994. Vol. 89, N 4. P. 553—559.
- 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.
- Muller E., Gargani D., Schaeffer V., Stevens J., Fernandez-Becerra C., Sanchez-Moreno M., Dollet M. Variability in the phloem restricted plant trypanosomes (*Phytomo-*

- nas spp.) associated with wilts of cultivated crops // *Europ. Journ. Plant Pathol.* 1995. Vol. 100. P. 425—434.
- Peng P. L.-M., Wallace F. G. The cultivation of *Blastocrithidia triatomae* *Cerisola* e. a., 1971 // *J. Protozool.* 1981. Vol. 28. P. 116—118.
- Petry K., Gargani D., Baltz Th., Kastelein P., Dollet M. Use monoclonal antibodies for differentiation of different isolates of *Phytomonas* (Plant trypanosomatids) // *J. Phytopathol.* 1989. Vol. 126. P. 59—68.
- Podlipaev S. A. Two new subspecies of trypanosomatids (Kinetoplastida: Trypanosomatidae), parasites of bugs (Heteroptera) from Cuba and the United States, with a discussion on trypanosomatids of water striders (Heteroptera: Gerridae) // *Zoosystem. Ros.* 1999. Vol. 8, N 1. P. 1—5.
- Podlipaev S. A. Insect trypanosomatids: the need to know more // *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 2000. Vol. 95. P. 517—522.
- Podlipaev S. The more insect trypanosomatids under study — the more diverse Trypanosomatidae appears // *Intern. J. Parasitol.* 2001. Vol. 31. P. 648—652.
- Podlipaev S. A., Bulat S. A. Characterization of trypanosomatids from insects and plants: UP-PCR (universally primed PCR) and cross hybridization of PCR products // *Zoological Sessions.* 1998. Proc. Zoological Inst. RAS. Vol. 276. P. 155—160.
- Podlipaev S. A., Malysheva M. N., Kolesnikov A. A. *Leptomonas rigidus* sp. n. (Trypanosomatidae) — a parasite of *Salda littoralis* L. (Hemiptera: Heteroptera) // *Acta Protozool.* 1991. Vol. 30. P. 121—127.
- Podlipaev S. A., Naumov A. D. Colonies of trypanosomatids on agar plates: the tool for differentiation of the species and isolates // *Protistology (Russia).* 2000. Vol. 1. P. 113—119.
- Sanchez-Moreno M., Fernandez-Becerra C., Mascaro C., Rosales M. J., Dollet M., Osuna A. Isolation, in vitro culture, ultrastructural study, and characterization by lectin-agglutination tests of *Phytomonas* isolated from tomatoes (*Lycopersicon esculentum*) and cherimoyas (*Annona cherimoyia*) in southeastern Spain // *Parasitol. Res.* 1995. P. 575—581.
- Sbravate C., Campaner M., Camargo L., Conchon I., Teixeira M. M. G., Camargo E. P. Culture and generic identification of trypanosomatids of phytophagous Hemiptera in Brazil // *J. Protozool.* 1989. Vol. 36. P. 543—547.
- Shaub G. The effects of trypanosomatids on insects // *Adv. Parasitol.* 1992. Vol. 31. P. 255—304.
- Shaub G. Pathogenicity of trypanosomatids on insects // *Parasitol. Today.* 1994. Vol. 10, N 12. P. 463—468.
- Shmittner S. M., McGhee R. B. Host specificity of various species of *Crithidia* Leger // *J. Parasitol.* 1970. Vol. 56, N 4. P. 684—693.
- Teixeira M. M. G., Campaner M., Camargo E. P. Characterization of the target antigens of *Phytomonas*-specific monoclonal antibodies // *J. Euk. Microbiol.* 1995. Vol. 42, N 3. P. 232—237.
- Vickerman K. The evolutionary expansion of the trypanosomatid flagellates // *Intern. J. Parasitol.* 1994. Vol. 24, N 8. P. 1317—1331.
- Wallace F. G. The trypanosomatid parasites of Insects and Arachnids // *Exp. Parasitol.* 1966. Vol. 18. P. 124—193.
- Wallace F. G., Camargo E. P., McGhee R. B., Roitman I. Guidelines for the description of new species of lower trypanosomatids // *J. Protozool.* 1983. Vol. 30. P. 308—313.
- Wallace F. G., Roitman I., Camargo E. P. Trypanosomatids of plants // *Parasitic Protozoa.* Eds Kreier J. P., Baker J. R. 1992. Vol. 2. P. 55—84.

ЗИН РАН, Санкт-Петербург, 199034

Поступила 13.02.2002

HOST SPECIFICITY OF HOMOXENOUS TRYPANOSOMATIDS

S. A. Podlipaev

Key words: biodiversity, host specificity, insects, molecular methods, plants, trypanosomatids.

SUMMARY

Some problems in a correct using of the term «host specificity» for parasitic protozoans and specifically for the trypanosomatids are discussed. Results of investigation the host specificity of the trypanosomatids obtained by traditional methods are summarized. Host specificity data of some

insect-associated trypanosomatids based on the identification of parasites by means of molecular methods is discussed.

The subjectivity is an immanent distinctive feature of host specificity investigation in parasitic protozoans — trypanosomatids, especially in parasites of insects and plants. There is a vicious circle, when the conclusions about specificity are related with the necessity of taxonomic identification of the parasites during the process of biodiversity and ecological studies. The taxonomic position of parasite is often determined based on a data of observed hosts specificity. This is quite common in cases, when reliable morphological characters are absent, and it indeed takes place in the homoxenous trypanosomatids. The using of molecular markers only allows to reliably identify and compare the parasites, without involving the properly taxonomic data, and finally to make more objective conclusions about their host specificity. A crucial question in this kind of investigation is an obtaining of adequate and wide set of laboratory cultures (isolates) correctly reflecting the diversity of the hosts. It is always necessary to take in attention a possibility of occasional infections, which could misrepresent obtained results.

About 50 cultures isolated from different hosts (mostly Hemiptera: Heteroptera) and places (mostly North Russia) have been examined by means of RAPD, UP-PCR, MLEE and cross DNA hybridization. Some of them were placed in rRNA-based molecular phylogeny. As it was found out, none natural groups of homoxenous trypanosomatids (groups of similar genomes) demonstrated a clear preferential distribution on certain insect taxon of any taxonomic rank, — species, genera, family and even order. It is postulated that the host specificity of insect-associated trypanosomatids is extremely wide.
