

Zygmunt PIROG, Roman GIERYNG,
Włodzimierz JAŚKIEWICZ, Władysław PIETROŃ,
Halina GIERYNG

**Komputerowa ocena przydatności elektroforetycznych wzorców białkowych
dla taksonomii *Diplopoda****

Компьютерная оценка пригодности электрофоретических белковых стандартов для
таксономии *Diplopoda*

The Computer Evaluation of the Usefulness of the Protein Electrophoretical Patterns in
Diplopoda Taxonomy

Cechą użyteczną w taksonomii może być dowolna właściwość dotycząca struktury, funkcji lub zachowania (rozpatrywana w oderwaniu od organizmu), pod warunkiem, że można ją jednoznacznie zdefiniować. W miarę, jak badania biologiczne schodzą na coraz niższe poziomy, w rozważaniach taksonomicznych staje się możliwe wykorzystanie coraz większej liczby cech molekularnych. Problemami tymi zajmuje się chemotaksonomia i systematyka makromolekularna (19). Niektórzy biolodzy spodziewają się, że znajomość szczegółowej struktury białek różnych organizmów doprowadzi do taksonomii białkowej, uzupełniającej genetyczny opis gatunków.

Zanim jednak szerokie wykorzystanie automatycznych analizatorów sekwencji aminokwasowych, wspomaganych przez elektroniczne maszyny cyfrowe, stanie się powszechne, wykorzystuje się w chemotaksonomii pośrednie metody porównywania białek różnych gatunków. Jedną z takich metod, stosowaną już od 20 lat, jest elektroforetyczna charakterystyka rozpuszczalnych białek. Niektóre z wysoce powtarzalnych technik elektroforezy dyskowej w żelu poliakrylamidowym umożliwiają szybką „daktyloskopię” (*finger printing*) rozpuszczalnych białek, charakterystycznych dla gatunku. Na przykład w taksonomii małych zwierząt porównuje się elektroforegramy białkowe z totalnych ekstraktów pojedynczych osobników.

* Praca subsydiowana przez Instytut Zoologii PAN w ramach tematu nr MR.II.3.

Prace taksonomiczne, w których wykorzystywano metodę elektroforezy białek, można podzielić na 2 grupy. Pierwszą grupę reprezentują badania, w których udowodniano wysoką powtarzalność metody elektroforetycznej i wykazano, że elektroforetyczne wzorce rozpuszczalnych białek są charakterystyczne dla gatunków, a nawet szczepów w obrębie tego samego gatunku. Autorzy tych prac, nie wdając się w spekulacje filogenetyczne, potwierdzają jedynie wysoką przydatność metody elektroforetycznej w ustalaniu przynależności gatunkowej i szczepowej w tych przypadkach, w których cechy morfologiczne są słabo zaznaczone lub istnieje duży polimorfizm (3, 6, 7, 13–17, 25–28, 34, 36, 37, 39, 42, 43, 48–52). Autorzy drugiej grupy prac wychodzą z założenia (lub uważają za wysoce prawdopodobne), iż w przypadku blisko spokrewnionych jednostek systematycznych frakcje białkowe o tych samych współczynnikach ruchliwości elektroforetycznej (R_f) i tej samej morfologii reprezentują homologiczne białka (5, 9–12, 18, 22–24, 29, 32, 38, 46, 47).

Niektórzy z autorów posuwają się w interpretacjach tak bardzo, że współczynniki podobieństwa elektroforegramów, określane w procentach wspólnych frakcji białkowych, traktują jako wskaźniki pokrewieństwa filogenetycznego badanych gatunków. Uważamy, że do takiej interpretacji należy podejść z rezerwą i dlatego postanowiliśmy zweryfikować ją doświadczalnie na przykładzie krocionogów. W tym celu podjęto badania dotyczące optymalnych warunków elektroforetycznego rozdziału ekstraktów białkowych z pojedynczych osobników krocionogów, oceniono stopień powtarzalności rozdziałów dla poszczególnych gatunków, obliczono współczynniki podobieństwa taksonomicznego elektroforegramów za pomocą metody taksonometrycznej oraz skonfrontowano wyniki z istniejącym systemem *Diplopoda*. Realizacja przedostatniego celu wymagała hipotetycznego potraktowania frakcji białkowych posiadających ten sam współczynnik ruchliwości elektroforetycznej, lecz pochodzących z różnych gatunków, jako homologicznych cech taksonomicznych.

MATERIAŁ I METODY

Do badań użyto, spokrewnionych w różnym stopniu, następujących gatunków krocionogów: *Glomeris connexa* C. L. K., *Glomeris hexasticha* Brdt., *Trachysphaera acutula* (Latz.), *Orthomorpha gracilis* C. L. K., *Strongylosoma stigmatosum* (Eichw.), *Leptoiulus trilobatus trilobatus* (Verh.), *Unciger foetidus* (C. L. K.), *Chromatoiulus projectus kochi* (Verh.), *Polydesmus complanatus* (L.) i *Polydesmus tataranus tataranus* Latz. Pozycje systematyczne tych gatunków podaje ryc. 2. Gatunki *G. connexa*, *Ch. proj. kochi*, *P. complanatus* i *U. foetidus* reprezentowane były przez osobniki obojga płci, natomiast pozostałe tylko przez samice, ponieważ oznaczenie samców wymagałoby wyseparowania odnoży kopulacyjnych. Tak uszkodzone osobniki nie nadają się już do badań biochemicznych.

Krocionogi głodzono 24 godz. (opróżnienie jelita), usypiano eterem, a następnie chłodzono i miażdżono. Miazgę homogenizowano w chłodzonym homogenizatorze przy 6000 obr./min. przez 3 min. Do homogenizacji i ekstrakcji białek używano soli fizjologicznej (zawierającej śladowe ilości

diizopropylodifluorofosforanu jako inhibitora proteaz) lub buforu Tris-glicyna o pH 8,3, używanego do elektroforezy. Homogenat wirowano w temp. $4^{\circ}C$ przy 15 000 obr./min. przez 15 min. Supernatant oczyszczano od substancji niskocząsteczkowych na kolumnkach z Sephadexem G25, następnie rozcieńczano w stosunku 1 : 1 i oznaczano białko metodą Lowry i wsp. (35). Objętości zawierające po 50 μg białka (zagęszczanego w razie potrzeby za pomocą glikolu polietylenowego) наносono na kolumny z żelem poliakrylamidowym. Elektroforezę wykonywano, wg metody Daviesa (8), w aparacie własnej konstrukcji, posiadającym oddzielne naczynia katodowe. Aparat ten umożliwia rozdziały w mikroskali, w kolumnach o wymiarach $3,0 \times 45$ mm, w czasie ok. 50 min., przy natężeniu prądu 2,0 mA na 1 kolumnę. W roli znacznika frontu używano fluoresceiny. Żele utrwalano w 15% kwasie tróchlorooctowym i barwiono roztworem czerni amidowej 10B lub błękitu Coomassie. Wybarwione kolumny żelowe opracowywano densytometrycznie za pomocą aparatu Schnell-photometer GII. Na podstawie densytogramów obliczano dla każdej frakcji współczynniki ruchliwości elektroforetycznej (R_f). Dla każdego gatunku rozdziały powtarzano 10-krotnie, używając za każdym razem innego osobnika. Frakcje stałe (powtarzające się we wszystkich rozdzielach danego gatunku) z elektroforegramów wszystkich gatunków ponumerowano według wzrastających wartości R_f i zestawiono w formie macierzy informacyjnej (tab. 1). Frakcje o tych samych wartościach R_f i tej samej morfologii hipotetycznie potraktowano jako homologiczne cechy taksonomiczne badanych krocionogów. Zgodnie z procedurą taksonomii numerycznej wykonano obliczenia taksonomicznych wag (znaczeń) poszczególnych cech (na podstawie ich informacyjności w zbiorze badanych gatunków, rozproszenia i wzajemnych korelacji), opierając się na informacyjno-wagowej metodzie taksonomii numerycznej (40, 41), według następujących algorytmów:

$$W_{a_i a_i} = \frac{-\log P(a_i)}{-\sum_{i=1}^n P(a_i) \log P(a_i)}$$

$$W_{a_i a_j} = \frac{1}{2}(W_{a_i a_i} + W_{a_j a_j})$$

gdzie: $a_i a_i$ — zgodność pary OTU w i -tej modalności cechy a ; $a_i a_j$ — zgodność pary OTU w j -tej modalności cechy a ; $a_i a_j$ — niezgodność modalności cechy a u porównywanej pary OTU; $P(a_i)$ — prawdopodobieństwo i -tej modalności cechy a w zbiorze OTU; n — liczba różnych modalności cechy a ; W — waga komunikatu taksonomicznego.

Natomiast współczynniki związku taksonomicznego (T_{kl}) dla wszystkich par OTU z formuły:

$$T_{kl} = \frac{\sum_{i=1}^z W_{a_i a_i}}{\sum_{a=1}^s W_{aa}}$$

gdzie: z — liczba cech zgodnych; s — liczba wszystkich cech; aa — dowolny komunikat taksonomiczny związany z dowolną cechą a .

Współczynniki T_{kl} dla wszystkich par OTU zestawiono w formie macierzy. Następnie macierz poddano grupowaniu hierarchicznemu metodą Bery'ego (4) i uzyskano dendrogram będący graficznym obrazem związków taksonomicznych między badanymi gatunkami. Obliczenia komputerowe były wykonywane w Ośrodku Obliczeniowym Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie.

WYNIKI I ICH OMÓWIENIE

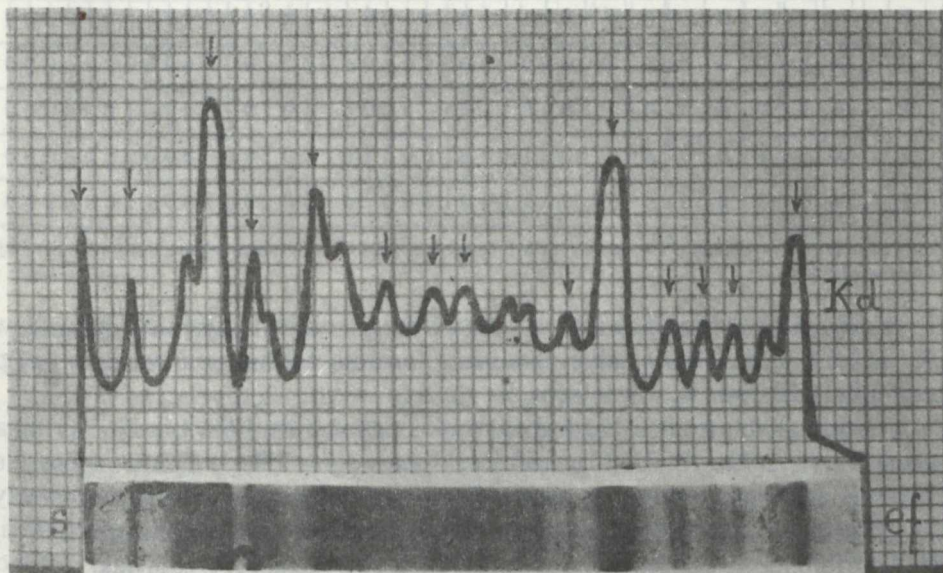
A. Wyniki doświadczeń metodycznych

We wstępnych doświadczeniach wykonywano rozdziały totalnych ekstraktów białkowych *Diplopoda*, oczyszczanych (jak podawała większość autorów) drogą dializy. Dawało to nie najlepsze rezultaty rozdziałów, zwłaszcza w elektroforegramach o dużej liczbie frakcji. W związku z tym zdecydowano się oczyszczać ekstrakty od substancji niskocząsteczkowych na kolumnkach (4×80 mm) z Sephadexem G25. Rezultaty okazały się zadowalające. Uważamy więc, że wstępne oczyszczanie roztworów tą metodą jest niezbędnym warunkiem otrzymania dobrych rozdziałów i z powodzeniem zastępuje ultrawierowanie. Doświadczenia pozwoliły również ustalić, że lepsze i bardziej powtarzalne wyniki daje homogenizacja stawonogów w płynie fizjologicznym z dodatkiem inhibitora proteaz niż, jak podaje większość autorów, w roztworze buforowym Tris-glicyna, używanym do elektroforezy w charakterze elektrolitu. Rezygnacja z użycia tego buforu posiada jeszcze i tę zaletę, że Tris zniekształca wyniki oznaczeń białka przy użyciu barwnika Folina, stosowanego w metodzie Lowry (26). Ustalono też, że jakościowo lepsze elektroforegramy otrzymuje się wówczas, gdy kolumny z żelem są w trakcie elektroforezy chłodzone bieżącą wodą. Okazało się, że elektroforegramy białek krocionogów są najbardziej czytelne, jeżeli droga rozdziału wynosi 40 mm. W tym celu skonstruowano specjalny aparat do elektroforezy, który posiada jedno naczynie anodowe i oddzielne naczynia katodowe. W każdym z nich umieszcza się jedną kolumnę z żelem. Umożliwia to przerwanie rozdziału dowolnej kolumny niezależnie od pozostałych, wówczas gdy znacznik frontu osiągnie dokładnie 40 mm w każdej kolumnie. Z naszych doświadczeń wynika, że do barwienia elektroforegramów dla celów porównawczych lepiej jest zamiast błękitu Coomassie używać czerni amidowej, gdyż daje ona w odróżnieniu od błękitu nieco odmienne zabarwienia różnych kompleksów białkowych. Pomaga to w identyfikacji frakcji nie tylko na podstawie wartości R_f , lecz również w oparciu o różne odcienie dysków i ich odmienną morfologię („ostre”, dyfuzyjne, szare, czarne, brunatne, szare z różowym odcieniem itp.). We wstępnych doświadczeniach ustalono też, że w celu uniknięcia błędnych interpretacji niezbędne są dodatkowe rozdziały elektroforetyczne mieszanek roztworów białek z tych gatunków, u których znajduje się wspólne frakcje o tej samej wartości R_f . Niezbędne jest przestrzeganie następującego kryterium identyczności współczynników R_f frakcji z różnych elektroforegramów: frakcje białkowe pochodzące z różnych źródeł mają ten sam współczynnik ruchliwości elektroforetycznej tylko wtedy, gdy w elektroforegramach z mieszanek tworzą jeden dysk o sumarycznej koncentracji białka, co łatwo jest ocenić na podstawie densytogramu.

B. Wyniki taksonometrycznej oceny podobieństw elektroforegramów

Współczynniki ruchliwości elektroforetycznej stałych frakcji białkowych badanych krocionogów przedstawia macierz informacyjna (tab. 1). Frakcje te można podzielić ze względu na ruchliwość elektroforetyczną, koncentrację i morfologię na 4 grupy:

1. Frakcje stałe (FS), czyli takie, które powtarzają się we wszystkich elektroforegramach danego gatunku, niezależnie od płci i wieku badanych osobników. Tylko takie frakcje uwzględniano przy porównywaniu elektroforegramów badanych gatunków. Zasadę wyboru frakcji stałych pokazuje ryc. 1 na przykładzie elektroforegramu *G. connexa*.



Ryc. 1. Przykład opracowania wyników elektroforezy; Kd — krzywa densytometryczna, ef — elektroforegram białek *Glomeris connexa* C. L. K., ↓ — frakcje stałe, s — start
Example of elaboration of electrophoresis results; Kd — densitometric curve, ef — electrophoretogram of *Glomeris connexa* C. L. K. proteins, ↓ — solid fractions, s — start

2. Frakcje zmienne (FZ) to takie, które pojawiają się tylko w elektroforegramach niektórych osobników, lub takie, których koncentracja jest niewielka i zmienna. FZ nie brano pod uwagę.

3. Frakcje gatunkowo specyficzne (FG), czyli zawsze powtarzające się w elektroforegramach tego i tylko tego gatunku.

4. Frakcje wspólne (FW), czyli występujące w elektroforegramach co najmniej 2 gatunków. Spośród nich nie uwzględniono 3 unimodalnych frakcji,

Tab. 1. Macierz
Information

Nr frakcji	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
R_f	0,03	0,04	0,05	0,06	0,07	0,12	0,13	0,14	0,15	0,16	0,18	0,20	0,24	0,26	0,28	0,30	0,33	0,34	0,35	0,37	0,39	0,42
OTU																						
A	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	2	0
B	1	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	1	0	0	0	0	2	0	0	0	0
C	0	0	1	0	1	1	0	0	0	1	0	1	1	0	0	2	0	0	0	0	0	0
D	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	2
E	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0
F	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
G	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0
H	0	1	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0
I	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0
J	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	1	1	0	0	1	0	1	0	0	0

Objaśnienia: A-J — symbole OTU jak na ryc. 2, 0 — brak frakcji białkowej, 1 — obecność frakcji białkowej, 2 — frakcje gatunkowe specyficzne.

tj. takich, które występowały w elektroforegramach wszystkich gatunków ($R_f = 0,12, 0,19$ i $0,67$), gdyż zgodnie z formułą taksonomii wagowej wagi cech unimodalnych są równe zero.

Wśród stałych frakcje każdego gatunku przeważały FW. Liczba FG była niewielka (1, 2 lub 4). U 2 gatunków krocionogów (H, J) FG w ogóle nie stwierdzono (tab. 1). Mimo to elektroforegramy każdego z gatunków okazały się swoiste w tym sensie, że przestrzenny rozkład poszczególnych frakcji, ich morfologia i koncentracja tworzyły niepowtarzalny wzór, tak bardzo charakterystyczny, że zwykły „rzut oka” pozwala na rozpoznanie gatunku, z którego ten rozdział pochodzi.

Zastosowanie informacyjno-wagowej metody taksonometrycznej pozwoliło na obliczenie współczynników związku taksonomicznego (T_{kl}) pomiędzy każdym z badanych gatunków (reprezentowanym w tym przypadku przez zbiór frakcji jego rozpuszczalnych białek) a każdym innym. Wyniki obliczeń przedstawia macierz współczynników T_{kl} (tab. 2).

Jeżeli pary OTU ułożymy w kolejności zmniejszania się wartości ich T_{kl} , to otrzymamy ciąg, który przedstawiono w tab. 3. Najwyższą wartość przyjmuje współczynnik $T_{EF} = 0,6550$. Charakteryzuje on związek taksonomiczny 2 blisko spokrewnionych gatunków rodzaju *Polydesmus*, tj. *P. complanatus* i *P. tatranus tatranus*. Drugi co do wielkości współczynnik (T_{IJ}) dotyczy

informacyjna
matrix

23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47
0,45	0,46	0,47	0,48	0,49	0,50	0,54	0,55	0,58	0,61	0,62	0,63	0,65	0,70	0,72	0,73	0,75	0,76	0,79	0,82	0,86	0,89	0,95	0,96	0,98
0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2	0	0	0	2	0	1	0	1	0	0	0	1
2	0	0	0	0	1	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	1
0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	2	0	0	1	0	0	0	0	0	0
0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0
0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0
0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	1
0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1
0	0	0	2	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	2	1	0	0	1	1

Explanation: A-J — species symbols as in Fig. 2, 0 — absence of protein fraction, 1 — presence of protein fraction, 2 — specific fractions of species.

gatunków rodzaju *Glomeris*, tj. *G. connexa* i *G. hexasticha* (porównać z ryc. 2). Tak więc współczynniki związku taksonomicznego najbardziej spokrewnionych (spośród badanych) gatunków okazały się najsilniejsze, a wniosek stąd płynący jest taki, że przynajmniej niektóre wspólne frakcje białkowe dla gatunków tego samego rodzaju reprezentują rzeczywiście homologiczne białka. Na tym w zasadzie kończy się zgodność naszych wyników z przyjętym systemem *Diplopoda*. Spójrzmy bowiem na trzeci co do wartości współczynnik związku taksonomicznego, tj. $T_{HJ} = 0,4911$. Gatunki H i J, czyli *T. acutula* i *G. connexa* należą do 2 rodzin z rzędu *Oniscomorpha* (porównać z ryc. 2), lecz ten najniższej rangi wspólny dla 2 gatunków takson reprezentuje aż rząd (!). Miałaby więc być związek na poziomie rzędu na drugim miejscu po związkach wewnątrzrodzajowych? Na czwartym miejscu w tab. 3 znajduje się związek T_{AD} , tj. pomiędzy *U. foetidus* i *Ch. projectus kochi*. Taksonem najniższej rangi, do którego te gatunki należą, jest podrodzina *Brachyiulinae*. A więc związek w obrębie tej podrodziny okazał się słabszy niż wewnątrz wymienionego poprzednio rzędu *Oniscomorpha* (!). Zwróćmy uwagę jeszcze na pewien zbieg okoliczności. Szóste miejsce w tab. 3 przypada na $T_{CD} = 0,4657$. Współczynnik ten reprezentuje najsilniejszy spośród związków wewnątrzrodzicznych (rodzina *Iulidae*). Najsłabszy zaś związek wewnątrzrodzinny, tj. $T_{AC} = 0,3433$ (18 miejsce w tabeli), przypada na parę OTU, dla których wspólnym taksonem najniższej rangi jest również ta sama rodzina *Iulidae*.

Tab. 2. Macierz współczynników T_{ki} poszczególnych par elektroforegramów białkowych badanych gatunków *Diplopoda*Matrix of T_{ki} coefficients of individual pairs of protein electrophoregrams of the studied *Diplopoda*

A	1,0000									
B	0,3168	11,0000								
C	0,3433	0,4120	1,0000							
D	0,4842	0,3261	0,4657	1,0000						
E	0,2241	0,2705	0,3225	0,2818	1,0000					
F	0,2115	0,2956	0,3477	0,3069	0,6550	1,0000				
G	0,3116	0,4470	0,4047	0,3210	0,2962	0,3214	1,0000			
H	0,3345	0,3379	0,3522	0,3438	0,3499	0,3751	0,3689	1,0000		
I	0,3027	0,3385	0,3219	0,3120	0,3573	0,3448	0,2955	0,4785	1,0000	
J	0,3153	0,3132	0,2967	0,3246	0,3322	0,3196	0,2704	0,4911	0,6101	1,0000
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J

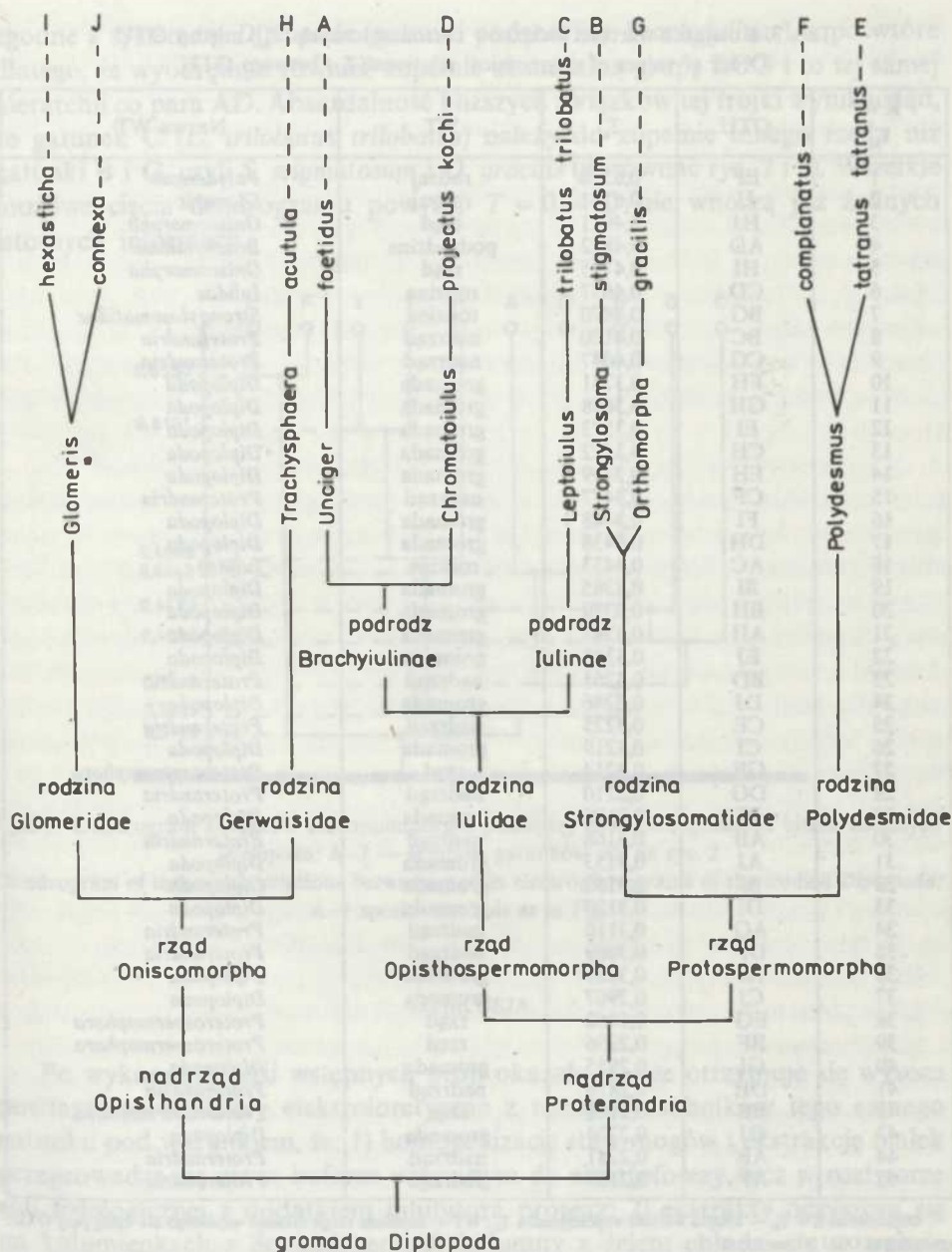
Oznaczenia literowe gatunków (OTU) jak na ryc. 2.

Letter symbols of species (OTU) as in Fig. 2.

Nie będziemy komentowali wszystkich sprzeczności wynikających z porównania tab. 3 z pozycją systematyczną badanych krocionogów. Zainteresowany czytelnik może je łatwo odnaleźć przez porównanie tab. 3 z ryc. 2.

Efekt grupowania hierarchicznego macierzy T_{ki} za pomocą metody Bery'ego przedstawia dendrogram przypominający drzewo rodowe (ryc. 3). Analiza dendrogramu daje wiele informacji i nie sposób jest wszystkich omówić. Ograniczymy się tylko do najistotniejszych. Pierwsze cięcie, na wysokości $0,3281 > \bar{T}^* > 0,3120$, przeciwstawia gatunki rodzaju *Polydesmus* (E i F) wszystkim pozostałym. Z punktu widzenia morfologii i anatomii *Diplopoda* nie byłoby to uzasadnione. Jeśli trzeba by było rodzajowi *Polydesmus* przeciwstawić któreś z badanych przez nas gatunków, to byłoby to słuszne jedynie w stosunku do H, I i J, czyli gatunków reprezentujących nadrząd *Opisthandria*, do których rodzaj *Polydesmus* nie należy (porównać z ryc. 2). Drugie cięcie dendrogramu, na wysokości $0,3617 > \bar{T} > 0,3281$, dzieli zbiór badanych gatunków na 3 podzbiory tej samej rangi: EF, IJH oraz ADBGC. Podzbiory te reprezentują w obecnym systemie *Diplopoda* gatunki z taksonów bardzo różnej rangi. EF należą do rodzaju *Polydesmus*, IJH — do rzędu *Oniscomorpha* (nadrząd *Opisthandria*). Te 2 grupy można by wzajemnie przeciwstawić, co wcześniej było już sygnalizowane. Nie można się natomiast zgodzić na utworzenie z grupy ABCDG taksonu tej samej rangi co rodzaj *Polydesmus* z jednej strony i rząd *Oniscomorpha* — z drugiej. Propozycję taką potraktowano by jako niedorzeczność. Jednakże fakt, iż *T. acutula* z rodziny *Gervaisiidae* nawiązuje w pewnym stopniu do 2 gatunków z rodzaju *Glomeris* z sąsiedniej rodziny *Glomeridae*, był dla nas swego rodzaju zaskoczeniem. Jest to bowiem jedyny przykład pewnej zgodności dendrogramu z systemem *Diplopoda* na tak wysokim poziomie hierarchii taksonomicznej.

* Przeciętą.



Ryc. 2. Położenie systematyczne badanych gatunków *Diplopoda* (na podstawie Stojalowskiej, 1961);
A-J — symbole gatunków (OTU)

Systematic position of the studied *Diplopoda* species (according to Stojalowska, 1961);
A-J species symbols (OTU)

Tab. 3. Kolejność wartości związków taksonomicznych (T_{kl}) między OTU
Order of values of taxonomical relations (T_{kl}) between OTU

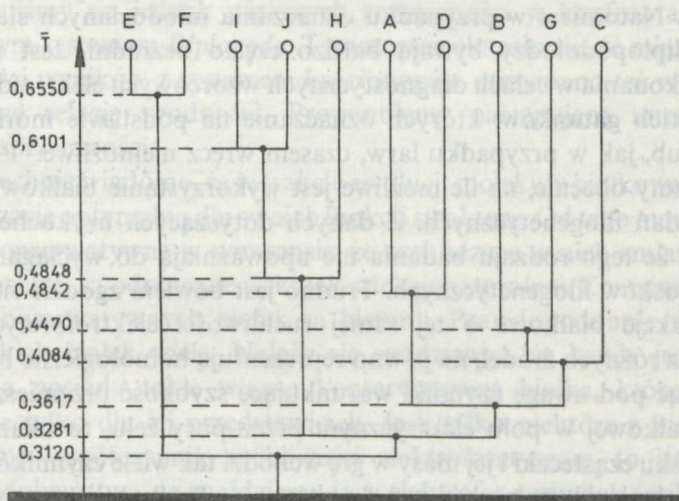
KW T_{kl}	OTU	T_{kl}	WT	Nazwa WT
1	EF	0,6550	rodzaj	<i>Polydesmus</i>
2	IJ	0,6101	rodzaj	<i>Glomeris</i>
3	HJ	0,4911	rzęd	<i>Oniscomorpha</i>
4	AD	0,4842	podrodzina	<i>Brachyiulinae</i>
5	HI	0,4785	rzęd	<i>Oniscomorpha</i>
6	CD	0,4657	rodzina	<i>Iulidae</i>
7	BG	0,4470	rodzina	<i>Strongylosomatidae</i>
8	BC	0,4120	nadrząd	<i>Proterandria</i>
9	CG	0,4047	nadrząd	<i>Proterandria</i>
10	FH	0,3751	gromada	<i>Diplopoda</i>
11	GH	0,3698	gromada	<i>Diplopoda</i>
12	EI	0,3573	gromada	<i>Diplopoda</i>
13	CH	0,3522	gromada	<i>Diplopoda</i>
14	EH	0,3499	gromada	<i>Diplopoda</i>
15	CF	0,3477	nadrząd	<i>Proterandria</i>
16	FI	0,3448	gromada	<i>Diplopoda</i>
17	DH	0,3438	gromada	<i>Diplopoda</i>
18	AC	0,3433	rodzina	<i>Iulidae</i>
19	BI	0,3385	gromada	<i>Diplopoda</i>
20	BH	0,3379	gromada	<i>Diplopoda</i>
21	AH	0,3345	gromada	<i>Diplopoda</i>
22	EJ	0,3322	gromada	<i>Diplopoda</i>
23	BD	0,3261	nadrząd	<i>Proterandria</i>
24	DJ	0,3246	gromada	<i>Diplopoda</i>
25	CE	0,3225	nadrząd	<i>Proterandria</i>
26	CI	0,3219	gromada	<i>Diplopoda</i>
27	GF	0,3214	rzęd	<i>Proterospermophora</i>
28	DG	0,3210	nadrząd	<i>Proterandria</i>
29	FI	0,3196	gromada	<i>Diplopoda</i>
30	AB	0,3168	nadrząd	<i>Proterandria</i>
31	AJ	0,3153	gromada	<i>Diplopoda</i>
32	BJ	0,3132	gromada	<i>Diplopoda</i>
33	DI	0,3120	gromada	<i>Diplopoda</i>
34	AG	0,3116	nadrząd	<i>Proterandria</i>
35	DF	0,3069	nadrząd	<i>Proterandria</i>
36	AI	0,3027	gromada	<i>Diplopoda</i>
37	CJ	0,2967	gromada	<i>Diplopoda</i>
38	EG	0,2962	rzęd	<i>Proterospermophora</i>
39	BF	0,2956	rzęd	<i>Proterospermophora</i>
40	GI	0,2955	gromada	<i>Diplopoda</i>
41	DE	0,2818	nadrząd	<i>Proterandria</i>
42	BE	0,2705	rzęd	<i>Proterospermophora</i>
43	GJ	0,2704	gromada	<i>Diplopoda</i>
44	AE	0,2241	nadrząd	<i>Proterandria</i>
45	AF	0,2115	nadrząd	<i>Proterandria</i>

Objaśnienia: KW T_{kl} — kolejna wartość współczynnika T_{kl} ; WT — najniższa ranga taksonu wspólnego dla danej pary OTU; symbole par OTU jak na ryc. 2.

Explanation: KW T_{kl} — successive value of T_{kl} coefficient; WT — the lowest rank of taxon shared by a given OTU pair; symbols of OTU pairs as in Fig. 2.

Następne cięcie dendrogramu, na wysokości $0,4084 > \bar{T} > 0,3617$, jest interesujące z dwu powodów. Po pierwsze dlatego, że wyraźnie wyodrębnia parę gatunków AD, tj. *U. foetidus* i *Ch. projectus kochi*, co jest na pewnym poziomie

zgodne z systemem *Diplopoda* (gatunki podrodziny *Brachyiulinae*), a po wtóre dlatego, że wyodrębnia również zupełnie absurdalną grupę BCG i to tej samej hierarchii co para AD. Absurdalność bliższych związków tej trójki wynika stąd, że gatunek C (*L. trilobatus trilobatus*) należy do zupełnie innego rzędu niż gatunki B i G, czyli *S. stigmatosum* i *O. gracilis* (porównać ryc. 2 i 3). Wszelkie możliwe cięcia dendrogramu powyżej $T = 0,4470$ nie wnoszą już żadnych istotnych informacji.



Ryc. 3. Dendrogram związków taksonomicznych pomiędzy elektroforegramami białek badanych *Diplopoda*; A–J — symbole gatunków jak na ryc. 2

Dendrogram of taxonomic relations between protein electrophoregrams of the studied *Diplopoda*; A–J species symbols as in Fig. 2

DYSKUSJA

Po wykonaniu serii wstępnych prób okazało się, że otrzymuje się wysoce powtarzalne rozdziały elektroforetyczne z różnych osobników tego samego gatunku pod warunkiem, że: 1) homogenizację stawonogów i ekstrakcję białek przeprowadza się nie w buforze używanym do elektroforezy, lecz w roztworze soli fizjologicznej z dodatkiem inhibitora proteaz; 2) ekstrakty oczyszcza się na kolumnkach z Sephadexem; 3) kolumny z żelem chłodzi się w trakcie elektroforezy do temperatury bieżącej wody, nie zaś bliskiej 0°C , jak to czyniło większość autorów. Wynika to prawdopodobnie stąd, że w temperaturach bliskich 0°C dochodzi do dysocjacji niektórych agregatów białkowych w wyniku zmian organizacji cząsteczek wody w tej temperaturze. Zmiana uporządkowania rozpuszczalnika odbija się bowiem na strukturze czwartorzędowej, ze względu

na rolę oddziaływań hydrofobowych w utrzymywaniu struktury trzecio- i czwartorzędowej białka (33). Z faktu wysokiej swoistości gatunkowej białkowych *finger print* wynika niezaprzeczalna przydatność elektroforezy w taksonomicznej diagnostyce na poziomie gatunkowym. Metoda ta powinna być wykorzystywana zwłaszcza w tych przypadkach, w których istnieją kłopoty z oznaczaniem osobników na podstawie cech morfologicznych. Na przykład w taksonomii *Diplopoda* nierzadkie są kłopoty z oznaczaniem samic. Często jedynym pewnym kryterium przynależności gatunkowej jest znalezienie kopulującej pary. Natomiast w przypadku oznaczania młodocianych stadiów rozwojowych diplopodolodzy bywają bardzo często bezradni. Jest więc pilna potrzeba wykonania w celach diagnostycznych wzorcowych elektroforegramów tych wszystkich gatunków, których oznaczanie na podstawie morfologii jest kłopotliwe lub, jak w przypadku larw, czasem wręcz niemożliwe.

Rozpatrzmy obecnie, na ile możliwe jest wykorzystanie białkowych *finger print* do badań filogenetycznych. Z danych dotyczących fizykochemii białek wynikałoby, że tego rodzaju badania nie upoważniają do wyciągania jakichkolwiek wniosków filogenetycznych. Trudno jest bowiem zgodzić się z założeniem, że frakcje białkowe o tej samej ruchliwości elektroforetycznej, lecz pochodzące z różnych źródeł, na pewno reprezentują homologiczne białka. Jeśli bowiem wziąć pod uwagę czynniki warunkujące szybkość przemieszczania się molekuly białkowej w polu elektrycznym przez pory żelu, to okazuje się, że oprócz ładunku cząsteczki i jej masy w grę wchodzi tak wiele czynników (kształt, elastyczność, lepkość, stabilność w polu elektrycznym itp.), iż nieuchronny jest wniosek, że zależność między sekwencją aminokwasową cząsteczki a współczynnikiem jej ruchliwości jest na tyle nieokreślona, że zupełnie różne białka mogą mieć nierozróżnialny w danych warunkach współczynnik R_f . Dowodem na to jest fakt, iż jednorodność elektroforetyczna jako kryterium czystości preparatu białkowego czasem zawodzi. Różnice ruchliwości elektroforetycznej białek zależą bowiem nie tylko od ich masy cząsteczkowej i polarnych reszt aminokwasów, lecz także od aminokwasów decydujących o charakterze domen tzw. struktury superdrugorzędowej. Chodzi tu o aminokwasy heliksotwórcze (*helix making*), przerywające *helix* (*helix breaking*), a także neutralne, wchodzące w skład zakrętów łańcucha (*chain reversals*) i struktur β (33). Od charakteru domen i relacji przestrzennych między nimi zależy bezpośrednio struktura trzeciorzędowa. Ta zaś wspólnie z rozpuszczalnikami określa ostatecznie strukturę czwartorzędową, która wraz z masą i ładunkiem współdecyduje o ruchliwości elektroforetycznej molekuly. Biorąc to pod uwagę dochodzi się do wniosku, że nie może też istnieć prosta zależność między wielkością zmiany sekwencji białka w trakcie ewolucji a wielkością zmiany jego ruchliwości elektroforetycznej. A więc nie tylko różne białka mogą mieć ten sam współczynnik R_f , ale z kolei białka homologiczne, niewiele różniące się sekwencją (czasem tylko jednym aminokwasem, jak na przykład hemoglobina A i hemoglobina S), mogą mieć

bardzo różną ruchliwość w polu elektrycznym. To ostatnie zjawisko jest zresztą codziennie wykorzystywane w każdym laboratorium, gdzie rozdziela się elektroforetycznie na przykład różne warianty hemoglobiny czy izoenzymów do celów diagnostycznych.

Aby praktycznie zweryfikować słuszność naszych przewidywań, zastosowaliśmy do oceny podobieństw elektroforetycznych wzorców białkowych komputerową obróbkę danych, opierając się na jednej z metod taksonomii numerycznej. Uzyskane w ten sposób wyniki potwierdziły te przypuszczenia. Spodziewaliśmy się jednak większych rozbieżności w konfrontacji wyników z istniejącym systemem *Diplopoda*. Tymczasem okazało się, że mimo generalnej rozbieżności wyników z systemem krocionogów otrzymano też w kilku punktach pewne relacje zgodności. Proponujemy następującą interpretację tej pozornej sprzeczności:

Powszechnie wiadomo, że w trakcie ewolucji molekuly białkowe uzyskują po pewnym czasie optymalną dla swoich funkcji strukturę. Od tego momentu białka stają się konserwatywne w tym sensie, że zachodzące w nich zmiany sekwencji aminokwasowej są odrzucane wskutek selekcji naturalnej. Znanym przykładem skrajnie konserwatywnych białek są histony. Prawdopodobnie w przyrodzie istnieje takich białek wiele. Należy się spodziewać, że każda jednostka systematyczna posiada takie własne konserwatywne białka, które są charakterystyczne tylko dla jej przedstawicieli. Jeśli tylko niektóre z nich mają nierozróżnialny współczynnik ruchliwości elektroforetycznej, to istnieje pewne prawdopodobieństwo, że znajdziemy je w elektroforegramach spokrewnionych gatunków w postaci frakcji o tym samym współczynniku R_f . Prawdopodobieństwo to jest oczywiście tym większe, im bardziej spokrewnione gatunki są badane. Dlatego też wynik porównania ich elektroforegramów może być w jakimś stopniu zgodny z ich rzeczywistymi stosunkami filogenetycznymi. Jednak w przypadku niezgodności nie ma w zasadzie podstaw do wyciągania jakichkolwiek wniosków filogenetycznych. O wiele częściej białkowe frakcje o tym samym współczynniku R_f , lecz pochodzące z różnych gatunków, będą reprezentowały zupełnie różne cząsteczki o nieporównywalnej funkcji. Więc jeśli na podstawie nierozróżnialności współczynników R_f potraktuje się je jako cechy homologiczne, to efekt może okazać się (jak wykazują nasze doświadczenia) zwykłym nieporozumieniem.

Reasumując należy stwierdzić, że nie ulega wątpliwości, iż elektroforetyczne wzorce białkowe mogą mieć istotną wartość w taksonomicznej diagnostyce na poziomie gatunku i mniejszych taksonów. Metoda elektroforetyczna może się też okazać przydatna do wykrywania gatunków bliźniaczych, co jest niezwykle ważne, np. w parazytologii. Jednak wykorzystywanie jej w roli kryterium pokrewieństwa filogenetycznego jest z całą pewnością nieuzasadnione.

Można się jednak spodziewać, że zastosowanie histochemicznych metod identyfikacji białek enzymatycznych w elektroforegramach może dostarczać

uzasadnionych wniosków filogenetycznych, ale najwyżej w ramach taksonów rangi gatunkowej i rodzajowej. Ostatnio już coraz częściej ukazują się badania oparte na takiej metodyce. Dobrym przykładem mogą tu służyć prace Abrahama i Doanego (1), Koroczki (31), Koroczki i wsp. (30), Iwaszczenki i Koroczki (20, 21) oraz Backera (2), w których o stosunkach filogenetycznych w rodzaju *Drosophila* wnioskuje się na podstawie podobieństwa profili izoenzymów z grupy esteraz i amylaz.

PIŚMIENICTWO

1. Abraham T., Doane W.: Genetic Regulation of Tissue Specific Expression of Amylase Structure Genes in *D. melanogaster*. Proc. Nat. Acad. Sci. USA **75**, 4446–4450 (1978).
2. Backer W.: Evolution of the α -esterase Duplication within the Montana Subphylad of the Virilis Species Group of *Drosophila*. Genetics **94**, 733–748 (1980).
3. Bierieźko W. K.: Analiz białkowych ekstraktów iz poławozrielych *Dictyocaulus filaria* i *Dictyocaulus viviparus* mietodom diskowego elektroforieza. Biul. Wsies. Inst. Giel'mintol. **3**, 14–18 (1969).
4. Berry B. J. L.: A Method for Deriving Multifactor Uniform Regions. Przegl. Geogr. **33**, 343–356 (1940).
5. Corbett J. J.: Biochemical Comparison of Some Classical *Tetrahymena pyriformis* and *T. vorax* Strains. J. Protozool. **17**, 181–182 (1970).
6. Corradetti A., Verolini F., Bucci A., Pennacchio A. E.: Disc Electrophoresis of Water-soluble Plasmodial Extracts of Two Strains of *Plasmodium berghei*. Parassitologia **13**, 385–389 (1971).
7. Greenwalt D., Borchers H.: An Electrophoretic Study of Caecal Proteins of *Clinostomum marginatum* (Trematoda). J. Minn. Acad. Sci. **43**, 18–20 (1977).
8. Davis B. J.: Disc Electrophoresis — II. Method and Application to Human Serum Proteins. Ann. N. Y. Acad. Sci. **121**, 404–427 (1964).
9. Dessauer H. C.: Taxonomic Significance of Electrophoretic Patterns of Animal Sera. The Serol. Museum **34**, 4–8, Feb. (1966).
10. Ebert F.: Characterization of *Leishmania donovani* Strains by Disc Electrophoresis. Z. Tropenmed. Parasit. **24**, 517–524 (1973).
11. Ebert F.: Electrophoretic Studies on *Leishmania tropica* Strains. Z. Tropenmed. Parazit. **25**, 49–53 (1974 a).
12. Ebert F.: Comparative Electrophoretic Studies on Leishmanial Parasites of Cutaneous Leishmaniasis of the New World and Their Relationships to *Leishmania donovani* and *L. tropica*. Z. Tropenmed. Parasit. **25**, 259–266 (1974 b).
13. Friz C. T., Jansson I., Magnusson M. B.: A Method for Analysis Protein in Individual Amoebae. J. Protozool. **17**, 417–420 (1970).
14. Gieraskin P. P., Lukianienko W. I.: Widospiecyficznost' frakcyonnogo sostawa gie-moglobina krowi osietrowych ryb. Žurn. Obszcz. Biol. **33**, 478–483 (1972).
15. Goodchild C. G.: Protein Contents of the Tapeworm *Hymenolepis diminuta* from Normal, Bileless, and Starved Rats. J. Parasitol. **47**, 830–832 (1961).
16. Goodchild C. G., Martin V. L.: Speciation in *Spirorchis* (Trematoda, Spirorchidae) Infecting the Pained Turtle, *Chrysemys pisa*. J. Parasitol. **55**, 1169–1173 (1969).

17. Hadaś E., Kasprzak W., Mazur T.: Electrophoretic Studies on Strains of Small Free-living *Amoebae*. Third International Congress of Parasitology, Munich, 25–31 August, vol. 1, 5–6 (1974).
18. Hadaś E.: Elektroforetyczna analiza białek w zastosowaniu do taksonomii pierwotniaków. *Wiad. Parazytol.* **23**, 355–361 (1977).
19. Heywood V. H.: Taksonomia roślin. PWN, Warszawa 1974.
20. Iwaszczenko N. I., Koroczkin L. I.: Utrata tkaniewowej specyficzności odnim izoformiamentów estierazy u *D. hydei*. *Ontogieniez* **16**, 175–178 (1985).
21. Iwaszczenko N. I., Koroczkin L. I.: Srawnitelnoje issledowanie spiekttra izoformiamentów estierazy w razlicznych organach niekotorych drozofilid. *Žurn. Obszcz. Biol.* **47**, 631–639 (1986).
22. Johnson B. L.: The Protein Electrophoresis to Species Relationships in Wheat. [w:] R. Bogart (ed.): Genetic Lectures. Oregon State University Press, Oregon 1970, vol. 1, 19–44.
23. Kasprzak W., Hadaś F., Mazur T.: Elektroforetyczna analiza białek w zastosowaniu do taksonomii pelzaków wolnożyjących. Materiały XI Zjazdu PTP., 10–12 maj, Poznań 1973.
24. Kates J. R., Goldstein L.: A Comparison of the Protein Composition of Three Species of *Amoebae*. *J. Protozool.* **11**, 30–35 (1964).
25. Klimienko W. W.: Mictod elektroforieza w poliakrylamidnom gielebiochimiczeskij tiest dla differencyrowki gielmintow. *Biul. Wsies. Inst. Gielmintol.* **1**, 61–64 (1967).
26. Klimienko W. W.: Soderżanije bialka w ekstraktach *Fasciola gigantica* i niekotoryje faktory, wlijauszczyje na jego opriedielenije. *Trudy Wsies. Inst. Gielmintol.* **15**, 153–158 (1969).
27. Klimienko W. W.: Frakcyjonowanie białkow iz *Fasciola hepatica* i *Fasciola gigantica* mietodami gielfiltracyi i elektroforieza w poliakrylamidnom giele. *Sbor. rabot po gielmintol.*, *Kolos* **7**, 157–163 (1971).
28. Klimienko W. W.: O biochimiczskom podchodie k problemie gostal'noj specyficznosti gielmintow. *Trudy Wsies. Inst. Gielmintol.* **19**, 91–101 (1972).
29. Klimienko W. W.: Ispolzowanie w sistematikie gielmintow mietoda elektroforieza w poliakrylamidnom giele. *Trudy Wsies. Inst. Gielmintol.* **23**, 83–89 (1977).
30. Koroczkin L. I., Kiknadze I. G., Pachomow A. A.: Srawnitelnyj analiz spiekttra izoformiamentów estieraz u razlicznych widow *Drosophila*. *Žurn. Obszcz. Biol.* **42**, 210–221 (1981).
31. Koroczkin L. I.: Organnaja specyficznost' spiekttra izoformiamentów estierazy w razwitiu *Drosophila* grupy *viridis*. *Ontogieniez* **13**, 90–94 (1982).
32. Krasnobajewa Z. N., Stiepanczенок - Rubnik T. I., Gorochowska I. M.: Issledowanie gomogientow organow i gielmoloimfy krowososuszczich kleszczej mietodom elektroforieza. *Mied. Parazit. i Parazit. Bolezni* **40**, 704–708 (1971).
33. Lassota Z. i wsp.: Biologia molekularna. PWN, Warszawa 1980.
34. Le Ray D., Afchain D., Jadin J., Fameree L.: Immunotaxonomic Interrelations between *Trypanosoma brucei*, *T. rhodesiense* and *T. gambiense*. *Ann. Parasit. Hum. Comp.* **46**, 531–532 (1971).
35. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Faar A. L., Randall R. J.: Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265–275 (1951).
36. Montalvo F., Reeves R. E.: Electrophoretic Characterization of Amoebal Phosphate Isomerases. *Exp. Parasitol.* **22**, 120–136 (1968).
37. Naumyczewa M. I., Suszczenko N. I.: Białkowyje frakcyi iz tkaniej połowozrietych askarid swini (myszcy, kutikuła, matki, połostnaja żydkost' i celnyje askaridy). *Trudy Wsies. Inst. Gielmintol.* **15**, 219–225 (1969).
38. Pawelec I.: Układ systematyczny gatunków środkowoeuropejskich rodzaju *Chortippus* Fieb. (*Orthoptera*, *Acrididae*) w świetle badań eksperymentalnych. *Ann. Univ. Mariae Curie-Skłodowska, sectio C* **29**, 91–105 (1974).

39. Pietron W.: Zastosowanie elektroforetycznego rozdzielu bialek w taksonomii i diagnostyce parazytologicznej. *Fol. Soc. Sci. Lubl. Biol.* **1**, 51–55 (1982).
40. Piróg Z.: Badania nad przydatnością taksonomii numerycznej dla celów biologicznej klasyfikacji. Rozprawa dokt. (maszynopis) Biblioteka AM, Lublin 1979.
41. Piróg Z.: Metody numeryczne w taksonomii. *Fol. Soc. Sci. Lubl. Biol.* **24**, 57–62 (1982).
42. Reeves R. E., Montalvo F., Sillero A.: Glucokinase from *Entamoeba histolytica* and Related Organism. *Biochemistry* **6**, 1752–1767 (1967).
43. Ruff M. D., Davis G. M., Werner J. K.: *Schistosoma japonicum*: Disc Electrophoretic Protein Patterns of the Japanese, Philippine, and Formosan Strains. *Exp. Parasitol.* **33**, 437–446 (1973).
44. Stojalowska W.: *Krocionogi (Diplopoda)* Polski. PWN, Warszawa 1961.
45. Stojalowska W., Staręga W.: Katalog fauny Polski, Część XIV, z. 2, *Krocionogi (Diplopoda)*. PWN, Warszawa 1974.
46. Whitney P. J., Vaughan J. G., Heale J. B.: A Disc Electrophoretic Study of the Protein of *Verticillium albo-astrum*, *V. dahliae* and *Fusarium oxysporium* with Reference to Their Taxonomy. *J. Exp. Bot.* **19**, 415–426 (1968).
47. Visvesvara G. S., Balamuth W.: Comparative Studies on Related Free-living and Pathogenic *Amoebae* with Special Reference to *Acanthamoeba*. *J. Protozool.* **22**, 245–256 (1975).
48. Yoshimura K.: *Paragonimus*: Electrophoretic Fractionation of Whole Body Proteins as an Aid in Specific Identification of a Species from Sado Island, Japan. *Exp. Parasitol.* **25**, 107–117 (1969 a).
49. Yoshimura K.: *Paragonimus westermani*, *P. ohirai*, and *P. miyazakii*: Electrophoretic Comparison of Whole Body Proteins. *Exp. Parasitol.* **25**, 118–130 (1969 b).
50. Yoshimura K., Hishinuma Y., Sato M.: A Preliminary Study on the Disc Electrophoretic Patterns of *Paragonimus kellicotti*. *Ward, 1908 Adult Worms. Res. Bull., Meg., Parasitol. M.* **3**, 12–17 (1970 a).
51. Yoshimura K., Hishinuma Y., Sato M.: Comparative Studies on *Paragonimus sadoensis* and *P. ohirai*. IV. Comparison of Adult Worms Obtained from Experimental Infections. *J. Parasitol.* **19**, 440–454 (1979 b).
52. Zwolinskenie W., Sriogo A.: Charakteristika bielkowego spektra ekstraktow iz skoleksow, gierminatiwnych oboloczek i zydkosti larwocisty *Echinococcus granulosus* mietodom diskowego elektroforieza w poliakrylamidnom giele. *Acta Parasitol. Lituan.* **14**, 47–51 (1976).

РЕЗЮМЕ

Разработано оптимальные условия выделения растворимых белков из отдельных особей *Diplopoda* при помощи электрофореза в полиакриламидном геле. Установлено, что белковые электрофореграммы характеризуются высокой повторимостью и видовой специфичностью.

Белковые фракции с таким же коэффициентом электрофоретической подвижности, относящиеся к электрофореграммам 10 видов *Diplopoda* были гипотетически зачислены к гомологическим таксономическим признакам, учитывая предпосылки некоторых авторов. На этом основании по информационно-весовому методу был вычислен коэффициент таксономической связи с отдельными видами. Большинство результатов, полученных по этому методу оказалось в противоречии с существующим таксономическим делением *Diplopoda*. В связи с этим авторы пришли к выводу, что белковые фракции с таким же коэффициентом электрофоретической подвижности, но относящиеся к различным источникам, чаще всего представляют собой разные белковые молекулы и неоправданным кажется отнести их к гомологическим таксономическим признакам. И поэтому авторы

считают, что электрофоретические белковые стандарты можно применять в таксономии лишь в качестве диагностических стандартов на уровне вида и низших таксономических единиц.

SUMMARY

The optimal conditions for the distribution of the soluble proteins from *Diplopoda* individuals by means of the polyacrylamide gel electrophoresis were worked out. It was determined that the protein electrophoregrams were characterized by their high repeatability and the species specificity.

The protein fractions of the same electrophoretical mobility coefficients coming from the electrophoregrams of 10 *Diplopoda* species were hypothetically treated as the taxonomic homologic features, just like it was suggested by some authors. On the basis of this similarity coefficients among the individual species were calculated using the informational-weight method of the numerical taxonomy. The majority of the obtained results appeared to be inconsistent with the existing *Diplopoda* taxonomic divisions. Thus, the authors suggest that the protein fractions of the same electrophoretical mobility coefficients but of the different origin are most often the different protein molecules and their treatment as the taxonomic homologic features is not justifiable. That is why the authors believe that the electrophoretical protein patterns can be used exclusively as the diagnostic ones in the taxonomy at the level of the species and the lower taxonomic units.

