



Поступила в редакцию 01.12.2015
Принята в печать 28.12.2016

УДК 619:576.895.131
DOI: 10.12737/14273

Для цитирования:

Кучбоек А.Э., Каримова Р.Р., Рузиев Б.Х., Салахутдинов И.Б., Эгамбердиев Ш.Ш. Морфологическая и молекулярная характеристика некоторых видов нематод семейства Protostrongylidae Leiper, 1926 // Российский паразитологический журнал. — М., 2016. — Т. 38. — Вып. 4. — С. 454–461

For citation:

Kuchboev A.E., Karimova R.R., Ruziev B.Kh., Salakhutdinov I.B., Egamberdiev Sh.Sh. Morphological and molecular identification of some species of nematode of the family Protostrongylidae Leiper, 1926 // Russian Journal of Parasitology, 2016, V. 38, Iss. 4, pp. 454–461

МОРФОЛОГИЧЕСКАЯ И МОЛЕКУЛЯРНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА НЕКОТОРЫХ ВИДОВ НЕМАТОД СЕМЕЙСТВА PROTOSTRONGYLIDAE LEIPER, 1926

Кучбоек А.Э.¹, Каримова Р.Р.¹, Рузиев Б.Х.², Салахутдинов И.Б.³, Эгамбердиев Ш.Ш.³

¹Институт генофонда растительного и животного мира АН РУз, 100053, г. Ташкент, ул. Богишамол, 232, e-mail: a_kuchboev@rambler.ru

²Каршинский государственный университет, Узбекистан, г. Карши

³Центр геномики и биоинформатики при АН РУз, МСВХ Уз и ассоциации «Uzpakhtasanoat», Ташкент

Реферат

Цель исследования — проведение морфологической и молекулярно-генетической идентификации и установление филогенетической взаимосвязи среди видов протостронгирид.

Материалы и методы. Гельминтологический материал собирали от диких и домашних полорогих и наземных моллюсков из разных областей Узбекистана. Для изучения морфологии протостронгирид использовали методы Боева и Anderson. Личинок первой стадии изучали путём исследования проб фекалий. При этом учитывали отличительные морфологические признаки личинок без дорсального кутикулярного шипа у вершины хвоста (для видов Protostrongylinae) и с шипом (для видов Muelleriinae, Vastrestrongylinae и др.), а также длину, форму хвоста и размеры тела личинки. Для изучения личинок третьей стадии протостронгирид отделяли ножки у зараженных моллюсков *X. candacharica* и помещали их в искусственный желудочный сок. Для изучения филогенетических взаимодействий протостронгирид использовали частичные нуклеотидные последовательности рибосомальной ДНК (ITS2) видов *Protostrongylus rufescens*, *P. shiozawai*, *Ortostrongylus macrotis*, *Cystocaulus ocreatus* и *Umingmakstrongylus pallikuukensis*. Филогенетический анализ проведен при помощи программного обеспечения ClustalX 2.0.

Результаты и обсуждение. В результате проведенных морфологических и молекулярных исследований у полорогих выявлено 5 видов протостронгирид: *Protostrongylus rufescens*, *P. hobmaieri*, *Protostrongylus sp.*, *Spiculocaulus leuckarti* и *Cystocaulus ocreatus*. Морфологический и молекулярно-генетический анализ позволил уточнить видовое и пространственное распределение эндемичных протостронгирид.

Ключевые слова: Protostrongylidae, полорогие, моллюски, rDNA, ITS-2.

Введение

Нематоды семейства Protostrongylidae Leiper, 1926 — своеобразная группа нематод, паразитов респираторной системы жвачных и зайцеобразных. В семействе протостронгирид к настоящему времени описано 60 видов, отдельные популяции которых зарегистрированы в Европе, Азии, Америке, Африке и Австралии [1–7]. В Узбекистане зарегистрировано 15 видов паразитов полорогих [2–4].



В биологическом отношении нематоды семейства Protostrongylidae занимают особое положение среди родственных групп. В процессе эволюции они перешли к обитанию в условиях суши на всех стадиях своего развития. Половозрелые нематоды паразитируют у наземных млекопитающих, а личинки развиваются в наземных моллюсках, выполняющих роль промежуточных хозяев. В организме этих моллюсков развиваются личинки второй и третьей стадий [2, 3].

Молекулярные исследования этой группы нематод ограничены. Убедительных фактов, касающихся частичных последовательностей из малой и большой субъединицы рибосомальной ДНК у Protostrongylidae, не обнаружено [8]. Посредством ограниченного анализа последовательностей рибосомальных ДНК 18S и 28S, выделенных из представителей таксонов Strongylida были выведены различия в монофилии протостронгирид внутри Metastrongylina [9]. Ранее проведены анализы на более низких таксономических уровнях, исследующие как ядерные, так и митохондриальные локусы или конформационный полиморфизм. Уделялось внимание разработке диагностики применения в географически экстенсивных регионах [9–11] или оценке генетического разнообразия видов и популяций [12, 13]. На основе сравнений и сходства последовательностей второго внутреннего транскрибирующего спейсера (ITS-2) стала возможной идентификация видов 7 родов протостронгирид, эндемичных для Северной Америки [11].

Дифференцированный анализ с использованием молекулярных маркеров (ядерных и митохондриальных) является крайне важным вкладом в изучении полевых коллекций как взрослых паразитов, так и личинок. Корреляция молекулярных последовательностей между взрослыми (подтвержденной сравнительной морфологией) и личиночными стадиями паразитов приведет к первоначальной точной идентификации видов рода Protostrongylus и других протостронгирид. К настоящему времени не удалось обнаружить достоверных диагностических морфологических признаков сходства в строении личинок первой стадии (L1 в фекалиях и окружающей среде) и личинок второй и третьей стадий (L2, L3 в промежуточном хозяине) [3, 11].

Целью наших исследований было проведение морфологической и молекулярно-генетической идентификации и установление филогенетической взаимосвязи среди видов протостронгирид.

Материалы и методы

Сбор материала. Гельминтологический материал собирали от диких (*Capra sibirica*, *C. falconeri*, *Ovis vignei* и *O. ammon*) и домашних (*C. hircus* и *O. aries*) полорогих и наземных моллюсков *Xeropicta (X) candacharica* в предгорно-горных зонах Наманганской, Ташкентской, Джизакской и Сурхандарьинской областей Узбекистана.

Морфологическое изучение. Для изучения морфологии протостронгирид использовали методы Боева [2] и Anderson [7]. Для определения таксономической принадлежности этих нематод готовили временные препараты, обработанные глицерином.

Личинок первой стадии (L1) изучали путём исследования проб фекалий диких и домашних полорогих. Учитывали отличительные морфологические признаки личинок без дорсального кутикулярного шипа у вершины хвоста (для видов Protostrongylinae) и с шипом (для видов Muelleriinae, Vastrestrongylinae и др.), а также длину, форму хвоста и размеры тела личинки.

Для изучения личинок третьей стадии (L3) протостронгирид отделяли ножки у зараженных моллюсков *X. candacharica* и помещали их в искусственный желудочный сок. В этой среде разрушался чехлик (панцирь) и освобождались инвазионные личинки.

После определения видовой принадлежности половозрелых и личиночных стадий нематод материал хранили в отдельных пробирках с дистиллированной водой при низких температурах (–20 °C) или в 70%-ном этаноле для молекулярного анализа.

В работе использованы микроскопы разных модификаций (ML 2000 с цифровой камерой и Olympus CX31).

Выделение ДНК, амплификация и секвенирование. Для изучения филогенетических взаимодействий протостронгирид использовали частичные нуклеотидные последовательности рибосомальной ДНК (ITS2).

Реакцию ПЦР проводили с использованием геномной ДНК в концентрации 10 нг, 2,5 мкл 10 × Taq буфера, 0,2 мкл дНТФ (нуклеиновые трифосфаты ДНК), 25 Ммоль каждая, 5 пикомоль/мкл праймера где прямой праймер ITS- 2 F (5'-ACGTCTGGTTCAGGGTTGTT-3') и обратный ITS-2 R (5'-TTAGTTTCTTTTCCCTCCGCT-3'), 0,2 мкл Taq полимеразы (5 ед./мкл), воды до 25 мкл при следующем температурном режиме: 94 °С в течение 30 с, 40 циклов (94 °С в течение 10 с, 55 °С — 30 с, 72 °С в течение 30 с) и финальная амплификация 72 °С в течение 10 мин. ПЦР продукты были очищены при помощи кита «DNA Clean & Concentrator™-5». Секвенирование осуществляли на автоматическом секвенаторе (ABI 3730xl) в Европейском геномном и диагностическом центре «GATC Biotech AG» (Konstanz, Германия).

Полученные последовательности образцов нематод были исправлены и выравнены при помощи программного обеспечения «Sequencher 4.9», в качестве контролей использовали референтные последовательности из базы данных NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Филогенетический анализ проводили при помощи программного обеспечения ClustalX 2.0 [14]. Филогенетические деревья построены при помощи метода присоединения соседей NJ (Neighbor-Joining method).

Для сравнения филогенетического анализа использованы нуклеотидные последовательности ITS-2 участка видов *Protostrongylus rufescens* (EU018485), *P. shiozawai* (AB478249), *Ortostrongylus macrotis* (EU018483), *Cystocaulus ocreatus* (EU018481) и *Umingmakstrongylus pallikuukensis* (AY648409), которые получены из Генбанка (NCBI GenBank).

Результаты и обсуждение

В результате проведенных исследований домашних и диких животных обнаружены половозрелые нематоды 4 видов протостронгирид: *Protostrongylus rufescens* (Leuckart, 1865), *P. hobmaieri* Cameron, 1934, *Spiculocaulus leuckarti* Schulz, Orlov et Kutass, 1933 и *Cystocaulus ocreatus* (Railliet and Henry, 1908).

Изучено морфологическое строение L1 *Protostrongylus* sp., выделенных из фекалий коз (рис. 1). Личинки протостронгирид L1 с фекалиями выделяются из организма дефинитивного хозяина. В общих чертах они очень схожи по морфологии [3, 10]. Тело личинок покрыто двухконтурной, слегка исчерченной кутикулой. Терминально расположенное ротовое отверстие ведет в ротовую капсулу. Пищевод цилиндрический, сзади слегка расширенный. Его длина равна почти половине всей длины личинки.

Длина тела личинок колеблется в пределах 306–380, ширина — 19–24 мкм (рис. 1).

Нервное кольцо окружает пищевод. Ближе к его середине, на вентральной стороне, открывается экскреторное отверстие.

Кишечник переходит в тонкий ректум и заканчивается анальным отверстием. Между кишечником и кутикулой, в задней части тела личинки, лежит половой зачаток. Он имеет овальную форму и состоит из двух клеток. Задний конец тела личинки заканчивается заостренным хвостом.

Указанные личинки характеризуются отсутствием дорзального кутикулярного шипа у вершины хвоста. Анализируя морфологические признаки, можно констатировать, что эти личинки принадлежат одному из родов подсемейству *Protostrongylinae* Kamensky, 1905. Для подтверждения этого предположения проведены молекулярно-генетические исследования.

На рисунке 2 показана L3 с темно-коричневым ребровидным чехликом, изолированная из моллюска *X. candacharica*. Морфология L3 протостронгирид в промежуточном хозяине коренным образом отличается от L1.

Длина тела 682–690, ширина — 55–60 мкм (рис. 2).

Дифференциация L3 осуществляется после формирования чехлика. После освобождения от чехлика личинка малоподвижна, а ее внутренняя структура аналогична другим видам инвазионных личинок протостронгирид.

ДНК 4 видов половозрелых протостронгирид и образцов личиночных стадий была амплифицирована с использованием ITS-2 региона. Размер амплификатов анализировали при помощи гель-электрофореза в 1,5%-ном агарозном геле. Было выявлено, что размер амплификатов у нематоды *Protostrongylus rufescens* и *P. hobmaieri* составляет 380 пар нуклеотидов (п.н.), *Spiculocaulus leuckarti* — 388, *Cystocaulus ocreatus* — 399. L3 имеет одинаковый молеку-

лярный размер, аналогичный видам нематод рода *Protostrongylus* и составляет 380 п.н. L1 домашних коз (без кутикулярного шипика у вершины хвоста) имеет около 400 п.н.

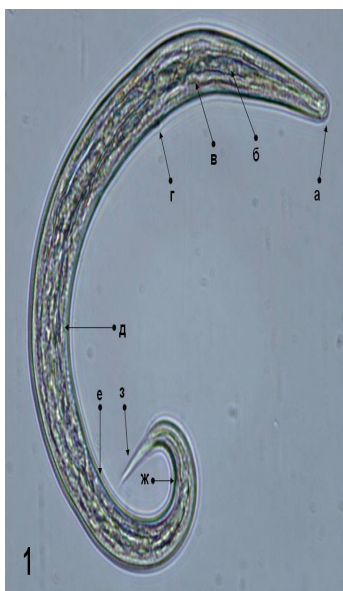


Рис. 1. Микрофотография L1 *Protostrongylus* sp. (ув. $\times 400$):

а — головной конец; б — пищеводно-кишечный переход; в — нервное кольцо; г — экскреторное отверстие; д — кишечник; е — половой зачаток; ж — анус; з — хвост

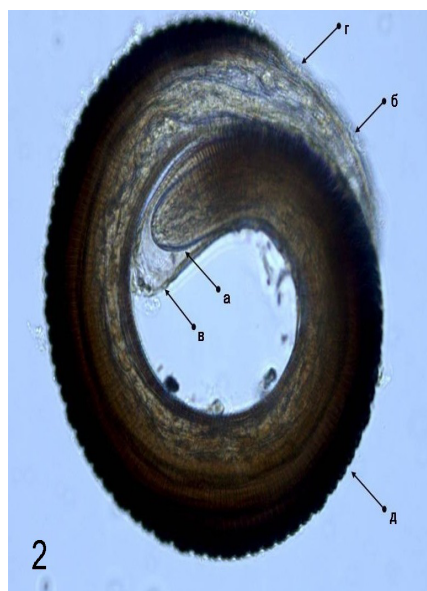


Рис. 2. Микрофотография L3 протостронгилид, извлеченной из ноги моллюска (ув. $\times 400$):

а — головной конец; б — хвостовой конец; в, г — хитинизированные бороздки на головной и хвостовой частях личинки; д — панцирь

Амплификаты были очищены и секвенированы на генетическом анализаторе. Полученные нуклеотидные последовательности были сравнены опубликованными последовательностями региона ITS-2 при помощи BLAST международного генетического банка NCBI (blast.ncbi.nlm.nih.gov). Определенная нами последовательность (кроме вида *P. rufescens*) не была ранее депонирована в электронную базу данных GenBank и является новой для нее. Сиквенсы, полученные в ходе исследования, депонированы в NCBI GenBank (таб. 1). Было выявлено, что последовательности L3 протостронгилид коррелировали с данными NCBI, также идентифицирован как *P. rufescens*. Этот факт подтверждает материал, приведенный в филограмме (рис. 3). В то время как для L1 *Protostrongylus* sp. соответствующий вид в Генбанке не найден и он пока аналогичен с родом *Protostrongylus*.

Филогенетический анализ проводили сравнением нуклеотидных последовательностей для каждого образца по ITS-2 региону. Филогенетические деревья были построены нами при помощи методов присоединения соседей NJ (neighbor-joining method). Данный подход был выбран нами по следующим причинам. Метод NJ является наиболее распространенным дистанционным методом построения деревьев. В методе NJ в кластер объединяются последовательности, дающие наименьшую сумму всех ветвей дерева, т. е. учитываются и длины остальных ветвей. При этом в отличие от UPGMA длины ветвей, выходящих из одного узла, могут быть и не равны между собой. Такой подход позволяет видеть более точные филогенетические отношения [14]. Поэтому для верификации данных мы использовали и метод NJ и бутстрап анализ (1000 репликаций).

Таблица 1

Номера полученных сиквенсов ITS-2 в базе данных NCBI GenBank

Вид нематод	Стадии	Образец	Регистрированные номера в GenBank
<i>Protostrongylus rufescens</i>	Имаго	AK1a	KF811499
<i>P. rufescens</i>	Имаго	AK4	KF811498
<i>P. rufescens</i>	Имаго	AK5	KF811497
<i>P. rufescens</i>	Имаго	AK7a	KF811495
<i>P. rufescens</i>	L3	AK16a	KF811494
<i>P. rufescens</i>	L3	AK17a	KF811493
<i>P. hobmaieri</i>	Имаго	AK8	KF811491
<i>P. hobmaieri</i>	Имаго	AK13	KF811492
<i>P. hobmaieri</i>	Имаго	AK23	KF811490
<i>P. hobmaieri</i>	Имаго	AK26	KF811489
<i>Spiculocaulus leuckarti</i>	Имаго	AK14a	KF811488
<i>Protostrongylus</i> sp.	L1	AK19b	KF811500
<i>Cystocaulus ocreatus</i>	Имаго	AK2a	KF811487
<i>Metastrongylus elongatus</i>	Имаго	AK29	KF811486

Филогенетический анализ с использованием метода NJ 19 образцов нематод различных видов позволил распределить их на 3 различных кластера (рис. 3). В качестве корневого образца был использован образец *Metastrongylus salmi* (Geddoelst, 1923). Первый кластер представлен образцом *M. salmi* (отличающийся на 18% от второго и третьего кластеров). Второй кластер представили образцы *P. shiozawai*, *Protostrongylus* sp., *S. leuckarti*, *O. macrotis*, *P. hobmaieri* и *P. rufescens*, оказавшиеся довольно близкими видами на генетическом уровне. Третий кластер включал в себя виды *C. ocreatus* и *U. pallikuukensis*, показывающее также близкое генетическое родство.

Второй кластер также может быть разделен на пять различных групп. Группа 1 — *P. shiozawai* и *Protostrongylus* sp., показывающие близкое генетическое родство, 2 — *S. leuckarti*, 3 — *O. macrotis*, 4 — представители *P. hobmaieri* и 5 — представители *P. rufescens*.

По результатам проведенных исследований у *Caprinae* выявлено 5 видов протостронгирид: *Protostrongylus rufescens*, *P. hobmaieri*, *Protostrongylus* sp., *Spiculocaulus leuckarti* и *Cystocaulus ocreatus*. Морфологический и молекулярно-генетический анализ, выявленных нематод, позволяет провести их точную идентификацию, в том числе эндемичных протостронгирид.

Результаты этих исследований позволяют расширить взгляды по затронутой проблеме и идентифицировать географические разновидности паразитов.

Литература

1. Азимов Д.А., Акрамова Ф.А., Хусанов А., Кучубов А.Э. Структура и функционирование нематод семейства Protostrongylidae Leiper, 1926 // Доклады АН РУз. — Ташкент, 1998. — № 10. — С. 39–41.
2. Боев С.Н. Основы нематодологии. Протостронгилиды. — М.: Наука, 1975. — Т. 25. — 266 с.
3. Контримавичус В.Л., Делямуре С.Л., Боев С.Н. Основы нематодологии. Метастронгилоидеи домашних и диких животных. — М.: Наука, 1976. — Т. 26. — 239 с.
4. Кулмаматов Э.Н., Исакова Д.Т., Азимов Д.А. Гельминты позвоночных горных экосистем Узбекистана. — Ташкент: Фан, 1994. — 151 с.
5. Кучубов А.Э. Популяционная экология, систематика нематод семейства Protostrongylidae Leiper, 1926 и функционально-метаболические процессы в системе «паразит–хозяин»: автореф. дис. ... д-ра биол. наук. — Ташкент, 2009. — 43 с.
6. Рузиев Б.Х. Ассоциативная инвазия протостронгилидами овец и морфо-функциональные взаимоотношения в системе «паразит–хозяин»: автореф. дис. ... канд. биол. наук. — Ташкент, 2008. — 21 с.

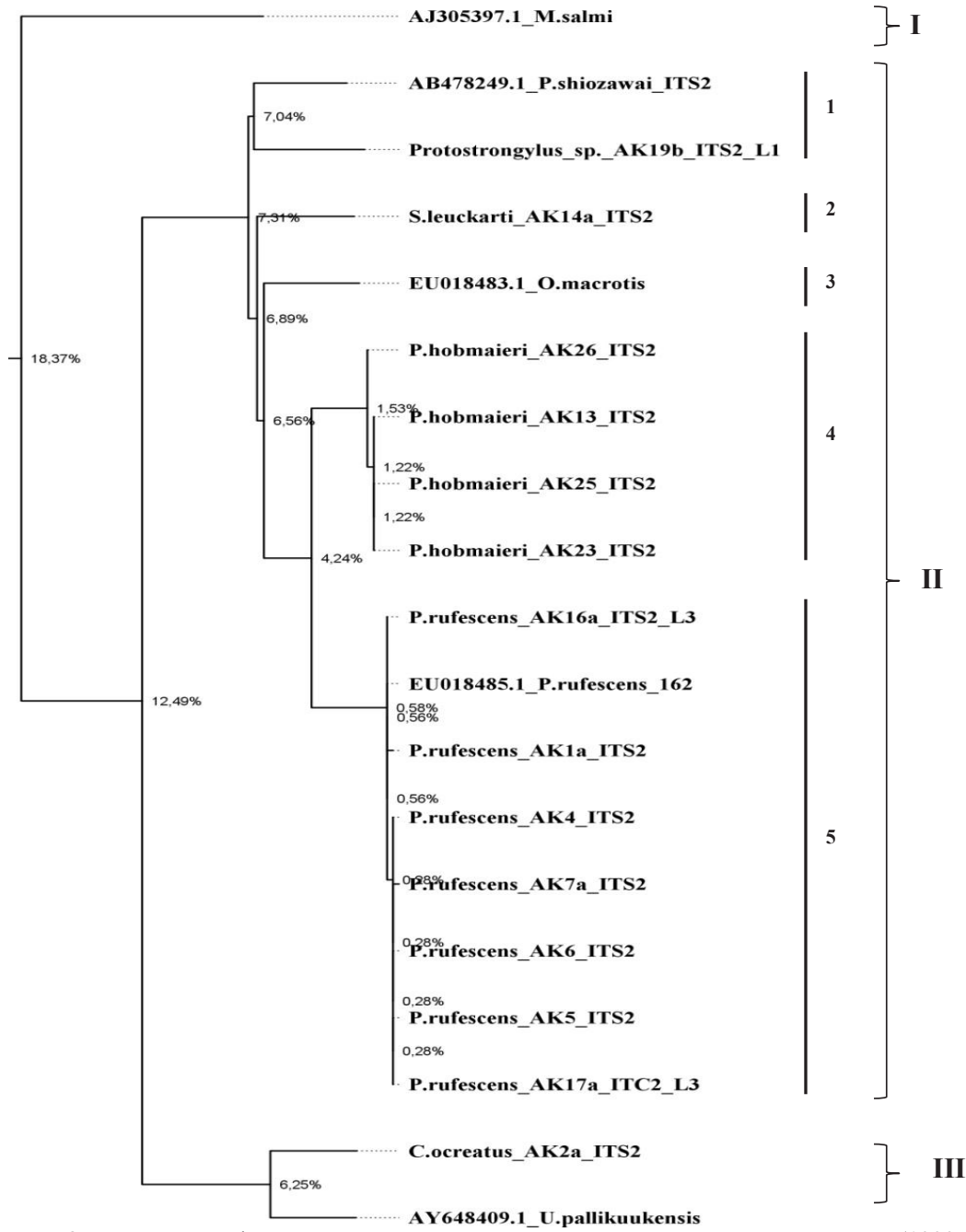


Рис. 3. Укоренённое филогенетическое дерево, построенное при помощи метода NJ (1000 повторений) для 19 образцов нематод различных видов (в качестве корневого вида использован образец нематод *Metastrongylus salmi*)



7. Anderson R.C. Key to genera of the superfamily Metastrongyloidea. — No. 5. In CIN Keys to the nematode parasites of vertebrates, R. C. Anderson, A. G. Chabaud and S. Willmott (eds.). Commonwealth Agricultural Bureaux, Farnham Royal, UK. 1978. — P. 1–40.
8. Carreno R.A., Nadler S.A. Phylogenetic analysis of the Metastrongyloidea (Nematoda: Strongylida) inferred from ribosomal RNA gene sequences. *Journal of Parasitology*, 2003, 89, pp. 965–973.
9. Chilton N.B., Huby–Chilton F., Gasser R.B., Beveridge I. The evolutionary origins of nematodes within the order Strongylida are related to predilection sites within hosts. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2006. Vol. 40, pp. 118–128.
10. Jenkins E.J., Appleyard G.D., Hoberg E.P. et al. Geographic distribution of the muscle-dwelling nematode *Parelaphostrongylus odocoilei* in North America, using molecular identification of first stage larvae. *Journal of Parasitology*, 2005, Vol. 91, pp. 574–584.
11. Kutz S.J., Asmundsson I., Hoberg E.P. et al. Serendipitous discovery of a novel protostrongylid (Nematoda: Metastrongyloidea) in caribou (*Rangifer tarandus*), muskoxen (*Ovibos moschatus*) and moose (*Alces alces*) from high latitudes of North America based on DNA sequence comparisons. *Canadian Journal of Zoology*, 2007, Vol. 85, pp. 1143–1156.
12. Mortenson J.A., Abrams A., Rosenthal B. et al. *Parelaphostrongylus odocoilei* in Columbian black-tailed deer from Oregon. *Journal of Wildlife Diseases*, 2006, Vol. 42, pp. 527–535.
13. Asmundsson I., Mortenson J., Hoberg E.P. Muscieworms, *Parelaphostrongylus andersoni* (Nematoda: Protostrongylidae), discovered in Columbia white-tailed deer from Oregon and Washington: Implications for biogeography and host associations. *Journal of Wildlife Disease*, 2008, Vol. 44, pp. 16–27.
14. Larkin M.A., Blackshields G., Brown N.P. et al. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*, 2007, Vol. 23, pp. 2947–2948.

References

1. Azimov D.A., Akramova F.A., Husanov A., Kuchboev A.E. Structure and functioning of nematodes of the family Protostrongylidae Leiper, 1926. *Doklady AN Ruz.* [Proc. Acad. of Sci. of the Rep. Uzb.]. Tashkent, 1998, no. 10, pp. 39–41.
2. Boev S.N. *Osnovy nematologii. Protostrongilidy* [Essentials of nematology. Protostrongylids]. M., Nauka, 1975, vol. 25. 266 p.
3. Kontrimavichus V.L., Delyamure S.L., Boev S.N. *Osnovy nematologii. Metastrongiloidei domashnih i dikh zhivotnyh* [Essentials of nematology. Metastrongylidae in domestic and wild animals]. M., Nauka, 1976, vol. 26. 239 p.
4. Kulmamatov E.N., Isakova D.T., Azimov D.A. *Gel'minty pozvonochnyh gornyh ekosistem Uzbekistana*. [Helminths in vertebrates of mountain ecosystems of Uzbekistan]. Tashkent, Fan, 1994. 151 p.
5. Kuchboev A.E. *Populyacionnaya ehkologiya, sistematika nematod semeystva Protostrongylidae Leiper, 1926 i funktsional'no-metabolicheskie processy v sisteme «parazit–hozyain»*. Avtoref. dis. ... d-ra biol. nauk [Population ecology, systematics of nematodes of the family Protostrongylidae Leiper 1926 and functional metabolic processes in host-parasite relationship. Abst. doct. diss... biol. sci.]. Tashkent, 2009. 43 p.
6. Ruziev B.H. *Assosiativnaya invaziya protostrongilidami ovets i morfo-funktsional'nye vzaimootnosheniya v sisteme «parazit–hozyain»*. Avtoref. dis. ... kand. biol. nauk. [Associative protostrongylid infection in sheep, and morphological and functional relationship of “host — parasite” system. Abst. Phd. diss... biol. sci.]. Tashkent, 2008. 21 p.
7. Anderson R.C., Chabaud A.G., Willmott S. Key to genera of the superfamily Metastrongyloidea. — No. 5. CIN Keys to the nematode parasites of vertebrates, Commonwealth Agricultural Bureaux, Farnham Royal, UK. 1978, pp. 1–40.
8. Asmundsson I., Mortenson J., Hoberg E.P. Muscieworms, *Parelaphostrongylus andersoni* (Nematoda: Protostrongylidae), discovered in Columbia white-tailed deer from Oregon and Washington: Implications for biogeography and host associations. *Journal of Wildlife Disease*, 2008, vol. 44, pp. 16–27.
9. Carreno R.A., Nadler S.A. Phylogenetic analysis of the Metastrongyloidea (Nematoda: Strongylida) inferred from ribosomal RNA gene sequences. *Journal of Parasitology*, 2003, 89, pp. 965–973.
10. Chilton N.B., Huby–Chilton F., Gasser R.B., Beveridge I. The evolutionary origins of nematodes within the order Strongylida are related to predilection sites within hosts. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2006. vol. 40, pp. 118–128.
11. Jenkins E.J., Appleyard G.D., Hoberg E.P. et al. Geographic distribution of the muscle-dwelling nematode *Parelaphostrongylus odocoilei* in North America, using molecular identification of first stage larvae. *Journal of Parasitology*, 2005, vol. 91, pp. 574–584.
12. Kutz S.J., Asmundsson I., Hoberg E.P. et al. Serendipitous discovery of a novel protostrongylid (Nematoda: Metastrongyloidea) in caribou (*Rangifer tarandus*), muskoxen (*Ovibos moschatus*) and moose (*Alces alces*) from high latitudes of North America based on DNA sequence comparisons. *Canadian Journal of Zoology*, 2007, vol. 85, pp. 1143–1156.



13. Larkin M.A., Blackshields G., Brown N.P. et al. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*, 2007, vol. 23, pp. 2947–2948.
14. Mortenson J.A., Abrams A., Rosenthal B. et al. *Parelaphostrongylus odocoilei* in Columbian black-tailed deer from Oregon. *Journal of Wildlife Diseases*, 2006, vol. 42, pp. 527–535.

Russian Journal of Parasitology, 2016, V. 38, Iss. 4

DOI: 10.12737/14273

Received 01.12.2016

Accepted 28.11.2016

MORPHOLOGICAL AND MOLECULAR IDENTIFICATION OF SOME SPECIES OF NEMATODE OF THE FAMILY PROTOSTRONGYLIDAE LEIPER, 1926

Kuchboev A.E.¹, Karimova R.R.¹, Ruziev B.Kh.², Salakhutdinov I.B.³, Egamberdiev Sh.Sh.³

¹Institute of the Gene Pool of Plants and Animals Uzbek Academy of Sciences, 100053, Tashkent, 232 Bogishamol St., e-mail: a_kuchboev@rambler.ru

²Karshi State University, Karshi

³The Center of Genomics and Bioinformatics under Uzbek Academy of Sciences, Ministry of Agriculture of Uzbekistan, «Uzpakhtasanoat» Association, Tashkent

Abstract

Objective of research. The purpose of this research is to carry out morphological and molecular genetic identification and to determine phylogenetic relationship among *Protostrongylidae* species.

Materials and methods. Helminthological material was collected from domestic hollow-horned ruminants and land mollusks in different areas of Uzbekistan. The morphology of protostrongylids was studied using the methods of Boev (1975) and Anderson (1978). The first-stage larvae were investigated by examination of fecal samples from animals taking into account remarkable morphological features of larvae without dorsal cuticular thorn at the tail point (for *Protostrongylinae*) and with thorn (for *Muelleriinae*, *Varestrongylinae* et al.] as well as length, tail form and body size of larvae. To study the morphology of the third-stage protostrongylid larvae, the feet of infected mollusks *X. candacharica* were separated and placed into the artificial gastric juice. Nucleotide sequences ITS-2 regions of species *Protostrongylus rufescens*, *P. shiozawai*, *Ortostrongylus macrotis*, *Cystocaulus ocreatus* and *Umingmakstrongylus pallikuukensis* were used to study phylogenetic relations between protostrongylids. The phylogenetic analysis was conducted using the software Clustal X 2.0.

Results and discussion. Based on morphological and molecular examinations, five species of protostrongylid nematodes: *Protostrongylus rufescens*, *P. hobmaieri*, *Protostrongylus sp.*, *Spiculocaulus leuckarti* and *Cystocaulus ocreatus* were found in hollow-horned ruminants. The morphological and molecular-genetic analysis of detected nematodes enables precise identification of species and spatial distribution of endemic protostrongylids.

Keywords: Protostrongylidae, hollow-horned animals, mollusks, rDNA, ITS-2.

© 2016 The Author(s). Published by All-Russian Scientific Research Institute of Fundamental and Applied Parasitology of Animals and Plants named after K.I. Skryabin. This is an open access article under the Agreement of 02.07.2014 (Russian Science Citation Index (RSCI) http://elibrary.ru/projects/citation/cit_index.asp) and the Agreement of 12.06.2014 (CA-BI.org/Human Sciences section: <http://www.cabi.org/Uploads/CABI/publishing/fulltext-products/cabi-fulltext-material-from-journals-by-subject-area.pdf>)