

УДК 619:576.895.132

DOI:

Поступила в редакцию 13.01.2015

Принята в печать 27.06.2015

Кучбоев А. Э.<sup>1</sup>, Каримова Р. Р.<sup>1</sup>, Рузиев Б. Х.<sup>2</sup>, Салахутдинов И. Б.<sup>3</sup>, Эгамбердиев Ш. Ш.<sup>3</sup>  
Морфологическая и молекулярная характеристика некоторых видов нематод семейства  
*Protostrongylidae* Leiper, 1926 // Российский паразитологический журнал.–М.–2015.–Вып.3.–С. .

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

Кучбоев А. Э.<sup>1</sup>, Каримова Р. Р.<sup>1</sup>, Рузиев Б. Х.<sup>2</sup>, Салахутдинов И. Б.<sup>3</sup>, Эгамбердиев Ш. Ш.<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Институт генофонда растительного и животного мира АН РУз  
100053, Ташкент, ул. Богишамол, 232, e-mail: a\_kuchboev@rambler.ru

<sup>2</sup> Каршинский государственный университет, Карши, Узбекистан

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

### Реферат

Цель исследования – проведение морфологической и молекулярно-генетической идентификации и изучение филогенетической взаимосвязи среди видов протостронгилид.

Материалы и методы. Гельминтологический материал собирали от диких и домашних полорогих и наземных моллюсков рода *Xeropicta* в предгорно-горных зонах Узбекистана. Морфологию протостронгилид изучали методами Боева (1975) и Anderson (1978). Для определения вида нематод готовили временные препараты, обработанные глицерином. Личинок первой стадии изучали путем исследования проб фекалий животных с учетом длины, формы хвоста и размера тела. Для изучения морфологии личинок третьей стадии протостронгилид отделяли ножки у зараженных моллюсков *Xeropicta candacharica* и помещали их в искусственный желудочный сок, где разрушался чехлик 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 °С) или в 70%-ном этаноле для молекулярного анализа. В работе использованы микроскопы ML 2000 с цифровой камерой и Olympus CX31. Выделение ДНК, амплификацию и секвенирование проводили на автоматическом секвенаторе. Филогенетический анализ проводили при помощи программного обеспечения ClustalX 2.0. 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. Обнаружены половозрелые нематоды четырех видов протостронгилид: *Protostrongylus rufescens*, *P. hobmaieri*, *Spiculocaulus leuckarti* и *Cystocaulus ocreatus*. ДНК четырех видов половозрелых протостронгилид и личинок была амплифицирована с использованием ITS-2 региона. Размер амплификатов у нематоды *P. rufescens* и *P. hobmaieri* составил 380 пар нуклеотидов (п. н.), *S. leuckarti* – 388, *C. ocreatus* – 399. По результатам филогенетического анализа и сравнения нуклеотидных последовательностей у Caprinae выявлено 5 видов протостронгилид: *Protostrongylus rufescens*, *P. hobmaieri*, *Protostrongylus* sp., *Spiculocaulus leuckarti* и *Cystocaulus ocreatus*. Морфологический и молекулярно-генетический анализ выявленных нематод позволяет провести их точную идентификацию.

Ключевые слова: Protostrongylidae, полорогие, моллюски, DNA, ITS-2, нуклеотидная последовательность.

### Введение

Нематоды семейства Protostrongylidae Leiper, 1926 – своеобразная группа нематод, паразитов респираторной системы жвачных и зайцеобразных. В семействе протостронгилид к настоящему времени описано 60 видов, отдельные популяции которых зарегистрированы в Европе, Азии,

Америке, Африке и Австралии [1–7]. В Узбекистане у полорогих зарегистрировано 15 видов паразитов [2–4].

В биологическом отношении нематоды семейства Protostrongylidae занимают особое положение среди родственных групп. Они в процессе эволюции на всех стадиях своего развития перешли к обитанию в условиях суши. 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].

Данные по молекулярному анализу нематод этой группы ограничены. В частности, 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 протостронгилид внутри Metastrongylina [9]. 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) были идентифицированы виды 7 родов протостронгилид, эндемичных для Северной Америки [11].

Дифференцированный анализ с использованием молекулярных маркеров (ядерных и митохондриальных) является крайне важным вкладом в изучении полевых коллекций взрослых паразитов и личинок. Корреляция молекулярных последовательностей между взрослыми (подтвержденной сравнительной морфологией) и личиночными стадиями паразитов приведет к первоначальной точной идентификации видов рода Protostrongylus и других протостронгилид. 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 изучение филогенетической взаимосвязи среди видов протостронгилид.

### Материалы и методы

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 candacharica* в предгорно-горных зонах Наманганской, Ташкентской, Джизакской и Сурхандарьинской областей Узбекистана.

Для изучения морфологии протостронгилид 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. При этом учитывали 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 и форму хвоста и размеры тела.

Для изучения личинок третьей стадии (L3) протостронгилид отделяли ножки у зараженных моллюсков *X. candacharica* и помещали их в искусственный желудочный сок, где разрушался чехлик 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 ML 2000 с цифровой камерой и Olympus CX31.

Для изучения филогенетических взаимодействий протостронгилид 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 в следующем температурном режиме: 94 °C в течение 30 с, 40 циклов (94 °C в течение 10 с, 55 °C 30 с, 72 °C в течение 30 с) и финальная амплификация: 72 °C в течение 10 мин. ПЦР продукты очищали 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 были построены при помощи метода присоединения соседей NJ (Neighbor-Joining method).

Для сравнения филогенетического анализа использовали 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 у домашних и диких животных обнаружены половозрелые нематоды четырех 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 экскрементами выделяются из организма дефинитивного хозяина. Они, в общих чертах, 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, а 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.

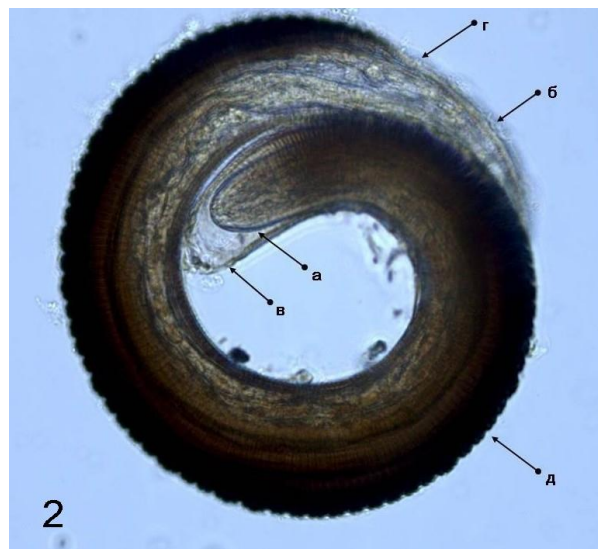
Указанные личинки характеризуются отсутствием дорзального кутикулярного шипа у вершины хвоста. Анализируя морфологические признаки можно констатировать то, что эти личинки принадлежат одному из родов подсемейству Protostrongylinae Kamensky, 1905. Для подтверждения этого предположения проведены молекулярно-генетические 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 L3 – 682–690, ширина – 55–60 мкм (рис. 2).



**Рис. 1.** Микрофотография личинки первой стадии *Protostrongylus sp.* (увеличение 400 ×):  
а – головной конец; б – пищеводно-



**Рис. 2.** Личинки третьей стадии протостронгирид, извлеченные из ноги моллюска (увеличение 400 ×):

кишечный переход; в – нервное кольцо;  
г – экскреторное отверстие; д – кишечник;  
е – половой зачаток; ж – анус; з – хвост

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

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

ДНК 4 видов половозрелых протостронгилид 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 *P. rufescens* и *P. hobmaieri* составляет 380 пар нуклеотидов (п. н.), *S. leuckarti* – 388, *C. ocreatus* – 399. L3 имеет одинаковый молекулярный размер, аналогичный видам нематод рода *Protostrongylus* и составляет 380 п. н. А L1 домашних коз (без кутикулярного шипика у вершины хвоста) имеет около 400 п. н.

Амплификаты были очищены и секвенированы на генетическом анализаторе. Полученные нуклеотидные последовательности были сравнены с опубликованными последовательностями региона ITS-2 при помощи BLAST международного генетического банка NCBI (blast.ncbi.nlm.nih.gov). Оказалось, что 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 (табл. 1). Было выявлено что последовательности L3 протостронгилид коррелировали с данными NCBI, так же идентифицирован вид личинок, 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*.

Таблица 1. Номера полученных сиквенсов ITS-2 в базе данных NCBI GenBank

| Вид нематод                      | Стадия | 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 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. учитывают 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).

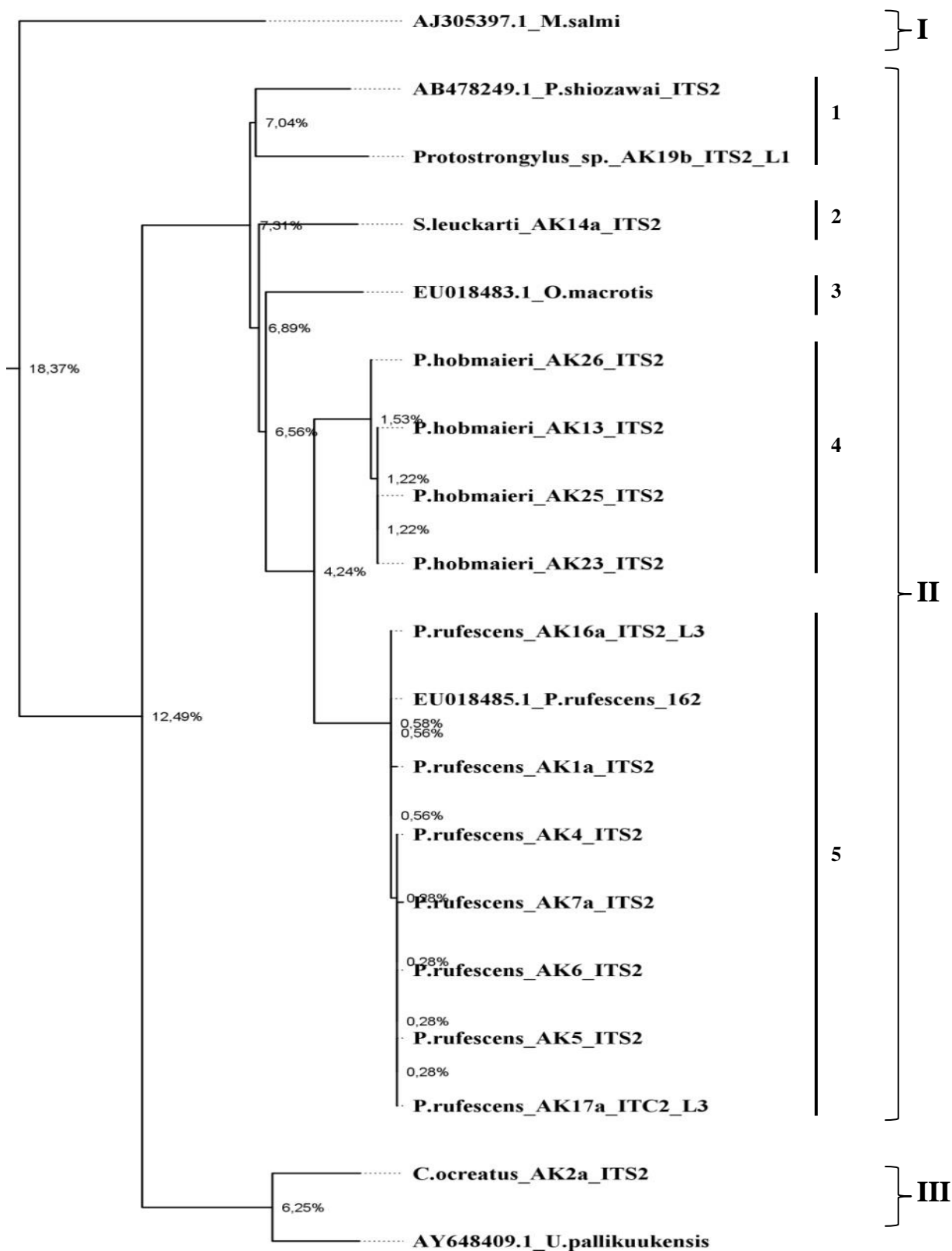
Филогенетический анализ с использованием метода NJ 19 образцов нематод различных видов позволил распределить их на 3 различных кластера (рис. 3). В качестве корневого образца был использован образец *Metastrongylus salmi* (Gedoelst, 1923). Первый кластер представлен образцом *M.*

*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*, показывающие также близкое генетическое родство.

Второй кластер также можно разделить 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 Carpiinae выявлено 5 видов протостронгилид: *P. rufescens*, *P. hobmaieri*, *Protostrongylus sp.*, *S. leuckarti* и *C. ocreatus*. Морфологический и молекулярно-генетический анализ выявленных нематод позволяет провести их точную идентификацию, в том числе эндемичных протостронгилид.

Результаты этих исследований позволяют расширить взгляды по затронутой проблеме и способствуют идентификации географических разновидностей паразитов.



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

## Литература

1. Азимов Д. А., Акрамова Ф. А., Хусанов А., Кучбоев А. Э. Структура и функционирование нематод семейства Protostrongylidae Leiper, 1926 // Докл. 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. Кучбоев 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.
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. – P. 1–40.
8. Carreno R. A., Nadler S. A. Phylogenetic analysis of the Metastrongyloidea (Nematoda: Strongylida) inferred from ribosomal RNA gene sequences // J. of Parasitology. – 2003. – Vol. 89. – P. 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. – P. 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 // J. of Parasitology. – 2005. – Vol. 91. – P. 574–584.
11. Kutz S. J., Asmundsson I., Hoberg E. P. et al. Veitch A 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 J. of Zoology. – 2007. – Vol. 85. – P. 1143–1156.
12. Mortenson J. A., Abrams A., Rosenthal B. et al. *Parelaphostrongylus odocoilei* in Columbian black-tailed deer from Oregon // J. of Wildlife Diseases. – 2006. – Vol. 42. – P. 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 // J. of Wildlife Disease. – 2008. – Vol. 44. – P. 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. – P. 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. *Dokl. AN RUz*. [Proc. of Academy of Sciences of the Republic of Uzbekistan]. Tashkent, 1998, no. 10, pp. 39–41.
2. Boev S. N. *Osnovy nematodologii. Protostrongilidy* [Essentials of Nematodology. Protostrongylids]. Moscow, Nauka, 1975, vol. 25. 266 p.
3. Kontrimavichus V. L., Delyamure S. L., Boev S. N. *Osnovy nematodologii. Metastrongiloidei domashnih i dikih zhivotnyh*. [Essentials of Nematodology. Metastrongylidae in domestic and wild animals.]. Moscow, Nauka, 1976, vol. 26. 239 p.
4. Kulmamatov E. N., Isakova D. T., Azimov D. A. *Gel'minty pozvonochnyh gornyh ekosistem Uzbekistana* [Helminthes in vertebrates of mountain ecosystems of Uzbekistan]. Tashkent, Fan, 1994. 151 p.
5. Kuchboev A. E. *Populyatsionnaya ekologiya, sistematika nematod semeistva Protostrongylidae Leiper, 1926 i funktsional'no-metabolicheskiye processy v sisteme «parazit–hozyain»*: Avtoref. dis... d-ra biol. nauk. [Population ecology, systematics of the nematode family Protostrongylidae Leiper, 1926, functional and metabolic processes in host – parasite relationship. Abst. doct. diss... biol.sc.]. Tashkent, 2009. 43 p.
6. Ruziev B. H. *Associativnaya 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. sc.]. Tashkent, 2008. 21 p.

7. Anderson R. C., Chabaud A. G., Willmott S. Key to genera of the superfamily Metastrongyloidea. No. 5. CIH Keys to the nematode parasites of vertebrates. – Commonwealth Agricultural Bureaux, Farnham Royal, UK, 1978, pp. 1–40.

8. Carreno R. A., Nadler S. A. Phylogenetic analysis of the Metastrongyloidea (Nematoda: Strongylida) inferred from ribosomal RNA gene sequences. J. of Parasitology, 2003, vol. 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 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. J. of Parasitology, 2005, vol. 91, pp. 574–584.

11. Kutz S. J., Asmundsson I., Hoberg E. P. et al. Veitch A 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 J. 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. J. of Wildlife Diseases, 2006. vol. 42, pp. 527–535.

13. Asmundsson I., Mortenson J., Hoberg E. P. Musclemoors, *Parelaphostrongylus andersoni* (Nematoda: Protostrongylidae), discovered in Columbia white-tailed deer from Oregon and Washington: Implications for biogeography and host associations. J. 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.

#### **Russian Journal of Parasitology**

DOI:

Article history:

Received 13.01.2015

Accepted 27.06.2015

*Kuchboev A. E.<sup>1</sup>, Karimova R. R.<sup>1</sup>, Ruziev B. H.<sup>2</sup>, Salahutdinov I. B.<sup>3</sup>, Egamberdiev Sh. Sh.<sup>3</sup> Morphological and molecular characteristics of some nematode species of the family Protostrongylidae Leiper, 1926. Russian Journal of Parasitology, 2015, V. 3, P. .*

#### **MORPHOLOGICAL AND MOLECULAR CHARACTERISTICS OF SOME NEMATODE SPECIES OF THE FAMILY PROTOSTRONGYLIDAE LEIPER, 1926**

**Kuchboev A. E.<sup>1</sup>, Karimova R. R.<sup>1</sup>, Ruziev B. H.<sup>2</sup>, Salahutdinov I. B.<sup>3</sup>, Egamberdiev Sh. Sh.<sup>3</sup>**

<sup>1</sup> Institute of plants and animals genofond at Academy of Sciences of Uzbekistan, 100053, Tashkent, 232 Bogishamol St., e-mail: a\_kuchboev@rambler.ru

<sup>2</sup> Karshi State University, Karshi, Uzbekistan

<sup>3</sup> Center of Genomics and Bioinformatics at Academy of Sciences of Uzbekistan, Ministry of Agriculture and Water Resources and the Association «Uzpahtasanoat», Tashkent

#### **Abstract**

**Objective of research:** conducting morphological and molecular-genetic identification and studying phylogenetic relations between protostrongylids.

**Materials and methods:** helminthological material was collected from wild (*Capra sibirica*, *C. falconeri*, *Ovis vignei* and *O. ammon*) and domestic hollow horned ruminants (*C. hircus* and *O. aries*), and land mollusks of the family Xeropicta in the piedmont and mountain area of Uzbekistan. The morphology of protostrongylids was studied using the methods of Boev (1975) and Anderson (1978). To identify the nematode type we used temporary preparations treated with glycerol. The first-stage larvae were investigated by examination of fecal samples from animals taking into account the length, tail form and body size. To study the morphology of the third-stage protostrongylid larvae the feet of infected mollusks *Xeropicta candacharica* were separated and placed into the artificial gastric juice where the cap was destroyed and the infected larvae were eliminated. After determination of species belonging of mature and larval nematodes the



material was stored in separate test-tubes with distilled water under the low temperature (- 20 °C) or in 70 % Ethanol for the molecular analysis. We used microscopes ML 2000 with a digital camera and Olympus CX3. DNA extraction, amplification and sequencing were performed with an automated sequencer. Phylogenetic analysis was conducted using the software Clustal X 2.0. Phylogenetic trees were created by the Neighbor-Joining method. Nucleotide sequences ITS-2 regions of species *Protostrongylus rufescens* (EU018485), *P. shiozawai* (AB478249), *Ortostrongylus macrotis* (EU018483), *Cystocaulus ocreatus* (EU018481) and *Umingmakstrongylus pallikuukensis* (AY648409) received from the NCBI GenBank were used in phylogenetic analysis.

**Results and discussion:** Four species of adult protostrongylid nematodes: *Protostrongylus rufescens*, *P. hobmaieri*, *Spiculocaulus leuckarti* and *Cystocaulus ocreatus* were determined. DNA from four species of mature protostrongylids and larvae was amplified by using ITS-2 regions. Amplificate dimension of nematodes *P. rufescens* and *P. hobmaieri* was 380 base pairs (b.p.), *S. leuckarti* – 388, *C. ocreatus* – 399 b.p. According to the results of phylogenetic analysis and comparison of nucleotide sequences, five protostrongylid species were found in animals of the Caprinae subfamily: *P. rufescens*, *P. hobmaieri*, *Protostrongylus sp.*, *S. leuckarti* and *C. ocreatus*. The morphological and molecular-genetic analysis of detected nematodes enables the precise identification.

**Keywords:** Protostrongylidae, hollow-horned, mollusks, DNA, ITS-2, nucleotide sequence.

© 2015 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](http://elibrary.ru/projects/citation/cit_index.asp)) and the Agreement of 12.06.2014 (CABI.org / Human Sciences section: <http://www.cabi.org/Uploads/CABI/publishing/fulltext-products/cabi-fulltext-material-from-journals-by-subject-area.pdf>)