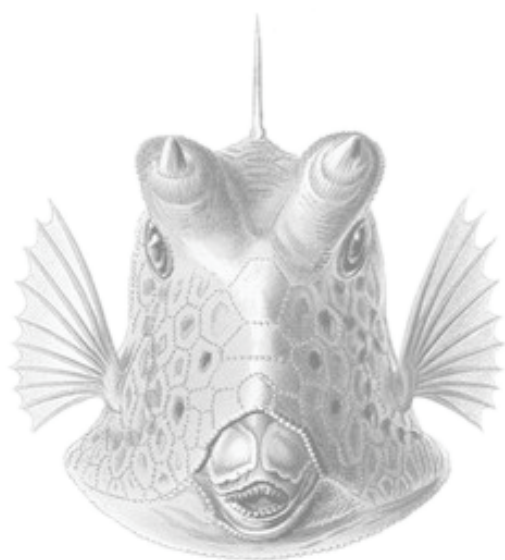


Современные проблемы теоретической и морской паразитологии



УДК 576.8
ББК 28.083
С 56

Ответственные редакторы

д.б.н., проф. К.В. Галактионов, д.б.н., проф. А.В. Гаевская

Рецензенты

д.б.н., проф. А.Н. Пельгунов, д.б.н., проф. Е.П. Иешко

Современные проблемы теоретической и морской паразитологии :
С 56 сборник научных статей / ред.: К. В. Галактионов, А. В. Гаевская. – Севастополь :
Изд-ль Бондаренко Н. Ю., 2016. – 242 с.
ISBN 978-5-9908633-2-3

Сборник включает серию оригинальных статей, раскрывающих различные аспекты современной проблематики морской и теоретической паразитологии. В публикациях авторов из разных стран (Азербайджана, Белоруссии, Вьетнама, Германии, Италии, России, Турции и Японии) освещаются история и перспективы развития морской паразитологии, вопросы теоретической и экологической паразитологии, частные и общие вопросы функциональной морфологии, систематики, генетики, фаунистики и биогеографии паразитов морских, пресноводных и наземных животных и растений, рассматриваются теоретические аспекты реализации их жизненных циклов. В ряде статей описываются важные с практической и теоретической точек зрения аспекты популяционной биологии паразитов и использования паразитов в качестве биологических меток для исследования различных сторон экологии хозяев, а также возможности применения современных генетических и математических методов и для оптимизации паразитологических исследований.

Сборник составлен по материалам научных докладов на VI Всероссийской конференции с международным участием «Школа по теоретической и морской паразитологии» (5–10 сентября 2016 г., г. Севастополь).

Сборник рассчитан на паразитологов, зоологов, экологов, ветеринарных врачей, работников рыбной промышленности и аквакультуры, студентов вузов.

Издание сборника поддержано Российским фондом фундаментальных исследований, грант № 16-04-20519.

УДК 576.8
ББК 28.083

Contemporary problems of theoretical and marine parasitology : collection of
scientific papers / Eds.: K.V. Galaktionov, A.V. Gaevskaya. – Sevastopol: Bondarenko
Publishing, 2016. – 242 p.

This book includes original papers on different contemporary problems facing marine and theoretical parasitology. The articles, which are written by authors from various countries (Azerbaijan, Belarus, Germany, Italy, Japan, Russia, Turkey and Vietnam), cover a range of diverse topics, including: the history of and prospects for the development of marine parasitology, questions on theoretical and ecological parasitology, specialized and general aspects of functional morphology, systematics, genetics, faunal and biogeographical studies on the parasites of marine, freshwater and terrestrial animals and plants, and the theoretical studies on life cycles. Some papers are devoted to the important, more practical aspects of the population biology of parasites, the use of parasites as biological tags for investigating of host ecology, and also the possibility utilizing advanced genetic and mathematical methods to optimize parasitological studies.

The book was prepared on the basis of the scientific reports presented at the VIth All-Russian Conference, with international participation, entitled “School for Theoretical and Marine Parasitology”, which took place at Sevastopol, September 5–10, 2016.

This collection of papers will be of interest to parasitologists, zoologists, ecologists, veterinarians, those involved in the fishing industry and aquaculture, and students.

The publication is supported by Russian Foundation for Basic Research, Grant No 16-04-20519.

Печатается по решению ученого совета
Института морских биологических исследований им. А.О. Ковалевского РАН
(протокол № 8 от 12.07.2016)

ISBN 978-5-9908633-2-3

©Авторы статей, 2016
©Паразитологическое общество при РАН, 2016
©Институт морских биологических исследований им. А.О. Ковалевского РАН, 2016
©Зоологический институт РАН, 2016

Pilley B.M. A new genus, *Vairimorpha* (Protozoa: Microsporida), for *Nosema necatrix* Kramer 1965: Pathogenicity and life cycle in *Spodoptera exempta* (Lepidoptera: Noctuidae) // Journal of Invertebrate Pathology. – 1976. – Vol. 28, iss. 2. – P. 177–183.

Tokarev Yu.S., Malysh J.M., Kononchuk A.G., Seliverstova E.V., Frolov A.N., Issi I.V. Redefinition of *Nosema pyrausta* (*Perezia pyraustae* Paillot 1927) basing upon ultrastructural and molecular phylogenetic studies // Parasitology Research. – 2015. – Vol. 114, iss. 2. – P. 759–761.

Vossbrink C.R., Debrunner-Vossbrinck B.A. Molecular phylogeny of the Microsporidia: ecological, ultrastructural and taxonomic considerations // Folia Parasitologica. – 2005. – Vol. 52, iss. 1/2. – P. 131–142.

GENETIC POLYMORPHISM OF MICROSPORIDIA OF THE GENUS NOSEMA

J.M. Malysh, I.V. Grushevaya, A.N. Ignatieva, A.N. Frolov, Y.S. Tokarev, I.V. Issi

All-Russian Institute of Plant Protection, St. Petersburg, Russia, malyshjm@mail.ru

Genus *Nosema* is a polyphyletic taxon, composed of members of two phylogenetic lineages of microsporidia in sister position to each other. Presence of additional octosporous sporogony is formal criterion for species allocation to the genus *Vairimorpha*, while the absence – to the genus *Nosema*. The problem is that additional sporogony is not obligatory and is present in certain members of both lineages. It was proposed to define genus for this microsporidia basing upon their small subunit ribosomal RNA (SSU rRNA) sequence similarity to the type species, *Nosema bombycis* and *Vairimorpha necatrix*, respectively, more than ten years ago (Vossbrinck, Debrunner-Vossbrinck, 2005) yet remains unsupported formally. As opposed to SSU rRNA locus, internal transcribed spacer (ITS) is highly polymorphic. Comparison of *Nosema pyrausta* isolates shows molecular clone similarity of 65–85% for molecular clones derived both from a single host specimen or from different geographical locations.

УДК 576.895.132:595.6:577.21(265)

МОЛЕКУЛЯРНЫЙ АНАЛИЗ УРОВНЯ ВНУТРИРОДОВОЙ ИЗМЕНЧИВОСТИ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ RANSOMNEMATOIDEA ОСТРОВНОЙ ФАУНЫ ТИХООКЕАНСКОГО РЕГИОНА

С.В. Малышева, О.А. Панова, С.Э. Спиридонов

Институт проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова РАН,
г. Москва, Россия; malysheva24@gmail.com

Исследованные в данной работе паразитические нематоды являются представителями типовых родов двух семейств Hethidae и Carnoyidae надсемейства Ransomnematodea (Rhigonematomorpha). Представители данной группы обитают в задней кишке крупных тропических многоножек (Diplopoda), играющих важную роль в деструкции целлюлозы в тропических экосистемах. Основной пищей рансомнематид служат бактерии, обитающие в просвете кишки хозяина, что представляет особый интерес в плане изучения путей становления паразитизма в пределах типа Nematoda. Крупные диплоподы относятся к числу беспозвоночных не способных преодолевать водные преграды. Известно, что современные очертания суша в регионе Юго-Восточной Азии приобрела в конце последнего оледенения, когда в результате постоянных изменений уровня моря появлялись и исчезали «мосты» между

отдельными островами Филиппинского и Зондского архипелагов и материковой Азией. Значительный интерес представляет изучение генетического разнообразия паразитических нематод диплопод с целью поиска ответа на вопрос: отражается ли в уровне нуклеотидных различий между паразитическими нематодами диплопод различных регионов островной и материковой Юго-Восточной Азии геологическая история этого региона.

Нематоды были получены в ходе вскрытий многоножек-хозяев, собранных в Индонезии (о-в Сумба, 9°41' с.ш., 119°59' в.д.) и на Филиппинах (о-ва Минданао (7°53' с.ш. 125°04' в.д.) и Бохоль (9°50' с.ш., 124°10' в.д.)). На острове Минданао сбор материала был произведен в нескольких точках: в провинции Букиднон (водопад Дила Фолз и Масуан Пик, Центральный Минданао) и в провинции Ланао дель Норте (водопад Тинаго Фолз, Северный Минданао). Материал по многоножкам с острова Сумба был представлен особями *Salpidobolus Silvestri*, 1897 (Spirobolida: Rhinocricidae), в то время как филиппинские пробы, помимо спироболид, также содержали представителей отряда Spirostreptida (Spirostreptida: Harpagophoridae). В результате морфологического изучения материала для молекулярных исследований были отобраны три представителя рода *Carnoya* Gilson, 1898, два из которых были описаны нашей группой (*C. filipjevi* Malysheva, 2014 и *C. philippinensis* Malysheva, Mohagan & Spiridonov, 2015), и три представителя рода *Heth* Cobb, 1898, включая описанного ранее *H. impalutiensis* Malysheva, Mohagan & Spiridonov, 2015.

ДНК выделяли по методу Холтермана (Holterman et al., 2006) из единичных особей нематод. Для получения последовательностей D2-D3 фрагмента большой субъединицы рибосомы (28S рДНК) нами были использованы праймеры LSU391 (5'-AGCGGAGGAAAAGAACTAA-3') и LSU501 (5'-TCGGAAGGA ACCAGCTACTA-3' (Nadler et al., 2006). Для амплификации последовательностей малой субъединицы рибосомы (18S рДНК) нами были использованы две пары праймеров. Пара нематодо-специфичных праймеров nem18SF (5'-CGCGAATRGCTC ATTACAACAGC-3') и nem18SR (5'-GGGCGGTATCTGATCGCC-3') была использована для амплификации 5' конца участка 18S рДНК (Floyd et al., 2005). Другая пара праймеров 24F (5'-AGRGGTGAAA TYCGTGGACC-3') и Q39 (5'-TAATGA TCCWTCYGCAGGTTCACCTAC-3') была использована для амплификации недостающего 3' конца 18S рДНК (Blaxter et al., 1998). Длина полученных ампликонов составила порядка 650 н.п. и 1630 н.п., соответственно. Во всех случаях ПЦР-реакции были проведены согласно стандартному протоколу. Полученный ПЦР-продукт очищали в 1% агарозном геле, содержащем 0,003% бромистого этидия и визуализировали при помощи УВ трансиллюминатора ECX-15.М и системы Gel Imager-2. Секвенирование производилось в ЦПК «Геном». Полученные последовательности выравнивали с помощью Clustal X. Филогенетический анализ проводили с использованием программ RAUP 4.0b.10 и MEGA5.

Филогенетический анализ 18S рДНК для *H. impalutiensis* Malysheva, Mohagan & Spiridonov, 2015 и двух других представителей рода продемонстрировал наиболее близкую связь исследуемого вида с *Heth* sp. из Индонезии с разницей в 4 н.п. Другие два представителя рода из Австралии и Вьетнама, последовательности 18S рДНК которых были получены нами ранее, отличаются от *H. impalutiensis* на 11 и 14 н.п., соответственно. Все представители рода объединяются в группу со 100% поддержкой. Тот же уровень поддержки группы отмечен и для последовательностей 28S рДНК (D2-D3 сегмент). Наименьшее различие по количеству нуклеотидных пар наблюдается у *H. impalutiensis* с другим филиппинским видом (4 н.п.), в то время как различия с индонезийским видом составляют 19 н.п., а для австралийского и вьетнамского видов таковые отличия составляют 28 и 38 н.п., соответственно.

Анализ последовательности большой и малой субъединиц рДНК представителей рода *Carnoya* показал, что межвидовой уровень нуклеотидных различий для D2-D3 сегмента 28S рДНК составляет порядка 10-14 н.п., при этом уровень нуклеотидных различий по 18S составляет всего 1-5 н.п. По результатам морфологического анализа на о-ве Минданао нами было обнаружено две популяции нематод *C. philippinensis*. Молекулярный анализ показал, что последовательности D2-D3 сегмента 28S рДНК представителей каждой популяции отличаются всего на 1-2 н.п., отличий по 18S выявлено не было. Совокупный анализ полученных молекулярных данных показал, что на филограммах род *Carnoya* объединяется с представителями семейства Hethidae со 100% уровнем поддержки во всех видах анализа как по

18S, так и по 28S доменам рДНК, а не с прочими представителями Carnoyidae (Malysheva et al., 2015).

Рассматривая полученные результаты, в целом, можно отметить, что наименьшие различия были отмечены между нематодами многоножек, собранных на двух соседних островах Филиппинского архипелага – Минданао и Бохоле, которые были соединены «сухопутным мостом» около 17 тыс. лет назад. Общеизвестным является и существование подобных участков суши, связывающих острова Зондского архипелага с современной материковой Азией. Необходим сбор дополнительного материала по другим, более изменчивым локусам, а также сбор материала на тех участках современной суши, которые не были связаны с материковой Азией и ныне существующими островами в течение нескольких последних десятков тысяч лет.

Исследования выполнены при поддержке гранта Президента Российской Федерации № МК-3636.2015.4.

Список литературы

Blaxter M.L., De Ley P., Garey J.R., Liu L.X., Scheldemann P., Vierstraete A., Vanfleteren J.R., Mackey L.Y., Dorris M., Frisse L.M., Vida J.T., Thomas W.K. A molecular evolutionary framework for the phylum Nematoda // *Nature*. – 1998. – Vol. 392. – P. 71–75.

Floyd R.M., Rogers A.D., Lamshead P.J.D., Smith C.R. Nematode-specific PCR primers for the 18S small subunit rRNA gene // *Molecular Ecology Notes*. – 2005. – Vol. 5, iss. 3. – P. 611–612.

Holterman M., Van Der Wurff A., Van Den Elsen S., Van Megen H., Bongers T., Holovachov O., Bakker J., Helder J. Phylum-wide analysis of SSU rDNA reveals deep phylogenetic relationships among nematodes and accelerated evolution towards crown clades // *Molecular Biology Evolution*. – 2006. – Vol. 23, iss. 9. – P. 1792–1800.

Malysheva S.V., Mohagan A.B., Spiridonov S.E. Morphological and molecular characterisation of *Carnoya philippinensis* sp. n. (Nematoda: Carnoyidae) from Mindanao Island, Philippines // *Russian Journal of Nematology*. – 2015. – Vol. 23. – P. 137–144.

Nadler S.A., Bolotin E., Stock S.P. Phylogenetic relationships of *Steinernema* Travassos, 1927 (Nematoda: Cephalobina: Steinernematidae) based on nuclear, mitochondrial and morphological data // *Systematic Parasitology*. – 2006. – Vol. 63, iss 3. – P. 161–181.

Voris H.K. Maps of Pleistocene sea levels in Southeast Asia: shorelines, river systems and time durations // *Journal of Biogeography*. – 2000. – Vol. 27, iss. 5. – P. 1153–1167.

MOLECULAR ANALYSIS OF INTRASPECIFIC VARIATION LEVEL IN RANSOMNEMATOIDEA REPRESENTATIVES FROM PACIFIC ISLANDS FAUNA

S.V. Malysheva, O.A. Panova, S.E. Spiridonov

A.N. Severtsov Institute of Ecology and Evolution, Russian Academy of Sciences,
Moscow, Russia; malysheva24@gmail.com

The analysis of nucleotide differences between *Heth* Cobb, 1898 representatives from the Pacific region has shown that the level of nucleotide differences in 18S rDNA is significantly lower than in 28S rDNA (4 bp and 19 bp from the closest species, correspondingly). Nucleotide differences for 18S rDNA between close species of *Carnoya* Gilson, 1898 were found in five positions, while sequences of *C. philippinensis* from different localities were identical. Partial sequences for 28S rDNA revealed the difference in single nucleotide between two studied representatives of *C. philippinensis* n. and 10 bp difference with *C. filipjevi*.