

СОДЕРЖАНИЕ

Том 54, № 6, 2020

Физиолого-экологические аспекты взаимоотношений между энтомопатогенными грибами (Ascomycota, Hypocreales) и насекомыми	443
<i>Крюков В. Ю., Ярославцева О. Н., Глупов В. В.</i>	
Строение органа Галлера и систематика иксодовых клещей подсемейства Ixodinae (семейство Ixodidae)	470
<i>Леонович С. А.</i>	
Genetic diversity in monoxenous and trixenous digeneans sharing one molluscan host species	491
<i>Gonchar A.</i>	
Level of IFN- γ , TNF- α , and IL-10 among Sudanese infected by malaria parasite	504
<i>Al Sayed S. E. A., Malik A. H., Musa H. A.</i>	
Prevalence of <i>Paramphistomum</i> species in cattle slaughtered at Gwagwalada abattoir, Abuja, Nigeria	514
<i>Arowolo O. B., Mohammed B. R., Opara M. N.</i>	
Авторский указатель статей за 2020 г. (том 54)	522

CONTENTS

Vol. 54, No. 6, 2020

Physiological and ecological aspects of interactions between entomopathogenic fungi (Ascomycota, Hypocreales) and insects	443
<i>Kryukov V. Yu., Yaroslavtseva O. N., Glupov V. V.</i>	
The structure of the Haller's organ and taxonomy of ixodid ticks subfamily Ixodinae (family Ixodidae)	470
<i>Leonovich S. A.</i>	
Genetic diversity in monoxenous and trixenous digeneans sharing one molluscan host species	491
<i>Gonchar A.</i>	
Level of IFN- γ , TNF- α , and IL-10 among Sudanese infected by malaria parasite	504
<i>Al Sayed S. E. A., Malik A. H., Musa H. A.</i>	
Prevalence of <i>Paramphistomum</i> species in cattle slaughtered at Gwagwalada abattoir, Abuja, Nigeria	514
<i>Arowolo O. B., Mohammed B. R., Opara M. N.</i>	
Author Index Volume 54 (2020)	522

УДК 76.895.122: 595.7

ФИЗИОЛОГО-ЭКОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ВЗАИМООТНОШЕНИЙ МЕЖДУ ЭНТОМОПАТОГЕННЫМИ ГРИБАМИ (ASCOMYCOTA, HYPOCREALES) И НАСЕКОМЫМИ

© 2020 г. В. Ю. Крюков^a, О. Н. Ярославцева^{a *}, В. В. Глупов^a

^aИнститут систематики и экологии животных СО РАН,
ул. Фрунзе, 11, Новосибирск, 630091 Россия

* e-mail: yarosl@inbox.ru

Поступила в редакцию 27.08.2020 г.

После доработки 17.10.2020 г.

Принята к публикации 20.10.2020 г.

В обзоре кратко обобщены сведения о факторах вирулентности энтомопатогенных аскомицетов и защитных реакциях насекомых-хозяев. Особое внимание уделено влиянию различных экологических факторов (температура, токсиканты, сопутствующие инфекции, симбиотические организмы и паразитоиды) на физиологические аспекты взаимоотношений между насекомыми-хозяевами и энтомопатогенными грибами. На основе проведенного анализа мы предполагаем, что длительные стрессирующие воздействия (такие как пониженные температуры, природные и синтетические токсиканты, бактериальные инфекции) приводят к подавлению большого комплекса клеточных и гуморальных защитных реакций, а также к онтогенетическим нарушениям у насекомых. Это может приводить к резкому повышению восприимчивости к энтомопатогенным грибам. Понимание данных механизмов имеет значение для развития новых подходов к биологическому контролю экономически значимых видов насекомых.

Ключевые слова: иммунитет насекомых, *Beauveria*, *Metarhizium*, система паразит-хозяин, экологические факторы

DOI: 10.31857/S1234567806060012

Энтомопатогенные аскомицеты среди паразитов насекомых

К настоящему времени паразитов рассматривают как неотъемлемую часть естественных экосистем, оказывающих большое влияние на их функционирование. Данная группа организмов зачастую играет решающую роль не только в динамике популяций и сообществ хозяев, но и в структуре пищевых цепей, внося значимый вклад в биомассу

и энергетический поток. Особое место среди паразитических организмов занимают паразитические грибы, в том числе поражающие насекомых.

В свою очередь насекомые представляют собой самую большую и разнообразную группу животных на Земле. Они также являются хозяевами или источниками питательных веществ для огромного количества паразитов, патогенов и хищников. Более 700 известных видов грибов адаптировались к жизни за счет насекомых (Roberts, Humber, 1981). За исключением основных высших базидиомицетов, паразитические виды встречаются в каждом основном таксономическом подразделении грибов и обитают почти во всех экосистемах. Наибольшее количество видов грибов, способных поражать насекомых, относится к порядку Нуроцреалес (Ascomycota, Sordariomycetes). Среди представителей Нуроцреалес патогенность по отношению к насекомым – довольно древний признак, о чём свидетельствуют окаменелости в янтаре раннего мелового периода (в пределах 98–112 миллионов лет назад) (Sung et al., 2008). Считается, что возникновение энтомопатогенности среди грибов приходится на период адаптации насекомых к покрытосеменным растениям (Sung et al., 2008).

В силу того, что паразитические аскомицеты широко распространены в природе и активно используются в производстве биологических препаратов, то в данном обзоре мы остановимся на взаимоотношениях грибов именно этой таксономической группы и насекомых различных отрядов. Эволюция этих организмов привела к существованию групп с разными типами размножения. В частности, телеоморфных грибов, в жизненном цикле которых всегда присутствует половая стадия, и анаморфных, у которых данная стадия образуется крайне редко и локально либо полностью утрачена. Последних ранее относили к формальному отделу Deuteromycota (= Anamorphic fungi). В настоящее время широкое использование молекулярно-генетических методов приводит к таксономическому объединению анаморфных и телеоморфных видов и родов (Sung et al., 2007; Kepler et al., 2017). Однако эти две группы грибов демонстрируют значительные различия в их экологии. В частности, для анаморфных форм (*Beauveria*, *Metarhizium*, *Isaria* и др.) характерны широкий спектр насекомых-хозяев, космополитическое распространение, эвритопность, факультативно-сапротрофное питание, возможность развития в ризосфере или внутренних тканях растений (Vega, 2018). Напротив, телеоморфные грибы (*Cordyceps*, *Ophiocordyceps* и др.), как правило, стенотопны, имеют ограниченный спектр хозяев, локальное распространение, характеризуются более сложными, длительными жизненными циклами и облигатным паразитизмом. Подавляющее большинство работ по физиологии паразит-хозяинных отношений выполнено на анаморфных грибах *Beauveria* и *Metarhizium*.

Энтомопатогенные аскомицеты известны с первой половины XVIII в. и являются первыми описанными в литературе энтомопатогенными организмами (Коваль, 1984).

Микозы, вызываемые аскомицетами, часто встречаются в популяциях насекомых самых разных отрядов, вызывая их гибель на энзоотическом или эпизоотическом уровнях. Однако использование энтомопатогенных аскомицетов в качестве продуцентов биопрепаратов встречает ряд трудностей, связанных с нестабильной эффективностью. Это обусловлено существенной зависимостью выживаемости пропагул грибов от факторов внешней среды, а также от физиологического состояния насекомых хозяев. Поэтому для понимания взаимоотношений в исследуемых паразит-хозяйственных системах необходим анализ механизмов вирулентности грибов, защитных систем хозяев, а также влияния средовых факторов на физиологию обоих звеньев системы.

Этапы патогенеза и факторы вирулентности грибов

Инфицирование грибами насекомых может происходить через различные участки тела. Для некоторых грибов может наблюдаться определённая органотропная приуроченность. Энтомопатогенные грибы являются единственными микроорганизмами насекомых, способными инфицировать хозяев через поверхностные структуры, за счет адгезии к кутикуле и последующего проникновения через этот барьер (Борисов и др., 2001; Thomas, Read, 2007). Возможность грибковой пероральной инфекции была также описана в ряде работ, однако этот способ проникновения исследован слабо (обзор: Mannino et al., 2019). С появлением новых технологий секвенирования стали доступны геномы основных энтомопатогенных грибов и было описано много грибных генов, потенциально способных обеспечить оральную инфекцию. Среди грибов, геномы которых были секвенированы, *Beauveria bassiana* (Bals.-Criv.) Vuill имеет большое количество сходных генов с не грибными патогенами, в частности с бактериями *Bacillus thuringiensis* Berliner, способными синтезировать внутриклеточный дельта эндотоксин и вызывать кишечные токсикозы у насекомых (Mannino et al., 2019).

Инфицирование насекомых грибами можно условно разделить на несколько этапов, первый – это адгезия конидий к поверхности кутикулы. Адгезия происходит за счёт неспецифических гидрофобных и электростатических взаимодействий между кутикулой насекомого и конидиями. Вклад в прикрепление конидий к кутикулярной поверхности могут внести неровности, шероховатости и различные выросты кутикулы. Хотя определяющим является химический состав верхнего слоя, то есть кутикулина, как части эпикутикулы (Vega et al., 2012). Большое значение в формировании гидрофобных связей между конидиями и кутикулой играют неполярные липиды: жирные кислоты, длинноцепочечные углеводороды и воска (восковые эфиры) кутикулина (Pedrini et al., 2007). На адгезию конидий к кутикуле могут оказывать существенное влияние ряд белков грибов. Например, у грибов *Metarhizium* имеются адгезин-подобные белки Mad1 и Mad2, играющие существенную роль при патогенезе насекомых, а также при

взаимодействии с ризосферой растений (Barelli et al., 2011). Данные небольшие белки (молекулярная масса менее 20 kDa) могут играть определяющую роль в вирулентности грибов (Sevim et al., 2012; Jiang et al., 2020). Энтомопатогенные аскомицеты могут экспрессировать два класса гидрофобинов (HYD), которые могут играть различную роль в адгезии и последующем развитии этих грибов (Wosten, 2001; Bayut et al., 2012). Кроме того, гидрофобиновые белки могут модулировать иммунные реакции организма хозяина. Среди энтомопатогенных грибов гидрофобиновые белки MacHYD3, локализованные на поверхности конидий *Metarhizium acridum* (Driver & Milner) J.F. Bisch., Rehner & Humber могут активировать как гуморальный, так и клеточный иммунитет саранчи *Locusta migratoria manilensis* (Meyen) (Jiang et al., 2020). Также в клеточных стенках конидий энтомопатогенных грибов имеются негидрофобные белки, в частности у *Metarhizium* CPW10, участвующие во взаимодействии конидий с поверхностными структурами кутикулы насекомых (Li et al., 2010).

После адгезии грибов на поверхности кутикулы начинается этап дифференциации инфекционных структур – формирования ростковых трубок и аппрессориев. Значительную роль в этих процессах играет липидный обмен грибов, зависящий от композиционного состава углеводородов и жирных кислот эпикутикулы (Ortiz-Urquiza, Keyhani, 2013; Keyhani, 2018). Насекомые с преобладанием насыщенных (линейных или разветвленных) углеводородов в эпикутикуле обычно более чувствительны к грибам, по сравнению с насекомыми, у которых преобладают ненасыщенные углеводороды (Pedrini et al., 2007). Углеводороды являются важным питательным источником для энтомопатогенных грибов. Например, виды *Metarhizium* утилизируют насыщенные линейные и разветвленные углеводороды (Napolitano, Juarez, 1997), что способствует успешному формированию ростковых трубок и аппрессориев и в итоге усиливает вирулентность (Jarrold et al., 2007; Lin et al., 2011). Удаление углеводородов с кутикулы насекомых с помощью растворителей (н-гексан, пентан) приводит к ингибированию прорастания конидий грибов. Жирные кислоты, как правило, демонстрируют фунгистатический эффект, при этом они также могут оказывать влияние на продукцию гидролитических ферментов грибов и дифференциацию инфекционных структур (Ment et al., 2013; Wronska et al., 2018). Помимо углеводородов и жирных кислот в кутикуле насекомых могут детектироваться бензоиноны (и другие альдегиды и кетоны), жирные спирты, терпены и другие вещества, которые ингибируют прорастание энтомопатогенов (Pedrini et al., 2018).

При формировании указанных инфекционных структур и проникновении через кутикулу грибы начинают выделять различные ферменты, гидролизирующие кутикулярные слои, а также токсины. Среди гидролизирующих белков стоит отметить группу ферментов: комплекс цитохромов Р450, эндохитиназ и протеаз. Цитохром

P450-зависимые монооксигеназы грибов участвуют в деградации углеводородов и жирных кислот насекомых. Так, ряд генов цитохрома P450 был охарактеризован для грибов *B. bassiana* (CYP52X1) (Zhang et al., 2012) и *Metarhizium robertsii* J.F. Bisch., S.A. Rehner & Humber (CYP52X2) (Lin et al., 2011). Мутанты с нефункционирующими генами CYP52X1 теряют вирулентность при топикальном заражении насекомых, но сохраняют ее при инъекциях грибов в гемоцель (Zhang et al., 2012), что доказывает важность монооксигеназ при развитии грибов на/в кутикуле. Эндохитиназы действуют непосредственно на хитин, один из основных компонентов кутикулы насекомых. Например, *M. anisopliae* имеет эндохитиназы, кодируемые генами Chit1 (Anwar et al., 2019). Протеазы разрушают белки кутикулы, в первую очередь прокутикулы (St. Leger et al., 1995; 1996; Dhar et al., 2010). В частности, субтилизины семейства Pr1 могут иметь ключевое значение во время проникновения гриба через кутикулу и определять вирулентность видов *Metarhizium* и *Beauveria*. Отметим, что виды грибов с широким кругом хозяев обладают большими спектрами протеаз, липаз, монооксигеназ и других ферментов по сравнению со специализированными видами (Zheng et al., 2011; Xiao et al., 2012; Hu et al., 2014). Ферменты действуют в сочетании с механическим давлением гриба на кутикулу. Показано, что ослабление тургорного давления у *M. robertsii* путем удаления гена MrHex1, связанного с функционированием гифальных септ, приводит к нарушениям в формировании аппрессориев и падению вирулентности при кутикулярном инфицировании насекомых, но не при инъектировании (Tang et al., 2020).

После проникновения через кутикулу в гемоцель развитие грибов происходит в форме гифальных тел. В целях предотвращения действия защитных систем организма, а также действия осмотического давления внутри гемоцеля некоторые грибы экспрессируют ряд генов, отвечающих за синтез осмосенсоров Mos1 (Wang et al., 2008) или кодирующих белок защитного покрытия (Mc11) (Wang, St Leger, 2006). Эффективное поглощение питательных веществ даёт возможность паразитическим грибам быстро увеличивать собственную массу внутри хозяина. В организме насекомых большую роль в успешном развитии гриба начинают играть вторичные метаболиты энтомопатогенов, влияя на выживаемость грибов и на активность физиологических систем организма насекомых (Charnley, 2003; Molnar et al., 2010; Donzelli, Krasnoff, 2016). Причём стоит отметить, что грибы могут продуцировать большое количество вторичных метаболитов, способных влиять на различные физиологические процессы хозяев, ингибировать иммунные реакции, менять поведение насекомых. Например, деструксины (циклические пептидные токсины) *Metarhizium* вызывают нарушение работы кальциевых каналов, функций цитоскелета и вызывают апоптоз гемоцитов, что приводит к значительной супрессии фагоцитоза и инкаспулации (Charnley, 2003; Wang et al., 2012; Lu, St Leger, 2016). Кроме того, деструксины способны ингибировать синтез антимикробных пеп-

тидов, оказывать влияние на экспрессию ингибиторов сериновых протеиназ, подавлять меланизацию и влиять на уровень экспрессии генов, кодирующих антиоксидантные ферменты хозяина (Pal et al., 2007; Han et al., 2013). Однако вклад деструксинов в вирулентность грибов *Metarhizium* остается дискуссионным. В недавних работах было показано, что уровень продукции деструксинов в хозяевах при патогенезах намного ниже доз, необходимых для парализации и гибели хозяев (Rios-Moreno et al., 2017). Ряд авторов регистрировал положительную корреляцию между продукцией деструксинов и уровнем вирулентности по отношению к саранчовым и чешуекрылым (Kershaw et al., 1999; Wang et al., 2012), тогда как другие (Donzelli et al., 2012) показали, что генный нокаут синтеза деструксинов в *M. robertsii* не приводит к снижению вирулентности по отношению к *Spodoptera exigua* (Hbn), *Galleria mellonella* L. и *Tenebrio molitor* L., по сравнению с исходным штаммом. Ряд вторичных метаболитов, по всей видимости, служит для подавления конкурентной бактериальной флоры при развитии микозов. Например, установлено, что ооспореин *B. bassiana* действует как антибактериальный компонент на конечных стадиях развития микоза в вошчинной огневке, позволяя грибу максимально использовать ткани хозяина и затем спорулировать на его поверхности (Fan et al., 2017).

После колонизации тела хозяина гифальными телами в гемоцеле образуется склероций (плотное скопление мицелия), а затем наблюдается обратный рост гиф и формирование дочернего спороношения в виде конидий (для анаморфных форм) или стром с перитециями (для телеоморфных форм) на поверхности хозяина. Интересно, что данный процесс не всегда может быть реализован. Многие генетические дерегуляции могут приводить к нарушению формирования дочернего спороношения и бактериальному распаду трупов (Huang et al., 2015; Fan et al., 2017; Kryukov et al., 2019; Xie et al., 2019). Вероятно, формирование мицелия и спор на погибших от грибной инфекции насекомых, – весьма деликатный процесс, который зависит от многих генетических изменений у грибных патогенов.

Иммунный ответ хозяина

При проникновении через кутикулу и формировании гифальных тел в гемоцеле грибы сталкиваются с иммунной системой насекомых, с гуморальной и клеточной. Эти две системы действуют синхронно, обеспечивая достаточно высокий уровень защиты организма. В первую очередь стоит отметить, что в составе грибных стенок присутствуют компоненты, содержащие β -1,3-гликаны, которые представляют собой паттерны, способные модулировать иммунный ответ насекомых (Hillyer, 2016; Chen, Lu, 2018). Так, β -1,3-гликаны могут связываться β -1,3-гликан распознающими белками (β GRP), также известными как грам-негативные связывающие белки (GNBP), что

приводит к активации профенолоксидазного (ПФО) каскада и синтеза антимикробных пептидов (АМП). В *Drosophila melanogaster* Meigen β -1,3-гликаны распознаются GNBp-3, которые запускают активацию Toll пути (Hoffmann, 2003; Gottar et al., 2006). Считается, что экспрессия АМП, таких как цекропины A1, дрозомицины, мечнико-вины и др., индуцирует защиту против грибной инфекции. У тутового шелкопряда *Bombyx mori* L. имеется четыре β GRP (Tanaka et al., 2008), которые играют важную роль в активации ПФО, в частности β GRP-1 и β GRP-2 связываются с β -1,3-гликаном и вовлекаются в активацию ПФО каскада (Chen, Lu, 2018). β GRP-1 шелкопряда имеет β -1,3-гликан-связывающий домен и глюконаза-подобный домен. Расщепление этого белка хемотрипсином даёт два фрагмента, один с молекулярным весом 20 kDa связывает β -1,3-гликаны, другой 43 kDa, представляющий собой глюконазо-подобный домен, способен активировать ПФО каскада. Истощение β GRP-1 в плазме приводит к существенному снижению активации ПФО каскада гликанами, но восстанавливается при добавлении рекомбинантного β GRP-3, т.е. в активации ПФО каскада принимают участие как β GRP-1, так и β GRP-3 за счёт распознавания β -1,3-гликанов. В результате транскриптомного анализа было установлено, что во время микоза тутового шелкопряда, вызванного энтомопатогенным грибом *B. bassiana*, происходит экспрессия основных генов иммунитета, включая гены, кодирующие морицин, цекропин B, убиквитин, ли-зоцим и предшественник β GRP (Chen, Lu, 2018). Отметим, что экспрессия АМП при микозах может предотвращать вторичные инфекции, в первую очередь, бактериальные. При взаимодействии АМП с грибами в гемолимфе может выбрасываться определённое количество веществ, входящих в состав грибных стенок, которые, в свою очередь, будут обладать иммуномодулирующими свойствами.

Большую роль в защите организма насекомых от грибной инфекции играют активированные кислородные метаболиты (АКМ), в том числе свободные радикалы различной природы, при этом ключевую роль играют полухиноновые радикалы (Slepneva et al., 1999). Так, с помощью ЭПР-спектроскопии с использованием спиновых ловушек мы впрямую зарегистрировали генерацию полухиноновых радикалов в гемолимфе гусениц сибирского шелкопряда *Dendrolimus superans sibiricus* Tschetv. и вошинной огнёвки *G. mellonella* (Slepneva et al., 1999). Причём при остром микозе, вызванном грибом *M. anisopliae* s. l., у личинок *G. mellonella* отмечалось существенное снижение количества образующихся полухиноновых радикалов, как и фенолоксидазной активности в гемолимфе (Slepneva et al., 2003). В результате взаимодействия полухиноновых радикалов с кислородом образуется перекись водорода, которая обладает цитотоксичной активностью, в том числе по отношению к патогенным микроорганизмам (Komarov et al., 2005). Полухиноновые радикалы и радикалы аскорбиновой кислоты были обнаружены с помощью ЭПР-спектроскопии в кишечнике гусениц волнянки *Orgyia*

leucostigma (Smith) и кольчатого шелкопряда *Malacosoma disstria* Hbn. (Barbehenn et al., 2003). Причём тип радикала определялся качеством корма. Кроме того, в гемоцитах насекомых может образовываться оксид азота (монооксид), обладающий высокореакционной активностью (Semenova et al., 2014), в том числе цитотоксичной, и способный влиять на активность фенолоксидаз, в то же время повышая продукцию ДОПА-хрома в гемолимфе насекомых (Sanzhaeva et al., 2016). В кишечнике ряда насекомых пероксидаза опосредует окисление танинов, потом образуется пероксид водорода, а затем в результате взаимодействия пероксида с железом, которое регистрируется в большом количестве в листьях, образуются цитотоксичные радикалы (реакция Фентона) (Barbehenn et al., 2005; Barbehenn, Constabel, 2011). При этом мы можем предположить, что антимикробные пептиды, экспрессируемые в организме при микозах, способны усиливать действие различных активированных кислородных метаболитов.

Выброс большого количества свободных радикалов, как и АКМ, может вызвать окислительный стресс организма (Lushchak, 2014; Forman, 2016). В связи с этим в любом организме, в том числе у насекомых, существует достаточно мощная антиоксидантная система. Эта система представлена комплексом ферментов и неферментных соединений, способных элиминировать высокореакционные продукты. Кроме того, немаловажное значение будет иметь детоксицирующая система, которая будет взаимодействовать с продуктами, которые образуются при различных воздействиях на организм, в том числе при окислительном стрессе и при патологических изменениях.

Мы установили, что развитие микозов у насекомых сопровождается резким увеличением активности ферментов, участвующих в процессах деградации и детоксикации ксенобиотиков различного происхождения. В частности, нами показано, что инфицирование энтомопатогенными грибами гусениц воцинной огневки приводит к изменению спектра и активности глутатион-S-трансфераз, неспецифических эстераз, кислых и щелочных фосфатаз. Изменение активности данных ферментов является неспецифической реакцией организма насекомых и обусловливается повреждением покровных тканей или интоксикацией организма (Serebrov et al., 2001). По-видимому, повышение активности детоксицирующих ферментов при микозах и других инфекциях – это ответная реакция насекомого на интоксикацию организма токсичными метаболитами патогена или продуктами распада тканей хозяина. Подтверждением участия индуцильных ферментов в детоксикационных процессах может служить снижение чувствительности гусениц пчелиной огневки к химическому инсектициду малатиону, в детоксикации которого могут участвовать все изученные нами ферментные системы (Serebrov et al., 2003). Следствием данных изменений является повышение адаптационных возможностей организма насекомых, в частности снижение их чувствительности к химическим инсектицидам. С другой стороны, ингибирование детоксицирующих ферментов резко увеличивает гибель насекомых от грибной инфекции (Serebrov et al., 2006), что служит косвенным доказательством участия детоксицирующих ферментов при формировании

резистентности насекомых к энтомопатогенным грибам, а также открывает новые возможности для создания эффективных комбинированных биопрепаратов на основе энтомопатогенных грибов и ингибиторов детоксицирующих ферментов.

Ключевую роль в защите насекомых от грибов выполняет клеточный иммунный ответ. В первую очередь стоит отметить инкапсуляцию. На первом этапе инкапсуляции гемоциты взаимодействуют с поверхностными структурами грибных паразитов, затем вокруг гифальных тел начинает формироваться многослойная капсула (Chouvenc et al., 2009). При этом внутренние слои гемоцитов разрушаются, в результате выбрасывается большое количество гидролитических ферментов, а также активируется профенолоксидазный каскад. Инкапсуляция тесно связана с процессом меланизации и выбросом АКМ, которые возможно способны уничтожать гифальные тела (Slepneva et al., 2003; Komarov et al., 2005; Semenova et al., 2014). При этом известно, что грибы способны выживать внутри данных капсул и выходить из них за счет действия гидролитических ферментов и продукции токсинов (Wang et al., 2012; Feng et al., 2015). Выживание грибов в меланотической капсule также вероятно может происходить за счёт повышенной экспрессии грибами антиоксидантных ферментов, которые в природной среде активно защищают грибы от внешних факторов, в первую очередь от ультрафиолетового излучения (Xie et al., 2012; Zhang, Feng, 2018). По всей видимости, инкапсуляция является эффективным механизмом инактивации грибов при инфицировании низкими дозами или слабовирулентными штаммами и может приводить либо к остановке патогенеза, либо переходу микоза в персистирующее состояние в организме хозяина (Chouvenc et al., 2009; Kryukov et al., 2018a).

К настоящему времени появляются работы по так называемому патогенному праймированию (priming of pathogen resistance) организма хозяина. Суть его заключается в том, что предварительное инфицирование насекомых сублетальными дозами патогена приводит к повышению устойчивости к более высоким дозам (в некоторых случаях к смертельным дозам) (Mikonranta et al., 2014). Эти авторы считают, что это обусловлено повышенной генерацией АКМ в организме насекомых, хотя до конца механизм этого явления не ясен. По нашему мнению, здесь играют ключевую роль не только радикалы, но и детоксицирующие и антиоксидантные ферменты, уровень и активность которых может меняться при сублетальных воздействиях микроорганизмов на насекомых.

Влияние экологических факторов на физиологические взаимодействия между энтомопатогенными грибами и насекомыми

Успешное развитие грибов в организме насекомых в значительной степени зависит от физиологического состояния хозяев. Вероятно, что в естественных условиях энтомопатогенные аскомицеты наиболее часто поражают насекомых, ослабленных различными стрессовыми воздействиями (Boomsma et al., 2014). Для заражения

насекомых чаще всего необходимы высокие дозы конидий грибов – десятки и сотни тысяч конидий на одну особь (Jaronski, 2010; Ment et al., 2010; Kryukov et al., 2018b). Однако под действием различных стрессирующих факторов или сопутствующих инфекций может происходить многократное повышение чувствительности к грибам и для развития микоза становятся достаточными низкие дозы. В других случаях, напротив, воздействие стрессов или присутствие тех или иных микроорганизмов в хозяине приводит к повышению устойчивости к грибным патогенам. Ниже рассмотрим наиболее хорошо изученные факторы, такие как субоптимальные температуры, токсиканты, сопутствующие инфекции и паразитоиды.

Фактор температуры

Температура – важнейший фактор, влияющий на развитие грибных патогенезов у насекомых. Развитие и исход микоза зависят от двух составляющих – температурного оптимума (и лимитов роста) самого патогена и функционирования защитных систем хозяина. Оптимумы роста большинства энтомопатогенных аскомицетов находятся в диапазоне 20–30 °C с лимитами 8–35 °C, но эти показатели значительно варьируют как у разных видов, так и у разных изолятов в пределах вида (обзор: Vidal, Fargues, 2007). Значение температурной биологии хозяина в развитии грибных болезней экспериментально изучалось преимущественно на моделях с использованием грибов из родов *Metarhizium* и *Beauveria*, а данные, касающиеся более специализированных телеоморфных грибов, практически отсутствуют. В большинстве случаев длительное или кратковременное повышение температуры приводит к повышению клеточного и гуморального иммунитета и, соответственно, повышению устойчивости к энтомопатогенным грибам (Zibaee et al., 2009; Fuller et al., 2011; Catalan et al., 2012; Kryukov et al., 2018a, b; Shamakhi et al., 2019), хотя кратковременный холодовой стресс может также активировать антигрибные защитные системы (Mowlds, Kavanagh, 2008). Напротив, в условиях постоянной пониженной температуры восприимчивость к грибам чаще всего возрастает. Например, ограничение поведенческой терморегуляции у саранчовых приводило к их повышенной восприимчивости к *M. acridum* и *B. bassiana* (Blanford, Thomas, 2001). Ограничение терморегуляции у *Locusta migratoria* L. приводило к более резкому подавлению клеточного иммунитета грибом *M. acridum* по сравнению с особыми, у которых была возможность регулировать температуру (Ouedraogo et al., 2003). Для личинок воцинной огневки показано, что снижение температуры от оптимальной (35 °C) до субоптимальной (25 °C) приводит к усилению восприимчивости к грибу *M. robertsii* в 10 раз (Kryukov et al., 2018b). При понижении температуры у огневки изменялось соотношение эпикутикулярных жирных кислот, нарушились механизмы антигрибной защиты, связанные с активностью фенолоксидаз и уровнем инкапсуляции. Фаллер с соавторами (Fuller et al., 2011) показали на термитах *Nasutitermes acajutlae*

(Holmgren), что температура их гнезд позитивно коррелирует с уровнем фенолоксидазной активности и негативно коррелирует с уровнем восприимчивости к грибу *M. anisopliae*.

Отдельного внимания заслуживает восприимчивость к грибам в состоянии холода-вой диапаузы. Во время этой диапаузы иммунитет насекомых продолжает работать (Nakamura et al., 2011), все же данное состояние, по-видимому, является благоприятным для развития микозов. Так, у сверчка *Gryllus veletis* Alexander & Bigelow во время зимней диапаузы наблюдается снижение уровня меланизации и возрастание восприимчивости к *M. anisopliae* (Ferguson et al., 2018). У личинок *Eurosta solidagnis* (Fitch) в условиях зимней диапаузы устойчивость грибу *Metarhizium brunneum* Petch была сниженной по сравнению с насекомыми, собранными весной и осенью, хотя у *Curculio* sp. наибольшая восприимчивость регистрировалась в осенний период, что также было ассоциировано с низким уровнем меланизации (Ferguson, Sinclair, 2017).

Нами проведена серия экспериментов на личинках вощинной огневки, зараженных грибом с ограниченной специализацией *Cordyceps militaris* (L.) Fr. (Kryukov et al., 2018a, 2020). Эксперименты проводились при 25 °C (активное состояние насекомых) и 15 °C (факультативная диапауза). Личинки были весьма чувствительны к грибу в состоянии диапаузы, тогда как в активном состоянии они были способны «выздоравливать» и успешно завершать метаморфоз. В активном состоянии (25 °C) мы наблюдали повышение уровня фенолоксидаз и инкапсуляции в ответ на инфекцию, тогда как в состоянии диапаузы (15 °C), напротив, регистрировалось падение этих параметров иммунитета (Kryukov et al., 2018a). Кроме того, при высокой температуре регистрировался более высокий подъем экспрессии антигрибных пептидов галиомицина и галлеримицина (Kryukov et al., 2020). Интересно, что в активном состоянии личинок (25 °C) инфекция переходила в персистирующую форму, но могла быть активирована в стадии куколки или имаго, особенно при помещении насекомых в холодные условия (Kryukov et al., 2018a). Мы предположили, что грибы с ограниченной специализацией такие как *C. militaris* имеют менее развитые механизмы управления иммунитетом хозяев по сравнению *Metarhizium* и *Beauveria*, что соотносится с полногеномными исследованиями этих групп грибов (Zheng et al., 2011; Xiao et al., 2012). Возможно, телеоморфные грибы приспособлены к развитию в хозяевах, находящихся именно в стадии диапаузы.

Воздействие токсикантов

Воздействие синтетических или природных инсектицидов, как правило, приводит к усилению восприимчивости насекомых к энтомопатогенным грибам на уровне аддитивного или синергистического эффектов. Причиной этого является ряд изменений как в иммунном ответе, так и в общефизиологических и поведенческих модификаторах.

циях. В обзоре Джеймса и Ксу (James, Xu, 2012) показано влияние растительных и синтетических инсектицидов на параметры иммунитета насекомых: клеточного, в т. ч. активность инкапсуляции и гуморального – экспрессию АМП, активность фенолоксидаз, антиоксидантных, детоксицирующих ферментов. Существует ряд работ по исследованию комбинированного воздействия инсектицидов и энтомопатогенных грибов на физиологические системы насекомых. Хиромори и Нишигаки (Hiromori, Nishigaki, 2001) установили, что синергизм между *M. anisopliae* s. l. и инсектицидами (фенитротион и тефлубензурон) на личинках *Anomala cuprea* Hope ассоциирован с сильным падением активности фенолоксидазы и пула гранулоцитов при совместном действии указанных агентов. Зибае с соавторами (Zibaee et al., 2012) показали, что сочетание аналога ювенильного гормона пирипроксифена и гриба *B. bassiana* приводит к ингибированию ряда параметров клеточного иммунитета и снижению фенолоксидазной активности у клопа *Eurygaster integriceps* Puton. Парк и Ким (Park, Kim, 2011) установили, что метаболит бактериального происхождения бензилиденацитон усиливает восприимчивость личинок совки *S. exigua* к грибу *B. bassiana* на основе нарушения иммунного ответа к микозу со стороны клеточного иммунитета и ряда АМП. Совместное действие инсектицида на основе растительного алкалоида матрин и гриба *Lecanicillium muscarium* R. Zare & W. Gams на белокрылку *Bemisia tabaci* (Gennadius) было изучено Али с соавторами (Ali et al., 2017). Авторы показали, что синергизм обусловлен нарушением ряда антиоксидантных и детоксицирующих реакций, а также ацетилхолинового баланса у насекомых при комбинированном действии матрина и грибной инфекции. Сходные эффекты были выявлены на саранче *L. migratoria* при комбинированном действии рианоида хлорантранилипирол и гриба *M. anisopliae* (Jia et al., 2016). Авторы предположили, что основная причина синергизма связана с нарушением баланса ионов кальция в насекомом-хозяине.

При синергизме между грибами и инсектицидами важную роль играют общезоологические нарушения у насекомых, такие как нарушение питания и отставание в развитии (Furlong, Groden, 2001, 2003; Akhanaev et al., 2017; Fisher et al., 2017). Например, Фишер с соавторами (Fisher et al., 2017) показали, что синергизм в смертности жука *Anoplophora glabripennis* (Motschulsky) при комбинированном воздействии гриба *M. brunneum* и никотиноида имидоклаприда аналогичен таковому при воздействии *M. brunneum* и голодаания. Одной из причин синергизма является то, что действие имидоклаприда на жуков, как и голодаание, предотвращает повышение уровня инкапсуляции, вызываемое грибной инфекцией. Однако под воздействием имидоклаприда данное ингибирование было более сильным, чем при голодаании. Нами в серии работ на личинках колорадского жука показано, что природные и полусинтетические инсектициды (авермектины, фторированные производные усниновой кислоты) являются

ся сильными синергистами грибов *M. robertsii* и *B. bassiana* (Tomilova et al., 2016; Akhanaev et al., 2017; Kryukov et al., 2018c). Среди физиологических изменений мы регистрировали нарушение клеточного иммунного ответа и активации антиоксидантных и детоксицирующих ферментов к грибу под влиянием полулетальных или сублетальных доз этих токсикантов. Однако более существенным фактором, влияющим на усиление восприимчивости к грибу, была задержка в развитии под влиянием инсектицидов, приводящая к «фиксации» на определенной восприимчивой стадии онтогенеза (начало IV личиночного возраста) (Tomilova et al., 2019). Высокая восприимчивость этой стадии была ассоциирована с наибольшим обилием насыщенных углеводородов эпидермы, высокой аттрактивностью кутикулы для конидий, тонкой кутикулой, а также низким уровнем общего числа гемоцитов и инкапсуляции, по сравнению с более поздними стадиями онтогенеза. Таким образом, усиление восприимчивости насекомых к грибам по всей видимости происходит из-за нарушения целого комплекса иммунных реакций в результате воздействия токсикантов. Кроме того, существенную роль здесь играют онтогенетические изменения, наблюдаемые под действием инсектицидов.

Роль сопутствующих инфекций и симбиотических микроорганизмов

Сопутствующие бактериальные патогены могут значительно усиливать восприимчивость насекомых к грибам. Хорошо известно, что суб- и полулетальные дозы бактерии *B. thuringiensis* существенно повышают восприимчивость разных видов Coleoptera и Lepidoptera к грибам *Beauveria* и *Metarhizium* как в лабораторных экспериментах, так и в полевых условиях (Wraight, Ramos, 2005, 2017; Kryukov et al., 2009; Sayed, Behle, 2017). На примере личинок колорадского жука показано, что причинами данного синергизма являются задержка развития под действием бактериоза (Wraight, Ramos, 2005), а также нарушения клеточного иммунного ответа, изменения в активности фенолоксидаз, антиоксидантных и детоксицирующих ферментов под влиянием *B. thuringiensis* (Yaroslavtseva et al., 2017). Микроспоридиозы также повышают чувствительность хозяев к грибным инфекциям *Beauveria* и *Metarhizium*, что показано на саранчовых и чешуекрылых (Tounou et al., 2008; Rahman et al., 2010; Tokarev et al., 2011), хотя иммунный ответ к грибу под действием микроспоридиозов специально не исследовался. Нематоды *Sychnotylenchus* sp., ассоциированные с уссурийским полиграфом *Polygraphus proximus* Blandford, вызывают повышение восприимчивости насекомого-хозяина к грибу *B. bassiana* (Kerchev et al., 2017). При этом у линии полиграфа, зараженной нематодами, отмечен сниженный уровень фенолоксидазной и эстеразной активности по сравнению с линией, свободной от нематод.

При развитии микозов грибы вступают во взаимоотношения с симбиотической флорой хозяина, локализующейся на покровах, в гемоцеле и кишечнике (Boucias

et al., 2018). Эти взаимодействия могут быть прямыми (на основе антагонистических взаимодействий между микроорганизмами) либо опосредованными через реакции гуморального и клеточного иммунитета хозяина. В первом случае бактериальные ассоцианты чаще выступают как часть защитной системы насекомого, во втором – могут приводить как к антагонизму, так и к синергизму с грибным патогеном.

Установлено, что грамположительные бактерии *Bacillus* sp., ассоциированные с кутикулой цикадовых и дельфацид, проявляют антагонизм по отношению к большому количеству изолятов *B. bassiana* и *M. anisopliae* (Toledo et al., 2011, 2015). Большой цикл работ по кутикулярной флоре был проведен на муравьях-листорезах рода *Acromyrmex* (Mattoso et al., 2012; de Souza et al., 2013; Couceiro et al., 2016 и др.). На кутикуле этих муравьев развиваются мутуалистические актинобактерии – *Pseudonocardiaceae*, которые способствуют защите выращиваемых муравьями базидиомицетов (используемых для питания) от специализированных грибов *Escovopsis*, а также от различных энтомопатогенов, включая *Metarhizium*. Поверхностная обработка муравьев антибиотиками повышала восприимчивость муравьев к *Metarhizium*.

Взаимодействия энтомопатогенных грибов с бактериями гемоцеля и кишечника могут быть как антагонистическими, так и синергистическими. Теоретически при развитии микоза гриб должен ингибировать микрофлору хозяина, в особенности ассоциированную с кишечным трактом, поскольку это критично для завершения цикла и образования дочернего поколения гриба (Boucias et al., 2018). Однако экспериментальные данные чаще свидетельствуют о подъеме общего пула кишечных бактерий или отдельных представителей при развитии гриба в кутикуле и гемоцеле (Wei et al., 2017; Ramirez et al., 2018; Xu et al., 2018). На примере имаго комаров *Anopheles* показано, что перкутикулярное инфицирование грибом *B. bassiana* приводит к снижению в кишечнике активности дуалоксидазы (DUOX), ответственной за продукцию АКМ, а также к снижению экспрессии генов кодирующих antimикробные пептиды (Wei et al., 2017). Это сопровождается подъемом численности условных патогенов *Serratia marcescens* и обуславливает их проникновение из кишечника в гемоцель (Wei et al., 2017). Данные процессы способствуют более быстрому развитию грибной инфекции у *Anopheles*. У жуков-короедов *Dendroctonus valens* LeConte перкутикулярное инфицирование конидиями *B. bassiana* приводило к повышению относительного обилия кишечных протеобактерий *Erwinia*, а скармливание данных бактерий аксенным жукам вызывало повышение восприимчивости к грибной инфекции (Xu et al., 2018). Таким образом, в данных взаимоотношениях формируется комплекс прямых и обратных связей, приводящих к синергизму. Гриб способен «манипулировать» кишечной микробиотой через комплекс иммунных реакций хозяина, что приводит к обострению грибной инфекции. Сопоставимые результаты получены Крамс с соавторами (Krambs et al., 2017) на вощинной огневке. Согласно этим данным личинки с обедненной кишечной флорой характеризуются более высоким уровнем инкапсуляции и повышенной экспрессией

АМП в гемолимфе, что может косвенно свидетельствовать о повышении резистентности к грибным инфекциям.

Антагонистические взаимоотношения грибов с кишечными бактериями описаны преимущественно в случаях перорального инфицирования. Например, при подавлении кишечной флоры рыжего таракана *Blatella germanica* (L.) с помощью антибиотиков насекомые становились значительно более восприимчивы к грибу *M. anisopliae* при скармливании конидий (Zhang et al., 2018). Чжоу с соавторами (Zhou et al., 2019) показали, что мухи *Delia antiqua* (Meigen), высоко-резистентные к грибным инфекциям, утрачивают это свойство при ингибировании микрофлоры с помощью антибиотиков. Интересно, что некоторые облигатные внутриклеточные симбионты способны ингибировать развитие микозов. В частности, показано, что присутствие *Wolbachia* может усиливать резистентность дрозофил *D. melanogaster* к грибу *B. bassiana* (Pantaleev et al., 2007). Сходным образом у тлей присутствие эндосимбионтов *Rickettsia* и *Spiroplasma* приводило к повышению устойчивости к энтомофторовому грибу *Pandora neoaphidis* (Remaud. & Hennebert) Humber либо к снижению споруляции этого гриба на трупах тлей (Lukasik et al., 2013).

Воздействие различных биотических и абиотических факторов может приводить к изменению восприимчивости к грибным инфекциям через изменения в микробиоме насекомых. Например, воздействие низких доз нейротоксических инсектицидов (комплекс авермектинов) на личинок комара *Aedes aegypti* (L.) приводит к перестройке микробиома в сторону снижения относительного обилия актинобактерий *Microbacterium paraoxydans* – антагонистов грибов и увеличения относительного обилия некоторых синергистов грибов, таких как *Pseudomonas* sp. (Noskov et al., 2020). Это приводит к более быстрой колонизации гемоцеля личинок гифальными телами *M. robertsii* и, соответственно, более быстрой гибели насекомых. В целом изучение взаимодействий между патогенными грибами и симбионтной микрофлорой насекомых находится на начальных этапах и требует более глубоких исследований.

Паразитоиды

Конкурентные взаимодействия между паразитоидами и энтомопатогенными грибами чаще всего складываются в пользу грибов, при этом исход в этих отношениях зависит от последовательности и интервала времени между откладкой яиц паразитоидом в/на хозяина и его инфицированием грибами (Roy, Pell, 2000). Как правило, чем меньше интервал между откладкой яиц и последующим инфицированием грибом, тем меньше шансов у паразитоида пройти успешное развитие. При этом паразитоиды часто не способны дифференцировать зараженных и не зараженных грибами хозяев, особенно если речь идет о ранних стадиях развития микозов (Baverstock et al., 2010). Паразитоиды выделяют различные антибиотические коктейли для подавления патогенных и симбиотических микроорганизмов хозяина (Weiss et al., 2014). С другой стороны,

эти метаболиты приводят к резкому подавлению клеточного и гуморального иммунитета хозяев, что необходимо для развития паразитоидов (Richards, 2012; Becchimanz et al., 2017). Кроме того, паразитоидные инвазии могут приводить к морфологическим и биохимическим изменениям кутикулы насекомых-хозяев (El-Sufty, Fuhrer, 1981b). Указанные физиологические изменения у хозяев могут делать их весьма «легкодоступными» для энтомопатогенных грибов. Усиление восприимчивости насекомых к грибам под влиянием паразитоидов (Braconidae и Ichneumonidae), их ядов или отдельных компонентов ядов показано в ряде работ (King, Bell, 1978; El-Sufty, Fuhrer, 1981a; Dani et al., 2004; Dos Santos et al., 2006; Richards et al., 2011). Согласно нашим исследованиям парализация личинок воцинной огневки ядом эктопаразитоида *Habrobracon hebetor* (Say) приводит к резкому усилению восприимчивости к энтомопатогенным грибам *Beauveria*, *Metarhizium* и *Isaria* (Kryukov et al., 2013). В частности, восприимчивость парализованных личинок к грибу *B. bassiana* увеличивалась почти в пять тысяч раз. Последующие исследования выявили целый комплекс механизмов данного повышения чувствительности. Было установлено, что у парализованных личинок изменяются фунгистатические свойства кутикулы, что обуславливает высокую скорость прорастания гриба (Kryukov et al., 2018d). У парализованных личинок наблюдалось резкое падение клеточного иммунитета, в частности – снижение способности гемоцитов к адгезии, падение их выживаемости (Kryukova et al., 2015) и падение уровня инкапсуляции (Kryukov et al., 2018d). Интересно, что при парализации паразитоидом у личинок огневки также наблюдались резкие изменения в бактериальном сообществе кишечника, выражавшиеся в подъеме численности *Enterobacter* sp., *Serratia marcescens* и *Enterococcus faecalis* (Polenogova et al., 2019). Скармливание данных бактерий личинкам огневки приводило к увеличению чувствительности к *B. bassiana*, но физиологические механизмы данного повышения остались не выясненными. Мы предположили, что *H. hebetor* имеет слабые механизмы избегания конкуренции с энтомопатогенными грибами, поскольку для паразитоида характерна весьма короткая по времени личиночная стадия (3–4 суток), которая может опережать развитие гриба. Поскольку самки паразитоида парализуют избыточное количество личинок (больше, чем необходимо для откладки яиц), и личинки не употребляют в пищу хозяина полностью, парализованные насекомые могут представлять собой весьма доступный ресурс для развития микроорганизмов, в том числе энтомопатогенных грибов (Kryukov et al., 2018d).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Энтомопатогенные аскомицеты характеризуются большим и сложным комплексом биохимических механизмов, направленных на развитие в насекомых, а насекомые-хозяева имеют разнообразные и многоступенчатые механизмы защиты от этих патогенов. Биотические и абиотические факторы могут оказывать сильное влияние на взаимодействия между насекомыми и энтомопатогенными грибами в пользу первого

либо второго звена системы. Вопросы, касающиеся влияния факторов внешней и внутренней среды насекомых на их восприимчивость к грибам, изучены недостаточно, и особенно это касается биотических воздействий. Причины усиления чувствительности насекомых к грибам под влиянием субоптимальных температур, инсектицидов, сопутствующих инфекций и паразитоидов имеют комплексную основу, выражющуюся в одновременном подавлении многих защитных систем, а также в онтогенетических нарушениях. Данная особенность может быть важной для развития подходов к биологическому контролю хозяйственно значимых видов. Вероятно, общее угнетение организма насекомых может быть более эффективным, чем ингибирование конкретных звеньев иммунитета, поскольку у хозяев могут проявляться различные компенсаторные механизмы защиты. Поэтому последующие исследования могут быть направлены на ингибирование физиологических механизмов, определяющих широкий спектр защитных реакций насекомых против микроорганизмов.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского Научного Фонда (грант № 19-14-00138). Анализ влияния сопутствующих инфекций и симбионтов на устойчивость насекомых к грибам выполнен при поддержке гранта этого же фонда (№ 20-74-10043).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Борисов Б.А., Серебров В.В., Новикова И.И., Бойкова И.В. 2001. Энтомопатогенные аскомицеты и дейтеромицеты. В кн.: Глупова В.В. (ред.). Патогены насекомых: структурные и функциональные аспекты. М., Круглый год, 352–427.
- Коваль Э.З. 1984. Клавиципильные грибы СССР. Киев, Наукова Думка, 287 с.
- Akhanaev Yu.B., Tomilova O.G., Yaroslavtseva O.N., Duisembekov B.A., Kryukov V.Yu., Glupov V.V. 2017. Combined action of the entomopathogenic fungus *Metarhizium robertsii* and avermectins on the larvae of the Colorado potato beetle *Leptinotarsa decemlineata* (Say) (Coleoptera, Chrysomelidae). Entomological Review97: 158–165. DOI: 10.1134/S0013873817020026
- Ali1 S., Zhang C., Wang Z., Wang X.-M., Wu J.-H., Cuthbertson A.G.S., Shao Z., Qiu B.-L. 2017. Toxicological and biochemical basis of synergism between the entomopathogenic fungus *Lecanicillium muscarium* and the insecticide matrine against *Bemisia tabaci* (Gennadius). Scientific Reports, 7: 46558. DOI: 10.1038/srep46558
- Anwar W., Javed M.A., Shahid A.A.K., Akhter A., Rehman M.Z.U., Hameed U., Iftikhar S., Haider M.S. 2019. Chitinase genes from *Metarhizium anisopliae* for the control of whitefly in cotton. Royal Society Open Science 6 (8). DOI:10.1098/rsos.19412
- Barbehenn R.V., Poopat U., Spencer B. 2003. Semiquinone and ascorbyl radicals in the gut fluids of caterpillars measured with EPR spectrometry. Insect Biochemistry and Molecular Biology 33 (1): 125–130. DOI: 10.1016/s0965-1748(02)00183-2
- Barbehenn R.V., Dodick T., Poopat U. 2005. Fenton-type reactions and iron concentrations in the midgut fluids of tree-feeding caterpillars. Archives of Insect Biochemistry and Physiology 60 (1): 32–43. DOI: 10.1002/arch.20079

Barbehenn R.V., Constabel C.P. 2011. Tannins in plant-herbivore interactions. *Phytochemistry* 72 (13): 1551–1565.

DOI: 10.1016/j.phytochem.2011.01.040

Barelli L., Padilla-Guerrero I.E., Bidochka M.J. 2011. Differential expression of insect and plant specific adhesin genes, Mad1 and Mad2, in *Metarhizium robertsii*. *Fungal Biology* 115 (11): 1174–1185. DOI: 10.1015/j.funbio.2011.08.003

Baverstock J., Roy H.E., Pell J.K. 2010. Entomopathogenic fungi and insect behaviour: from unsuspecting hosts to targeted vectors. *BioControl* 55: 89–102. DOI: 10.1007/978-90-481-3966-8_7

Bayry J., Aimanianda V., Guijarro J.I., Sunde M., Latge J.P. 2012. Hydrophobins—Unique Fungal Proteins. *PLoS Pathogen* 8 (5). DOI: 10.1371/journal.ppat.1002700

Becchimanza A., Avolio M., Di Leli I., Marinelli A., Varricchio P., Grimaldi A., de Eguileor M., Pennacchio F., Caccia S. 2017. Host regulation by the ectophagous parasitoid wasp *Bracon nigricans*. *Journal of Insect Physiology* 101: 73–81. DOI: 10.1016/j.jinsphys.2017.07.002

Blanford S., Thomas M.B., 2001. Host thermal biology: the key to understanding host-pathogen interactions and microbial pest control? *Agricultural and Forest Entomology* 1 (3): 195–202. DOI: 10.1046/j.1461-9563.1999.00027.x

Boomsma J.J., Jensen A.B., Meyling N.V., Eilenberg J. 2014. Evolutionary Interaction Networks of Insect Pathogenic Fungi. *Annual Review of Entomology* 59: 467–485. DOI: 10.1146/annurev-ento-011613-162054

Boucias D.G., Zhou Y., Huang S., Keyhani N.O. 2018. Microbiota in insect fungal pathology. *Applied Microbiology and Biotechnology* 102: 5873–5888. DOI: 10.1007/s00253-018-9089-z

Catalan T.P., Wozniak A., Niemeyer H.M., Kalergis A.M., Bozinovic F. 2012. Interplay between thermal and immune ecology: Effect of environmental temperature on insect immune response and energetic costs after an immune challenge. *Journal of Insect Physiology* 58 (3): 310–317. DOI: 10.1016/j.jinsphys.2011.10.001

Charnley A.K. 2003. Fungal pathogens of insects: cuticle degrading enzymes and toxins. *Advances in Botanical Research* 40: 241–321. DOI: 10.1016/S0065-2296(05)40006-3

Chen K., Lu Z. 2018. Immune responses to bacterial and fungal infections in the silkworm, *Bombyx mori*. *Developmental and Comparative Immunology* 83: 3–11. DOI: 10.1016/j.dci.2017.12.024

Chouenc T., Su N.-Y., Robert A. 2009. Cellular encapsulation in the eastern subterranean termite, *Reticulitermes flavipes* (Isoptera), against infection by the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Journal of Invertebrate Pathology* 101 (3): 234–241. DOI: 10.1016/j.jip.2009.05.008

Couceiro J.D., Marcelino W.L., Amaral K.D., Gandra L.C., de Souza D.J., Della Lucia T.M.C. 2016. Effects of entomopathogenic fungi on the mortality and immune system of the leaf-cutting ant *Acromyrmex subterraneus subterraneus*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 161 (2): 152–159. DOI: 10.1111/eea.12500

Dani M.P., Richards E.H., Edwards J.P. 2004. Venom from the pupal endoparasitoid, *Pimpla hypochondriaca*, increases the susceptibility of larval *Lacanobia oleracea* to the entomopathogens *Bacillus cereus* and *Beauveria bassiana*. *Journal of Invertebrate Pathology* 86: 19–25. DOI: 10.1016/j.jip.2004.03.007

de Souza D.J., Lenoir A., Kasuya M.C.M., Ribeiro M.M.R., Devers S., Couceiro J.D., Della Lucia T.M.C. 2013. Ectosymbionts and immunity in the leaf-cutting ant *Acromyrmex subterraneus subterraneus*. *Brain Behavior and Immunity* 28: 182–187. DOI: 10.1016/j.bbi.2012.11.014

Dhar P., Kaur G. 2010. Cuticle-degrading proteases produced by *Metarhizium anisopliae* and their induction in different media. *Indian Journal of Microbiology* 50 (4): 449–455. DOI: 10.1007/s12088-011-0098-1

Donzelli B.G.G., Krasnoff S.B., Sun-Moon Y., Churchill A.C.L., Gibson D.M. 2012. Genetic basis of destruxin production in the entomopathogen *Metarhizium robertsii*. *Current Genetics* 58: 105–116. DOI: 10.1007/s00294-012-0368-4

- Donzelli B.G.G., Krasnoff S.B. 2016. Molecular genetics of secondary chemistry in *Metarhizium* fungi. Advances in Genetics 96: 365–436. DOI: 10.1016/bs.adgen.2016.01.005
- Dos Santos H.J.G., Marques E.J., Barros R., Gondim M.G.C. 2006. Interaction of *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok., *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. and the parasitoid *Oomyzus sokolowskii* (Kurdjumov) (Hymenoptera: Eulophidae) with larvae of diamondback moth, *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Plutellidae). Neotropical Entomology 35: 241–245. DOI: 10.1590/S1519-566X2006000200013
- El-Sufy R., Fuhrer E. 1981a. Wechselbeziehungen zwischen *Pieris brassicae* L. (Lep., Pieridae), *Apanteles glomeratus* L. (Hym., Braconidae) und dem Pilz *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. Journal of Applied Entomology 92: 321–329.
- El-Sufy R., Fuhrer E. 1981b. Parasitare veränderungen der wirtskutikula bei *Pieris brassicae* und *Cydia pomonella* durch entomophage endoparasiten. Entomologia Experimentalis et Applicata 30: 134–139. DOI: 10.1111/j.1570-7458.1981.tb03087.x
- Fan Y., Liu X., Keyhani N. O., Tang G., Pei Y., Zhang W., S. Tong. 2017. Regulatory cascade and biological activity of *Beauveria bassiana* oosporein that limits bacterial growth after host death. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 114 (9): 1578–1586. DOI: 10.1073/pnas.1616543114
- Feng P., Shang Y., Cen K., Wang C. 2015. Fungal biosynthesis of the bibenzoquinone oosporein to evade insect immunity. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 112 (36): 11365–11370. DOI: 10.1073/pnas.1503200112
- Ferguson L.V., Dhakal P., Lebennon J.E., Heinrichs D.E., Bucking C., Sinclair B.J. 2018. Seasonal shifts in the insect gut microbiome are concurrent with changes in cold tolerance and immunity. Functional Ecology 32 (10): 2357–2368. DOI: 10.1111/1365-2435.13153
- Ferguson L.V., Sinclair B.J. 2017. Insect immunity varies idiosyncratically during overwintering. Journal of Experimental Zoology 327 (5): 222–234. DOI: 10.1002/jez.2067
- Fisher J.J., Castrillo L.A., Donzelli B.G.G., Hajek A.E. 2017. Starvation and imidacloprid exposure influence immune response by *Anoplophora glabripennis* (coleoptera: cerambycidae) to a fungal pathogen. Journal of Economic Entomology 110 (4): 1451–1459. DOI: 10.1093/jee/tox124
- Forman H.J. 2016. Redox signaling: An evolution from free radical stoaging. Free Radical Biology and Medicine 97: 398–407. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2016.07.003
- Fuller C.A., Postava-Davignon M.A., West A., Rosengaus R.B. 2011. Environmental conditions and their impact on immunocompetence and pathogen susceptibility of the Caribbean termite *Nasutitermes acajutlae*. Ecological Entomology 36 (4): 459–470. DOI: 10.1111/j.1365-2311.2011.01289.x
- Furlong M.J., Groden E. 2001. Evaluation of synergistic interactions between the Colorado potato beetle (Coleoptera: Chrysomelidae) pathogen *Beauveria bassiana* and the insecticides, imidacloprid, and cyromazine. Journal of Economic Entomology 94 (2): 344–356. DOI: 10.1603/0022-0493-94.2.344
- Furlong M.J., Groden E. 2003. Starvation induced stress and the susceptibility of the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata*, to infection by *Beauveria bassiana*. Journal of Invertebrate Pathology 83 (2): 127–138. DOI: 10.1016/S0022-2011(03)00066-1
- Gottar M., Gobert V., Matskevich A.A., Reichhart J.M., Wang C., Butt T.M., Belvin M., Hoffmann J.A., Ferrandon D. 2006. Dual detection of fungal infections in *Drosophila* via recognition of glucans and sensing of virulence factors. Cell 127 (7): 1425–1437. DOI: 10.1016/j.cell.2006.10.046
- Han P., Jin F., Dong X., Fan J., Qiu B., Ren S. 2013. Transcript and protein profiling analysis of the destruxin A – induced response in larvae of *Plutella xylostella*. PLoS ONE 8 (4). DOI: e60771. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0060771>

- Hillyer J.F. 2016. Insect immunology and hemopoiesis. *Developmental and Comparative Immunology* 58: 102–118. DOI: 10.1016/j.dci.2015.12.006
- Hiromori H., Nishigaki. 2001. Factor analysis of synergistic effect between the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* and synthetic insecticides. *Applied Entomology and Zoology* 36 (2): 231–236. DOI: 10.1303/aez.2001.231
- Hoffmann J.A. 2003. The immune response of *Drosophila*. *Nature* 426: 33–38. DOI: 10.1038/nature02021
- Hu X., Xiao G. H., Zheng P., Shang Y. F., Su Y., Zhang X.Y., Liu X.Z., Zhan S., St Leger R.J., Wang C.S. 2014. Trajectory and genomic determinants of fungal – pathogen speciation and host adaptation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111: 16796–16801. DOI: 10.1073/pnas.1412662111
- Huang W., Shang Y., Chen P., Gao Q., Wang C. 2015. MrpacC regulates sporulation, insect cuticle penetration and immune evasion in *Metarhizium robertsii*. *Environmental Microbiology* 17(4): 994–1008. DOI: 10.1111/1462-2920.12451
- James R.R., Xu J. 2012. Mechanisms by which pesticides affect insect immunity. *Journal of Invertebrate Pathology* 109 (2): 175–182. DOI: 10.1016/j.jip.2011.12.005
- Jaronski S.T. 2010. Ecological factors in the inundative use of fungal entomopathogens. *BioControl* 55: 159–185. DOI: 10.1007/s10526-009-9248-3
- Jarrold S.L., Moore D., Potter U., Charnley A.K. 2007. The contribution of surface waxes to pre-penetration growth of an entomopathogenic fungus on host cuticle. *Mycological Research* 111 (2): 240–249. DOI: 10.1016/j.mycres.2006.10.007
- Jia M., Cao G., Li Y., Tu X., Wang G., Nong X., Whitman D.W., Zhang Z. 2016. Biochemical basis of synergism between pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* and insecticide chlorantraniliprole in *Locusta migratoria* (Meyen). *Scientific Reports* 6: 28424. DOI: 10.1038/srep28424
- Jiang Z., Ligoxygakis P., Xia Y. 2020. HYD3, a conidial hydrophobin of the fungal entomopathogen *Metarhizium acridum* induces the immunity of its specialist host locust. *BioRxiv* (The preprint server for biology) DOI: 10.1101/2020.06.13.149757
- Kepler R.M., Luangsa-ard J.J., Hywel-Jones N.L., Quandt C.A., Sung G-H., Rehner S.A., Aime M.C., Henkel T.W., Sanjuan T., Zare R., Chen M., Li Z., Rossman A.Y., Spatafora J.W., Shrestha B. 2017. A phylogenetically-based nomenclature for *Cordycipitaceae* (*Hypocreales*). *IMA Fungus* 8(2): 335–353. DOI: 10.5598/imafungus.2017.08.02.08
- Kerchev I.A., Kryukova N.A., Kryukov V.Yu., Glupov V.V. 2017. Entomoparasitic nematodes *Sychnotylenchus* sp. (Anguinidae) on the four-eyed fir bark beetle *Polygraphus proximus*: effects on the host's immunity and its susceptibility to *Beauveria bassiana*. *Invertebrate Survival Journal* 14: 324–329. DOI: 10.25431/1824-307X/isj.v14i1.324-329
- Kershaw M.J., Moorhouse E.R., Bateman R., Reynolds S.E., Charnley A.K. 1999. The role of destruxins in the pathogenicity of *Metarhizium anisopliae* for three species of insect. *Journal of Invertebrate Pathology* 74(3): 213–223. DOI: 10.1006/jipa.1999.4884
- Keyhani N. 2018. Lipid biology in fungal stress and virulence: Entomopathogenic fungi. *Fungal Biology* 122 (6): 420–429. DOI: 10.1016/j.funbio.2017.07.003
- King, E.G., Bell, J.V. 1978. Interactions between a braconid, *Microplitis croceipes*, and a fungus, *Nomuraea rileyi*, in laboratory-reared bollworm larvae. *Journal of Invertebrate Pathology* 31 (3): 337–340. DOI: 10.1016/0022-2011(78)90225-2

- Komarov D.A., Slepneva I.A., Glupov V.V., Khramtsov V.V. 2005. Superoxide and hydrogen peroxide formation during enzymatic oxidation of DOPA by phenoloxidase. Free Radical Research 39: 853–858. DOI: 10.1080/10715760500166693
- Krams I.A., Kecko S., Joers P., Trakimas G., Elferts D., Krams R., Luoto S., Rantala M.J., Inashkina I., Gudra D., Fridmanis D., Contreras-Garduno J., Grantiņa-Ieviņa L., Krama T. 2017. Microbiome symbionts and diet diversity incur costs on the immune system of insect larvae. Journal of Experimental Biology 220: 4204–4212. DOI: 10.1242/jeb.169227
- Kryukov V.Yu., Khodyrev V.P., Yaroslavtseva O.N., Kamenova A.S., Duisembekov B.A., Glupov V.V. 2009. Synergistic action of entomopathogenic hyphomycetes and the bacteria *Bacillus thuringiensis* ssp. *morrisoni* in the infection of Colorado potato beetle *Leptinotarsa decemlineata*. Applied Biochemistry and Microbiology 45 (5): 511–516. DOI: 10.1134/S000368380905010X
- Kryukov V.Yu., Kryukova N.A., Glupov V.V. 2013. Susceptibility of *Galleria mellonella* larvae to anamorphic entomopathogenic ascomycetes under envenomation and parasitization by *Habrobracon hebetor*. Russian Journal of Ecology 44 (1): 89–92. DOI: 10.1134/S1067413613010074
- Kryukov V.Yu., Tomilova O.G., Yaroslavtseva O.N., Wen T.C., Kryukova N.A., Polenogova O.V., Tokarev Y.S., Glupov V.V. 2018a. Temperature adaptations of *Cordyceps militaris*, impact of host thermal biology and immunity on mycosis development. Fungal Ecology 35: 98–107. DOI: 10.1016/j.funeco.2018.07.003
- Kryukov V.Y., Yaroslavtseva O.N., Whitten M.M.A., Tyurin M.V., Ficken K.J., Greig C., Melo N.R., Glupov V.V., Dubovskiy I.M., Butt T.M. 2018b. Fungal infection dynamics in response to temperature in the lepidopteran insect *Galleria mellonella*. Insect Science 25 (3): 454–466. DOI: 10.1111/1744-7917.12426
- Kryukov V.Yu., Tomilova O.G., Luzina O.A., Yaroslavtseva O.N., Akhanaev Y.B., Tyurin M.V., Duisembekov B.A., Salakhutdinov N.F., Glupov V.V. 2018c. Effects of fluorine containing usnic acid and fungus *Beauveria bassiana* on the survival and immune–physiological reactions of Colorado potato beetle larvae. Pest Management Science 74 (3): 598–606. DOI: 10.1002/ps.4741
- Kryukov V.Yu., Kryukova N.A., Tyurin M.V., Yaroslavtseva O.N., Glupov V.V. 2018d. Passive vectoring of entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* among the wax moth *Galleria mellonella* larvae by the ectoparasitoid *Habrobracon hebetor* females. Insect Science 25 (4): 643–654. DOI: 10.1111/1744-7917.12457
- Kryukov V. Y., Kabilov M. R., Smirnova N., Tomilova O. G., Tyurin M. V., Akhanaev Y. A., Polenogova O. V., Danilov V. P., Zhangissina S. K., Alikina T., Yaroslavtseva O. N., Glupov V. V. 2019. Bacterial decomposition of insects post-*Metarhizium* infection: Possible influence on plant growth. Fungal Biology 123 (12): 927–935. DOI: 10.1016/j.funbio.2019.09.012
- Kryukov V., Kosman E., Tomilova O., Polenogova O., Rotskaya U., Tyurin M., Alikina T., Yaroslavtseva O., Kabilov M., Glupov V. 2020 Interplay between Fungal Infection and Bacterial Associates in the Wax Moth *Galleria mellonella* under Different Temperature Conditions Journal of Fungi 6(3), 170. <https://doi.org/10.3390/jof6030170>
- Kryukova N.A., Chertkova E.A., Semenova A.D., Glazachev Y.I., Slepneva I.A., Glupov V.V. 2015. Venom from the ectoparasitic wasp *Habrobracon hebetor* activates calcium-dependent degradation of *Galleria mellonella* larval hemocytes. Archives of Insect Biochemistry and Physiology 90 (3): 117–130. DOI: 10.1002/arch.21247
- Li J., Ying S.-H., Shan L.-T., Feng M.-G. 2010. A new non-hydrophobic cell wall protein (CWP10) of *Metarhizium anisopliae* enhances conidial hydrophobicity when expressed in *Beauveria bassiana*. Applied Microbiology and Biotechnology 85: 975–984. DOI:10.1007/s00253-009-2083-8

- Lin L., Fang W., Liao X., Wang F., Wei D., St. Leger R. J. 2011. The MrCYP52 cytochrome P450 monooxygenase gene of *Metarhizium robertsii* is important for utilizing insect epicuticular hydrocarbons. *PLoS ONE* 6 (12): e28984. DOI: 10.1371/journal.pone.0028984
- Lu H.-L., St.Leger R.J. 2016. Insect immunity to entomopathogenic fungi. *Advances in Genetics* 94: 254–286. DOI: 10.1016/bs.adgen.2015.11.002
- Lukasik P., Guo H., Van Asch M., Ferrari J., Godfray H.C.J. 2013. Protection against a fungal pathogen conferred by the aphid facultative endosymbionts *Rickettsia* and *Spiroplasma* is expressed in multiple host genotypes and species and is not influenced by co-infection with another symbiont. *Journal of Evolutionary Biology* 26 (12): 2654–2661. DOI: 10.1111/jeb.12260
- Lushchak V.I. 2014. Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. *Chemico-Biological Interactions* 224: 164–175. DOI: 10.1016/j.cbi.2014.10.016
- Mannino M.C., Huarte-Bonnet C., Davyt-Colo D., Pedrini N. 2019. Is the insect cuticle the only entry gate for fungal infection? Insights into alternative modes of action of entomopathogenic fungi. *Journal of Fungi* 5 (2): 33. DOI: 10.3390/jof5020033
- Mattoso T.C., Moreira D.D.O., Samuels R.I. 2012. Symbiotic bacteria on the cuticle of the leaf-cutting ant *Acromyrmex subterraneus* subterraneus protect workers from attack by entomopathogenic fungi. *Biology Letters* 8 (3): 461–464. DOI: 10.1098/rsbl.2011.0963
- Ment D., Gindin G., Rot A., Soroker V., Glazer I., Barel S., Samish M. 2010. Novel technique for quantifying adhesion of *Metarhizium anisopliae* conidia to the tick cuticle. *Applied and Environmental Microbiology* 76 (1): 3521–3528. DOI: 10.1128/AEM.02596-09
- Ment D., Gindin G., Rot A., Eshel D., Teper-Bamnolker P., Ben-Ze'ev I., Glazer I., Samish M. 2013. Role of cuticular lipids and water-soluble compounds in tick susceptibility to *Metarhizium* infection. *Biocontrol Science and Technology* 23 (8): 956–967. DOI: 10.1080/09583157.2013.811217
- Mikonranta L., Mappes J., Kaukonen M., Freitak D. 2014. Insect immunity: oral exposure to a bacterial pathogen elicits free radical response and protects from a recurring infection. *Frontiers in Zoology* 11 (23). DOI: 10.1186/1742-9994-11-23
- Molnar I., Gibson D. M., Krasnoff S. B. 2010. Secondary metabolites from entomopathogenic Hypocrealean fungi. *Natural Product Reports* 27: 1241–75. DOI 10.1039/c001459c
- Mowlds P., Kavanagh K. 2008. Effect of pre-incubation temperature on susceptibility of *Galleria mellonella* larvae to infection by *Candida albicans*. *Mycopathologia* 165: 5–12. DOI: 10.1007/s11046-007-9069-9
- Nakamura A., Miyado K., Takezawa Y., Ohnami N., Sato M., Ono C., Harada Y., Yoshida K., Kawano N., Kanai S., Miyado M., Umezawa A. 2011. Innate immune system still works at diapause, a physiological state of dormancy in insects. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 410 (2): 351–357. DOI: 10.1016/j.bbrc.2011.06.015
- Napolitano R., Juarez M.P. 1997. Entomopathogenous fungi degrade epicuticular hydrocarbons of *Triatoma infestans*. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 344 (1): 208–214. DOI: 10.1006/abbi.1997.0163
- Noskov Y.A., Kabilov M.R., Polenogova O.V., Yurchenko Y.A., Belevich O.E., Yaroslavtseva O.N., Alikina T.Y., Byvaltsev A.M., Rotskaya U.N., Morozova V.V., Glupov V.V., Kryukov V.Y. 2020. A neurotoxic insecticide promotes fungal infection in *Aedes aegypti* larvae by altering the bacterial community. *Microbial Ecology* (in print) DOI: 10.1007/s00248-020-01567-w
- Ortiz-Urquiza A., Keyhani N.O. 2013. Action on the surface: entomopathogenic fungi versus the insect cuticle. *Insects* 4 (3): 357–374. DOI: 10.3390/insects4030357

- Ouedraogo R.M., Cusson M., Goettel M.S., Brodeur J. 2003. Inhibition of fungal growth in thermoregulating locusts, *Locusta migratoria*, infected by the fungus *Metarhizium anisopliae* var *acridum*. Journal of Invertebrate Pathology 82 (2): 103–109. DOI: 10.1016/S0022-2011(02)00185-4
- Pal S., St. Leger R.J., Wu L.P. 2007. Fungal peptide Destruxin A plays a specific role in suppressing the innate immune response in *Drosophila melanogaster*. Journal of Biological Chemistry 282: 8969–8977. DOI:10.1074/jbc.M605927200
- Panteleev D.Y., Goryacheva I.I., Andrianov B.V., Reznik N.L., Lazebny O.E., Kulikov A.M. 2007. The endosymbiotic bacterium *Wolbachia* enhances the nonspecific resistance to insect pathogens and alters behavior of *Drosophila melanogaster*. Russian Journal of Genetics 43 (9): 1066–1069. DOI: 10.1134/S1022795407090153
- Park J., Kim Y. 2011. Benzylideneacetone suppresses both cellular and humoral immune responses of *Spodoptera exigua* and enhances fungal pathogenicity. Journal of Asia-Pacific Entomology 14 (4): 423–427. DOI: 10.1016/j.aspen.2011.06.001
- Pedrini N. 2018. Molecular interactions between entomopathogenic fungi (Hypocreales) and their insect host: Perspectives from stressful cuticle and hemolymph battlefields and the potential of dual RNA sequencing for future studies. Fungal Biology 122 (6): 538–545. DOI: 10.1016/j.funbio.2017.10.003
- Pedrini N., Crespo R., Juarez M.P. 2007. Biochemistry of insect epicuticle degradation by entomopathogenic fungi. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology 146: 124–137. DOI: 10.1016/j.cbpc.2006.08.003
- Polenogova O.V., Kabilov M.R., Tyurin M.V., Rotskaya U.N., Krivopalov A.V., Morozova V.V., Mozhaitsseva K., Kryukova N.A. , Alikina T., Kryukov V.Yu., Glupov V.V. 2019. Parasitoid envenomation alters the *Galleria mellonella* midgut microbiota and immunity, thereby promoting fungal infection. Scientific Reports 9: 4012. DOI: 10.1038/s41598-019-40301-6
- Rahman K.M.A., Barta M., Cagan L. 2010. Effects of combining *Beauveria bassiana* and *Nosema pyrausta* on the mortality of *Ostrinia nubilalis*. Central European Journal of Biology 5 (4): 472–480. DOI: 10.2478/s11535-010-0035-z
- Ramirez J.L., Dunlap C.A., Muturi E.J., Barletta A.B.F., Rooney A.P. 2018. Entomopathogenic fungal infection leads to temporospatial modulation of the mosquito immune system. Plos Neglected Tropical Diseases 12 (4): e0006433. DOI: 10.1371/journal.pntd.0006433
- Richards E.H. 2012. Salivary secretions from the ectoparasitic wasp, *Eulophus pennicornis* contain hydrolases, and kill host hemocytes by apoptosis. Archives of Insect Biochemistry and Physiology 79 (2): 61–74. DOI: 10.1002/arch.21006
- Richards E.H., Bradish H., Dani M. P., Pietravalle S., Lawson A. 2011. Recombinant immunosuppressive protein from *Pimpla hypochondrica* venom (RvpR1) increases the susceptibility of *Mamestra brassicae* larvae to the fungal biological control agent, *Beauveria bassiana*. Archives of Insect Biochemistry and Physiology 78 (3): 119–131. DOI: 10.1002/arch.20447
- Rios-Moreno A., Garrido-Jurado I., Raya-Ortega M.C., Quesada-Moraga E.2017. Quantification of fungal growth and destruxin A during infection of *Galleria mellonella* larvae by *Metarhizium brunneum*. Journal of Invertebrate Pathology 149: 29–35. DOI: 10.1016/j.jip.2017.06.007
- Roberts D.W., Humber R.A. 1981. Entomogenous Fungi. In: Cole G.T., Kendrick B. (eds). Biology of Conidial Fungi. New York: Academic Press 201–236.
- Roy H.E., Pell J.K. 2000. Interactions between entomopathogenic fungi and other natural enemies: implications for biological control. Biocontrol Science and Technology 10 (6): 737–752. DOI: 10.1080/09583150020011708

- Sanzhaeva U., Vorontsova Y., Glazachev Y., Slepneva I. 2016. Dual effect of nitric oxide on phenoloxidase-mediated melanization. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* 31 (6): 1063–1068. DOI: 10.3109/14756366.2015.1088843
- Sayed A.M.M., Behle R.W. 2017. Evaluating a dual microbial agent biopesticide with *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* and *Beauveria bassiana* blastospores. *Biocontrol Science and Technology* 27 (4): 461–474. DOI: 10.1080/09583157.2017.1303662
- Semenova A.D., Glazachev Y.I., Slepneva I.A., Glupov V.V. 2014. Quantitative determination of nitric oxide production in haemocytes: Nitrite reduction activity as a potential pathway of NO formation in haemolymph of *Galleria mellonella* larvae. *Nitric Oxide-Biology and Chemistry* 37: 46–52. DOI: 10.1016/j.niox.2013.12.011
- Serebrov V.V., Alekseev A.A., Glupov V.V. 2001. Changes in the activity and pattern of hemolymph esterases in the larvae of greater Wax Moth *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera, Pyralidae) during Mycosis. *Biology Bulletin* 28: 499–503. DOI: 10.1023/A:1016748328135
- Serebrov V.V., Kiselev A.A., Glupov V.V. 2003. The study of some synergistic factors between entomopathogenic fungi and chemical insecticides. *Mycology and phytopathology* 37 (1): 76–82.
- Serebrov V.V., Martemyanov V.V., Glupov V.V., Gerber O.N., Malyarchuk A.A., Alekseev A.A. 2006. Effect of entomopathogenic fungi on detoxification enzyme activity in greater wax moth *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera, Pyralidae) and role of detoxification enzymes in development of insect resistance to entomopathogenic fungi. *Biology Bulletin* 33 (6): 581–586. DOI: 10.1134/S1062359006060082
- Sevim A., Donzelli B.G.G., Wu D., Demirbag Z., Gibson D.M., Turgeon B.G. 2012. Hydrophobin genes of the entomopathogenic fungus, *Metarhizium brunneum*, are differentially expressed and corresponding mutants are decreased in virulence. *Current Genetics* 58 (2): 79–92. DOI: 10.1007/s00294-012-0366-6
- Shamakhi L., Zibaee A., Karimi-Malati A., Hoda H. 2019. Effect of thermal stress on the immune responses of *Chilo suppressalis* walker (Lepidoptera: Crambidae) to *Beauveria bassiana*. *Journal of Thermal Biology* 84: 136–145. DOI: 10.1016/j.jtherbio.2019.07.006
- Slepneva I.A., Glupov V.V., Sergeeva S.V., Khramtsov V.V. 1999. EPR detection of reactive oxygen species in hemolymph of *Galleria mellonella* and *Dendrolimus superans sibiricus* (Lepidoptera) larvae. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 264 (1): 212 – 215.
- Slepneva I.A., Komarov D.A., Glupov V.V., Serebrov V.V., Khramtsov V.V. 2003. Influence of fungal infection on the dopa-semiquinone and dopa-quinone production in haemolymph of *Galleria mellonella* larvae. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 300 (1): 188–191. DOI: 10.1016/S0006-291X(02)02766-3
- St. Leger R.J., Joshi L., Bidochka M.J., Roberts D.W. 1995. Protein synthesis in *Metarhizium anisopliae* growing on host cuticle. *Mycological Research* 99 (9): 1034–1040. DOI: 10.1016/S0953-7562(09)80769-7
- St. Leger R.J., Joshi L., Bidochka M.J., Rizzo N.W. 1996. Biochemical characterization and ultrastructural localization of two extracellular trypsin produced by *Metarhizium anisopliae* in infected insect cuticles. *Applied and Environmental Microbiology* 62 (4): 1257–1264.
- Sung G.H., Hywel-Jones N.L., Sung J.M., Luangsaard J.J., Shrestha B., Spatafora J.W. 2007. Phylogenetic classification of *Cordyceps* and the clavicipitaceous fungi. *Studies in Mycology* 57: 5–59. DOI: 10.3114/sim.2007.57.01
- Sung G.H., Poinar G., Spatafora J.W. 2008. The oldest fossil evidence of animal parasitism by fungi supports a Cretaceous diversification of fungal-arthropod symbioses. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 49 (2): 495–502. DOI: 10.1016/j.ympev.2008.08.028

- Tanaka H., Ishibashi J., Fujita K., Nakajima Y., Sagisaka A., Tomimoto K., Suzuki N., Yoshiyama M., Kaneko Y., Iwasaki T., Sunagawa T., Yamaji K., Asaoka A., Mita K., Yamakawa M. 2008. A genome-wide analysis of genes and gene families involved in innate immunity of *Bombyx mori*. Insect Biochemistry and Molecular Biology 38 (12): 1087–1110. DOI: 10.1016/j.ibmb.2008.09.001
- Tang G., Shang Y., Li S., Wang C. 2020. MrHex1 is Required for Woronin Body Formation, Fungal Development and Virulence in *Metarhizium robertsii*. Journal of Fungi 6 (3) 172. DOI:10.3390/jof6030172
- Thomas M.B., Read A.F. 2007. Can fungal biopesticides control malaria? Nature Reviews Microbiology 5: 377–383. DOI: 10.1038/nrmicro1638
- Tokarev Y.S., Levchenko M.V., Naumov A.M., Senderskiy V., Lednev G.R. 2011. Interactions of two insect pathogens, *Paranosema locustae* (Protista: Microsporidia) and *Metarhizium acridum* (Fungi: Hypocreales), during a mixed infection of *Locusta migratoria* (Insecta: Orthoptera) nymphs. Journal of Invertebrate Pathology 106 (2): 336–338. DOI: 10.1016/j.jip.2010.09.019
- Toledo A.V., Alippi A.M., Lenicov A.M.D. 2011. Growth inhibition of *Beauveria bassiana* by bacteria isolated from the cuticular surface of the corn leafhopper, *Dalbulus maidis* and the planthopper, *Delphacodes kuscheli*, two important vectors of maize pathogens. Journal of Insect Science 11 (1): 1–13. DOI: 10.1673/031.011.0129
- Toledo A., Lopez S., Aulicino M., Lenicov A.M.D., Balatti P. 2015. Antagonism of entomopathogenic fungi by *Bacillus* spp. associated with the integument of cicadellids and delphacids. International Microbiology 18 (2): 91–97. DOI:10.2436/20.1501.01.238
- Tomilova O.G., Kryukov V.Yu., Duisembekov B.A., Yaroslavtseva O.N., Tyurin M.V., Kryukova N.A., Skorokhod V., Dubovskiy I.M., Glupov V.V. 2016. Immune–physiological aspects of synergy between avermectins and the entomopathogenic fungus *Metarhizium robertsii* in Colorado potato beetle larvae. Journal of Invertebrate Pathology 140: 8–15. DOI: 10.1016/j.jip.2016.08.008
- Tomilova O.G., Yaroslavtseva O.N., Ganina M.D., Tyurin M.V., Chernyak E.I., Senderskiy I.V., Noskov Y.A., Polenogova O.V., Akhanaev Y.B., Kryukov V.Yu., Glupov V.V., Morozov S.V. 2019. Changes in antifungal defence systems during the intermolt period in the Colorado potato beetle. Journal of Insect Physiology 116: 106–117. DOI: 10.1016/j.jinsphys.2019.05.003
- Tounou A.K., Kooyman C., Douro-Kpindou O.K., Poehling H.M. 2008. Interaction between *Paranosema locustae* and *Metarhizium anisopliae* var. *acridum*, two pathogens of the desert locust, *Schistocerca gregaria* under laboratory conditions. Journal of Invertebrate Pathology 97 (3): 203–210. DOI: 10.1016/j.jip.2007.10.002
- Vega F.E. 2018. The use of fungal entomopathogens as endophytes in biological control: a review. Mycologia 110 (1): 4–30.
- Vega F.E., Meyling N.V., Luangsa-Ard J.J., Blackwell M. 2012. Fungal Entomopathogens. In: Vega, F., Kaya, H. K. (eds.) Insect Pathology. 2nd Edition. San Diego, CA: Academic Press.: 171–220. DOI: 10.1016/B978-0-12-384984-7.00006-3
- Vidal C., Fargues J. 2007. Climatic constraints for fungal biopesticides. In: Ekesi S., Maniania N. K. (eds.). Use of Entomopathogenic Fungi in Biological Pest Management. Research Signpost Inc, Kerala: 39–55.
- Wang B., Kang Q., Lu Y., Bai L., Wang C. 2012. Unveiling the biosynthetic puzzle of destruxins in *Metarhizium* species. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 109 (4): 1287–1292. DOI: 10.1073/pnas.1115983109
- Wang C., St. Leger R.J. 2006. A collagenous protective coat enables *Metarhizium anisopliae* to evade insect immune responses. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 103 (17): 6647–6652. DOI: 10.1073/pnas.0601951103

- Wang C., Duan Z., St. Leger R. J. 2008. MOS1 Osmosensor of *Metarhizium anisopliae* is required for adaptation to insect host hemolymph. *Eukaryotic Cell* 7 (2): 302–310. DOI:10.1128/EC.00310-07
- Wei G., Lai Y., Wang G., Chen H., Li F., Wang S. 2017. Insect pathogenic fungus interacts with the gut microbiota to accelerate mosquito mortality. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 114(23): 5994–5999. DOI:10.1073/pnas.1703546114
- Wosten H.A. 2001. Hydrophobins: multipurpose proteins. *Annual Review of Microbiology* 55: 625 –646. DOI: 10.1146/annurev.micro.55.1.625
- Wraight S.P., Ramos M.E. 2005. Synergistic interaction between *Beauveria bassiana* – and *Bacillus thuringiensis tenebrionis* – based biopesticides applied against field populations of Colorado potato beetle larvae. *Journal of Invertebrate Pathology* 90 (3): 139–150. DOI: 10.1016/j.jip.2005.09.005
- Wraight S.P., Ramos M.E. 2017. Characterization of the synergistic interaction between *Beauveria bassiana* strain GHA and *Bacillus thuringiensis morrisoni* strain tenebrionis applied against Colorado potato beetle larvae. *Journal of Invertebrate Pathology* 144: 47–57. DOI: 10.1016/j.jip.2017.01.007
- Wronska A.K., Bogus M.I., Wloka E., Kazek M., Kaczmarek A., Zalewska K. 2018. Cuticular fatty acids of *Galleria mellonella* (Lepidoptera) inhibit fungal enzymatic activities of pathogenic *Conidiobolus coronatus*. *PLoS ONE* 13 (3): e0192715. DOI: 10.1371/journal.pone.0192715
- Xiao G., Ying S.H., Zheng P., Wang Z.L., Zhang S., Xie X.Q., Shang Y., St Leger R.J., Zhao G.P., Wang C., Feng M.G. 2012. Genomic perspectives on the evolution of fungal entomopathogenicity in *Beauveria bassiana*. *Scientific Reports* 2: 483. DOI: 10.1038/srep00483.
- Xie T., Wang Y., Yu D., Zhang Q., Zhang T., Wang Z., Huang B. 2019. MrSVP, a secreted virulence-associated protein, contributes to thermotolerance and virulence of the entomopathogenic fungus *Metarhizium robertsii*. *BMC Microbiology* 19: 25. DOI: 10.1186/s12866-019-1396-8
- Xie X.Q., Li F., Ying S.H., Feng M.G. 2012. Additive contributions of two manganese-cored superoxide dismutases (mnsods) to antioxidation, UV tolerance and virulence of *Beauveria bassiana*. *PLoS ONE* 7 (1): e30298. DOI: 10.1371/journal.pone.0030298
- Xu L., Deng J., Zhou F., Cheng C., Zhang L., Zhang J., Lu M. 2018. Gut microbiota in an invasive bark beetle infected by a pathogenic fungus accelerates beetle mortality. *Journal of Pest Science* 92: 343–351. DOI: 10.1007/s10340-018-0999-4
- Yaroslavtseva O.N., Dubovskiy I.M., Khodyrev V.P., Duisembekov B.A., Kryukov V.Yu., Glupov V.V. 2017. Immunological mechanisms of synergy between fungus *Metarhizium robertsii* and bacteria *Bacillus thuringiensis* ssp *morrisoni* on Colorado potato beetle larvae. *Journal of Insect Physiology* 96: 14–20. DOI: 10.1016/j.jinsphys.2016.10.004
- Zhang F., Sun X.X., Zhang X.C., Zhang S., Lu J., Xia Y.M., Huang Y.H., Wang X.J. 2018. The interactions between gut microbiota and entomopathogenic fungi: a potential approach for biological control of *Blattella germanica* (L.). *Pest Management Science* 74 (2): 438–447. DOI: 10.1002/ps.4726
- Zhang L.B., Feng M.G. 2018. Antioxidant enzymes and their contributions to biological control potential of fungal insect pathogens. *Applied Microbiology and Biotechnology* 102: 4995 – 5004. DOI: 10.1007/s00253-018-9033-2
- Zhang S., Widemann E., Bernard G., Lesot A., Pinot F., Pedrini N., Keyhani N.O. 2012. CYP52X1, representing new cytochrome P450 subfamily, displays fatty acid hydroxylase activity and contributes to virulence and growth on insect cuticular substrates in entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Journal of Biological Chemistry* 287: 13477–13486. DOI: 10.1074/jbc.M111.338947

- Zheng P., Xia Y.L., Xiao G.H., Xiong C.H., Hu X., Zhang S.W., Zheng H.J., Huang Y., Zhou Y., Wang S.Y., Zhao G.P., Liu X., St Leger R.J., Wang C. 2012. Genome sequence of the insect pathogenic fungus *Cordyceps militaris*, a valued traditional Chinese medicine. *Genome Biology* 12: R116, DOI: 10.1186/gb-2011-12-11-r116
- Zhou F., Wu X., Xu L., Guo S., Chen G., Zhang X. 2019. Repressed *Beauveria bassiana* infections in *Delia antiqua* due to associated microbiota. *Pest Management Science* 75 (1): 170–179. DOI: 10.1002/ps.5084
- Zibaee A., Bandani A. R., Talaei-Hassanlouei R., Malagoli D. 2009. Temperature and Ca²⁺ ion as modulators in cellular immunity of the Sunn pest *Eurygaster integriceps* Puton (Heteroptera: Scutelleridae). *Entomological Research* 39 (6): 364–371. DOI: 10.1111/j.1748-5967.2009.00251.x
- Zibaee A., Bandani A.R., Malagoli D. 2012. Methoxyfenozide and pyriproxyfen alter the cellular immune reactions of *Eurygaster integriceps* Puton (Hemiptera: Scutelleridae) against *Beauveria bassiana*. *Pesticide Biochem Physiol* 102 (1): 30–37. DOI: 10.1016/j.pestbp.2011.10.006

PHYSIOLOGICAL AND ECOLOGICAL ASPECTS
OF INTERACTIONS BETWEEN ENTHOMOPATHOGENIC FUNGI
(ASCOMYCOTA, HYPOCREALES) AND INSECTS

V. Yu. Kryukov, O. N. Yaroslavtseva, V. V. Glupov

Keywords: insect immunity, *Beauveria*, *Metarrhizium*, host-parasite system, environmental factors

SUMMARY

In the review, we briefly summarized virulence mechanisms of entomopathogenic ascomycetes and the defense reactions of host insects. Special attention is paid to the influence of environmental factors (temperature, toxicants, concomitant infections, symbiotic microorganisms and parasitoids) on the physiological aspects of the relationship between insect hosts and entomopathogenic fungi. Based on the analysis performed, we suggest that the increase in the susceptibility of insects to fungal infections under the influence of various stresses has a complex basis, which is expressed by suppression of defense reactions set, as well as by disturbance ontogenesis. Understanding these mechanisms is important for the development of new approaches to biological control of economically important species.

УДК 576.895

**СТРОЕНИЕ ОРГАНА ГАЛЛЕРА И СИСТЕМАТИКА
ИКСОДОВЫХ КЛЕЩЕЙ ПОДСЕМЕЙСТВА IXODINAE
(СЕМЕЙСТВО IXODIDAE)**

© 2020 г. С. А. Леонович*

Зоологический институт РАН,
Университетская наб. 1, Санкт-Петербург, 199034 Россия
* e-mail: leonssa@mail.ru

Поступила в редакцию 10.09.2020 г.

После доработки 20.09.2020 г.

Принята к публикации 25.09.2020 г.

На основании собственных и литературных данных проведен анализ строения органа Галлера, главного рецепторного органа иксодовых клещей, изученного методами растровой электронной микроскопии, у 43 видов клещей рода *Ixodes* Latreille, 1795, единственного рода в составе подсемейства Ixodinae. Описано строение органа Галлера у представителей 13 подродов: *Ixodes* s. str. (14 видов), *Pholeioxodes* Schulze, 1942 (3 вида), *Ixodiopsis* Filippova, 1957 (4 вида), *Ceratixodes* Neumann, 1902 (1 вид), *Scaphixodes* Schulze 1941 (2 вида), *Trichotoixodes* Reznik, 1961 (2 вида), *Partipalpiger* Hoogstraal, Clifford, Saito and Keirans 1973 (1 вид), *Pomerantzevella* Feider, 1965 (1 вид), *Eschatoccephalus* Frauenfeld, 1851 (2 вида), *Afrixodes* Morel, 1966 (1 вид), *Sternalixodes* Schulze, 1938 (8 видов), *Multidentatus* Clifford, Sonenshine, Keirans and Kohls, 1973 (3 вида), *Endopalpiger* Schulze (1935) (1 вид). Выделены таксономические признаки (число и топография сенсилл в разных отделах органа, наличие и форма капсулярного отверстия, форма углубления сенсилл передней группы и др.). Показано, что строение органа Галлера специфично для отдельных подродов, в то время как видовые различия (в пределах каждого подрода) практически не выражены. Проведено сравнение полученных данных с существующими представлениями о таксономии рода *Ixodes*.

Ключевые слова: орган Галлера, растровая электронная микроскопия, Ixodinae, *Ixodes*, систематика

DOI: 10.31857/S1234567806060024

Орган Галлера, впервые описанный естествоиспытателем Галлером в 1881 г. (Haller, 1881), – основной чувствительный орган иксодовых клещей, переносчиков опасных

трансмиссивных заболеваний. У клещей, как известно, нет антенн – придатков головной капсулы, несущих основную массу сенсорных образований, как это наблюдается у насекомых, поэтому роль антенн насекомых у клещей выполняют передние ноги. Клещи перемещаются на трех парах ног, а передняя пара ног служит им своеобразными аналогами антенн насекомых. Именно поэтому на передних ногах, а точнее, на их дистальных сегментах, лапках, располагаются основные органы чувств, позволяющие обнаруживать источник пищи или полового партнера. У гамазовых клещей – это тарзальный рецепторный орган (Leonovich, Stanyukovich, 2011; Leonovich, Dimov, 2012), а у иксодовых клещей – это орган Галлера. Кроме того, у большинства клещей отсутствуют глаза (Леонович, 2005)

Орган Галлера – чрезвычайно сложно устроенный орган чувств, в составе которого обнаружены сенсиллы (элементарные чувствительные образования членистоногих), реагирующие на запах, градиенты температуры, влажности и на некоторые другие стимулы (Леонович, 2005).

В строении органа Галлера есть черты, определяющие его функциональные особенности. И одновременно есть морфологические признаки, никак не связанные с функциональными особенностями. Примеры – пористый волосок передней группы сенсилл (обонятельный receptor) может располагаться по-разному среди остальных сенсилл передней группы, но при этом он остается сенсиллой, расположенной в переднем углублении, и, вместе с таким же волоском (сенсиллой), расположенным на симметричной передней лапке, способен определять направление источника обонятельного стимула. Учитывая мельчайшие размеры органа Галлера, расположение этой сенсиллы относительно остальных сенсилл (а оно может значительно различаться) на физиологическую и особенно поведенческую роль такой сенсиллы никак не влияет. Далее, основное функциональное значение отверстия капсулы – обеспечить доступ обонятельных (летучих) молекул к обонятельным сенсиллам капсулы. При этом форма отверстия, т.е. вытянуто оно вдоль или поперек продольной оси членика, округлое оно или овальное, или изрезанное – никакого функционального значения не имеет. То есть, подобные морфологические признаки, на которые эволюционный пресс не оказывает давления, могут быть использованы в качестве таксономических признаков (см. ниже).

Следует отметить, что ни в одной из таксономических работ данные по строению органа Галлера никак не использовались (и не используются до сих пор). Вместе с тем игнорировать данные по такому важному органу вряд ли правомочно.

Анализ современных работ, которые посвящены таксономии иксодовых клещей и в которых в том числе использованы молекулярные данные, показывает, что на основании этих данных делаются весьма скоропалительные выводы, никак не соответствующие морфологическому анализу. В связи с этим автору представляется важным рассмотреть строение органа Галлера, основного сенсорного органа иксодовых

клещей, не в связи с его функциональными особенностями, а в связи с таксономией этой группы.

Данное первое сообщение посвящено рассмотрению особенностей строения органа Галлера у клещей подсемейства Ixodinae, представленного в мировой фауне единственным родом *Ixodes*.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Всего в данной работе было проанализировано строение органа Галлера у следующих видов иксодовых клещей рода *Ixodes*: (подродовая принадлежность вида приведена по: Филиппова (1977) и Clifford et al. (1973).

Подрод *Ixodes* s. str.

I. persulcatus Schulze, 1930

I. redicorzevi Olenev, 1927

I. ricinus (Linnaeus, 1758)

I. pavlovskyi Pomerantzev, 1946

Подрод *Pholeoixodes* Schulze, 1942

I. arboricola Schulze & Schlottke, 1930

I. lividus Koch, 1844

Подрод *Ixodiopsis* Filippova, 1957

I. angustis Neumann, 1899

I. granulatus Supino, 1827

Подрод *Ceratixodes* Neumann, 1902

I. uriae White, 1852

Подрод *Scaphixodes* Schulze, 1941

I. caledonicus Nuttall, 1910

I. signatus Birula, 1895

Подрод *Trichotoixodes* Reznik, 1961

I. frontalis Panzer, 1795

Подрод *Partipalpiger* Hoogstraal, Clifford, Saito & Keirans 1973

I. ovatus Neumann, 1899

Подрод *Pomerantzevella* Feider, 1965

I. simplex Neumann, 1906

Подрод *Eschatocephalus* Frauenfeld, 1851

I. vespertilionis Koch, 1844

Подрод *Afrixodes* Morel, 1966

I. rubicundus Neumann, 1904

Кроме того, были использованы данные, приведенные в работах других авторов, как посвященных изучению органа Галлера непосредственно, так и в работах, не посвященных непосредственно органу Галлера, но содержащих электронные фотографии органа, полученные при помощи растрового электронного микроскопа.

Подрод *Ixodes* s. str.

- I. acutitarsus* Karsch, 1880 (Ronghang, Roy, 2014)
I. asanumai (Hayashi, Hasegawa, 1983)
I. boliviensis Neumann, 1904 (Homsher, Sonenshine, 1975)
I. dentatus Marx, 1899 (Homsher, Sonenshine, 1975)
I. granulatus Supino, 1897 (Homsher, Sonenshine, 1975)
I. laguri Olenev, 1929 (Honzakova et al., 1975)
I. loricatus Neumann 1899 (Homsher, Sonenshine, 1975)
I. luciae Senevet, 1940 (Homsher, Sonenshine, 1975)
I. muris Bishopp et Smith, 1937 (Homsher, Sonenshine, 1975)
I. scapularis Say, 1821 (Homsher, Sonenshine, 1975)

Подрод *Pholeoixodes* Schulze, 1942

- I. texanus* Banks, 1909 (Homsher, Sonenshine, 1975)

Подрод *Ixodiopsis* Filippova, 1957

- I. cookie* Packard, 1869 (Homsher, Sonenshine, 1975)
I. marxi Banks, 1908 (Homsher, Sonenshine, 1975)

Подрод *Trichotoixodes* Reznik, 1961

- I. brunneus* Koch, 1844 (Homsher, Sonenshine, 1977)

Подрод *Sternalixodes* Schulze, 1938

- I. anatis* Chilton, 1904 (Homsher et al., 1988)
I. confusus Roberts, 1960 (Homsher et al., 1988)
I. cordifer Neumann, 1908 (Homsher et al., 1988)
I. cornuatus Roberts, 1960 (Homsher et al., 1988)
I. dendrolagi Wilson, 1967 (Homsher et al., 1988)
I. hirsti Hassall, 1931 (Homsher et al., 1988)
I. holocyclus Neumann, 1899 (Homsher et al., 1988)

- I. trichosuri* Roberts, 1960 (*Sternalixodes*) (Homsher et al., 1988)

Подрод *Multidentatus* Clifford, Sonenshine, Keirans & Kohls, 1973

- I. paranaensis* Barros-Battesti, Arzua, Pichorim & Keirans, 2003 (Barros-Battesti et al., 2003)
I. percavatus Neumann, 1906 (Homsher, Sonenshine, 1979; Homsher et al., 1988)
I. auritulus Neumann, 1904 (Barros-Battesti et al., 2003)

Подрод *Endopalpiger* Schulze (1935)

- I. woyliei* Ash et al., 2017 (Ash et al., 2017)

Подрод *Eschatoccephalus* Frauenfeld, 1851

- I. ariadnae* Hornok et al., 2014 (Hornok et al., 2015)

Часть исследованных видов, непосредственно собранных автором, была изучена в растровом электронном микроскопе (РЭМ) по десяти и более экземпляров каждого пола и фазы развития (*I. ricinus*, *I. persulcatus*, *I. redicorzevi*, *I. rubicundus*, *I. lividus*). Сборы проводили в разных районах России и других стран. Остальные изученные автором виды были взяты из коллекции иксодовых клещей ЗИН РАН и изучены в РЭМ по двум-трем экземплярам каждой фазы развития и пола.

Для исследования в растровом электронном микроскопе клещи были зафиксированы в 70 % растворе этилового спирта, очищены в ультразвуковой ванне, а затем высушены методом критической точки в установке Hitachi Critical Point Dryer (HCP-2) с использованием жидкой углекислоты в качестве рабочего агента. Высушенные препараты клещей наклеивали на столики-подложки при помощи двусторонне-липкой ленты, напыляли платиной в установку EIKO-5 (Япония), и исследовали в растровом электронном микроскопе Hitachi S570.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

У всех исследованных видов клещей орган Галлера состоит из нескольких морфологически обособленных частей: капсулы, передней группы сенсиилл, сенсиилл дистального бугорка и посткапсуллярных сенсиилл (рис. 1). Капсула – отдел органа Галлера, в состав которого входят от 5 до 7 пористых волосков обонятельных сенсиилл. Сенсиилла – элементарный орган чувств членистоногих, включающий в себя кутикулярный отдел, представленный волоском (в таксономической литературе называемый также сетой, щетинкой, хетой и т. п.), иннервируемым одним или несколькими дендритами биполярных сенсорных нейронов и определяющим модальность (функцию) сенсииллы. Так, в обонятельных сенсииллах полый тонкостенный волосок (сета, хета) пронизан многочисленными мелкими порами, а в полости волоска обнаруживаются многочисленные ветвления рецепторных ресничек (Леонович, 1985; 2005). Контактные хеморецепторные сенсииллы (органы вкуса) характеризуются полым волоском, в полости которого проходят неветвящиеся дендриты, а на вершине волоска находятся одна крупная пора или несколько более мелких пор (однако в сравнении с порами обонятельных сенсиилл они значительно более крупные. Более подробно о связи ультраструктуры сенсиилл клещей с их функцией можно узнать из монографии Леоновича (2005). Капсула представляет собой углубление, часто погруженное под покровы, и сообщается со средой посредством капсуллярного отверстия. У клещей подсемейства Ixodinae капсула может быть открытой, у представителей второго подсемейства (Amblyomminae или Metastriata) она всегда закрытая. Обонятельные сенсииллы капсулы реагируют на летучие запахи хозяина, в частности на углекислый газ и аммиак (Леонович, 2005).

Перед капсулой у всех иксодовых клещей расположен набор из 4 типов сенсиилл (пористый, тонкий, конический и двуслойный волоски сенсиилл соответствующих типов) (рис. 1). Пористый волосок принадлежит обонятельной сенсиилле, бороздчатые волоски содержат хемо-терморецепторы, тонкий волосок – гигрорецептор, функция конического волоска до конца не выяснена (рис. 1A). Количество сенсиилл разных типов может варьировать, но их набор (из 4 типов) остается неизменным (Леонович, 2005). У клещей подсемейства Ixodinae эти сенсииллы располагаются на дне обширного углубления дистальнее капсулы – плоского формирования, слегка погруженного

под поверхность кутикулы тарзального членика и часто ограниченного кутикулярным валиком (рис. 1). У клещей подсемейства Amblyomminae (Prostriata) обширное углубление, в котором располагаются сенсииллы передней группы, отсутствует и все сенсииллы передней группы сконцентрированы на небольшом участке, ограниченном общим кутикулярным валиком (см. вторую часть настоящего сообщения).

Для каждого вида клещей характер взаимного расположения сенсиилл передней группы остается строго постоянным. В специальных исследованиях, посвященных регенерации органа Галлера у клеща *Ixodes ricinus*, путем суперимпозиции (последовательного наложения изображений, полученных в одном ракурсе и при одинаковом увеличении растрового электронного микроскопа), было показано, что расположение сенсиилл передней группы варьирует в определенных пределах, но эти пределы никак не меняют характер относительного взаиморасположения сенсиилл (рис. 2).

Те же результаты были получены на африканском виде *I. rubicundus*, причем выяснилось, что видоспецифичное взаиморасположение сенсиилл передней группы характерно для всех фаз развития (личинок, нимф и имаго) (рис. 3)

Отметим, что у личинок характер расположения сенсиилл остается типичным для вида, при этом в передней группе отсутствует один из тонких волосков, а число капсулярных сенсиилл также уменьшено. Дистальнее переднего углубления находится дистальный бугорок [distal knoll, по терминологии Леоновича (Leonovich, 2004)], выраженный только у представителей подсемейства Ixodinae (рис. 1). На этом бугорке располагаются одна или две (у большинства Ixodinae) пары сенсиилл. Одна из сенсиилл пары всегда представлена пористым обонятельным волоском, а вторая – редуцированной вкусовой сенсииллой (рис. 1). Пористый волосок дистального бугорка – один из важнейших рецепторов органа Галлера у клещей подсемейства Ixodinae. У клещей рода *Ixodes* это самая большая сенсиилла в составе органа Галлера (если средний размер сенсиилл передней группы составляет примерно 10–20 мкм, а размер сенсиилл капсулы колеблется в пределах 20–50 мкм (у разных видов), то размер дистальной пористой обонятельной сенсииллы переднего бугорка составляет 150–200 мкм).

У клеша *Ixodes ricinus* эта сенсиилла содержит фенольный и лактоновый рецепторы, позволяющие определять приближение потенциального хозяина с больших расстояний (Leonovich, 2004).

Проксимальнее капсулы располагается группа посткапсулярных волосков (сенсиилл) (рис. 1). Латеральные сенсииллы представлены вкусовыми рецепторами (так же как и латеральные волоски по бокам сенсиилл дистального бугорка), центральные сенсииллы этой группы относятся к двухслойным сенсииллам (комбинированным хемо-, термо-, гигрогорецепторам). Функция этих сенсиилл остается неясной.

Как будет показано в дальнейшем, строение углубления для сенсиилл передней группы, форма капсулярного отверстия (или его отсутствие в случае открытой капсулы),

набор и расположение сенсилл передней группы, количество обонятельных сенсилл капсулы – являются специфичными для каждого подрода, в то время как расположение (а в некоторых случаях и набор) посткапсуллярных сенсилл видоспецифичны. Так как в задачи автора не входит обсуждение видовых различий, а только различий подродовых, в дальнейшем особенности топографии и строения посткапсуллярных сенсилл приведены не будут.

Результаты исследований автора и анализ литературы продемонстрировали, что строение органа Галлера является специфичным для представителей подродовых группировок рода *Ixodes*. Приведем эти данные (рис. 4–7).

Подрод *Ixodes* s. str. (рис. 4A–4F, 6A–6D)

Всесветно распространенный подрод, характеризующийся широчайшим спектром хозяев, биотопов и паразито-хозяинных связей. Включает как немобионтов (пастищных паразитов), так иnidобионтов (гнездо-норовых паразитов) (Леонович, 2019). Самый крупный по количеству видов подрод (свыше 60 видов) (Филиппова, 1977).

Дистальный бугорок (anterior knoll) крупный, хорошо выражен, на нем располагаются две пары сенсилл (пористый волосок обонятельной сенсиллы и короткий гладкий волосок контактного хеморецептора) (Леонович, 1977, 1985) (рис. 1).

Углубление для сенсилл передней группы (anterior trough) обширное, довольно глубокое, трапециевидное, окружено кутикулярным валиком (рис. 4A, 4C, 4E, 4F).

В передней группе один пористый, один тонкий, один конический и два бороздчатых волоска (Леонович, 1976) (терминология см. Леонович, 2005) (рис. 1A; 4C, 4D). Пористый волосок передней группы сенсилл занимает дистально-латеральное положение (рис. 4). Пористый волосок передней группы примерно в полтора раза длиннее остальных (рис. 4C, 4D).

Капсула закрытая, сообщается со средой довольно крупным капсуллярным отверстием округлой формы, у некоторых видов отверстие может быть проксимально изрезано (рис. 4A, 4E, 4F). В капсule располагаются пористые волоски 7 обонятельных сенсилл (Леонович, 1977), обычно один волосок далеко высовывается из отверстия наружу (рис. 4).

Посткапсуллярных волосков 6: имеются центральная группа из четырех бороздчатых волосков двуслойных хемо-терморецепторов (Леонович, 2005) и пара латеральных вкусовых сенсилл (рис. 4).

У личинки дистальный бугорок несет не две, как у взрослых клещей, а одну пару сенсилл, отсутствует также один из бороздчатых волосков передней группы сенсилл (рис. 4B).

У изученных представителей подрода строение органа Галлера может довольно сильно варьировать, особенно это касается размера капсуллярного отверстия, степени его открытости, а также наличия или отсутствия изрезанности краев.

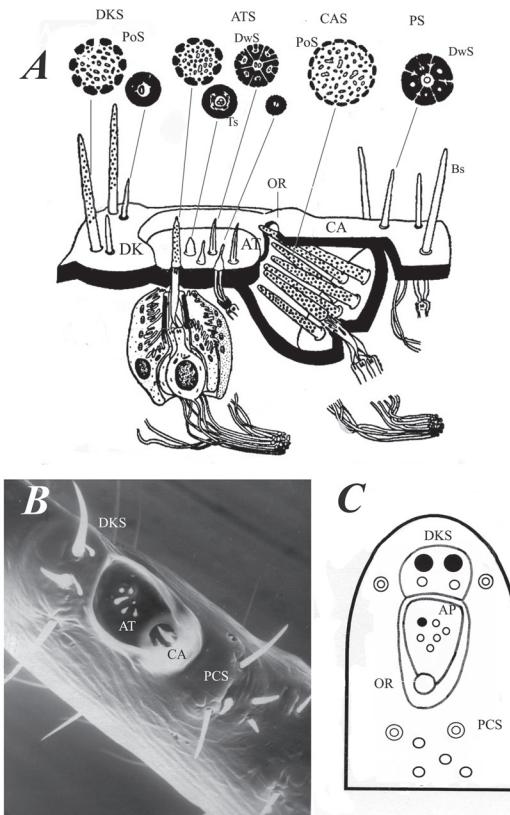


Рисунок. 1. Строение органа Галлера клещей подсемейства Ixodinae на примере таежного клеща *Ixodes persulcatus*. *A* – внутреннее строение органа Галлера таежного клеща по данным трансмиссивной электронной микроскопии (по: Леонович, 1977, 2005). *B* – общий вид органа Галлера в растровом электронном микроскопе. *C* – схематическое изображение органа Галлера (локализация сенсилий в основных отделах, форма переднего углубления и капсуллярного отверстия) органа Галлера таежного клеща, показанного на рис. 1*A* и 1*B*. Такие схемы использованы при иллюстрации текста (см. рис. 4–5). AT – переднее углубление (anterior trough), в котором расположена передняя группа сенсилий ATS (anterior trough sensilla); DK – дистальный бугорок (distal knoll); CA – капсула (capsule); OR – капсуллярное отверстие (capsular orifice); DKS – сенсилии дистального бугорка (distal knoll sensilla); CAS – капсуллярные сенсилии (capsular sensilla); PCS – посткапсуллярные сенсилии (postcapsular sensilla); PoS – сенсилия с порами (porous sensillum) (обонятельная сенсилия); DwS – сенсилия с дополнительными полостями (double-walled sensillum) комбинированный хемо-терморецептор; BS – контактный хеморецептор, вкусовая сенсилия (gustatory (upper-pore) sensillum); TS – терморецепторная сенсилия (thermo-sensitive sensillum).

Figure 1. Structure of the Haller's organ in ticks of the subfamily Ixodinae with an example of the dog tick *Ixodes ricinus*. *A* – inner fine structure of the organ by the data obtained in transmissive electron microscope (from: Leonovich, 1977; 2005). *B* – general view of the Haller's organ in scanning electron microscope. *C* – scheme of the organ (localization of sensilla in main parts of the organ, shape of the anterior trough and capsular orifice) of the taiga tick *I. persulcatus*, shown in Figs. 1*A* and 1*B*. Such schemes are used in graphic schemes in Figs 4 and 5).

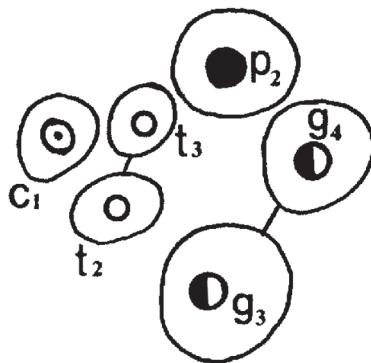


Рисунок 2. Топография сенсилл в передней группе (anterior trough sensilla) у клеща *Ixodes persulcatus*, полученное путем наложения изображений 63 экземпляров (из работы Leonovich, Belozerov, 1992). c¹ – коническая сенсилла, p² – пористая сенсилла, t² тонкая сенсилла; (t³) тонкая сенсилла; (g³) двухслойная сенсилла; (g⁴) двухслойная сенсилла.

Figure 2. Topography of anterior trough sensilla in the tick *Ixodes persulcatus* created by superimposition of 63 images obtained in scanning electron microscope (from Leonovich, Belozerov, 1992).

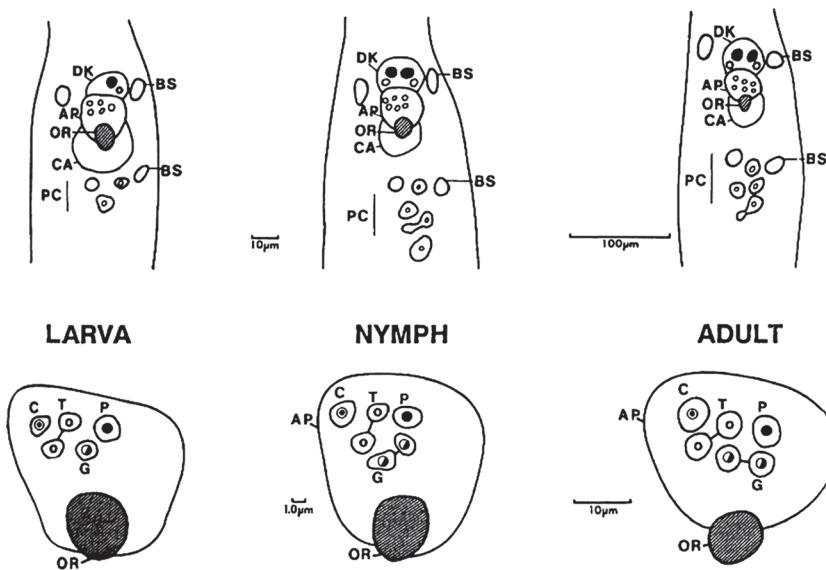


Рисунок 3. Топография сенсилл в передней группе (anterior trough sensilla) у клеща *Ixodes rubicundus* (Neumann, 1904) на разных фазах онтогенетического развития, полученное путем суперимпозиции (по: Belozerov et al., 1996). Условные обозначения как на рис. 1.
С – конический волосок (терморецептор); Т – тонкий волосок (гигрорецептор);
G – DwS (double-walled sensillum); Р – пористый волосок (обонятельная сенсилла).

Figure 3. Topography of anterior trough sensilla in the karoo paralysis tick *Ixodes rubicundus* (Neumann, 1904) at different developmental stages obtained by superimposition of scanning electron images (from Belozerov et al., 1996).

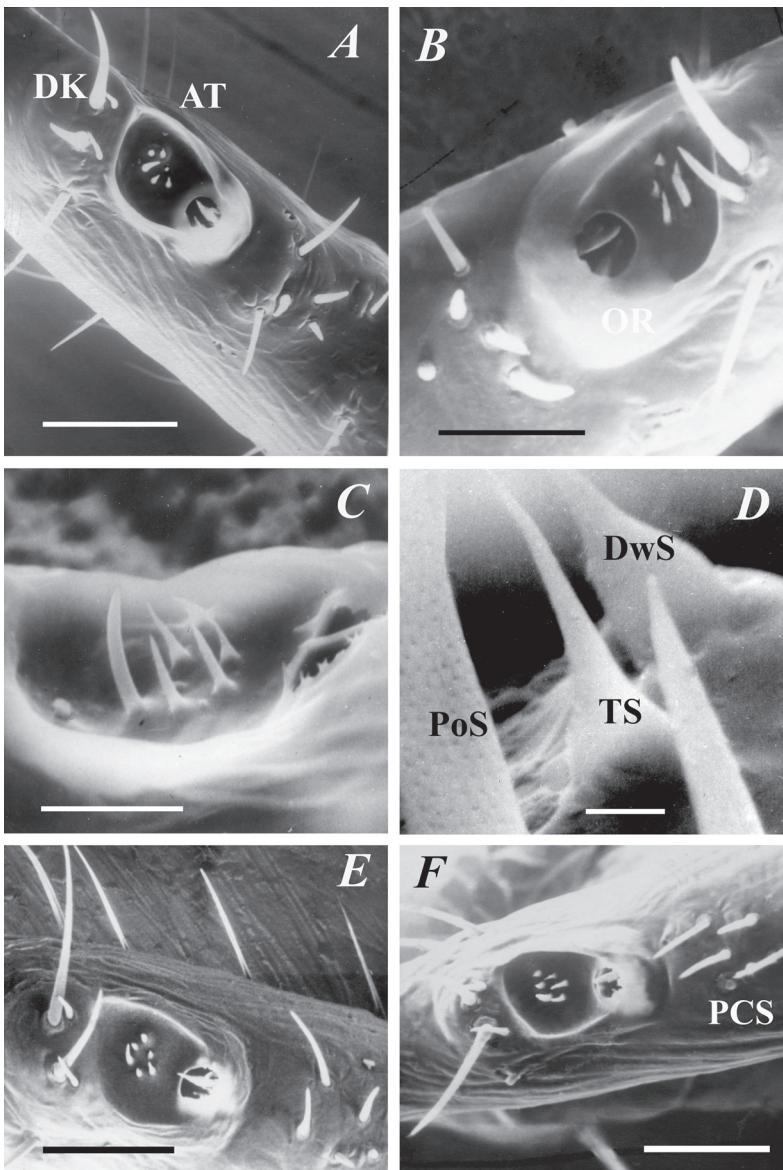


Рисунок 4. Строение органа Галлера у клещей рода *Ixodes* в растромовом электронном микроскопе: *A* – самка *Ixodes ricinus* (левая лапка); *B* – личинка *I. ricinus* (правая лапка); *C* – *I. redicorzevi*, передняя группа сенсилл; *D* – *I. persulcatus*, часть передней группы сенсилл с сосновыми типами сенсилл; *E* – *I. persulcatus*, самка; *F* – *I. persulcatus*, нимфа. Масштабная линейка, мкм: *A, E, F* – 50; *B* – 20; *C* – 10; *D* – 1.

Figure 4. Structure of the Haller's organ in ticks of the genus *Ixodes* in scanning electron microscope: *A* – female of *Ixodes ricinus* (left tarsus); *B* – larva of *I. ricinus* (right tarsus); *C* – *I. redicorzevi*, anterior group of sensilla; *D* – *I. persulcatus*, part of anterior pit sensilla with main types of the latter; *E* – *I. persulcatus*, female; *F* – *I. persulcatus*, nymph. Scale, μm : *A, E, F* – 50; *B* – 20; *C* – 10; *D* – 1.

Капсулярное отверстие может быть маленьким (составляющим менее пятой части дорзо-проксимального размера углубления для сенсилл передней группы) (*I. dentatus*, *I. scapularis*, *I. loricatus*), среднего размера (одна треть - одна четверть длины углубления для передней группы сенсилл) (*I. ricinus*, *I. persulcatus*) или большим (половина или треть длины углубления для сенсилл передней группы) (*I. muris*, *I. boliviensis*, *I. asanumai*). Задний край отверстия может быть изрезан (*I. redicorzevi*), а может быть и гладким (*I. scapularis*, *I. rubicundus*).

Среди изученных видов особняком стоит *I. luciae*, отличающийся особым расположением сенсилл передней группы (пористый волосок расположен отдельно от прочих, занимая самую дистальную позицию) и гантелеевидным капсулярным отверстием у взрослых клещей. При этом строение органа Галлера у личинки типично для подрода (Onofrio et al., 2010).

Также совершенно нетипично для подрода расположение сенсилл передней группы у *I. acutitarsus*, у которого сенсиллы передней группы расположены не компактно, а в линию, при этом пористый волосок занимает центральное положение (Ronghang, Roy, 2014)

Таким образом, для всех представителей подрода *Ixodes* s. str. характерны трапециевидное углубление для сенсилл передней группы, как правило, окруженное выраженным кутикулярным валиком, а также специфичная топография сенсилл передней группы (рис. 3, 4, 6A–6D). Вместе с тем различия в строении органа Галлера у изученных представителей подрода *Ixodes* s. str. говорят о возможно сборном, полифилетическом характере данного подрода. При этом строение органа никак не связано ни с характером паразитизма (nidобионты или немобионты), ни с природой хозяина. Так, *I. persulcatus*, *I. redicorzevi*, *I. ricinus* – немобионты с самым широким кругом хозяев (Филиппова, 1977); *I. acutitarsus* – распространенный в Юго-Восточной Азии немобионт (Ronghang, Roy, 2014); *I. boliviensis* чаще всего паразитирует на собаках в Новом Свете, *I. dentatus* –nidобионт, чаще всего встречается на кроликах, личинки паразитируют на птицах (Smith, 1945); *I. asanumai* – паразит рептилий: *I. granulatus* –nidобионт, паразитирует на тупайях; *I. laguri* –nidобионт, типичен в норах сусликов; *I. loricatus* – паразит опоссумов в Южной Америке; *I. luciae* –nidобионт, также паразит опоссумов; *I. scapularis* –немобионт.

Таким образом, выявленные различия в строении органа Галлера данного подрода косвенно говорят о его полифилии. Для решения этого вопроса необходимы дальнейшие таксономические исследования. Мнение о полифилии подрода *Ixodes* s. str. разделяется и акарологами, использовавшими молекулярные методы (Xu et al., 2003).

Подрод *Phleoxodes* (рис. 5A, 6E–6H).

Представлен исключительноnidобионтами, в основном паразитами птиц и, в меньшей мере, млекопитающих.

Дистальный бугорок хорошо выражен, на нем располагаются 2 пары сенсилл дистального бугорка (рис. 5A). Углубление для сенсилл передней группы округлое или овальное (рис. 5A, 6E–6H), сенсилл передней группы 6, обычный набор. У всех изученных представителей подрода имеется одна весьма характерная черта, отличающая клещей *Pholeoixodes* от всех остальных *Ixodes*. Капсулярное отверстие имеет особую форму – оно вытянуто в дорзо-проксимальном направлении, обратно-каплевидное (рис. 5A, 6E–6H). Сочетание округлого углубления для сенсилл передней группы и изрезанного обратно-каплевидного капсулярного отверстия характерно для всех изученных представителей подрода. У личинки отсутствует одна из двух пар сенсилл дистального бугорка и одна из сенсилл передней группы (подобно тому, как это было показано для клещей подрода *Ixodes* s. str. (рис. 6).

Строение органа Галлера у клещей подрода не зависит от круга хозяев. Так, *I. arboricola* – паразит птиц-дуплогнездников (Heylen et al., 2014), *I. lividus* – встречается в норах ласточек-береговушек (Филиппова, 1977), а *I. texanus* – в норах мелких млекопитающих (Darsie, Anastos, 1957).

Межвидовых различий в строении органа Галеры выявить не удалось.

Подрод *Sternalixodes* (рис. 6I–6L, 7A)

Представлен исключительно австралийскими видами (Австралия, Новая Зеландия, Папуа) (9 видов) и характеризуется разнообразными местообитаниями и хозяевами.

Дистальный бугорок не выражен, сенсиллы переднего бугорка располагаются на плоской поверхности лапки. В отличие от вышеописанных подродов, этот подрод имеет всего одну пару этих сенсилл (рис. 6I–6L, 7A). Углубление для сенсилл передней группы овальное. В передней группе не 6, а 7 сенсилл, два пористых волоска, очень крупных, один занимает самое дистальное, а второй – самое проксимальное положение в группе (рис. 6I–6L, 7A). Капсулярное отверстие большое, в капсule 5 обонятельных сенсилл.

У представителей этого подрода, также как у представителей *Ixodes* s. str., однообразное, характерное для подрода строение органа Галлера связано только с таксономией и не связано с характером паразитизма. Например, *I. anatis* –nidобионт, паразитирующий на киви в Новой Зеландии; *I. cordifer* – паразитирует на сумчатых дуплогнездниках (полосатый кускус) (т. е. тожеnidобионт), а *I. hirsti* и *I. holocyclus* – немобионты, вызывающие паралич скота на пастбищах. Тем не менее строение органа Галлера у них практически идентично.

Согласно некоторым современным работам, основанным на молекулярно-генетических данных, *Ixodes anatis* не принадлежит к подроду *Sternalixodes* (Kwak et al., 2017). Однако строение органа Галлера несомненно говорит о том, что этот вид – типичный представитель указанного подрода (сравнить рис. 7A и рис. 6I–6L).

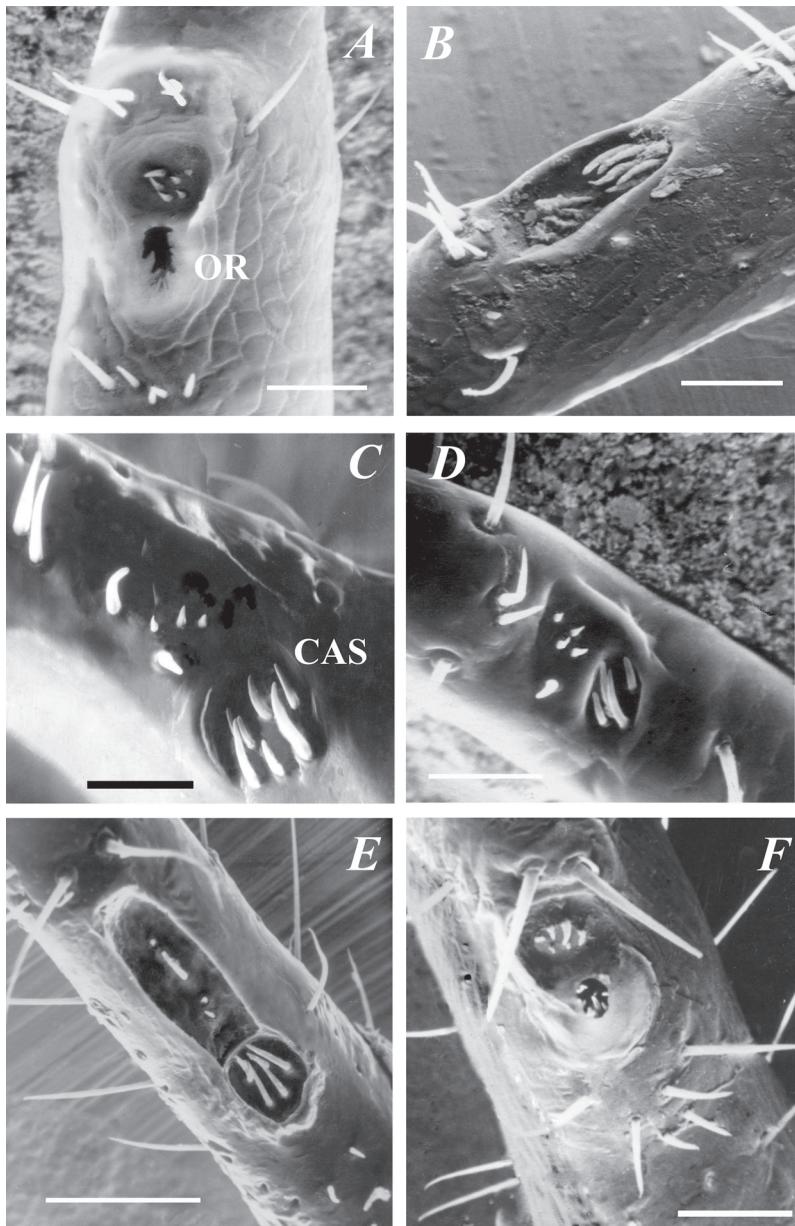


Рисунок 5. Строение органа Галлера у клещей рода *Ixodes* в растровом электронном микроскопе: А – самка *I. lивидус* (левая лапка); В – самка *I.simplex*; С – *I. uriae*, самка; Д – *I. uriae*, личинка; Е – *I. vespertilionis*, самка; F – *I. ovatus*, самка.
Масштабная линейка, мкм: А, В – 30; С, Д – 30; Е, F – 50.

Figure 5. Structure of the Haller's organ in ticks of the genus *Ixodes* in scanning electron microscope: A – female of *I. lивидус* (left tarsus); B – female of *I.simplex*; C – *I. uriae*, female; D – *I. uriae*, larva; E – *I. vespertilionis*, female; F – *I. ovatus*, female.
Scale, μm : A, B – 30; C, D – 30; E, F – 50.

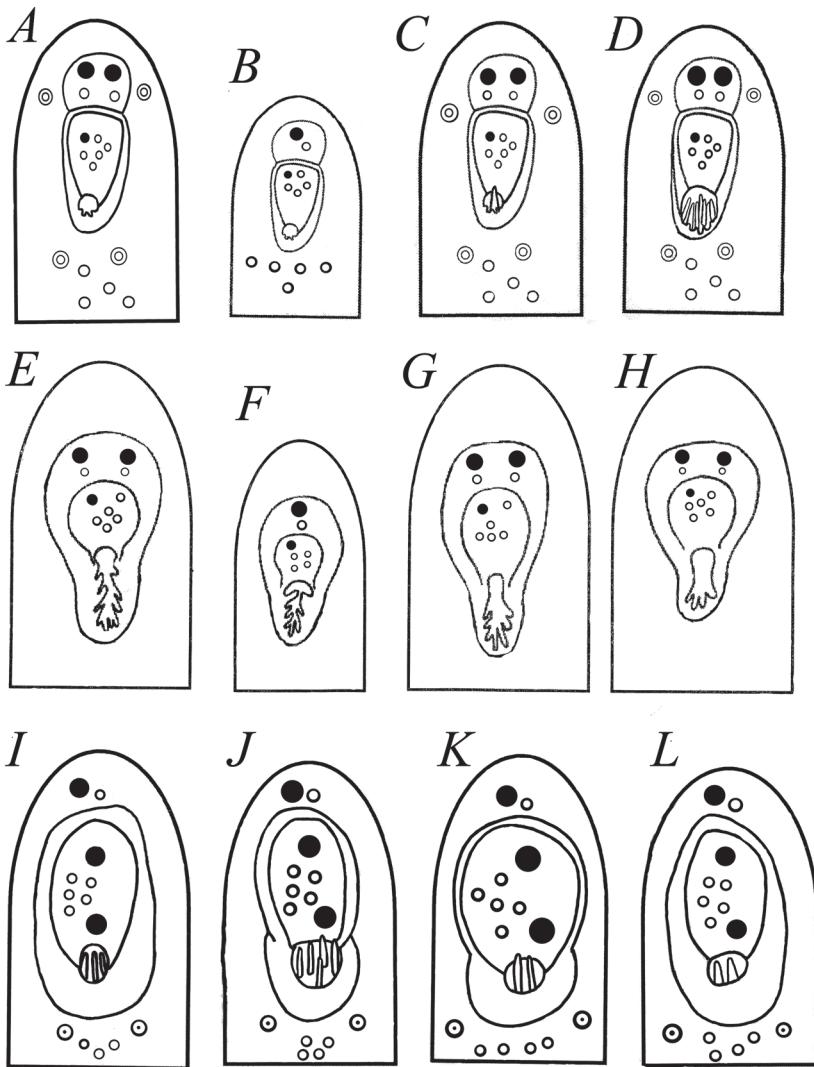


Рисунок 6. Схема внешнего строения органа Галлера у клещей рода *Ixodes*: представители подродов *Ixodes* s. str. (A–D), *Pholeoixodes* (E–H), *Sternalixodes* (I–L): A – *I. ricinus*; B – *I. ricinus* личинка; C – *I. persulcatus*; D – *I. redicorzevi*; E, F – *I. lividus* (самка и личинка); G – *I. arboricola*; H – *I. texanus* (рисунок по фотографии из работы (Homsher, Sonenshine, 1979); I – *I. dengrolagi*; J – *I. confusus*; K – *I. hirsti*; L – *I. holocyclus* (все из работы Homsher et al., 1988).

Figure 6. Scheme of the structure of the Haller's organ in ticks of the genus *Ixodes*: subgenera *Ixodes* s. str. (A–D), *Pholeoixodes* (E–H), *Sternalixodes* (I–L): A – *I. ricinus*; B – *I. ricinus* larva; C – *I. persulcatus*; D – *I. redicorzevi*; E, F – *I. lividus* (female and larva); G – *I. arboricola*; H – *I. texanus* (drawing on the basis of image from Homsher, Sonenshine, 1979); I – *I. dengrolagi*; J – *I. confusus*; K – *I. hirsti*; L – *I. holocyclus* (all from Homsher et al., 1988).

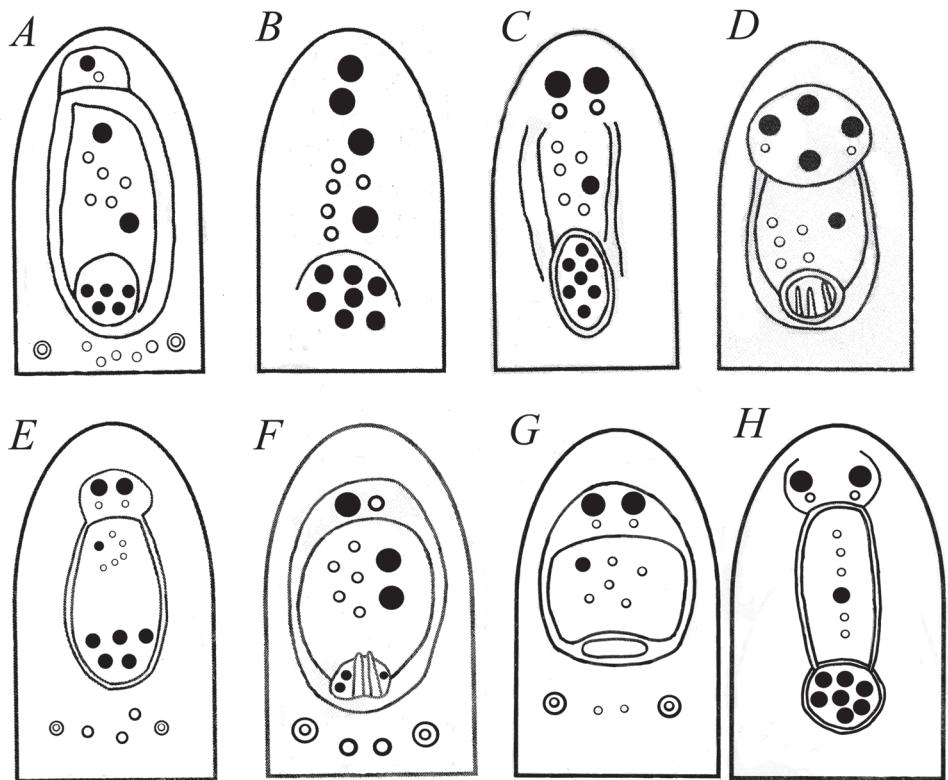


Рисунок 7. Схема внешнего строения органа Галлера у клещей рода *Ixodes*: представители подродов *Sternalixodes* (A), *Ceratixodes* (B), *Multidentatus* (C), *Trichotoixodes* (D), *Pomerantzevella* (E), *Endopalpiger* (F), *Ixodioipsis* (G) и *Eschatocephalus* (H). A – *I. anatis*; B – *I. uriae*; C – *I. percavatus*; D – *I. frontalis*; E – *I. simplex*; F – *I. woyliei*; G – *I. marxi*; H – *I. vespertilionis*.

Figure 7. Scheme of the structure of the Haller's organ in ticks of the genus *Ixodes*: subgenera *Sternalixodes* (A), *Ceratixodes* (B), *Multidentatus* (C), *Trichotoixodes* (D), *Pomerantzevella* (E), *Endopalpiger* (F), *Ixodioipsis* (G) and *Eschatocephalus* (H). A – *I. anatis*; B – *I. uriae*; C – *I. percavatus*; D – *I. frontalis*; E – *I. simplex*; F – *I. woyliei*; G – *I. marxi*; H – *I. vespertilionis*.

На примере этого подрода (как и вышеописанного подрода *Pholeoixodes*) особенно четко видно, что подродовые черты сохраняются у всех представителей подрода (у исследованных 8 видов из 9 видов, входящих в состав подрода) и зависят только от таксономического положения. Поэтому далее на рисунках автор приводит изображения не всех изученных видов данного подрода, а только одного из них, имея в виду, что у остальных орган Галлера устроен так же.

Подрод *Ceratixodes* (рис. 5C–5D, 7B)

Представлен единственным видом *Ixodes uriae*, который распространен в приполярных областях Северного и Южного полушарий и является типичным обитателем птичьих базаров.

Передний бугорок, как и углубление для сенсилл передней группы, отсутствует, все сенсиллы обоих отделов располагаются на плоской поверхности передней лапки (рис. 5C).

Сенсилл дистального бугорка две, но обе они представлены крупными пористыми волосками, т.е. редуцированные вкусовые сенсиллы отсутствуют.

В передней группе 7 сенсилл, имеются два пористых волоска, как у представителей подрода *Sternalixodes* (см. выше), также похож на представителей подрода *Sternalixodes* и по характеру расположения этих сенсилл (рис. 7B). Капсула открытая, имеется небольшое углубление, в котором видны 7 пористых волосков обонятельных сенсилл (рис. 5C).

У личинки отсутствуют один пористый и один бороздчатый волоски в составе передней группы сенсилл, в капсуле только 4 обонятельные сенсиллы (рис. 5D).

Подрод *Multidentatus* (рис. 7C)

Представители подрода связаны исключительно с птицами, преимущественно морскими (Hoogstraal, Aeschlimann, 1982).

Возвышение дистального бугорка не выражено, две пары сенсилл, каждая из которых включает длинный пористый и короткий вкусовой волоски, располагаются на прямой поверхности передней лапки.

В передней группе сенсилл 6 волосков, пористый занимает положение, показанное на рис. 7C. Капсула открытая, содержит 7 обонятельных сенсилл (рис. 7C). У обоих изученных видов (*I. paranaensis* и *I. percavatus*) строение органа Галлера практически идентично.

Подрод *Trichotoixodes* (рис. 7D)

Паразиты птиц (Buczek et al., 2016).

У двух изученных видов (*I. frontalis* и *I. brunneus*) орган Галлера устроен сходно.

Передний бугорок хорошо выражен, крупный, на нем располагаются 6 сенсилл: 4 длинных пористых обонятельных волоска и 2 коротких вкусовых волоска (характер расположения сенсилл показан на рис. 7D). Углубление сенсилл передней группы отчетливое, окружено кутикулярным валиком, расположение сенсилл сходно с таковым у *Ixodes* s. str. Капсулярное отверстие большое, округлое, число сенсилл в капсуле определить не удалось.

Подрод *Pomerantzevella* (рис. 5B, 7E)

Широко распространенные (Европа, Африка, Юго-Восточная Азия, Австралия, Новая Зеландия) паразиты рукокрылых. Кроме изученного автором *I. simplex*, подрод включает еще один вид – *Ixodes spiculae* Arthur, 1956, известный только по одному самцу из Африки (без данных о месте находки и хозяине) (Филиппова, 1977).

Передний бугорок хорошо развит, с двумя парами сенсилл (рис. 5B, 7E). Сенсииллы передней группы и сенсииллы капсулы находятся в одном общем углублении (рис. 5B). Расположение сенсилл передней группы сходно с таковым представителей *Ixodes* s. str. (рис. 7E).

Подрод *Endopalpiger* (рис. 7F)

Преимущественно австралийский род, в основном паразиты сумчатых и однопроходных.

Углубление для сенсилл передней группы овальное, окружено валиком, волосков дистального бугорка одна пара (рис. 7F). Сенсиилл передней группы 7 (два пористых волоска, расположение показано на рис. 7F). Капсуллярное отверстие овальное, слегка вытянутое в поперечном направлении, в капсуле 5 сенсиилл.

Подрод *Ixodiopsis* (рис. 7G)

Голарктический подрод включаетnidобионтов и немобионтов, для последних обычны каменистые местообитания, нападают на хозяев с поверхности почвы (Филиппова, 1977).

Строение органа Галлера близко таковому *Ixodes* s. str., однако углубление для сенсилл передней группы слегка вытянуто в поперечном членнику направлении, отверстие капсулы также почти щелевидное (рис. 7G). К сожалению, плохое качество фотографий, приведенных в работе Homsher, Sonenshine, 1975, не позволяет рассмотреть строение органа более подробно.

Подрод *Eschatocephalus* (рис. 5E, 7F)

Согласно данным Филипповой (1977), достоверно известен один вид – изученный автором *Ixodes vespertilionis*, паразит рукокрылых. Недавно был описан второй вид этого подрода – *I. ariadnae* Hornok et al., 2014, орган Галлера которого был исследован Хорноком с соавторами (Hornok et al., 2015). Строение органа Галлера у обеих видов практически идентично.

Дистальный бугорок развит, передняя часть бугорка сглажена, на бугорке располагаются две пары сенсилл (Рис. 5E). Углубление для сенсиилл передней группы узкое, сильно вытянутое в дорзо-проксимально направлении. Сенсииллы передней группы расположены в линию, пористый волосок находится примерно посередине линии (рис. 5E, 7F). Капсула открытая, отделена от переднего углубления кутикулярным валиком. Имеются 7 капсуллярных сенсиилл.

Подрод *Partipalpiger* (рис. 5F)

Строение органа Галлера очень близко к таковому *Ixodes* s. str. Для подрода *Partipalpiger* характерны округлое капсулярное отверстие с неизрезанными краями, сближенное положение волосков дистального бугорка и мелкие размеры редуцированных вкусовых сенсилл.

Подрод *Afrixodes* (рис. 3)

Строение органа Галлера на всех фазах развития показано на примере *I. rubicundus* (Belozerov et al., 1996).

Таким образом, анализ строения органа Галлера у клещей подсемейства Ixodinae, представленного в мировой фауне единственным родом *Ixodes*, показал, что существенные различия в морфологии касаются представителей отдельных подродов, в то время как межвидовые различия в пределах отдельного подрода практически несущественны. Особенно это касается четко установленных и явно монофилетических подродов, таких как *Pholeoixodes*, *Sternalixodes*, *Ceratixodes*, *Multidentetus*. В то же время наибольшие внутриподродовые вариации наблюдаются в пределах подродов, чей таксономический статус окончательно не определен (например, *Ixodes* s. str.). Эти обстоятельства позволяют рекомендовать использование данных по строению органа Галлера в систематике клещей рода *Ixodes* (и других родов, что будет показано во втором сообщении). Отметим, что во всех работах, посвященных систематике клещей рода *Ixodes*, данные по органу Галлера никак не используются. Использование этих данных, наряду с данными, полученными молекулярными методами, в случае неясной картины, позволили бы склонить чашу весов на ту или иную сторону.

Например, в работе Клиффорда с соавторами (Clifford et al., 1973) подрод *Trichotoixodes* включен в состав *Ixodes* s. str., в то время как орган Галлера у представителей этих подродов различается очень сильно (сравни рис. 6A–6D и рис. 7D). Подрод *Pholeoixodes* синонимизируется с подродом *Ixodiopsis*, что никак не соответствует строению органа Галлера у представителей этих подродов (см. рис. 6E–6H и рис. 7G). Еще один пример. В работе Charrier et al. (2019) филогенетические реконструкции, выполненные по данным транскриптомного анализа представителей *Ixodes* s. str., показали, что *I. holocyclus* (подрод *Sternalixodes*) и *Ixodes uriae* (*Ceratixodes*) образуют общую кладу, отдельную от клады, образованной видами *I. ricinus*, *I. persulcatus*, *I. scapularis* (подрод *Ixodes* s. str.). Это в целом соответствует особенностям строения у них органа Галлера.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена по Государственному заданию «Разнообразие паразитарных систем, адаптаций и путей эволюции паразитов» (номер темы: АААА-А19-119020690109-2). В работе были использованы материалы коллекции Зоологического института РАН (ЗИН РАН) (УФК ЗИН рег. № 2-2.20).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Леонович С.А. 1976. Морфология органа Галлера у клещей семейства Ixodidae (Acarina: Ixodoidea). Исследования в растровом электронном микроскопе. Проблемы зоологии. Л., Наука, с. 59–61.
- Леонович С.А. 1977. Электронно-микроскопическое исследование органа Галлера клеща *Ixodes persulcatus* (Ixodidae). Паразитология 11 (4): 340–347.
- Леонович С.А. 1985. Органы чувств. В кн. Таежный клещ *Ixodes persulcatus* Sch. (Acarina, Ixodidae). Морфология, систематика, экология, медицинское значение. Л.: Наука, с. 77–83.
- Леонович С.А. 2005. Сенсорные системы паразитических клещей. СПб., Наука, 235 с.
- Леонович С.А. 2019. О типах паразитизма иксодовых клещей (Ixodidae). Паразитология 53 (5): 416–420. DOI: 10.1134/S0031184719050053
- Филиппова Н.А. 1977. Иксодовые клещи подсемейства Ixodinae. Фауна СССР. Паукообразные. Т. 4. Вып. 4. Л., Наука, 386 с.
- Ash A., Elliot A., Godfrey S., Burmej H., Abdad M.Y., Northover A., Wayne A., Morris K., Clode P., Lymbery A., Thompson R.C.A. 2017. Morphological and molecular description of *Ixodes woyliei* n. sp. (Ixodidae) with consideration for co-extinction with its critically endangered marsupial host. Parasites and Vectors 10, Article number: 70.
- Barker S. C., Murrell A. 2004 . Systematics and evolution of ticks with a list of valid genus and species names. Parasitology 129: S15–S36. 10.1017/S0031182004005207
- Barros-Battesti D.M., Arzua M., Pichorim M., Keirans J.E. 2003. *Ixodes (Multidentatus) paranaensis* n. sp. (Acar: Ixodidae) a parasite of *Streptoprocne biscutata* (Slater 1865) (Apodiformes: Apodidae) birds in Brazil. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 98 (1). <https://doi.org/10.1590/S0074-02762003000100013>
- Belozerov V.N., Kok D.J., Fourie L.J., Leonovich S.A. 1996. The external structure of Haller's sensory organ in the Karoo paralysis tick *Ixodes (Afrixodes) rubicundus* Neum. (Ixodidae). Proceedings IX International Congress of Acarology (Michigan), 1996, pp. 397–399.
- Buczek A., Bartosik K., Olszewski T., Stepien K., Kubrak T., Sałata M. 2006. Host specificity of ticks (Acar: Ixodida). In: Arthropods. Epidemiological importance. Koliber, Lublin, pp. 37–54.
- Charrier N.P., Hermouet A., Hervet C., Agoulon A., Barker S.C., Heylen D., Toty C., McCoy K.D., Plantard O., Rispe C. 2019. A transcriptome-based phylogenetic study of hard ticks (Ixodidae). Scientific Reports 9, Article number 12923.
- Clifford C.M., Sonenshine D.E., Keirans J.E., Kohls G.M. 1973. Systematics of the Subfamily Ixodinae (Acarina: Ixodidae). 1. the Subgenera of *Ixodes*. Annals of the Entomological Society of America 66 (3): 489–500. <https://doi.org/10.1093/aesa/66.3.489>
- Darsie R.F., Anastos G. 1957. Geographical distribution and hosts of *Ixodes texanus* Banks (Acarina, Ixodidae). Annals of the Entomological Society of America 50 (3): 295–301. <https://doi.org/10.1093/aesa/50.3.295>
- Haller G. 1881 . Vorläufige Bemerkungen Über das Gehurorgan der Ixodiden. Zoologische Anzeiger 4: 165–167.
- Hayashi F., Hasegawa M. 1983. Immature stages and reproductive characteristics of the lizard tick, *Ixodes asanumai* (Acarina: Ixodidae). Applied Entomology and Zoology 18 (3): 315–323. DOI <https://doi.org/10.1303/aez.18.315>

- Heylen D.J.A., Van Oosten A.R., Devriendt N., Elst J. 2014. Seasonal feeding activity of the tree-hole tick, *Ixodes arboricola*. Parasitology 141 (8): 1044–1051. DOI: <https://doi.org/10.1017/S0031182014000225>
- Homsher P.J., Sonenshine D.E. 1975. Scanning electron microscopy of ticks for systematic studies: fine structure of Haller's organ in ten species of *Ixodes*. Transactions of the American Microscopical Society 94 (3): 368–374. DOI: 10.2307/3225501 <https://www.jstor.org/stable/3225501>
- Homsher P.J., Sonenshine D.E. 1979. Scanning electron microscopy of ticks for systematic studies: 3. Structure of Haller's organ in five species of the subgenus Multidentatus of the genus *Ixodes*. In Recent advances in acarology, Vol II. N.Y., Academic Press, pp. 485–491.
- Homsher P.J., Keirans J.E., Robbins R.G., Irwin-Pinkley L., Sonenshine D.E. 1988. Scanning electron microscopy of ticks for systematic studies: structure of Haller's organ in eight species of the subgenus *Sternalixodes* of the genus *Ixodes* (Acar: Ixodidae). Journal of Medical Entomology 25 (5): 348–353. <https://doi.org/10.1093/jmedent/25.5.348>
- Homsher P.J., Sonenshine D.E. 1977. Scanning electron microscopy of ticks for systematic studies 2. Structure of Haller's organ in *Ixodes brunneus* and *Ixodes frontalis*. Journal of Medical Entomology 14 (1): 93–97. <https://doi.org/10.1093/jmedent/14.1.93>
- Honzakova E., Sixl W., Waltinger H. 1975. Scanning electron microscopy of the ticks *Ixodes laguri* and *Ixodes arboricola*: surface structures of Haller's organ. Folia Parasitologica 22: 241–243.
- Hoogstraal H., Aeschlimann A. 1982. Tick-host specificity. Bulletin de la Société Entomologique Suisse 55: 5–32.
- Hornok S., Kontschán J., Estrada-Peña A., de Mera I.G.F., Tomanović S., de la Fuente J. 2015. Contributions to the morphology and phylogeny of the newly discovered bat tick species, *Ixodes ariadnae* in comparison with *I. vespertilionis* and *I. simplex*. Parasites and Vectors 8: 47.
- Kwak M.L., Beveridge I., Koehler A.V., Malipatil M., Gasser R.B., Jabbar A. 2017. Phylogenetic analysis of the Australasian paralysis ticks and their relatives (Ixodidae: *Ixodes*: *Sternalixodes*). Parasites & Vectors 10, Article number: 122.
- Leonovich S.A. 2004. Phenol and lactone receptors in the distal sensilla of the Haller's organ in *Ixodes ricinus* ticks and their possible role in host perception. Experimental and Applied Acarology 32 (1–2): 89–102. DOI: 10.1023/B:APPA.0000018200.24760.78
- Leonovich S.A., Belozerov V.N. 1992. Regeneration of Haller's sensory organ in the tick *Ixodes ricinus* L. Experimental and Applied Acarology 15: 59–79.
- Leonovich S.A., Dimov I. 2012. Sense organs on palps and fore tarsi of gamasid mites (Parasitiformes, Rhinonyssidae), parasites of the nasal cavity of the great tit, the rock dove, and the Eurasian coot. Entomological Review 92 (46): 1012–1019. DOI: 10.1134/S0013873812090084
- Leonovich S.A., Stanyukovich M.K. 2011. Sensory organs of mesostigmatic mites (Acarina, Mesostigmata) dwelling in body cavities of mammals and birds. Proceedings of the Zoological Institute RAS 315 (3): 263–273.
- Onofrio V.C., Labruna M.B., Faccini J.L.H., Barros-Battesti D.M.. 2010. Description of immature stages and redescription of adults of *Ixodes luciae* Sénevet (Acar: Ixodidae). Zootaxa 2495: 53–64.
- Ronghang B., Roy B. 2014. A Scanning electron microscopic observations on sensilla of *Ixodes acutitarsus* recovered from semi-wild cattle *Bos frontalis* Lambert. Entomology and Applied Science Letters 1 (4): 8–15.
- Shao R., Barker S.C., Mitani H., Aoki Y., Fukunaga M. 2005. Evolution of duplicate control regions in the mitochondrial genomes of Metazoa: a case study with Australasian *Ixodes* ticks. Molecular Biology and Evolution 22 (3): 620–629. <https://doi.org/10.1093/molbev/msi047>
- Smith C.N. 1945. Biology of *Ixodes dentatus* Neumann (Ixodidae). Annals of the Entomological Society of America 38 (2): 223–233. <https://doi.org/10.1093/aesa/38.2.223>
- Xu G., Fang Q.Q., Keirans J.E., Durden L.A. 2003. Molecular phylogenetic analyses indicate that the *Ixodes ricinus* complex is a paraphyletic group. Journal of Parasitology 89 (3): 452–457. [https://doi.org/10.1645/0022-3395\(2003\)089\[0452:MPAITT\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1645/0022-3395(2003)089[0452:MPAITT]2.0.CO;2)

THE STRUCTURE OF THE HALLER'S ORGAN AND TAXONOMY
OF IXODID TICKS OF THE SUBFAMILY IXODINAE
(FAMILY IXODIDAE)

S. A. Leonovich

Keywords: Haller's organ, scanning electron microscopy, Ixodinae, *Ixodes*, taxonomy

SUMMARY

The analysis of the structure of the Haller's organ, the main sensory organ of ixodid ticks, was performed on the basis of own and literary data, obtained by methods of scanning electron microscopy. A total of 43 hard tick species of the genus *Ixodes* Latreille, 1795, solitary genus of the subfamily Ixodinae, were examined, including representatives of 13 subgenera of the genus: *Ixodes* s. str. (14 species), *Pholeoixodes* Schulze, 1942 (3 species), *Ixodiopsis* Filippova, 1957 (4 species), *Ceratixodes* Neumann, 1902 (1 species), *Scaphixodes* Schulze 1941 (2 species), *Trichotoixodes* Reznik, 1961 (2 species), *Partipalpiger* Hoogstraal, Clifford, Saito & Keirans 1973 (1 species), *Pomerantzevella* Feider, 1965 (1 species), *Eschatocephalus* Frauenfeld, 1851 (2 species), *Afrixodes* Morel, 1966 (1 species), *Sternalixodes* Schulze, 1938 (8 species), *Multidentatus* Clifford, Sonenshine, Keirans & Kohls, 1973 (3 species), *Endopalpiger* Schulze (1935) (1 species). Taxonomic characters in the structure of the organ (the number and topography of sensilla in different parts of the organ, the presence and shape of the capsular orifice, shape of the anterior trough, etc.) were revealed. It was demonstrated that that the structure of the Haller's organ is specific for each subgenus, whereas interspecific differences within each certain subgenus are virtually very poor. Comparison of the obtained data with existing views on taxonomy of the genus *Ixodes* was performed.

УДК 595.122.2:575.174

GENETIC DIVERSITY IN MONOXENOUS AND TRIXENOUS DIGENEANS SHARING ONE MOLLUSCAN HOST SPECIES

© 2020 A. Gonchar^{a, b, *}

^a Department of Invertebrate Zoology, St Petersburg University,
Universitetskaya emb., 7/9, Saint Petersburg, 199034 Russia

^b Zoological Institute Russian Academy of Sciences,
Universitetskaya emb., 1, Saint Petersburg, 199034 Russia

* e-mail: anya.gonchar@gmail.com, a.gonchar@spbu.ru

Received 04.10.2020

Received in revised form 22.10.2020

Accepted 22.10.2020

Mudsnails *Peringia ulvae* serve as hosts for many digenean species; some of them differ a lot in their life cycle pattern. In the north of Europe two contrasting examples are *Cryptocotyle concava* (Heterophyidae) with a trixenous life cycle and *Bunocotyle progenetica* (Hemiridae) with a monoxenous life cycle. A ~ 870 base pairs long fragment of cox1 gene sequence was used to evaluate and compare genetic structure within these two species. Our findings suggest that high dispersal of *C. concava* keeps differentiation between different locations minimal and haplotype diversity quite high. In *B. progenetica* two haplotypes dominate and have at least limited dispersal.

Keywords: Digenea, life cycle, intraspecific diversity, *Bunocotyle progenetica*, *Cryptocotyle concava*

DOI: 10.31857/S1234567806060036

Monoxenous life cycles are not common in Digenea, but they occur and represent an extreme limitation of transmission (Poulin, Cribb, 2002). Such a limitation may offer some benefits, but also has significant drawbacks. One of the key concerns is the impact of one-host life cycle on the genetic diversity in a parasite. This impact may seem straightforward, but it has never been experimentally tested.

When a single host remains in the digenean life cycle, it is always a first intermediate host. Snails, the typical first intermediate hosts, usually harbour few clones of a parasite

following few infection events (Theron et al., 2004; Rauch et al., 2005; Keeney et al., 2007, 2008). Reproduction of the parthenitae – the sporocysts and rediae – does not produce genetic exchange and is in effect asexual. When the life cycle runs within one snail up until production of eggs or miracidia, these cannot be a result of mating between non-related parasites. So, in species with a monoxenous life cycle we expect lack of advantage from sexual reproduction and low genetic diversity.

Apart from sexual reproduction, intraspecific genetic diversity is also supported by spatial distribution and associated mixing opportunities. The most vagile host in the life cycle – for digeneans this generally means a vertebrate definitive host – largely determines genetic structure of a parasite. Birds and mammals provide better dispersal and less structure than fishes (Blasco-Costa, Poulin, 2013; Feis et al., 2015). Birds can even sustain connection between parasite populations that are geographically isolated (Gonchar, Galaktionov, 2020). In a monoxenous life cycle, the most vagile and the only host is a snail.

In the White Sea, the snails *Peringia ulvae* (along with their close relatives, *Ecrobia ventrosa*) serve as hosts for *Bunocotyle progenetica* (Markowski, 1936) Chabaud & Buttner, 1959 – the only monoxenous digenean in this region. These snails are also first intermediate hosts of other digeneans with more transmission events in their life cycles, for example, several species from families Microphallidae and Notocotylidae, and a heterophyid *Cryptocotyle concava* (Creplin, 1825) Lühe, 1899. The latter is an abundant parasite with a trixenous life cycle that involves fish second intermediate host and bird definitive host (a range of species with fish component in their diet, mainly gulls). It thus presents a contrasting example to *B. progenetica* regarding the expected genetic structure. Several studies have compared these two parasites of *P. ulvae* (Levakin, 2004, 2005; Levakin et al., 2013), but never in this particular aspect.

Here I for the first time assessed genetic structure of a monoxenous trematode (*B. progenetica*) and that of a trixenous one (*C. concava*) found in the same region and in the same molluscan host species.

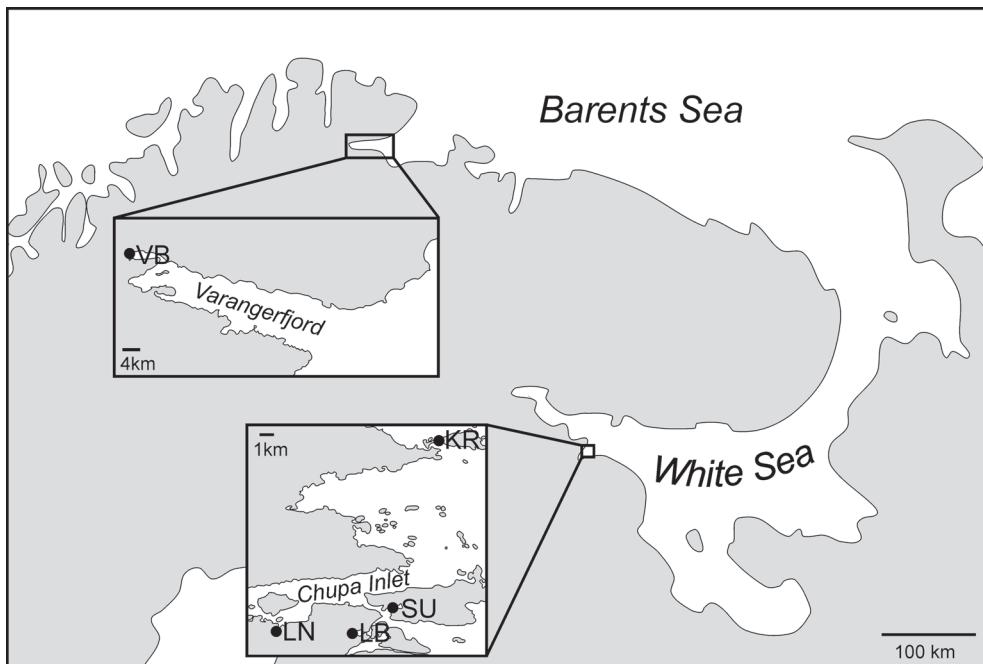
MATERIALS AND METHODS

The mud snails *Peringia ulvae* were collected in 2018–2019 in two regions: the Chupa Inlet in the Kandalaksha Bay of the White Sea (Russia) and the Varangerfjord in the south-western Barents Sea (Norway). The distance between these regions is about 500 km directly and about 1000 km along the shore line. In Varangerfjord, all the samples were taken from the same location, the large mudflat in the head of the fjord. In the Chupa Inlet, sampling took place in four locations within 10 km from each other. Sampling sites are summarized in fig. 1 and table 1.

Mud snails were collected during low tide using a sieve with a 1 mm mesh size, taken to the laboratory and dissected under a stereomicroscope to detect infection by digeneans. I selected rediae of *Cryptocotyle concava* and *Bunocotyle progenetica* from an infected snail, rinsed them in sea water and preserved in 96 % ethanol. Prevalence and intensity were not recorded.

Table 1. Collection sites

Region	Site	Coordinates
Varangerfjord, south-western Barents Sea	Varangerbotn	70°10'19.31"N, 28°33'52.42"E
Chupa Inlet, Kandalaksha Bay, White Sea	Sukhaya Salma Bay	66°18'42.12"N, 33°39'18.58"E
	Lebyazhya Bay	66°17'39.95"N, 33°35'04.88"E
	Levin Navolok Bay	66°17'50.57"N, 33°27'37.51"E
	Krasnyi Island	66°25'06.74"N, 33°44'09.03"E

**Figure 1.** Schematic map showing collection sites in the Barents and White Seas.

Sampling locations are marked with circles: VB – Varangerbotn, LN – Levin Navolok Bay, LB – Lebyazhya Bay, SU – Sukhaya Salma Bay, KR – Krasnyi Island.

To extract DNA, the ion exchange resin Chelex® 100, 200–400 mesh, molecular biology grade (Bio-Rad) was used. A single reidia in a small drop of ethanol was transferred to a new 1.5 ml microtube; any remaining ethanol was evaporated by incubating an opened tube at 35 °C for 1–3 min. Then 200 µl of 5 % Chelex in Milli-Q water and 2 µl of proteinase K (20 mg/ml) were added to each tube and samples were incubated at 56 °C for 16–18 hours while mixing at 750 rpm on thermomixer (Eppendorf). Next, the samples were boiled at 90 °C for 8 min and centrifuged at 16,000 g for 10 min while cooling to 4 °C. DNA in supernatant was carefully transferred to a new tube and stored at -20 °C.

The fragment of cytochrome c oxidase subunit I (*cox1*) gene sequence was amplified with PCR in 20 µl reaction mixtures containing 13 µl Milli-Q water, 4 µl ScreenMix HS (Evrogen, Russia),

0.5 µl of each forward and reverse primer diluted to 10 pmol/µl and 2 µl of DNA template. I used JB3 forward primer (TTTTTTGGGCATCCTGAGGTTAT, Bowles et al., 1993) and trem.cox1.rnrl (AATCATGATGCAAAAGGT, Králová-Hromadová et al., 2008) or COIRtrema (CAACAAAT-CATGATGCAAAAGG, Miura et al., 2005) reverse primer. PCRs were run on a Veriti thermal cycler (Thermo Fisher Scientific) with the following thermal profile: initial denaturation at 94 °C for 3 min; 35 cycles with 40 s at 94 °C, 40 s at 48 °C (trem.cox1.rnrl) or 51 °C (COIRtrema) and 40 s at 72 °C; final elongation at 72 °C for 7 min; and cooling to 4 °C. PCR products were size-separated with electrophoresis in a 1 % agarose gel (5 min at 60 V and 40 min at 80 V), stained with SybrGREEN (Invitrogen); results were visualized and photographed using ChemiDoc MP (Bio-Rad). Sequencing of fragments was performed directly from PCR mixture and with PCR primers in both directions on the automated ABI 3500xl genetic analyzer (Applied Biosystems).

To process chromatograms I used Geneious 11.1.4 (<https://www.geneious.com>). Forward and reverse reads were assembled to verify resulting sequence, and the quality was checked by eye. Further quality control involved ensuring no inappropriate stop codons in a translated sequence (translation table 21), and testing for the functional effect of the amino acid substitutions using Provean with a default threshold – 2.5 (Choi et al., 2012). I also used the translated sequence to search for similar proteins using BLASTP 2.10.1 + (Altschul et al., 1997). The boundaries of cox1 gene were estimated by aligning to the annotated mitochondrial genome of *Metagonimus yokogawai* (NC_023249) as a reference. The alignment of all the obtained sequences was exported in *.nex format for further analysis. To construct a haplotype network, I used Integer NJ Net method with reticulation tolerance 0.5 in PopART 1.7 (Leigh, Bryant, 2015). To estimate sequence divergence I used MEGA7 (Kumar et al., 2016). Using DnaSP6 (Rozas et al., 2017) I calculated F_{ST} and Tajima's D; built a mismatch distribution graph using population growth-decline model and tested the fit to this model with a Harpending's raggedness index r. To test the significance of differences in haplotype diversity between the Chupa Inlet and the Varangerfjord for *C. concava* I used the R script “genetic_diversity_diffs v.1.0.6” (R Core Team, 2015; Alexander et al., 2016).

For comparison, I used partial cox1 sequences of European *Cryptocotyle lingua* isolates (Blakelock et al., 2008; EU876333–EU876430). These were aligned and analyzed in DnaSP6 and MEGA7, as described above.

RESULTS

A total of 102 specimens were collected: 54 *Cryptocotyle concava* and 48 *Bunocotyle progenetica*. In Varangerfjord only *C. concava* were found. In Chupa Inlet, Sukhaya Salma and Lebyazhya Bays were major sampling sites, while from Levin Navolok Bay there were only five isolates and from Krasnyi Island only one.

I obtained high quality sequences covering 3'-region of the cox1 gene and adjacent tRNA-coding region for 40 *C. concava* and 32 *B. progenetica* isolates. High AT content was observed in both species: 63.5 % in *C. concava* and 67.5 % in *B. progenetica*. Stop codon was TAA in both species. All the sequences were submitted to GenBank under accession numbers MT422274–MT422345.

Sequences of *C. concava* were 872–881 base pairs (b. p.) long after trimming, and the resulting alignment contained 869 positions of which 27 were polymorphic (table 2). Average genetic divergence within the species was $0.31 \pm 0.09\%$. In the translated sequence, the majority of substitutions appeared synonymous, with two exceptions: Val → Ile (position 56 of the amino acid alignment) and Ser → Pro (236). None of these changes were predicted to have functional effect. Position 264 was a stop codon at the end of the cox1 gene sequence. The closest BLAST hit was *Metagonimus suifunensis* (QFS15968) with 87.6 % identity.

A total of 23 *C. concava* haplotypes were discovered; five of them were shared between Varangerfjord and Chupa Inlet. The average number of nucleotide differences between these populations was 2.885 and F_{st} was 0.12. The differences in haplotype diversity between the populations is not significant ($p = 0.195$). The cox1-based haplotype network for *C. concava* is in fig. 2a; it has reticulated structure and a repeated starburst pattern. Most haplotypes differed by one or two substitutions; the maximum difference between the two neighbouring haplotypes was four substitutions. Haplotype A was dominant in Varangerfjord; haplotype B occurred in all five sampling sites; 17 haplotypes were unique. Mismatch distribution was unimodal (fig. 3a).

For *B. progenetica* sequences were 853–860 b.p., and the alignment was 853 b.p. Average pairwise distance per site between all sequences was $0.21 \pm 0.1\%$. Four positions were polymorphic (table 2). In the translated sequence, three of them appeared non-synonymous: Ser → Asn (position three of the amino acid alignment), Ile → Val (4), and Thr → Met (239). None of these changes were predicted to have functional effect. Position 260 was a stop codon at the end of the cox1 gene sequence. The closest BLAST hit was *Isoparorchis eurytremum* (BAO74170) with 74 % identity.

The cox1-based haplotype network for *B. progenetica* is in fig. 2b. A total of three haplotypes were discovered, the neighbouring haplotypes differing by two or three substitutions. Haplotypes C (frequency 16) and D (11) were dominant, and were found in both major sampling sites (Sukhaya Salma and Lebyazhya Bays). Haplotype E (frequency 5) occurred in all the three sampling sites. Mismatch distribution was bimodal (fig. 3b).

I analyzed 98 cox1 sequences of *C. lingua* from GenBank. The samples originated from 16 sites in Europe: seven in southern Scandinavia, six in the UK and three along the continental coast of central Europe. The alignment was 1043 b.p. long, overlapping by 372 b. p. with the 5'-region of the cox1 alignment for *C. concava*. There were 19 non-synonymous substitutions across the whole alignment. The fragment overlapping for *C. lingua* and *C. concava* included 123 amino acids and had 10 fixed differences between the species. The total number of cox1 haplotypes for *C. lingua* was 72, with haplotype and nucleotide diversity values $Hd = 0.984$ and $\pi = 0.00379$.

Table 2. Genetic diversity indices based on cox1 sequences

Dataset		b. p.	N	S	H	Hd	π	K	Tajima's D
<i>B. progenetica</i>	all	853	32	4	3	0.627	0.00208	1.97	n.s.
<i>C. concava</i>	all	869	40	27	23	0.932	0.00312	2.715	-1.95**
	VB	869	20	14	12	0.879	0.00249	2.163	-1.65*
	CH	869	20	18	15	0.942	0.00335	2.911	-1.6*

VB – Varangerfjord, CH – Chupa Inlet, b.p. – length of alignment, N – number of samples, S – Number of polymorphic sites, H – number of haplotypes, Hd – haplotype diversity, π – nucleotide diversity, K – average number of nucleotide differences, * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$, n.s. not significant.

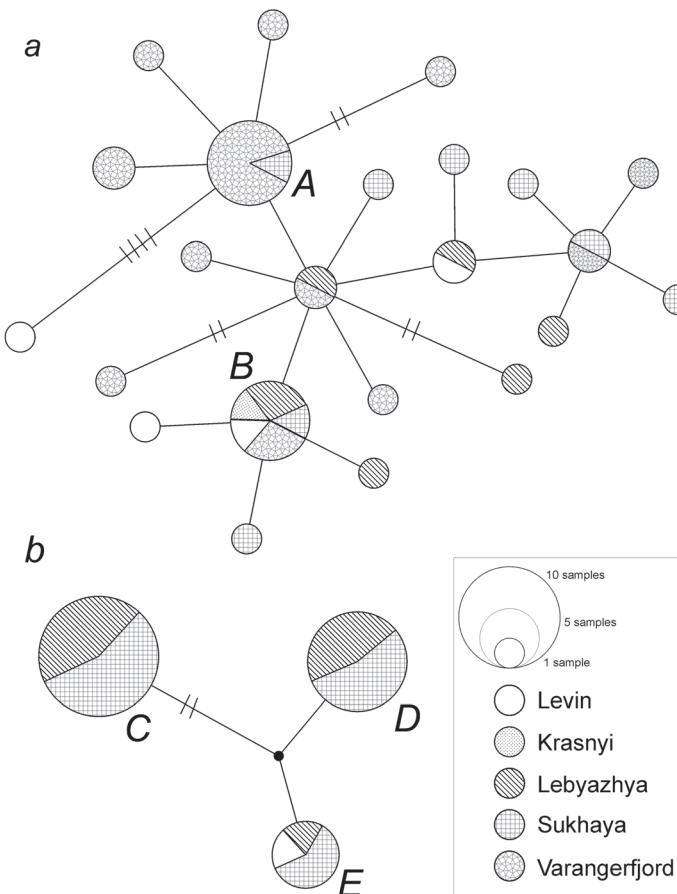


Figure 2. Haplotype networks based on cox1 sequence data for (a) *Cryptocotyle concava*, $n=40$; and (b) *Bunocotyle progenetica*, $n=32$. Circles indicate haplotypes, their frequencies correspond to circle sizes. Haplotypes connected by line differ by one (no hatch marks) or more (number of hatch marks) substitutions. Black dot illustrates a missing haplotype. Capital letters A–E mark haplotypes mentioned in the text. Sampling locations are represented by different fill patterns. Levin – Levin Navolok Bay, Krasnyi – Krasnyi Island, Lebyazhya – Lebyazhya Bay, Sukhaya – Sukhaya Salma Bay.

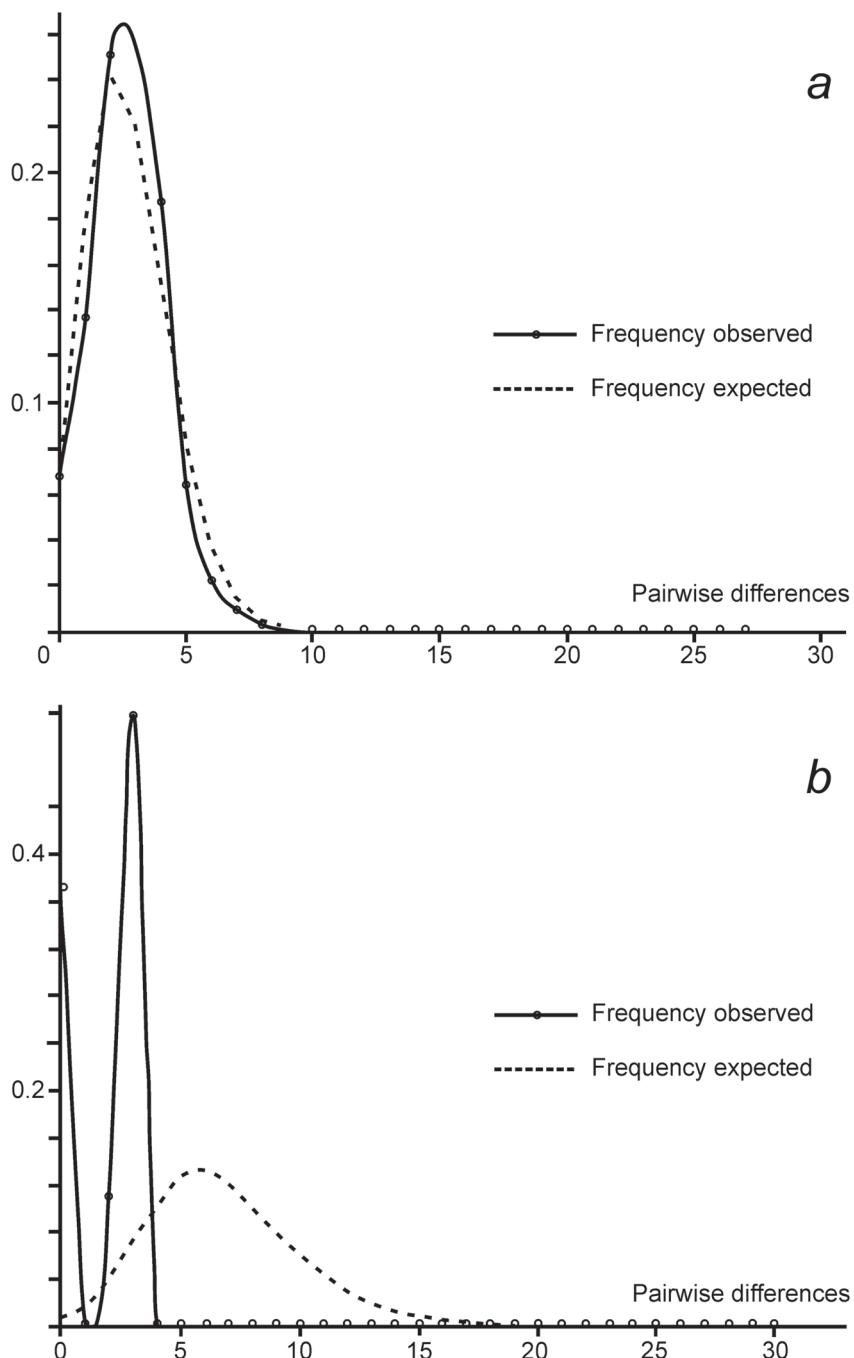


Figure 3. Mismatch distributions based on cox1 haplotypes for (a) *Cryptocotyle concava* and (b) *Bunocotyle progenetica*. Solid lines show observed frequencies, dashed lines show expected frequencies.

DISCUSSION

This study dealt with two species of trematodes that share the same first intermediate host, *Peringia ulvae*, but have a contrasting life cycle strategy. I obtained 72 sequences of a ~ 870 b.p. long fragment that included a 3'-region of cox1 gene. For *Cryptocotyle concava* this was the first molecular genetic evidence. Data on *Bunocotyle progenetica* were, to the best of our knowledge, the first intraspecific genetic diversity data for a monoxenous digenean. The study had relatively small sample sizes, relied on one DNA marker and provided non-exhaustive geographic range of sampling. The latter was especially critical for *B. progenetica* which I did not find in northern Norway. Despite these limitations, the results contribute to building a global picture of genetic diversity in digeneans.

For *C. concava*, the samples from two distant locations (Varangerfjord and Chupa Inlet) have shown lack of genetic differentiation. The haplotype network illustrates this well: five haplotypes are shared between the two locations, and haplotype pattern does not match a location pattern (fig. 2a). To test these observations I calculated F_{st} measure. It infers genetic differentiation from comparing genetic diversity within and among (sub)populations (Holsinger, Weir, 2009). In *C. concava*, $F_{st} = 0.12$ indicates gene flow between Varangerfjord and Chupa. This gene flow is consistent with the vagility of definitive hosts: birds can maintain long-distance dispersal of the parasite. This type of life cycle is called allogenic; the opposite is autogenic when the definitive hosts are fish, and colonization potential is smaller (Esch et al., 1988). Meta-analysis has also found that genetic structuring is lower in allogenic trematodes (Blasco-Costa, Poulin, 2013). The study of the two trixenous trematode species – autogenic and allogenic – in a marine environment gave the same result (Feis et al., 2015). Our results are thus consistent with the established ideas.

The results of this study were compared with those on three other representatives of Heterophyidae. All of them have a three-host life cycle where a definitive host is a fish-eating bird or mammal (including humans). First, I re-analyzed the published dataset for a closely related marine species *C. lingua* in Europe (Blakeslee et al., 2008), and proved no differentiation across sampling locations ($F_{st} = 0$). Then, the freshwater species *Metagonimus suisunensis* in the Russian Far East also follows this trend ($F_{st} = 0.05$, excluding the only sample from the northernmost location which had a highly diverged haplotype) (Tatonova et al., 2019). However, *Haplorchis taichui* forms several isolated populations in Vietnam (Dung et al., 2013) and, at the broader scale, in the mainland Southeast Asia (Thaenkham et al., 2017). These examples highlight that, although some trends in population genetics of trematodes have been identified, the case of every species adds new information.

Demographic history of *C. concava* inferred from sequence data suggests recent population expansion. The first evidence is the haplotype network that has star-like features, showing many unique haplotypes closely related to few central ones (structure similar to

type ii “complex star” in Jenkins et al., 2018). Population expansion can also be detected by neutrality tests, for example Tajima’s D that compares average pairwise differences with the number of segregating sites. For populations that underwent bottleneck recently it takes negative value, which is the case for *C. concava*. Further evidence is the unimodal mismatch distribution (fig. 3a). Probably the traces of bottleneck event that are observed in *C. concava* and *C. lingua* (Tajima’s D = -2.59) date from the last glacial maximum.

In the Chupa Inlet, *C. concava* and *Bunocotyle progenetica* were collected in the same sites, and even though sample sizes were not equal, the dataset is suitable for comparison. The number of detected haplotypes (H), haplotype diversity (Hd) and nucleotide diversity (π) were higher in *C. concava* (table 2). The difference is also evident from the haplotype network (fig. 2). Low intraspecific variability in *B. progenetica* is likely due to its life cycle that runs within one mollusc individual. This favours local expansion of single haplotypes but limits dispersal and genetic exchange.

Dispersal of *B. progenetica* relies on dispersal of its only host, the mollusc. *P. ulvae* may spread at the larval stage, but veligers cannot carry a parasite. Juveniles and adults of mud snails can float at the water surface and thus move much faster than by crawling (reviewed in Anderson, 1971; Armonies, Hartke, 1995). They may also be able to disperse once ingested by a bird, passing through the gut still alive (Haase et al., 2010; Cadée, 2011; van Leeuwen et al., 2012). At the local scale, either of these processes must be happening in the Chupa Inlet, as we find the same haplotypes of *B. progenetica* in different spots throughout the inlet (fig. 2). At the larger scale, biogeographic data on *P. ulvae* suggest that gene flow is quite high between the Baltic and the White Sea, probably due to dispersal by birds (Wilke, Davis, 2000). It is thus likely that *B. progenetica* was transferred to White Sea also from the Baltic, which is consistent with the records of this parasite there (Markowski, 1936; Reimer, 1961).

Since three *B. progenetica* haplotypes were detected at the White Sea, at least three *P. ulvae* infected with genetically distinct *B. progenetica* had arrived here at some point. This could have happened on a single occasion (for example, if snails were carried by the same bird) or as several independent events. The number of such events may be underestimated judging from present data: some parasite haplotypes may be unsampled; some could have become extinct at the White Sea; and some arriving snails could carry genetically identical parasites.

In any case, we assume that divergence of *B. progenetica* into the three haplotypes differing by 2–3 substitutions could not happen within the White Sea. It is a geologically young water body which formed and was colonized after the end of the last glacial maximum (LGM), not before 20 kya (Svendsen et al., 2004; Hughes et al., 2016). Considering the estimate of mutation rate for cox1 gene in digeneans as 2.5 % per Ma (Attwood et al., 2008),

the three haplotypes could not have formed at the White Sea. The Baltic Sea was also under ice during the LGM; the mud snails and parasites could spread here from the refugia at the Atlantic coast of Europe where *B. progenetica* is also documented now (Deblock, 1978).

Summing up, our findings on the genetic diversity in *C. concava* and *B. progenetica* illustrate some differences that would be expected between a tri- and monoxenous digenean species. Data on *C. concava* expand understanding of dispersal in species with an avian definitive host. As for *B. progenetica*, further study of intraspecific variation patterns could clarify more on its dispersal and persistence abilities. This will require sampling at a larger geographic scale, and sampling across several years to test whether the same haplotypes continue to dominate.

ACKNOWLEDGEMENTS

Funding for this study was provided by the Russian Foundation for Basic Research, grant number 18-34-01001. The study was carried out using the resources of the Educational and Research Station “Belomorskaiia” of St Petersburg University (SPbU) and the White Sea Biological Station “Kartesh” of the Zoological Institute of Russian Academy of Sciences (ZIN RAS). Sampling was in part supported by ZIN RAS according to the research programme number AAAA-A19-119020690109-2. The study relied on equipment of the research resource centre “Molecular and Cell Technologies” SPbU. The author is grateful to Peter Smirnov for his great assistance with material collection, Prof. Andrei Granovitch for making sampling in Varangerfjord possible, and to Drs. Anna Romanovich and Aleksey Masharsky for excellent sequencing support.

REFERENCES

- Alexander A., Steel D., Hoekzema K., Mesnick S.L., Engelhaupt D., Kerr I., Payne R., Baker C.S. 2016. What influences the worldwide genetic structure of sperm whales (*Physeter macrocephalus*)? Molecular Ecology 25: 2754–2772.
- Altschul S.F., Madden T.L., Schäffer A.A., Zhang J., Zhang Z., Miller W., Lipman D.J. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. Nucleic Acids Research 25: 3389–3402.
- Anderson A. 1971. Intertidal activity, breeding and the floating habit of *Hydrobia ulvae*. Journal of Marine Biological Association UK 51: 423–437.
- Armonies W., Hartke D. 1995. Floating of mud snails *Hydrobia ulvae* in tidal waters of the Wadden Sea, and its implications in distribution patterns. Helgoländer Meeresuntersuchungen 49: 529–538.
- Attwood S.W., Fatih F.A., Upatham E.S. 2008. DNA-sequence variation among *Schistosoma mekongi* populations and related taxa; phylogeography and the current distribution of Asian schistosomiasis. PLoS Neglected Tropical Diseases 2 (3): e200.
- Blakeslee A.M., Byers J.E., Lesser M.P. 2008. Solving cryptogenic histories using host and parasite molecular genetics: the resolution of *Littorina littorea*’s North American origin. Molecular Ecology 17 (16): 3684–3696.

- Blasco-Costa I., Poulin R. 2013. Host traits explain the genetic structure of parasites: a meta-analysis. *Parasitology* 140 (10): 1316–1322.
- Bowles J., Hope M., Tiu W.U., Liu X., McManus D.P. 1993. Nuclear and mitochondrial genetic markers highly conserved between Chinese and Philippine *Schistosoma japonicum*. *Acta Tropica* 55 (4): 217–229.
- Cadée G.C. 2011. *Hydrobia* as “Jonah in the Whale”: shell repair after passing through the digestive tract of shelducks alive. *Palaios* 26 (4): 245–249.
- Choi Y., Sims G.E., Murphy S., Miller J.R., Chan A.P. 2012. Predicting the functional effect of amino acid substitutions and indels. *PLoS ONE* 7 (10): e46688.
- Deblock S. 1978. Distribution géographique des cercaires parasites des Mollusques du genre *Hydrobia* Hartman des côtes de France. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée* 53 (6): 577–593.
- Dung D.T., Hop N.T., Thaenkhram U., Waikagul J. 2013. Genetic differences among Vietnamese *Haplorchis taichui* populations using the COI genetic marker. *Journal of Helminthology* 87 (1): 66–70.
- Esch G.W., Kennedy C.R., Bush A.O., Aho J.M. 1988. Patterns in helminth communities in freshwater fish in Great Britain: alternative strategies for colonization. *Parasitology* 96: 519–532.
- Feis M.E., Thieltges D.W., Olsen J.L., de Montaudouin X., Jensen K.T., Bazaïri H., Culloty S.C., Luttkhuizen P.C. 2015. The most vagile host as the main determinant of population connectivity in marine macroparásites. *Marine Ecology Progress Series* 520: 85–99.
- Gonchar A., Galaktionov K.V. 2020. New data support phylogeographic patterns in a marine parasite *Tristriata anatis* (Digenea: Notocotylidae). *Journal of Helminthology* 94: e79, 1–5.
- Haase M., Naser M.D., Wilke, T. 2010. *Ecrobia grimmi* in brackish Lake Sawa, Iraq: indirect evidence for long-distance dispersal of hydrobiid gastropods (Caenogastropoda: Rissooidea) by birds. *Journal of Molluscan Studies* 76 (1): 101–105.
- Holsinger K.E., Weir, B.S. 2009. Genetics in geographically structured populations: defining, estimating and interpreting F_{ST} . *Nature Reviews Genetics* 10 (9): 639–650.
- Hughes A.L., Gyllencreutz R., Lohne Ø.S., Mangerud J., Svendsen J.I. 2016. The last Eurasian ice sheets—a chronological database and time-slice reconstruction, DATED-1. *Boreas* 45 (1): 1–45.
- Jenkins T.L., Castilho R., Stevens, J.R. 2018. Meta-analysis of northeast Atlantic marine taxa shows contrasting phylogeographic patterns following post-LGM expansions. *PeerJ* 6: e5684.
- Keeney D.B., Waters J.M., Poulin, R. 2007. Clonal diversity of the marine trematode *Maritrema novaezealandensis* within intermediate hosts: the molecular ecology of parasite life cycles. *Molecular Ecology* 16 (2): 431–439.
- Keeney D.B., Bryan-Walker K., King T.M., Poulin R. 2008. Local variation of within-host clonal diversity coupled with genetic homogeneity in a marine trematode. *Marine Biology* 154 (1): 183–190.
- Králová-Hromadová I., Špakulová M., Horáčková E., Turčeková L., Novobilský A., Beck R., Koudela B., Marinculić A., Rajský D., Pybus M. 2008. Sequence analysis of ribosomal and mitochondrial genes of the giant liver fluke *Fascioloides magna* (Trematoda: Fasciolidae): intraspecific variation and differentiation from *Fasciola hepatica*. *Journal of Parasitology* 94 (1): 58–67.
- Kumar S., Stecher G., Tamura K. 2016. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution* 33 (7): 1870–1874.
- Leigh J.W., Bryant D. 2015. PopART: Full-feature software for haplotype network construction. *Methods in Ecology and Evolution* 6 (9): 1110–1116.
- Levakin I.A. 2004. The influence of infections with trematodes *Bunocotyle progenetica* (Hemiridae) and *Cryptocotyle cancaum* (Heterophiidae) onto mortality of littoral molluscs *Hydrobia ulvae* (Gastropoda: Prosobranchia) in condition of extremely high temperature. *Parazitologija* 38 (4): 352–358.

- Levakin I.A. 2005. The influence of infections with trematodes *Bunocotyle progenetica* (Hemiridae) and *Cryptocotyle concavum* (Heterophyidae) onto mortality of littoral mollusks *Hydrobia ulvae* (Gastropoda: Prosobranchia) after freezing. *Parazitologija* 39 (5): 407–413.
- Levakin I.A., Nikolaev K.E., Galaktionov K.V. 2013. A case study of singular spectrum analysis application in parasitology: dynamics of prevalence of *Cryptocotyle concavum* and *Bunocotyle progenetica* trematode parthenites in *Hydrobia ventrosa* snails at the White Sea. *Parazitologija* 47 (1): 23–37.
- Markowski S. 1936. Über die Trematodenfauna der Baltischen Mollusken aus der Umgebung der Halbinsel Hel. *Bull. Acad. Polon. Sci. Lett. B* 2: 311.
- Miura O., Kuris A.M., Torchin M.E., Hechinger R.F., Dunham E.J., Chiba S. 2005. Molecular-genetic analyses reveal cryptic species of trematodes in the intertidal gastropod, *Batillaria cumingi* (Crosse). *International Journal for Parasitology* 35 (7): 793–801.
- Poulin R., Cribb T.H. 2002. Trematode life cycles: short is sweet? *Trends in Parasitology* 18 (4): 176–183.
- R Core Team. 2015. R: a language and environment for statistical computing. Vienna, Austria, R Foundation for Statistical Computing. Available at <https://www.r-project.org/> (accessed 22 June 2020).
- Rauch G., Kalbe M., Reusch T.B.H. 2005. How a complex life cycle can improve a parasite's sex life. *Journal of Evolutionary Biology* 18 (4): 1069–1075.
- Reimer L. 1961. Die Stufen der Progenesis bei dem Fischtrematoden *Bunocotyle cingulata* Odhner, 1928. *Wiadomości Parazyologiczne* 7 (4–6): 843–849.
- Rozas J., Ferrer-Mata A., Sánchez-DelBarrio J.C., Guirao-Rico S., Librado P., Ramos-Onsins S.E., Sánchez-Gracia A. 2017. DnaSP 6: DNA sequence polymorphism analysis of large datasets. *Molecular Biology and Evolution* 34: 3299–3302.
- Svendsen J.I., Alexanderson H., Astakhov V.I., Demidov I., Dowdeswell J.A., Funder S., Gataullin V., Henriksen M., Hjort C., Houmark-Nielsen M., Hubberten, H.W., Ingólfsson O., Jakobsson M., Kjær K.H., Larsen E., Lokrantz H., Lunkka J.P., Lyså A., Mangerud J., Matiouchkov A., Murray A., Möller P., Niessen F., Nikolskaya O., Polyak L., Saarnisto M., Siegert C., Siegert M.J., Spielhagen R.F., Stein R. 2004. Late Quaternary ice sheet history of northern Eurasia. *Quaternary Science Reviews* 23: 1229–1271.
- Tatonova Y.V., Besprozvannykh V.V., Shumenko P.G., Nguyen H.M., Solodovnik D.A. 2019. First description of genetic diversity for the genus *Metagonimus* using the complete cox1 gene sequence. *International Journal for Parasitology* 49 (12): 985–992.
- Thaenkham U., Phuphisut O., Nuamtanong S., Yoonuan T., Sa-Nguankiat S., Vonghachack Y., Belizario V.Y., Dung D.T., Dekumyoy P., Waikagul J. 2017. Genetic differences among *Haplorchis taichui* populations in Indochina revealed by mitochondrial COX1 sequences. *Journal of Helminthology* 91 (5): 597–604.
- Theron A., Sire C., Rognon A., Prugnolle F., Durand P. 2004. Molecular ecology of *Schistosoma mansoni* transmission inferred from the genetic composition of larval and adult infrapopulations within intermediate and definitive hosts. *Parasitology* 129 (5): 571–580.
- van Leeuwen C.H.A., van der Velde G., van Lith B., Klaassen M. 2012. Experimental quantification of long distance dispersal potential of aquatic snails in the gut of migratory birds. *PLoS ONE* 7 (3): e32292.
- Wilke T., Davis G.M. 2000. Infraspecific mitochondrial sequence diversity in *Hydrobia ulvae* and *Hydrobia ventrosa* (Hydrobiidae: Rissooidea: Gastropoda): do their different life histories affect biogeographic patterns and gene flow? *Biological Journal of the Linnean Society* 70 (1): 89–105.

ВНУТРИВИДОВАЯ ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ИЗМЕНЧИВОСТЬ
У ТРЕМАТОД С МОНО- И ТРИКСЕННЫМ ЦИКЛОМ
ИЗ ОДНОГО ВИДА МОЛЛЮСКОВ-ХОЗЯЕВ

А. Г. Гончар

Ключевые слова: Digenea, trematodes, жизненный цикл, внутривидовая генетическая изменчивость, *Bunocotyle progenetica*, *Cryptocotyle concava*

РЕЗЮМЕ

Моллюски *Peringia ulvae* служат хозяевами для многих видов трематод, которые при этом могут сильно различаться по структуре своих жизненных циклов. На севере Европы два контрастных примера – это виды *Cryptocotyle concava* (Heterophyidae) с триксенным жизненным циклом и *Bunocotyle progenetica* (Hemiridae) с моноксенным. Мы секвенировали фрагмент гена cox1 длиной ~ 870 пар нуклеотидов для оценки и сравнения генетической структуры внутри этих видов. Наши результаты свидетельствуют о том, что активное распространение *C. concava* ограничивает дифференциацию между различными географическими регионами и поддерживает довольно высокое разнообразие гаплотипов. У *B. progenetica* два гаплотипа доминируют и имеют по крайней мере некоторый потенциал для распространения.

УДК 576.895.2 / 576.32/.36

LEVEL OF IFN- γ , TNF- α , AND IL-10 AMONG SUDANESE INFECTED BY MALARIA PARASITE

© 2020 S. E. A. Al Sayed^{a,*}, A. H. Malik^a, H. A. Musa^b

^a Department of Medical Parasitology, Faculty of Medical Laboratory Sciences,
The National Ribat University Khartoum, Sudan

^b Department of Microbiology, Faculty of Medicine, The National Ribat University,
Khartoum, Sudan

* e-mail: alshoag333@yahoo.com

Received 22.08.2020

Received in revised form 12.10.2020

Accepted 19.10.2020

Malaria still remains one of the oldest documented diseases of humans in the world. This study was aimed to measure the concentration of cytokine levels (IFN- γ , TNF- α , IL-10) in Sudanese malarial patients in serum specimens. 148 malaria positive patients were included in this study. The specimens were collected from three different areas: Kosti, Al-Greif Sharq, and El-Jayli Area. All specimens were examined using both blood films and ICT Pf/Pan. The overall mean of parasite counts were 22.36 x 109 parasite/L. After 14 days 54 of the participants returned back for follow up after completion of the anti-malarial treatment and the same previous tests were repeated again. 70 participants were selected to measure the concentration of cytokines according to the inclusion and exclusion criteria of the study. They were classified into two groups endemic and non-endemic and compared to their corresponding control groups and to the treated participants. The mean levels of IFN- γ , TNF- α , and IL-10 in serum of malarial patients from non-endemic area, was 59.94 pg/mL, 42.78 pg/mL, and 109.87 pg/mL respectively. The mean level of IFN- γ , TNF- α , and IL-10 in the serum of the malarial patients from the endemic area, was 14.26 pg/mL, 52.26 pg/mL, and 131.99 pg/mL respectively. IFN- γ and IL-10 showed a higher concentration when compared to a healthy control group (IFN- γ : E: $p = 0.040$ /NE: $p < 0.000$; IL-10: $p < 0.000$ for both areas). Also showed higher concentrations when compared to the treated groups in both areas (IFN- γ : $p = 0.010$; IL-10: $p < 0.000$; TNF- α : E: $p = 0.760$ /NE: $p = 0.650$). In the opposite TNF- α showed a significant difference with lower concentration when compared to the healthy group in both areas ($p < 0.000$). In this study both pro-inflammatory (IFN- γ , TNF- α) and anti-inflammatory (IL-10) cytokines for both endemic and non-endemic areas were elevated during infection and both decreased after treatment.

Keywords: Malaria, IFN- γ , TNF- α , IL-10, cytokines, Sudan, ICT Pf/Pan

DOI: 10.31857/S1234567806060048

Malaria is one of the most common diseases in the world. More than half the world population lives in malaria infected areas specially in Sudan where the latest WHO data published in 2017, reported that the number of malaria cases was 1305000 and the number of deaths reached 3,471 (Malaria in Sudan, 2017). Although it is a treatable disease, it has severe and may be deadly complications like cerebral malaria if doesn't treated (Centers for Disease Control..., 2015). There are many reviews about the relation between the clinical symptoms that caused by malaria parasite and the imbalance between cytokines that can lead to serious complications with regard to the main function of them by activating the effective molecules that kill malaria parasite (Perlmann, Troye-Blomberg, 2002; Nmorsi et al., 2010; Perera et al., 2013). However sometimes the over production of certain cytokines may lead to a serious deadly complications (Mandala et al., 2017). This concept can be used to minimize the complication of malaria by using them in vaccine, immunotherapy, or as diagnostic markers (Angulo, Fresno, 2002). In order to determine how cytokines vary with disease severity and syndrome, a study enrolled in the year 2017 in Malawian children presenting with cerebral malaria (CM), severe malarial anaemia (SMA) and uncomplicated malaria (UCM), with healthy controls. They analyzed serum cytokines concentrations in acute infection, and in convalescence. With the exception of IL-5, cytokine concentrations were highest in acute CM, followed by SMA, and were only mildly elevated in UCM. Cytokine concentrations had fallen to control levels when re-measured at one month of convalescence in all three clinical malaria (Mandala et al., 2017). In endemic area of Brazil there was study that aimed to characterize alterations in haematological patters and circulating plasma cytokines and chemokine levels in patients infected with *Plasmodium vivax* or *Plasmodium falciparum* during the acute and convalescent phases of infection whom compared with a healthy control. Thrombocytopenia, eosinopaenia, lymphopaenia and an increased number of band cells were observed in the majority of the patients during acute phase which returned to normal values at convalescent phase. This study was found a significantly higher for both *P. vivax* and *P. falciparum* patients of interleukin (IL)-6, IL-8, IL-17, interferon gamma (IFN- γ), tumour necrosis factor alpha (TNF- α), macrophage inflammatory protein-1 β and granulocyte-colony stimulating factor levels than controls during acute phase which maintained high levels during the convalescent phase. IL-10 was detected at high concentrations during the acute phase, but returned to normal levels during the convalescent phase (Rodrigues-da-Silva et al., 2014). In Nigeria Nmorsi et al. (2010) examined the array of some pro- and anti-inflammatory cytokines, namely, interleukin-4 (IL-4), interleukin-10 (IL-10), interferon- γ (IFN- γ), interleukin-5 (IL-5), interleukin-6 (IL-6), interleukin-12 (IL-12) and tumor necrosis factor- α (TNF- α) concentrations in some Nigerians with *falciparum* malaria. They concluded that IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12, TNF- α , and IFN- γ are involved in the immune-pathology and immune-regulation of uncomplicated and complicated malaria infections. IL-6, IL-12,

IFN- γ and IL-10 depressed in complicated/severe malaria may not provide any protective immunity and may be indicators of poor prognosis in *Plasmodium falciparum* infected Nigerian children. In this study is meant to look for the levels of some cytokines in the serum of Sudanese.

MATERIALS AND METHODS

This is a case control study conducted in three famous areas known to have a high prevalence of malaria. The study was approved by the Ministry of Health and The National Ribat University ethical. One hundred forty eight malaria positive patients recruited from the medical center in AlJraif East ($n = 40$), the medical center in El-Jayli ($n = 23$) area (Non-endemic areas/NE), and malaria center in Kosti ($n = 85$) (Endemic area/E) during period 2015 to 2018. Ninety four of the participants were males and fifty four were females. All samples were collected under special criteria: patients diagnosed as having malaria, permanent resident in the study area, not taking anti-malarial drug at least 2 weeks, free from other common infectious diseases, and willing to be involved in the study by signing a consent form. All specimens were diagnosed by both Giemsa stained thick-thin blood film (10 % v/v) and ICT Pf/Pan (Healgen Malaria Pf/Pan One Step Rapid Test). The parasite density was determined per μL of blood by counting the asexual form of them against TWBCs.

Serum was obtained the collected blood in plain vacutainer tube to measure the cytokines. The levels of cytokines (TNF- α , IFN- γ , and IL-10) were measured by sandwich ELISA kit (biolegend/ ELISA MAX™ Deluxe Sets). Each cytokine included with standard curve as directed by the manufacture that started from top standard concentration (IFN- γ : 500 pg/mL, TNF- α : 500 pg/mL, and IL-10 250 pg/mL) then six two fold serial dilutions of these top standard which run by ELISA parallel with the specimens. The absorbance of the ELISA was read by spectrophotometer at 450 nm within 15 minutes. Using Graph Pad Prism 7 program the standard curve was plotted with analyte concentration on the x-axis and absorbance on the y-axis. After 14 days all the steps of diagnosis were repeated for the cured patients. All data were analyzed online on web site <http://www.socscistatistics.com> considering 0.050 as significant values using Microsoft Office Exel 2007.

RESULTS

The overall mean of parasite counts were 22.36×10^9 parasite/L. The mean of parasites count in endemic area was 30.46×10^9 parasites/L and in the non-endemic area 13.28×10^9 parasites/L. The most prevalent *Plasmodium* species was *P. falciparum* 93.24 % ($n = 138$), then mixed infection of *P. falciparum* + *P. malariae* as 3.38 % ($n = 5$), and both *P. vivax* alone and mixed infection of *P. falciparum* + *P. vivax* with the same percentage 1.35 % ($n = 2$), and finally *P. malariae* alone was 0.68 % ($n = 1$) (fig. 1).

After fourteen days 54 of the participants returned back for follow up after completion of the anti-malarial treatment and the same previous tests were repeated again. 85.19 % ($n = 46$) of participants were free of malaria parasite and the parasitemia of 14.81 % ($n = 8$) was decreased significantly to 0.03×10^9 parasite/L ($p < 0.000$).

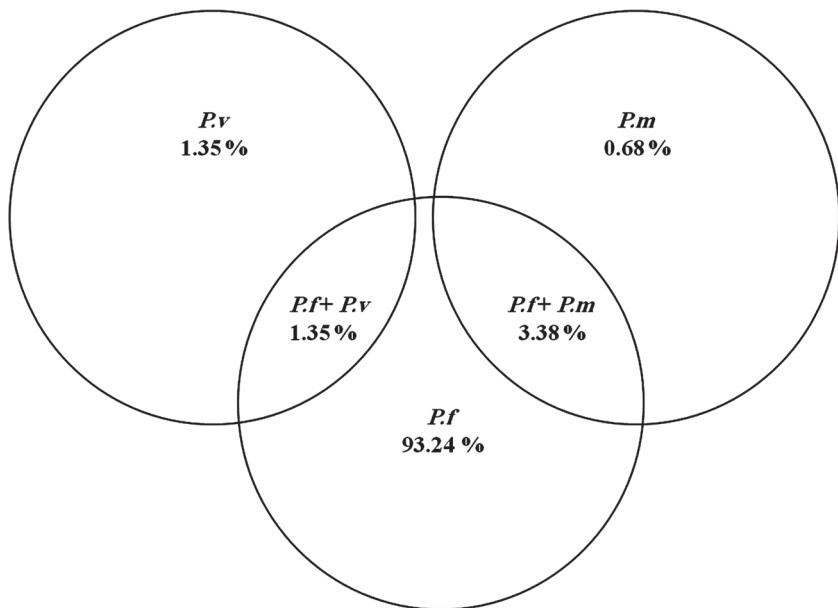


Figure 1. The percentages of the detected *Plasmodium* species: *P.f* – *Plasmodium falciparum*, *P.m* – *P. malariae*, *P.v* – *P. vivax*.

Seventy participants were selected to measure the concentration of cytokines (IFN- γ , TNF- α , IL-10) in serum according to the inclusion and exclusion criteria of the study. They were classified into two groups according to the endemicity of malaria parasite at these areas (endemic and non-endemic) and compared to their corresponding control groups and to the treated participants.

The group from non-endemic area was thirty three that compared to twenty participants of control group and twelve of the treated participants. The mean levels of IFN- γ , TNF- α , and IL-10 in serum of patients from non-endemic area before anti-malaria treatment was 59.94 pg/mL, 42.78, and 109.87 pg/mL respectively. All values of the cytokines in the serum of the malaria infected group showed significant difference when compared to the control group. The levels of the cytokines in the control group as follows: IFN- γ 6.57 pg/mL ($p < 0.000$), TNF- α 70.22 pg/mL ($p < 0.000$), and IL-10 1.16 pg/mL ($p < 0.000$). After anti-malarial treatment the level of the cytokines showed variations as follow: IFN- γ decreased significantly to 9.99 pg/mL ($p = 0.010$), TNF- α decreased insignificantly to 41.88 pg/mL ($p = 0.650$), and IL-10 decreased significantly to 5.02 pg/mL ($p < 0.000$) (table 1).

The group from endemic area was thirty seven that compared to twenty four participants of the control group and eighteen as a group of after treatment. The mean level of the IFN- γ , TNF- α , and IL-10 of the patients from the endemic area before anti-malarial treatment was 14.26 pg/mL, 52.26 pg/mL, and 131.99 pg/mL respectively. The mean level of the

cytokines of the control group (IFN- γ , TNF- α , IL-10) was 9.62 pg/mL, 117.06 pg/mL, 1.51 pg/mL respectively. There was a significant difference between the patients and the control group as follows: IFN- γ (significant, $p = 0.040$), TNF- α (significant, $p < 0.000$), and IL-10 (significant, $p < 0.000$) (table 2).

After the anti-malarial treatment the cytokines showed variations as follow: IFN- γ was decreased significantly (7.90 pg/mL, $p = 0.010$), TNF- α was decreased insignificantly (51.84 pg/mL, $p = 0.760$), and IL-10 was decreased significantly (3.91 pg/mL, $p < 0.000$) (table 3).

There is a significant difference between cytokines of endemic and non-endemic sera of healthy control as follows: IFN- γ : $p = 0.010$, TNF- α : $p < 0.000$, and IL-10: $p = 0.010$ (table 4).

Table 1. Mean of cytokines levels in the non-endemic area

Cytokines	Patients			Control ($n = 20$)	
	Before treatment ($n = 33$)	After treatment ($n = 12$)	P-vales	Cytokines level	P-vales
IFN- γ	59.94	9.99	0.010	6.57	< 0.000
TNF- α	42.78	41.88	0.650	70.22	< 0.000
IL-10	109.87	5.02	< 0.000	1.16	< 0.000

Table 2. Comparison of the mean cytokines levels (pg/ml) in the serum between the patients and controls in the endemic area

Cytokines	Patients ($n=37$)	Control ($n=24$)	P-vales
IFN- γ	14.26	9.62	0.040
TNF- α	52.26	117.06	< 0.000
IL-10	131.99	1.51	< 0.000

Table 3. The difference in the mean cytokines levels in serum (pg/ml) after treatment in the endemic area

Cytokines	Before treatment ($n=37$)	After treatment ($n=18$)	P-vales
IFN- γ	14.26	7.90	0.010
TNF- α	52.26	51.84	0.760
IL-10	131.99	3.91	< 0.000

Table 4. Comparison of the mean cytokines levels in serum of healthy control among non-endemic and endemic areas

Cytokines	Non-Endemic Areas	Endemic Areas	P-value
IFN- γ	6.57	9.62	0.010
TNF- α	70.22	117.06	<0.000
IL-10	1.16	1.51	0.010

DISCUSSION

Malaria is one of the most common diseases in Sudan. The World Health Organization – WHO published data in 2017 reporting the rate of total death due to malaria was 1.30 % (Malaria in Sudan, 2017). Now a days there are many trials to eradicate this disease and their complications permanently (Pan American Health Organization / World Health Organization — PAHO/WHO, 2018; WHO, 2018). These complications are shared between parasites and/or immune responses where the cytokines are one of them (Medina et al., 2011). This study aimed to measure the concentration of cytokines levels (IFN- γ , TNF- α , IL-10) in Sudanese malarial patients in serum samples.

During infection there are several pro-inflammatory cytokines like IFN- γ and TNF- α induced by many inflammatory cells like Th1 cells, CD8+ cells, NK cells, and macrophage. These cytokines are stimulated by malarial antigens leading to elimination of parasite or immuno-pathological effects in case of persistent response (Goldsby et al., 2002; Khan, 2008; Medina et al., 2011). In contrast the anti-inflammatory cytokines like IL-10 which induced by Th2 cells mainly and other inflammatory cells inhibit the pro-inflammatory cytokines (Couper et al., 2008; Akdis et al., 2016). As seen in this study both pro-inflammatory (IFN- γ , TNF- α) and anti-inflammatory (IL-10) cytokines in serum for both endemic and non-endemic areas were elevated during infection and both were decreased after cure maintaining the balance between them (pro/anti-inflammatory) as reported by Rodrigues-da-Silva et al. (2014) to avoid any immuno-pathological effects that mentioned by Medina et al. (2011). These cytokines showed significant difference to IFN- γ and IL-10 (endemic IFN- γ : $p = 0.040$; non-endemic IFN- γ : $p < 0.000$; IL-10: $p < 0.000$ for both areas) with higher concentrations when compared to healthy control group which agreed with Mandala et al. (2017), Medina et al. (2011), and Tatfeng, Agbonlahor (2010). Also the concentrations were higher when compared to the treated group in both areas (IFN- γ : $p = 0.010$; IL-10: $p < 0.000$) which agreed again with Mandala et al. (2017). TNF- α showed insignificant difference with higher concentration when compared to treated group (endemic area: $p = 0.760$; non endemic-area: $p = 0.650$) which agreed with a previous studies in elevation but not in significance. But this result agreed with Gandapur, Malik (1996) where the difference between the levels of TNF- α cytokine showed insignificant higher concentration in severe malaria than mild one and suggested that the population has some degree of immunity. Also they reported that the young trophozoite may be microscopically undetectable which support the positive correlation between parasite count and concentration of TNF- α in their study. TNF- α showed significant difference with lesser concentration in healthy group in both areas ($p < 0.000$) which disagreed with previous studies, where the TNF- α as pro-inflammatory cytokines should be increased during infection for protection to be higher than healthy one. But the inhibition of production of TNF- α is reported by many authors to be due to many possible

factors that act as anti-TNF- α during infection. Some microbes can act as immunosuppressive by enhancing production of IL-10 leading to decreasing in neutrophil counts and tumor necrosis factor α level (Hellgren et al., 2009). Another reason for this concept, the co-infection with some helminthes can modulate the immune response to malarial parasites by making more anti-inflammatory cytokines (IL-10) (Hartgers et al., 2009). Also the co-infection with Gram negative enteric bacilli can inhibit the production of TNF- α . This organism may be related to counter regulatory activities of IFN-induced increased nitric oxide (NO) that down regulate nitric oxide synthase (NOS) inducing cytokines, such as TNF- α , through a feedback mechanism (Davenport et al., 2016). The co-infection with HIV leading to depletion in CD4, CD8 and lowered serum levels of immunological mediators (Tatfeng, Agbonlahor, 2008). There are some foods which naturally inhibit the production of TNF- α like fatty fish, red fruits, tomatoes, red meat, nutritional yeast, honey, caffeine, dates, lactoferrin, ginger, Hibiscus sabdariffa (Karkadı) (Fakaye, 2008; Isa et al., 2008; Cohen, 2018). Beside that there are certain drugs can suppress TNF- α like aspirin, artemisinin, erythromycin, and paracetamol (Brandts et al., 1997; Schultz et al., 1998; Wang et al., 2011; Lutgen, Munyangi, 2018). During the disease the rate of consumption of patients may be reduced leading to reduction in expression of mRNA of TNF R2 in muscle (Hofmann et al., 1994). Finally the presence of certain genes can inhibit the expression of TNF- α (Mendonça et al., 2014). Beside that, there are other factors which increase production of TNF- α as seen in healthy control people like a long exposure to sun-light which contain UV-A irradiation that induces synthesis of IL-6 and TNF- α (Avalos-Diaz et al., 1999). Also the consumption of large amount of caffeine (coffee) can increase the level of TNF- α ; and insufficient ingestion of fruit or vegetables may increase the TNF- α (Cohen, 2018). The continuous exposure of the immune system to malaria parasite leads to a high concentration of cytokines. That was obvious in the detected levels of the cytokines from the healthy candidates in the endemic area when compared to those from the non-endemic one. The difference was significantly higher in those from the endemic area (IFN- γ : $p = 0.010$, TNF- α : $p < 0.000$, IL-10: $p = 0.010$). Also this was true about parasite counts (endemic area: 30.46×10^9 parasites/L; non-endemic area: 13.28×10^9 parasites/L) which agreed with Wroczynska et al. (2005).

CONCLUSION

In this study both pro-inflammatory (IFN- γ , TNF- α) and anti-inflammatory (IL-10) cytokines in serum for both endemic and non-endemic areas were elevated during infection and both decreased after cure maintaining the balance between them (pro/anti-inflammatory) to avoid any immuno-pathological effects.

ACKNOWLEDGEMENT

We are grateful to The National Ribat University and Prof. Moawia M. Mukhtar from The Institute of Endemic Diseases-Khartoum University for providing some facilities for this work. We would also like to acknowledge the personnel in the health centers for their great help in the collection of the specimens.

REFERENCES

- Akdis M., Aab A., Altunbulakli C., Azkur K., Costa R.A., Cramer R., Duan S., Eiwegger T., Eljaszewicz A., Ferstl R., Frei R., Garbani M., Globinska A., Hess L., Huitema C., Kubo T., Komlosi Z., Konieczna P., Kovacs N., Kucuksezer U.C., Meyer N., Morita H., Olzhausen J., O'Mahony L., Pezer M., Prati M., Rebane A., Rhyner C., Rinaldi A., Sokolowska M., Stanic B., Sugita K., Treis A., van de Veen W., PhD, Wanke K., Wawrzyniak M., Wawrzyniak P., Wirz O.F., Zakzuk J.S., Akdis C.A. 2016. Interleukins (from IL-1 to IL-38), interferons, transforming growth factor β , and TNF- α : Receptors, functions, and roles in diseases. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 138(4): 984–1010. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2016.06.033>
- Angulo I., Fresno M. 2002. Cytokines in the pathogenesis of and protection against malaria. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 9 (6): 1145–1152. DOI: 10.1128/CDLI.9.6.1145–1152.2002
- Avalos-Diaz E., Alvarado-Flores E., Herrera-Esparza R. 1999. UV-A irradiation induces transcription of IL-6 and TNF alpha genes in human keratinocytes and dermal fibroblasts. *Revue du rhumatisme* (English ed.) 66 (1): 13–19.
- Brandts C.H., Ndjavé M., Graninger W., Kremsner P.G. 1997. Effect of paracetamol on parasite clearance time in *Plasmodium falciparum* malaria. *The Lancet* 350 (9079): 704–709. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(97\)02255-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(97)02255-1)
- Centers for Disease Control and Prevention -CDC - Malaria - About Malaria - Disease 2015. Available from: <https://www.cdc.gov/malaria/about/disease.html> (20 August 2020)
- Cohen J. 2018. How to Inhibit TNF-alpha Naturally. SelfHack. Available from: <https://www.selfhacked.com/blog-supplements-lifestyle-factors-influence-tnf-interleukin-6-il-6/> (20 August 2020)
- Couper K.N., Blount D.G., Riley E.M. 2008. IL-10: the master regulator of immunity to infection. *The Journal of Immunology* 180(9): 5771–5777. doi: 10.4049/jimmunol.180.9.5771
- Davenport G.C., Hittner J.B., Otieno V., Karim Z., Mukundan H., Fenimore P.W., Hengartner N.W., McMahon B.H., Kempaiah P., Ong'echa J.M., Perkins D.J. 2016. Reduced parasite burden in children with *falciparum* malaria and bacteremia coinfections: role of mediators of inflammation. *Mediators of Inflammation*. 2016: 4286576. <http://dx.doi.org/10.1155/2016/4286576>
- Fakaye T. 2008. Toxicity and immunomodulatory activity of fractions of *Hibiscus sabdariffa* Linn (family Malvaceae) in animal models. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines* 5(4): 394–398.
- Gandapur A.S., Malik S.A. 1996. Tumor necrosis factor in *falciparum* malaria. *Annals of Saudi medicine* 16 (6): 609–614. <https://doi.org/10.5144/0256-4947.1996.609>
- Goldsby R.A., Kindt T.J., Osborne B.A., Kuby J. 2002. Immunology, 5th ed., New York:W. H. Freeman, 553 p.
- Hartgers F.C., Obeng B.B., Kruize Y.C.M., Dijkhuis A., McCall M., Sauerwein R.W., Luty A.J.F., Boakye D.A., Yazdanbakhsh M. 2009. Responses to malarial antigens are altered in helminth-infected children. *The Journal of Infectious Diseases* 199 (10): 1528–1535. <https://doi.org/10.1086/598687>
- Hellgren U.M., Leino M., Aarnisalo A.A., Mussalo-Rauhamaa H., Alenius H., Reijula K. 2009. Low tumor necrosis factor α levels and neutrophil counts in nasal lavage after mold exposure. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology* 102 (3): 210–215. [https://doi.org/10.1016/S1081-1206\(10\)60083-X](https://doi.org/10.1016/S1081-1206(10)60083-X)
- Hofmann C., Lorenz K., Braithwaite S.S., Colca J.R., Palazuk B.J., Hotamisligil G.S., Spiegelman B.M. 1994. Altered gene expression for tumor necrosis factor-alpha and its receptors during drug and dietary modulation of insulin resistance. *Endocrinology* 134(1): 264–270. <https://doi.org/10.1210/endo.134.1.8275942>
- Isa Y., Miyakawa Y., Yanagisawa M., Goto T., Kang M. S., Kawada T., Morimitsu Y., Kubota K., Tsuda T. 2008. 6-Shogaol and 6-gingerol, the pungent of ginger, inhibit TNF- α mediated downregulation of adiponectin

- expression via different mechanisms in 3T3-L1 adipocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 373 (3): 429–434. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2008.06.046>
- Khan M.M. 2008. Immunopharmacology: role of cytokines, Creighton University Medical Center, Omaha, United States, Springer Science + Business Media, 266 p.
- Lutgen P., Munyangi J. 2018. Platelets, eryptosis, amiodarone, aspirin, Artemisia. *Pharmacy and Pharmacology International Journal* 6(5): 377–381. DOI: 10.15406/ppij.2018.06.00205
- Malaria in Sudan2017. World Life Expectancy. Available from: <https://www.worldlifeexpectancy.com/sudan-malaria> (20 August 2020)
- Mandala W.L., Msefula C.L., Gondwe E.N., Drayson M.T., Molyneux M.E., MacLennan C.A. 2017. Cytokine profiles in Malawian children presenting with uncomplicated malaria, severe malarial anemia, and cerebral malaria. *Clinical and Vaccine Immunology* 24 (4): e00533-16. <https://doi.org/10.1128/CVI.00533-16>
- Medina T.S., Costa S.P., Oliveira M.D., Ventura A.M., Souza J.M., Gomes T.F., Vallinoto A.C.R., Póvoa M.M., Silva J.S., Cunha M.G. 2011. Increased interleukin-10 and interferon- γ levels in *Plasmodium vivax* malaria suggest a reciprocal regulation which is not altered by IL-10 gene promoter polymorphism. *Malaria Journal* 10(1): 264. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-10-264>
- Mendonça V.R., Souza L.C., Garcia G.C., Magalhães B.M., Lacerda M.V., Andrade B.B., Gonçalves M.S., Barral-Netto M. 2014. DDX39B (BAT1), TNF and IL6 gene polymorphisms and association with clinical outcomes of patients with *Plasmodium vivax* malaria. *Malaria Journal* 13 (1): 278. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-13-278>
- Nmorsi O.P.G., Isaac C., Ukwandu N.C.D., Ohaneme B.A. 2010. Pro-and anti-inflammatory cytokines profiles among Nigerian children infected with *Plasmodium falciparum* malaria. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine* 3 (1): 41–44. [https://doi.org/10.1016/S1995-7645\(10\)60029-6](https://doi.org/10.1016/S1995-7645(10)60029-6)
- Pan American Health Organization / World Health Organization -PAHO/WHO. The Road to Malaria Eradication - Update 2018. 2018. Available from: https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=14191:the-road-to-malaria-eradication-update-2018&Itemid=40275&lang=en (20 August 2020)
- Perera M.K., Herath N.P., Pathirana S.L., Phone-Kyaw M., Alles H.K., Mendis K.N., Premawansa S., Handunnetti S.M. 2013. Association of high plasma TNF-alpha levels and TNF-alpha/IL-10 ratios with TNF2 allele in severe *P. falciparum* malaria patients in Sri Lanka. *Pathogens and Global Health* 107 (1): 21–29. <https://doi.org/10.1179/2047773212Y.0000000069>
- Perlmann P., Troye-Blomberg M. 2002. Malaria and the immune system in humans. *Chemical Immunology* 80: 229–242.
- Rodrigues-da-Silva R.N., Lima-Junior J.C., Fonseca B.P.F., Antas P.R.Z., Baldez A., Storer F.L., Santos F., Banic D.M., de Oliveira-Ferreira J. 2014. Alterations in cytokines and haematological parameters during the acute and convalescent phases of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* infections. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 109 (2): 154–162. <http://dx.doi.org/10.1590/0074-0276140275>
- Schultz M.J., Speelman P., Zaaij S., van Deventer S.J., van der Poll T. 1998. Erythromycin inhibits tumor necrosis factor alpha and interleukin 6 production induced by heat-killed *Streptococcus pneumoniae* in whole blood. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 42 (7): 1605–1609. DOI: 10.1128/AAC.42.7.1605
- Tatfeng M.Y., Agbonlahor D.E., 2008. Proinflammatory cytokines and haematological indices in HIV seropositive adults with uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria. *Tropical Medicine and Health* 36 (2): 75–79. <https://doi.org/10.2149/tmh.2008-04>
- Tatfeng Y.M., and Agbonlahor D.E., 2010. Age-related cytokine profile in uncomplicated *Plasmodium* malaria infection. *Colombia Médica* 41 (4): 323–327.
- Wang Y., Huang Z., Wang L., Meng S., Fan Y., Chen T., Cao J., Jiang R., Wang C. 2011. The anti-malarial artemisinin inhibits pro-inflammatory cytokines via the NF- κ B canonical signaling pathway in PMA-induced THP-1 monocytes. *International Journal of Molecular Medicine* 27 (2): 233–241. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2010.580>
- World Health Organization – WHO 2018. Malaria control: the power of integrated action. Available from: <https://www.who.int/heli/risks/vectors/malariacontrol/en/> (20 August 2020)
- Wroczyńska A., Nahorski W., Bąkowska A., Pietkiewicz H. 2005. Cytokines and clinical manifestations of malaria in adults with severe and uncomplicated disease. *International Maritime Health* 56 (1–4): 103–114.

УРОВЕНЬ ЦИТОКИНОВ IFN- γ , TNF- α , and IL-10 В КРОВИ СУДАНЦЕВ, ИНФИЦИРОВАННЫХ МАЛЯРИЙНЫМ ПАРАЗИТОМ

Аль Сайед С. Е. А., Малик А. Х., Муса Х. А.

Ключевые слова: малярия, IFN- γ , TNF- α , IL-10, цитокины, Судан, ICT *Pf/Pan* тест

РЕЗЮМЕ

Малаярия по-прежнему остается одной из старейших зарегистрированных в мире болезней человека. Целью предлагаемого исследования является измерение уровней концентрации цитокинов (IFN- γ , TNF- α , IL-10) в образцах сыворотки крови у больных малярией пациентов в Судане. Всего было изучено 148 больных малярией пациентов. Образцы сыворотки были собраны в трех различных регионах Судана: г. Кости, Аль-Грейф Шарк и территория возле г. Эль-Джайли. Все образцы были изучены с использованием как мазков крови, так и метода иммунной хроматографии (тест Pf/Pan). Среднее число паразитов в образцах составило 22.36×10^9 паразитов на 1 л. Через 14 дней 54 пациента, лечившихся от малярии, были вновь исследованы с применением вышеописанных методов. 70 пациентов были отобраны для измерения концентрации цитокинов согласно критериям включения и исключения, использованных в работе. Эти пациенты были разделены на две группы (из эндемичных и не эндемичных по малярии районов), данные по которым сравнивали с соответствующими контрольными группами и с данными по пациентам, подвергшимся лечебным процедурам. Средний уровень концентрации цитокинов IFN- γ , TNF- α и IL-10 в сыворотке крови больных малярией из не эндемичных районов составили соответственно 59.94 пг/мл, 42.78 и 109.87 пг/мл. Средний уровень концентрации цитокинов IFN- γ , TNF- α и IL-10 в сыворотке крови больных малярией из эндемичных районов составили соответственно 14.26 пг/мл, 52.26 и 131.99 пг/мл. IFN- γ и IL-10 характеризовались более высоким уровнем концентрации в сравнении с контрольной группой здоровых пациентов (IFN- γ : E: $p = 0.040$ /NE: $p < 0.000$; IL-10: $p < 0.000$, для обоих регионов). Более высокую концентрацию наблюдали и при сравнении с группами лечившихся от малярии пациентов из обоих регионов (IFN- γ : $p = 0.010$; IL-10: $p < 0.000$; TNF- α : E: $p = 0.760$ /NE: $p = 0.650$). Кроме того, цитокин TNF- α достоверно отличался более низкой концентрацией при сравнении с группой здоровых пациентов в обоих регионах ($p < 0.000$). Согласно нашим данным, концентрация как про-воспалительных (IFN- γ , TNF- α), так и противовоспалительных (IL-10) цитокинов у пациентов из эндемичных и неэндемичных регионов повышалась при заражении малярией и понижалась после проведения лечебных процедур.

УДК 576.895.2 / 576.32/.36

**PREVALENCE OF *PARAMPHISTOMUM* SPECIES
IN CATTLE SLAUGHTERED AT GWAGWALADA ABATTOIR,
ABUJA, NIGERIA**

© 2020 O. B. Arowolo^a, *, B. R. Mohammed^{a, b, *}, M. N. Opara^a

^aDepartment of Parasitology and Entomology, Faculty of Veterinary Medicine,
University of Abuja, P.M.B 117, Abuja

^bFormerly of School of Sciences, Engineering and Technology Abertay University,
DD1 1HG, Dundee, United Kingdom

* e-mail: balarabemohammed161@yahoo.co.uk

Received 30.03.2020

Received in revised form 15.07.2020

Accepted 09.10.2020

A cross sectional study was carried out in September 2017–April 2018, in Gwagwalada abattoir to determine prevalence of *Paramphistomum* spp. in slaughtered cattle. Six hundred and forty eight (648) cattle were subjected to standard meat inspection procedures for the presence of *Paramphistomum* spp. Parasites were determined during initial examination and then determination was clarified microscopically to appreciate the morphology of adult *Paramphistomum* spp. The overall prevalence of *Paramphistomum* spp. in the study was (59.7 %). The prevalence was higher in male than in female cattle with prevalence of 51.4 % and 48.6 % respectively. A statistically significant difference ($P<0.05$) in prevalence of *Paramphistomum* spp. due to season of sampling, and to cattle species, sex, and age was observed. The highest infection rate of cattle with *Paramphistomum* spp. was observed in October. The revealed high infection rate of cattle with *Paramphistomum* spp. testifies to an intensive transmission of these parasites in the region, potentially resulting in immense economical losses in the area examined. Therefore, it is recommended to cattle breeders to improve feeds provision in order to obtain good body condition providing sufficient level of resistance against *Paramphistomum* infections. Integrated control approach using selected anthelmintic therapy and snail control to reduce the magnitude of the problem is also recommended.

Keywords: *Paramphistomum* spp., prevalence, cattle, Gwagwalada, Nigeria

DOI: 10.31857/S123456780606005X

In Nigeria, 13.9 million cattle population provides not only the main source of animal proteins; by-products, such as bones and skins also play a vital role in economic well-being

of the human populace (Sani, 2009; Lawal-Adebawale, 2012). A considerable socio-economic importance is therefore attached to ownership of these animals that in some cases may be the only realizable wealth of a rural household (Omeke, 1988; Bettencourt et al., 2015). Their production is however constrained by a variety of gastrointestinal helminthes, which are characterized by decrease in milk production, reduced product quality, mortality and other secondary infections (Saha et al., 2013). Helminthes including trematodes are known to be potential health hazard to cattle population and are therefore major impediment to efficient livestock production, characteristically affecting their growth and productive performances (Bisset, 1994; Charlier et al., 2015).

Among the plethora of Trematodes, *Paramphistomum* infection is established to have a devastating effect to cattle production globally, but the highest prevalence has been reported in tropical and subtropical regions, particularly in Africa including Nigeria (Khedri et al., 2015; Elelu et al., 2016). The epidemiology of *Paramphistomum* infection in cattle is determined by several factors governed by parasite-host-environment interactions (Martinez-Ibeas et al., 2016). Adults of *Paramphistomum* are found in the rumen and reticulum whilst immature parasites are found in the duodenum. Adult *Paramphistomum* flukes parasitize mainly in the fore stomachs of cattle causing irregular rumination (ruminitis), lower nutrition conversion, loss of body condition, decrease in milk production, and reduction of fertility rate (Mogdy et al., 2009; Ayalew et al., 2016). The immature flukes occur in the upper part of the small intestine (duodenum and ileum) causing hemorrhage, which leads to anaemia, weight loss, decreased production; death of animals may also occur (Maitra et al., 2014).

The taxonomy of paramphistomes has been extensively studied by light and electron microscopy, yet there are still areas where consensus is lacking. The major species that cause the disease include *Paramphistomum cervi* (Zeder, 1790), *P. corylophorum* (Fischoeder, 1901), *P. gotoi* Fukui, 1922, *P. gracile* Fischoeder, 1901, *P. hiberniae* Willmott, 1950, *P. ichikawai* Fukui, 1922, and *P. epicitum* Fischaezar, 1904. The ones that are predominantly found in Africa are *P. cervi* and *P. microbothrium* Fischoeder, 1901 (Smyth, 1996). Although *Paramphistomum* infection outbreaks in different communities have been extensively studied in different states in Nigeria (Biu, Oluwafunmilayo, 2004; Bunza et al., 2008; Njoku et al., 2009; Adedipe et al., 2014; Afolabi et al., 2017; Shola et al., 2020), there is paucity of information on the prevalence of this parasite in the Federal Capital Territory. This is essential for the design of an effective control strategy. The study was conducted to determine prevalence of *Paramphistomum* species in cattle slaughtered at Gwagwalada abattoir, Abuja, Nigeria.

MATERIALS AND METHODS

The study was carried out in Gwagwalada Area Council, one of the six councils of the Federal Capital Territory (FCT), Abuja – Nigeria. It is located geographically in the central part of Nigeria

between latitude 8°25'–9°9' N and longitude 6°29'–7°45' E. It has a Guinea Savannah type of vegetation, with rainy season stretching from April to October and dry season from November to March. The climate of the study area is tropical: non-arid climate with only two seasons throughout the year: wet and dry. The mean temperature in the study area ranges between 30–37 °C yearly with the highest temperature in March and the mean total annual rainfall of approximately 1650 mm per annum (NPC, 2006).

A cross sectional study was carried out on slaughtered animals in Gwagwalada abattoir for 3 days in a week during early dry season (September–December 2017) and 2 days in a week during the late dry season (January–April, 2018). The animals were randomly selected for sampling. Six hundred and forty-eight ($n = 648$) cattle slaughtered in Gwagwalada Area Council abattoir, Abuja, Nigeria were examined for the presence of *Paramphistomum* species. Adult worms were collected from the rumen and reticulum of the animal sampled using a standard meat inspection procedure that involves both primary and secondary examination.

Ante mortem inspection was carried out in animals before slaughter, to assess them generally. During the ante mortem examination, detail records about the species, sex, age, and breeding status of the animals were recorded. Ageing of the cattle was based on rostral dentition as described by Lasisi et al. (2002). Cattle aged (< 3 years old) were classified as young while (> 3 years old) were considered as adults. Sexual differentiation was based on the appearance of external genitals while breed identification was based on morphology as described by Yunusa et al. (2013).

Rumen of slaughtered animals selected to be sampled were inspected for the presence of rumen flukes. The collected flukes were transported to the laboratory in plastic containers with 10 % formalin. The flukes were washed several times in running tap water to remove debris and ruminal content. The flukes were later prepared for identification under stereomicroscope. Furthermore, collected flukes were preserved for further identification.

Rumen and reticula were systematically inspected for the presence or absence of adult *Paramphistomum* to estimate fluke burden using standard meat inspection procedures which include primary and secondary examination. The primary examination includes visualization and palpation. During the secondary examination further incision of the rumen and reticulum was made to check presence or absence of *Paramphistomum* spp. as described by Urquhart et al. (1996).

Rumen flukes were preliminarily identified under microscope using low power magnification and then slides were prepared for detailed morphological studies and identification. Flukes collected in Petri dishes were observed using stereoscope to appreciate the morphology. Final identification of *Paramphistomum* was done based on morphological features, such as shape, posterior sucker (acetabulum), anterior sucker, terminal genitalium and tegumental papillae following the standard guidelines given by Urquhart et al. (1996).

DATA ANALYSIS

Data were collected during the study and fed into a computer using Microsoft excel spreadsheet and analyzed with Statistical software (SPSS – 20.0). Descriptive statistics was employed and expressed in terms of frequency and simple percentage. Chi square (χ^2), ANOVA (F-Test), and t-test statistics were used to test the relationship between variables.

RESULTS

The overall prevalence of *Paramphistomum* spp. in cattle slaughtered at Gwagwalada abattoir was 59.1 %. Higher prevalence of *Paramphistomum* spp. was recorded in adult cattle (62.0 %) than in young ones (42.1 %). There was statistically significant difference ($P < 0.05$) in the prevalence of *Paramphistomum* between two age groups and female cattle showed a higher prevalence (61.0 %) than male (57.4 %). Similarly, there was no statistically significant difference between the breeds examined ($P > 0.05$) (tabl. 1). Identification result showed statistically significant variation in prevalence of *Paramphistomum* spp. between both sexes ($P < 0.05$) (tabl. 1).

Table 1. Prevalence of *Paramphistomum* spp. in cattle slaughtered in Gwagwalada abattoir

Sample parameter		No. examined (%)	No. infected (%)	t	P- Value
Age	Young	95 (14.7)	40 (42.1)	4.231*	0.001 ^a
	Adult	553 (85.3)	343 (62.0)		
	Total	648	383 (59.1)		
Sex	Male	343 (52.9)	197 (57.4)	6.114*	0.000 ^a
	Female	305 (47.1)	186 (61.0)		
	Total	648	383 (59.1)		
Breed	WF	374 (57.7)	216 (57.8)	15.250**	0.762
	ND	152 (23.5)	95 (62.5)		
	SG	70 (10.8)	41 (58.6)		
	K	52 (8.0)	31 (59.6)		
	Total	648	383 (59.1)		

*not significant at $\alpha = 0.05$, ^asignificant at $\alpha = 0.05$, * t – test, **chi square (χ^2).

Key: WF – White Fulani, ND – Ndama, SG – Sokoto Gudali, K – Keteku.

The infection rate is higher during early dry season (October–December), reaching its peak in the rainy season (tabl. 2).

Table 2. Monthly prevalence of *Paramphistomum* spp. in cattle slaughtered at Gwagwalada Area Council abattoir, Abuja

Months	Cattle examined	%	Infected cattle	%
September	73	11.3	58	79.5
October	92	14.2	77	83.7
November	70	8.8	25	35.7
December	70	8.8	32	45.7
January	75	11.6	27	36.0
February	86	13.3	37	43.0
March	102	15.7	66	64.7
April	80	12.3	61	76.3
Total	648	36.0	383	59.1

DISCUSSION

In this study, the overall prevalence of *Paramphistomum* spp. was 59.1 %; similar high prevalence (56 %) was recorded in Sokoto, Northern Nigeria (Bunza et al., 2008), 51.82 % in Ethiopia (Ayalew et al., 2016), and 53.1 % in Bangladesh (Paul et al., 2011). Lower prevalence rate was however, recorded in Turkey (8.95 %), Spain (18.8 %), and France (20 %) by Ozdal et al. (2010), González-Warleta et al. (2013) and Szmidt-Adjidé et al. (2000), respectively. The great variability shown in both cases is probably due to ecological and climatic differences between different locations throughout the continents of Africa, Asia and Europe. The other most important factors that influence the occurrence of trematodes in an area include availability of the suitable snail habitat (Dodangeh et al., 2019).

Findings of this study are in accordance with the reports of Davila et al. (2010), Raza et al. (2010) and Al-Shaibani et al. (2008) who had also revealed higher prevalence of helminthes in female. In this study, variation in occurrence of such helminthes in males and females might be due to variation in sample size (Bachal et al., 2002), stress, genetic resistance of host and insufficient/imbalanced feed against higher needs (Raza et al., 2010). Higher prevalence among females may be explained by loss of immunity during pregnancy, birth and lactation (Alade, Bwala, 2015).

The study did not identify any statistically significant difference in the rate of infection among the breeds ($P > 0.05$) examined.

Monthly prevalence showed that infection rate was higher in October and gradually fell down in November and increased in March. Similar work by Gul-E- Nayab et al. (2017) showed that prevalence of *Paramphistomum* spp. was highest in cattle in March and the lowest in November. Similar work by Chaudhri (2000) showed that there was significant decrease of the rate during raining season. It has been described that the bionomic requirements for breeding of *Planorbis* snails and development of intramolluscan stages of flukes often reach the optimum threshold during the wet months (Radostits et al., 2000).

However, during dry periods, breeding of snails (intermediate hosts) and development of larval flukes slow down or stop completely and snails undergo the aestivation state (Boray, 1994; Urquhart et al., 1996).

Although a decrease in prevalence was observed along with the advancement of dry season, relatively high prevalence rates were recorded, this may be due to infections acquired during previous peak of the snail activity season. The present study agrees with the finding of Akanda et al. (2014), who reported that parasitic infestation was highest in rainy season followed by summer and winter season.

CONCLUSION

In this study, *Paramphistomum* spp. was found to be prevalent in cattle. This will be a hindrance to the livestock production by causing remarkable direct or indirect losses in the study area. Moreover, the study area is suitable for the survival of the molluscan hosts that worsened the situation for the future. Therefore, taking into account the aforementioned conclusion, integrated control approach using selected anthelmintic therapy and snail control should be implemented to reduce the magnitude of the problem. In addition, awareness of the cattle breeders about the disease should be raised to enable them actively participate in control programs.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors wish to acknowledge the management and staff of the Gwagwalada Area Council abattoir and village for their kind permission and cooperation to use their facilities for the research.

REFERENCES

- Adedipe O.D., Uwalaka E.C., Akinseye V.O., Adediran O.A., Cadmus S.I.B. 2014. Gastrointestinal helminths in slaughtered cattle in Ibadan, South-Western Nigeria. Journal of Veterinary Medicine 2014: 923561.
- Afolabi O.J., Simon-Oke I.A., Ademiloye O.A. 2017. Gastro-intestinal parasites of bovine in Akure abattoirs, Nigeria. Journal of Entomology and Zoology studies 5: 1381–1384.
- Akanda M.R., Hasan M.M.I., Belal S.A., Roy A.C., Ahmad S.U., Das R., Masud A.A. 2014. A survey on prevalence of gastrointestinal parasitic infection in cattle of Sylhet division in Bangladesh. American Journal of Phytomedicine and Therapeutics 2: 855–860.
- Alade N.K., Bwala M.D. 2015. Gastrointestinal-parasites infestation in Yankasa sheep in a semi-arid environment. Livestock Research for Rural Development 27: 106.
- Al-Shaibani I.R.M., Phulan M.S., Arijo A., Qureshi T.A. 2008. Epidemiology of ovine gastrointestinal nematodes in Hyderabad district, Pakistan. Pakistan Veterinary Journal 28: 125–130.
- Ayalew G., Tilahun A., Aylate A., Teshale A., Getachew A. 2016. A study on prevalence of paramphistomum in cattle slaughtered in Gondar Elfora Abattoir, Ethiopia. Journal of Veterinary Medicine and Animal Health 8: 107–111.
- Bachal B., Sharif P., Rahamatullah R., Aijaz H.S. 2002. Prevalence of gastro-intestinal helminths in Buffalo calves. Journal of Biological Sciences 2: 43–45.
- Bettencourt E.M.V., Tilman M., Narciso V., Carvalho M.L.D.S., Henriques P.D.D.S. 2015. The livestock roles in the wellbeing of rural communities of Timor-Leste. Revista de Economia e Sociologia Rural 53: 63–80.
- Bisset S.A. 1994. Helminth parasites of economic importance in cattle in New Zealand. New Zealand Journal of Zoology 21: 9–22.
- Biu A.A., Oluwafunmilayo A. 2004. Identification of some paramphistomes infecting sheep in Maiduguri, Nigeria. Pakistan Veterinary Journal 24: 187–189.
- Boray J.C. 1994. Disease of Domestic Animals Caused by Flukes. Food and Agricultural Organisation of the Untied Nations, Rome, 49 p.

- Bunza M.D.A., Ahmad A., Fana S.A. 2008. Prevalence and of paramphistomiasis in ruminants slaughtered at Sokoto Central Abattoir, Sokoto. Nigerian Journal of Basic and Applied Sciences 16: 287–292.
- Charlier J., De Waele V., Ducheyne E., van der Voort M., Velde F.V., Claerebout E. 2015. Decision making on helminths in cattle: diagnostics, economics and human behaviour. Irish Veterinary Journal 69: 14.
- Chaudhri S.S. 2000. Studies on the incidence and epidemiology of paramphistomiasis in sheep. Information Bulletin 23: 269–274
- Davila G., Irsik M., Greiner E.C. 2010. *Toxocara vitulorum* in beef calves in North Central Florida. Veterinary Parasitology 168: 261–263.
- Dodangeh S., Daryani A., Sharif M., Gholami S., Kialashaki E., Moosazadeh M., Sarvi S. 2019. Freshwater snails as the intermediate host of trematodes in Iran: a systematic review. Epidemiology and Health 41: e2019001.
- Elelu N., Ambali A., Coles G.C., Eisler M.C. 2016. Cross-sectional study of *Fasciola gigantica* and other trematode infections of cattle in Edu Local Government Area, Kwara State, north-central Nigeria. Parasites & Vectors 9: 470.
- Gul-E-Nayab G., Muhammad I., Niaz S., Ali Z., Kattak S.A. 2017. Prevalence of gastrointestinal parasite, *Paramphistomum* in domestic animals (Cows and Buffaloes) of district Swat and Charsadda, KP, Pakistan. Journal of Entomology and Zoology Studies 5: 907–911.
- González-Warleta M., Lladosa S., Castro-Hermida J.A., Martínez-Ibeas A.M., Conesa D., Muñoz F., Mezo M. 2013. Bovine paramphistomosis in Galicia (Spain): prevalence, intensity, aetiology and geospatial distribution of the infection. Veterinary Parasitology 191: 252–263.
- Khedri J., Radfar M.H., Borji H., Mirzaei M. 2015. Prevalence and intensity of *Paramphistomum* spp. in cattle from South-Eastern Iran. Iranian Journal of Parasitology 10: 268–272.
- Lasisi O.T., Ojo N.A., Otesile E.B. 2002. Estimation of age of cattle in Nigeria using rostral dentition. Tropical Veterinarian 20: 204–208.
- Lawal-Adebawale O.A. 2012. Dynamics of ruminant livestock management in the context of the Nigerian agricultural system. In: Jawed K (ed.). Livestock Production. InTech, Rijeka, Croatia, 61–80.
- Maitra A., Yadav C.L., Sanjukta R.K. 2014. Seasonal prevalence of paramphistomosis in domestic ruminants in different agro-climatic zones of Uttarakhand, India. Asian Pacific Journal of Tropical Disease 4: S748–S753.
- Martinez-Ibeas A.M., Munita M.P., Lawlor K., Sekiya M., Mulcahy G., Sayers R. 2016. Rumen fluke in Irish sheep: prevalence, risk factors and molecular identification of two paramphistome species. BMC Veterinary Research 12: 143.
- Mogdy H., Al-Gaabary T., Salama A., Osman A., Amera, G. 2009. Studies on paramphistomosis on ruminants in Kafrelsheikh. Journal of Veterinary Medicine 10: 116–136.
- National Population Commission. 2006 Population Census of the Federal Republic of Nigeria, Abuja. Analytical Report at the National level. April 2009.
- Njoku-Tony R.F., Nwoko B.E.B. 2009. Prevalence of paramphistomiasis among sheep slaughtered in some selected abattoir in Imo State, Nigeria. Science World Journal 4: 12–15.
- Omeke B.C.O. 1988. Improving goat productivity in the humid zone of the tropics. Bulletin of Animal Health and Production in Africa 36: 126–130.
- Ozdal N., Gul A., Deger S. 2010. Prevalence of *Paramphistomum* infection in cattle and sheep in Van Province, Turkey. Helminthologia 47: 20–24.
- Paul A.K., Talukder M., Begum K., Rahman M.A. 2011. Epidemiological investigation of Paramphistomiasis in cattle at selected areas of Sirajgonj district of Bangladesh. Journal. Bangladesh Agricultural University 9: 229–232.

- Radostits O.M., Gay C.C., Blood D.C., Hindcliff I.F.F. (Eds) 2000. Veterinary Medicine (9th edition). W. B. Saunders company, London, 1877 p.
- Raza M.A., Murtaza S., Bachaya N.A., Hussain A. 2009. Prevalence of *Paramphistomum cervi* in ruminants slaughtered in District Muzaffar Garh. Pakistan Veterinary Journal 29: 214–215.
- Saha S.S., Bhowmik D.R., Chowdhury M.M.R. 2013. Prevalence of gastrointestinal helminthes in buffaloes in Barisal district of Bangladesh. Bangladesh Journal of Veterinary Medicine 11: 131–135.
- Sani A.B. 2009. Raw material production for export in Northern Nigeria: the experience of the people in the livestock and allied industries under British rule c. 1900–1960. African Economic History 37: 103–127.
- Shola D.O.F., Ganiyu I.A., Rabiu M., Hussain K., Sanda I.M., Baba A.Y., Balogun R.B. 2020. Helminth infections of great concern among cattle in Nigeria: Insight to its prevalence, species diversity, patterns of infections and risk factors. Veterinary World 13: 338–344.
- Smyth J.D. 1996. Animal Parasitology (3rd edition). Cambridge University Press, Cambridge, 549 p.
- Szmidt-Adjidé V., Abroux M., Adjidé C.C., Dreyfuss G., Lecompte A., Cabaret J., Rondelaud D. 2000. Prevalence of *Paramphistomum daubneyi* infection in cattle in central France. Veterinary Parasitology 87: 133–138.
- Urquhart G.M., Armour J., Duncan J.L., Dunn A.M., Jennings F.W. 1996. Veterinary Parasitology. (2nd edition). Oxford, Longman Scientific and Technical Press, United Kingdom. 785 p.
- Yunusa A.J., Salako A.E., Oladejo O.A. 2013. Morphometric characterization of Nigerian indigenous sheep using multifactorial discriminant analysis. International Journal of Biodiversity Conservation 5: 661–665.

ЗАРАЖЕННОСТЬ ВИДАМИ PARAMPHISTOMUM КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА НА СКОТОБОЙНЕ В ГВАГВАЛАДА (АБУДЖА, НИГЕРИЯ)

О. Б. Ароволо, Б. Р. Мохаммед, М. Н. Опара

Ключевые слова: *Paramphistomum* spp., зараженность, крупный рогатый скот, Гвагвалада, Нигерия

РЕЗЮМЕ

В период с сентября 2017 г. по апрель 2018 г. на скотобойне Гвагвалада было проведено обследование забитого крупного рогатого скота для определения зараженности *Paramphistomum* spp. Стандартной инспекции мясопродуктов на наличие *Paramphistomum* spp. подвергнуто 648 особей. Найденных паразитов определяли при первичном обследовании и уточняли при микроскопировании. Общая зараженность крупного рогатого скота *Paramphistomum* spp. в период исследования составила 59.1 %, причем зараженность самцов была выше (51. 4%), чем самок (48.6 %). Статистически значимые различия ($P < 0.05$) в зараженности *Paramphistomum* spp. животных обнаружены в разные сезоны, а также в зависимости от их вида, пола и возраста. Наибольшее заражение крупного рогатого скота *Paramphistomum* spp. отмечено в октябре. Выявленный высокий уровень заражения животных *Paramphistomum* spp. свидетельствует об интенсивной трансмиссии этих паразитов в регионе, что может привести к огромным экономическим потерям. Поэтому животноводам рекомендуется улучшить обеспечение выращиваемых животных кормами, что позволит повысить их устойчивость к заражению *Paramphistomum* spp. При этом необходимо проводить комплексные мероприятия по селективной глистогонной терапии и борьбе с улитками – промежуточными хозяевами *Paramphistomum* spp.

АВТОРСКИЙ УКАЗАТЕЛЬ СТАТЕЙ ЗА 2020 Г. (ТОМ 54)

	№	Стр.
Агасой В. В. Модификация методики изучения строения генитального аппарата слепней (Diptera: Tabanidae).....	1	49
Агасой В. В., Прокофьев В. В., Медведев С. Г. Сезонная динамика активности слепней (Diptera: Tabanidae) в Псковской области.....	4	267
Амирханян А. В. См. Кормилицына М. И. и др.	4	285
Артюшина Ю. В. См. Котти Б. К.	5	430
Атаев Г. Л., Прохорова Е. Е., Токмакова А. С. Защитные реакции легочных моллюсков при паразитарной инвазии.....	5	371
Атовуллаева Л. М. См. Кулемин М. В. и др.	1	25
Бакка С. В. См. Панюкова Е. В. и др.	4	322
Балданова Д. Р. См. Дугаров Ж. Н. и др.	5	423
Беллис Г. А. См. Спрыгин А. В. и др.	3	231
Бугмырин С. В. См. Иешко Е. П. и др.	1	3
Бурдуковская Т. Г. См. Дугаров Ж. Н. и др.	5	423
Бычкова Е. М. См. Григорьева Л. А. и др.	1	13
Вержуцкий Д. Б. См. Медведев С. Г. и др.	3	205
Вершинин Е. А. См. Стариков В. П.	2	152
Василенко А. В. См. Кулемин М. В. и др.	1	25
Воронин В. Н., Сюткин И. В., Голинева Е. А., Дудин А. С., Чернышёва Н. Б. Метацеркарии trematod семейства Bucephalidae карповых рыб Финского залива.....	2	117
Галактионов К. В. См. Прокофьев В. В. и др.	3	179
Галактионов К. В. См. Рысс А. Ю. и др.	1	57

Гасымов Э. К. См. Сеидбейли М. И. и др.	5	402
Глупов В. В. См. Крюков В. Ю. и др.	6	443
Голинева Е. А. См. Воронин В. Н. и др.	2	117
Горбунова И. В. См. Григорьева Л. А. и др.	1	13
Григорьева Л. А., Самойлова Е. П., Шапарь А. О., Бычкова Е. М., Лунина Г. А., Полозова Т. А., Чмырь И. А., Горбунова И. В., Заболотнов А. В., Историк О. А., Михайлова Е. А. Многолетний мониторинг численности опасных для человека иксодовых клещей <i>Ixodes persulcatus</i> и <i>I. ricinus</i> (Acari: Ixodinae) на территории Санкт-Петербурга и Ленинградской области.....	1	13
Долгих В. В. См. Тимофеев С. А и др.	5	355
Дугаров Ж. Н., Бурдуковская Т. Г., Хамнуева Т. Р., Балданова Д. Р., Куксин А. Н. Паразиты алтайского османа <i>Oreoleuciscus</i> sp. (Cypriniformes, Cyprinidae) в озере Торе-Холь (Убсунурская котловина, Тыва).....	5	423
Дугаров Ж. Н., Жепхолова О. Б., Толочко Л. В., Сондуева Л. Д., Пыжьянов С. В., Шестериков Д. С., Пыжьянова М. С., Шабаганова И. В. Обнаружение trematоды <i>Petasiger radiatus</i> (Trematoda: Echinostomatidae) у большого баклана в оз. Байкал.....	1	42
Дудин А. С. См. Воронин В. Н. и др.	2	117
Жепхолова О. Б. См. Дугаров Ж. Н. и др.	1	42
Журавлев В. С. См. Тимофеев С. А и др.	5	355
Заболотнов А. В. См. Григорьева Л. А. и др.	1	13
Историк О. А. См. Григорьева Л. А. и др.	1	13
Иешко Е. П., Коросов А. В., Никонорова И. А., Бугмырин С. В. Связь видового богатства сообществ гельминтов и численности хозяина (на примере обыкновенной бурозубки <i>Sorex araneus</i>).....	1	3
Карпенко С. В., Панов В. В. <i>Calodium soricicola</i> (Yokogawa et Nischigori, 1924) (Nematoda: Capillariidae): экологические особенности зараженности землероек юга западной Сибири.....	1	32
Квасов Д. А. См. Кормилицына М. И. и др.	4	285
Кобешова Ж. Б. См. Кулемин М. В. и др.	1	25
Ковалевский Ю. В. См. Кормилицына М. И. и др.	4	285
Колесникова А. А. См. Панюкова Е. В. и др.	4	322

Кононов А. В. См. Спрыгин А. В. и др.	3	231
Коренберг Э. И. См. Кормилицына М. И. и др.	4	285
Кормилицына М. И., Коренберг Э. И., Михайлова Т. В., Ковалевский Ю. В., Амирханян А. В., Транквилевский Д. В., Ромашов Б. В., Квасов Д. А., Саломатина А. М. Оценка возможной роли иксодовых клещей в природных очагах туляремии лесостепной зоны европейской части России.....	4	285
Корничук Ю. М. См. Рысс А. Ю. и др.	1	57
Коросов А. В. См. Иешко Е. П. и др.	1	3
Котти Б. К., Артюшина Ю. В. Блохи (<i>Siphonaptera</i>) млекопитающих и птиц на восточном Кавказе.....	5	430
Котти Б. К. См. Медведев С. Г. и др.	3	205
Крюков В. Ю., Ярославцева О. Н., Глупов В. В. Физиолого-экологические аспекты взаимоотношений между энтомопатогенными грибами (<i>Ascomycota</i> , <i>Hypocreales</i>) и насекомыми.....	6	443
Куксин А. Н. См. Дугаров Ж. Н. и др.	5	423
Кулемин М. В., Рапопорт Л. П., Василенко А. В., Кобешова Ж. Б., Шокпутов Т. М., Сайлаубекулы Р., Атовуллаева Л. М. Иксодовые клещи сельскохозяйственных животных в южном Казахстане: структура фауны, численность, эпизоотологическое значение.....	1	25
Левакин И. А. См. Прокофьев В. В. и др.	3	179
Леонович С. А. III Международный паразитологический симпозиум «Современные проблемы общей и частной паразитологии» (Санкт-Петербург, 18–20 декабря 2019 г.).....	2	173
Леонович С. А. Строение органа Галлера и систематика иксодовых клещей (семейство Ixodidae): подсемейство Ixodinae.....	6	470
Леонович С. А. Феромоны иксодовых клещей и их использование в борьбе с клещами: пятьдесят лет исследований, надежд и разочарований.....	2	126
Лунина Г. А. См. Григорьева Л. А. и др.	1	13
Медведев С. Г., Вержуцкий Д. Б., Котти Б. К. Разнообразие переносчиков возбудителя чумы: полигастальные паразиты – блохи рода <i>Rhadinopsylla</i> Jordan et Rothschild, 1911 (<i>Siphonaptera</i> : <i>Hystrichopsyllidae</i>).....	3	205
Медведев С. Г. См. Агасой В. В. и др.	4	267
Медведев С. Г., Печникова Н. А. Академик Е. Н. Павловский – анализ творческой деятельности.....	2	91

Михайлова Е. А. См. Григорьева Л. А. и др.	1	13
Михайлова Е. И. О распространении скребня <i>Neoechinorhynchus tumidus</i> (Eoanthocephala: Neoechinorhynchidae) в северной Азии.....	4	298
Михайлова Т. В. См. Кормилицына М. И. и др.	4	285
Николаев К. Е. См. Прокофьев В. В. и др.	3	179
Никонорова И. А. См. Иешко Е. П. и др.	1	3
Павелко В. И. См. Спрыгин А. В. и др.	3	231
Панов В. В. См. Карпенко С. В.	1	32
Панюкова Е. В., Целищева Л. Г., Пестов С. В., Колесникова А. А., Бакка С. В., Ходж Д. М., Шарахова М. В. Фауна и экология кровососущих комаров (Diptera: Culicidae) государственного природного заповедника «Нургуш» Кировской области.....	4	322
Пасунькина М. А. См. Спрыгин А. В. и др.	3	231
Пестов С. В. См. Панюкова Е. В. и др.	4	322
Печникова Н. А. См. Медведев С. Г.	2	91
Полозова Т. А. См. Григорьева Л. А. и др.	1	13
Прокофьев В. В. См. Агасой В. В. и др.	4	267
Прокофьев В. В. Галактионов К. В., Левакин И. А., Николаев К. Е. Свет или температура? Что и как регулирует эмиссию церкарий трематод из моллюсков-хозяев.....	3	179
Прохорова Е. Е. См. Атаев Г. Л. и др.	5	371
Пыжьянов С. В. См. Дугаров Ж. Н. и др.	1	42
Пыжьянова М. С. См. Дугаров Ж. Н. и др.	1	42
Разыграев А. В. Численность самцов <i>Culiseta</i> и <i>Culex</i> (Diptera, Culicidae) в привходовых частях пещер как отражение их различной устойчивости к низкой температуре наружного воздуха.....	2	137
Рапопорт Л. П. См. Кулемин М. В. и др.	1	25
Рзаев Ф. Г. См. Сейдбейли М. И. и др.	5	402
Ромашов Б. В. См. Кормилицына М. И. и др.	4	285

Рысс А. Ю. Рецензия на книгу. Чижов В. Н., Буторина Н. Н., Таболин С. Б., Лиманцева Л. А., Субботин С. А. «Энтомопаразитические нематоды отрядов Tylenchida и Aphelenchida». Москва, Товарищество научных изданий КМК, 2019, 691 с. ISBN 978-5-907099-11-1, твердая обложка, 15×22 см.....	1	60
Рысс А. Ю., Корничук Ю. М., Галактионов К. В. VII Всероссийская конференция с международным участием «Школа по теоретической и морской паразитологии». 9–14 сентября 2019 г., Севастополь.....	1	57
Сайлаубекулы Р. См. Кулемин М. В. и др.	1	25
Саломатина А. М. См. Кормилицына М. И. и др.	4	285
Самойлова Е. П. См. Григорьева Л. А. и др.	1	13
Сеидбейли М. И., Рзаев Ф. Г., Гасымов Э. К. Ультраструктурные особенности кожно-мускульного мешка гельминта <i>Trichostrongylus tenuis</i> (Mehlis, 1846) (Nematoda: Trichostrongylidae).	5	402
Сендерский И. В. См. Тимофеев С. А и др.	5	355
Сондуева Л. Д. См. Дугаров Ж. Н. и др.	1	42
Спрыгин А. В., Беллис Г. А., Павелко В. И., Пасунькина М. А., Кононов А. В. Сезонная активность самок мокрецов рода <i>Culciooides</i> (Diptera: Ceratopogonidae) в различных регионах Российской Федерации.....	3	231
Стариков В. П., Вершинин Е. А. Паразитические членистоногие обыкновенной слепушонки <i>Ellobius talpinus</i> Pallas, 1770 южного Зауралья (Курганская область).....	2	152
Сюткин И. В. См. Воронин В. Н. и др.	2	117
Тимофеев С. А., Сендерский И. В., Журавлев В. С., Долгих В. В. Микроспоридии и их ближайшие родственники: современные представления об эволюции уникальной группы экстремальных паразитов.....	5	355
Токмакова А. С. См. Атаев Г. Л. и др.	5	371
Толочко Л. В. См. Дугаров Ж. Н. и др.	1	42
Транквилевский Д. В. См. Кормилицына М. И. и др.	4	285
Хамнуева Т. Р. См. Дугаров Ж. Н. и др.	5	423
Ходж Д. М. См. Панюкова Е. В. и др.	4	322
Цапко Н. В. Список видов иксодовых клещей (AcarI, Ixodidae) России.....	4	341

Целищева Л. Г. См. Панюкова Е. В. и др.	4	322
Чернышёва Н. Б. См. Воронин В. Н. и др.	2	117
Чмырь И. А. См. Григорьева Л. А. и др.	1	13
Шабаганова И. В. См. Дугаров Ж. Н. и др.	1	42
Шапарь А. О. См. Григорьева Л. А. и др.	1	13
Шарахова М. В. См. Панюкова Е. В. и др.	4	322
Шатров А. Б. Совокупность функциональных систем как основной фактор становления паразитизма (на примере группировки <i>Parasitengonina</i> , <i>Acariformes</i>)....	3	259
Шестериков Д. С. См. Дугаров Ж. Н. и др.	1	42
Шокпутов Т. М. См. Кулемин М. В. и др.	1	25
Ярославцева О. Н. См. Крюков В. Ю. и др.	6	443
Abdalla S. G., Musa H. A., Adam I., Elzaki S. E., Malik A. H., Elsheik M. A., Saeed M. I. Molecular detection of <i>Plasmodium vivax</i> on dry blood spot in eastern Sudan.....	2	145
Abdullah S. M. См. Yakub A. и др.	2	163
Adam I. См. Abdalla S. G. и др.	2	145
Al-Sayed S. E. A., Malik A. H., Musa H. A. Level of IFN- γ , TNF- α , and IL-10 among Sudanese infected by malaria parasite.....	6	504
Amrito B. См. Yakub A. и др.	2	163
Arowolo O. B., Mohammed B. R., Opara M. N. Prevalence of <i>Paramphistomum</i> species in cattle slaughtered at Gwagwalada abattoir, Abuja, Nigeria.....	6	514
Danilov L. G., Kaplin V. G. Nematicidal activity of nematode-symbiotic bacteria <i>Xenorhabdus bovienii</i> and <i>X. nematophila</i> against root-knot nematode <i>Meloidogyne incognita</i>	5	413
Elsheik M. A. См. Abdalla S. G. и др.	2	145
Elzaki S. E. См. Abdalla S. G. и др.	2	145
Gonchar A. Genetic diversity in monoxenous and trixenous digeneans sharing one molluscan host species.....	6	491
Kalashnikova V. A. См. Kremnev G. A. и др.	4	312

Kaplin V. G. См. Danilov L. G.	5	413
Kremnev G. A., Kryuchkova L. Y., Miroliubov A. A., Kalashnikova V. A., Krupenko D. Y. Micro-CT as a method to visualize intramolluscan stages of Digenea.....	4	312
Krupenko D. Y. См. Kremnev G. A. и др.	4	312
Kryuchkova L. Y. См. Kremnev G. A. и др.	4	312
Malik A. H. См. Abdalla S. G. и др.	2	145
Malik A. H. См. Al-Sayed S. E. A. и др.	6	504
Miroliubov A. A. См. Kremnev G. A. и др.	4	312
Mohammed B. R. См. Arowolo O. B. и др.	6	514
Mohammed B. R., Simon M. K., Yayo A. M. Evolution of Nf2e1/dKeap 1 signaling pathway in activating CYP6M2 gene regulation: potential role in resistance to insecticides in <i>Anopheles gambiae</i> (Diptera: Culicidae) – a review.....	3	247
Musa H. A. См. Abdalla S. G. и др.	2	145
Musa H. A. См. Al-Sayed S. E. A. и др.	6	504
Opara M. N. См. Arowolo O. B. и др.	6	514
Saeed M. I. См. Abdalla S. G. и др.	2	145
Saiful I. K. B. M. См. Yakub A. и др.	2	163
Simon M. K. См. Mohammed B. R. и др.	3	247
Uday K. M. См. Yakub A. и др.	2	163
Wani S. A. Soil transmitted helminth infection and its effect on nutritional status of children in Kashmir.....	3	198
Yakub A., Amrito B., Abdullah S. M., Saiful I. K. B. M., Uday K. M. Morphological identification and prevalence of the dog flea <i>Ctenocephalides canis</i> (Curtis, 1826) and the cat flea (<i>Ctenocephalides felis</i> (Bouché, 1835) in Dhaka city, Bangladesh.....	2	163
Yayo A. M. См. Mohammed B. R. и др.	3	247