

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования «Российский государственный педагогический
университет им. А.И. Герцена»

На правах рукописи
УДК 595.122.2

**Усманова
Регина Рустамовна**

**Размножение и развитие спороцист
Leucochloridium paradoxum Carus, 1835 (Trematoda: Leucochloridiidae)**

1.5.12 – Зоология

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
доктор биологических наук, профессор,
Геннадий Леонидович Атаев

Санкт-Петербург
2023

ОГЛАВЛЕНИЕ

Введение	3
Список сокращений, использованных в тексте	9
Глава I. Обзор литературы	10
I. 1. История исследований трематод рода <i>Leucochloridium</i>	10
I. 2. Жизненный цикл трематод рода <i>Leucochloridium</i>	12
I. 3. Промежуточные хозяева трематод рода <i>Leucochloridium</i>	22
I. 4. Систематика рода <i>Leucochloridium</i>	27
I. 5. Молекулярно-генетические исследования трематод рода <i>Leucochloridium</i>	29
Глава II. Материал и методы	31
II. 1. Изучение промежуточных хозяев трематод <i>L. paradoxum</i>	31
II. 2. Изучение трематод <i>L. paradoxum</i> из природно-заражённых моллюсков	31
II. 3. Изучение трематод <i>L. paradoxum</i> из экспериментально заражённых моллюсков ..	34
II. 4. Гистологическое изучение спороцист <i>L. paradoxum</i>	36
II. 5. Изучение спороцист <i>L. paradoxum</i> с помощью конфокальной микроскопии	37
II. 6. Молекулярно-генетическое исследование моллюсков и трематод	37
Глава III. Результаты и обсуждение	40
III. 1. Видовая идентификация промежуточного хозяина	40
III. 2. Видовая идентификация спороцист трематод <i>L. paradoxum</i>	49
III. 3. Развитие и размножение спороцист <i>L. paradoxum</i>	59
III. 3. 1. Развитие и размножение в экспериментально заражённых моллюсках	59
III. 3. 2. Развитие и размножение в природнозаражённых моллюсках	73
Заключение	83
Выводы	91
Список используемой литературы	92

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Несмотря на широкую известность трематод р. *Leucochloridium* и долгую историю их изучения, многие вопросы, связанные с развитием и размножением разветвлённых спороцист этого рода, остаются нерешёнными. До настоящего времени даже остаётся открытым вопрос о том, к материнскому или дочернему поколению партенит они относятся. Отсутствуют сведения о механизме заражения моллюска-хозяина. Фрагментарны данные об онтогенезе и размножении спороцист. Также отсутствует информация о реализации жизненного цикла этих трематод в природе.

Уникальное строение партенит р. *Leucochloridium*, а именно наличие у них отростков, имеющих специфическую форму и окраску, позволяет использовать данную стадию жизненного цикла в целях видовой идентификации трематод этого рода (Гинецинская, 1953; Жукова и др., 2012; Ataev et al., 2016). За последнее десятилетие появился ряд статей, посвящённых этому вопросу (Yamada, Fukumoto, 2011; Nakao et al., 2019; Ohari et al., 2019 и др.). Однако в них отсутствуют сведения о внутривидовой генотипической и фенотипической изменчивости спороцист. Остаётся неясным, могут ли спороцисты с разными вариантами окраски отростков относиться к одному виду и могут ли спороцисты с одинаково окрашенными отростками относиться к разным видам. Поэтому важным аспектом исследования стало проведение видовой идентификации и анализ внутривидовой изменчивости партенит *L. paradoxum*.

В качестве модельного объекта в рамках исследования использованы наиболее распространённые на территории европейской части России и Белоруссии трематоды *L. paradoxum*. Их первоописание относится к началу XIX века (Rudolphi, 1803). Жизненный цикл этого вида был описан в конце XIX века (Heckert, 1889). Работа Гекерта (Heckert, 1889) – наиболее полная монография, посвящённая изучению развития и размножения трематод *L. paradoxum*.

Промежуточным хозяином трематод *L. paradoxum* являются моллюски *Succinea putris* (янтарки) из сем. Succineidae. Для гастропод этого семейства характерен широкий внутривидовой полиморфизм (Barker, 2001), что приводит к тому, что моллюски из разных родов могут быть схожи по морфологии раковин. В связи с этим для изучения развития и размножения спороцист из природнозаражённых моллюсков, а также для проведения экспериментов потребовалась предварительная видовая идентификация промежуточного хозяина.

Цель работы: изучение развития и размножения спороцист трематод *L. paradoxum*.

Основные задачи исследования:

1. Выполнить видовую идентификацию трематод *L. paradoxum* и их промежуточных хозяев – моллюсков *S. putris* на основании анализа морфологических признаков и молекулярно-генетических маркеров.
2. Осуществить экспериментальную постановку жизненного цикла трематод *L. paradoxum*.
3. Экспериментально изучить механизм заражения моллюсков *S. putris* трематодами *L. paradoxum*.
4. Изучить развитие и размножение разветвлённых спороцист *L. paradoxum*.
5. Определить сезонную динамику развития и размножения спороцист *L. paradoxum* в природнозаражённых моллюсках *S. putris*.
6. Проанализировать особенности реализации жизненного цикла *L. paradoxum* в условиях умеренных широт.

Научная новизна

Впервые проведено комплексное исследование паразито-хозяйинной системы «трематоды *Leucochloridium paradoxum* – моллюски *Succinea putris*». Впервые выполнен морфологический анализ и генотипирование моллюсков *S. putris* из разных популяций, а также *L. paradoxum*, паразитирующих в них. Для этого выполнен дизайн праймеров для участка митохондриальной ДНК *S. putris*. Также впервые проведён анализ внутривидовой изменчивости окраски спороцист *L. paradoxum*.

В результате исследования проведён комплексный анализ жизненного цикла *L. paradoxum*, получены данные о ранних этапах развития, о размножении партенит из экспериментально и природнозаражённых моллюсков *S. putris*. Новым для науки стало детальное изучение внутримоллюскового развития *L. paradoxum*, результаты которого доказали отсутствие паразитической фазы развития материнской спороцисты.

В рамках исследования впервые проведён анализ экстенсивности инвазии природнозаражённых моллюсков *S. putris* трематодами *L. paradoxum*, установлена динамика размножения спороцист на протяжении тёплого сезона. На основании полученных данных о развитии партенит *L. paradoxum*, анализа биологии их дефинитивных и промежуточных хозяев впервые представлена схема реализации жизненного цикла трематод этого вида в условиях средних широт.

Теоретическая и практическая значимость работы

Сем. Leucochloridiidae, куда входит р. *Leucochloridium*, является одной из базальных групп дигеней. В то же время эти трематоды обладают двуххозяйинным жизненным циклом,

в котором, вследствие протекания вне водной среды, утрачены свободноживущие личинки. В связи с этим сведения о природе партенит р. *Leucochloridium* важны для понимания эволюции дигеней в целом.

Установленные в ходе диссертационного исследования морфологические и молекулярно-генетические признаки трематод р. *Leucochloridium* и моллюсков *S. putris* позволяют проводить видовую идентификацию в фаунистических и систематических работах.

В рамках исследования показано отсутствие паразитической фазы развития материнской спороцисты трематод *L. paradoxum*. Разветвлённая спороциста относится к дочерней генерации и производит только метацеркарий. Полученные результаты о механизме размножения дочерней спороцисты *L. paradoxum* подтверждают универсальность герминальной массы (ГМ) как органа размножения партенит трематод.

Приведённая в работе периодизация онтогенеза спороцист важна для описания процессов, происходящих в популяциях природнозаражённых моллюсков, обитающих в разных климатических зонах.

Представленная в работе схема реализации жизненного цикла представляет интерес для зоологов, паразитологов и экологов. Среди партенит *L. paradoxum* выделены две сезонные когорты, выдвинуто предположение о депонирующей роли моллюсков в поддержании инвазии в условиях умеренных широт. Полученные сведения важны для разработки методов анализа гельминтофауны птиц – окончательных хозяев трематод р. *Leucochloridium* и профилактики их гельминтозов.

Разработанная методика поддержания жизненного цикла *L. paradoxum* в лабораторных условиях имеет значение для расшифровки жизненных циклов других трематод, использующих в качестве промежуточных хозяев наземных брюхоногих моллюсков. Особое значение имеет предложенный способ заражения наземных гастропод и их лабораторного культивирования.

Методология и методы исследования

Методология исследования основана на комплексном исследовании модели «трематоды *Leucochloridium paradoxum* – моллюски *Succinea putris*». Выполнена видовая идентификация обоих компонентов по морфологическим признакам и молекулярно-генетическим маркерам, что позволило экстраполировать данные о развитии партенит, полученные в рамках эксперимента, на спороцист из природнозаражённых моллюсков.

Для изучения партенит *L. paradoxum* была использована методология, основанная на детальном изучении их развития и размножения, что позволило выделить в онтогенезе дочерней спороцисты функциональные этапы онтогенеза.

В работе использованы как классические методы зоологии (полевые сборы, приготовление тотальных и гистологических препаратов, постановка жизненного цикла, световая, конфокальная и сканирующая электронная микроскопия), так и современные методы молекулярной биологии (выделение ДНК, ПЦР, построение филогенетических реконструкций и сетей гаплотипов).

Положения, выносимые на защиту

1. На основании анализа морфологических и молекулярно-генетических признаков все заражённые трематодами *L. paradoxum* моллюски (собранные на территории европейской части России и в Белоруссии) относятся к виду *S. putris*.

2. Все обнаруженные в моллюсках *S. putris* спороцисты с отростками, окрашенными в зелёный цвет, по морфологическим признакам и молекулярно-генетическим маркерам относятся к виду *L. paradoxum*.

3. Вылупление мирацидиев *L. paradoxum* происходит в желудке и средней кишке моллюска, после чего личинки проникают через кишечный эпителий в область гепатопанкреаса. В дальнейшем происходит разрушение сомы мирацидия и высвобождение генеративных клеток, из которых развивается дочерняя спороциста, представляющая единственное поколение партенит.

4. Закладка эмбрионов метацеркарий в спороцисте происходит субтегументарно и приурочена к герминальным массам. После достижения стадии зародышевого шара эмбрионы покидают её и развиваются в схизоцеле спороцисты. Достижение инвазионности метацеркариями происходит в окрашенных отростках.

5. В природнозаражённых моллюсках формируются две когорты партенит. Анализ сезонной динамики заражения моллюсков *S. putris* и развития спороцист позволяют определить роль моллюсков в поддержании жизненного цикла трематод *L. paradoxum* как основную в депонировании инвазии на протяжении холодного сезона.

Степень достоверности и апробация результатов

Основные положения диссертационного исследования представлены и обсуждены на:

1. Межвузовской конференции молодых ученых «Герценовские чтения» (Санкт-Петербург, 1–4 апреля 2018 г.).

2. Международной конференции «VI Съезд паразитологического общества» (Санкт-Петербург, 15–19 октября 2018 г.).

3. Всероссийской научной конференции с международным участием «Моллюски: биология, экология, эволюция и формирование малакофаун» (Ярославль, 14–18 октября 2019 г.).

4. VII Всероссийской конференции с международным участием «Школа по теоретической и морской паразитологии» (Севастополь, 9–14 сентября 2019 г.).

5. V Международной конференции «Концептуальные и прикладные аспекты научных исследований и образования в области зоологии беспозвоночных» (Томск, 26–28 октября 2020 г.).

6. Международном молодёжном научном форуме «Ломоносов-2020» (Москва, 10–27 ноября 2020 г.).

7. Международной научной конференции, посвящённой 150-летию Севастопольской биологической станции – Института биологии южных морей имени А. О. Ковалевского и 45-летию НИС «Профессор Водяницкий» «Изучение водных и наземных экосистем: история и современность» (Севастополь, 13–18 сентября 2021 г.).

8. Межвузовской студенческой конференции, посвященной 137-летию со дня рождения академика Е.Н. Павловского «Актуальные проблемы биологии и медицинской паразитологии» (Санкт-Петербург, 16 марта 2021 г.).

9. Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов-2021» (Москва, 12–23 апреля 2021 г.).

10. Всероссийской конференции «Биология водных экосистем в XXI веке: факты, гипотезы, тенденции» (Борок, 22–26 ноября 2021 г.).

11. Международной научно-практической конференции «Изучение водных и наземных экосистем: история и современность» (Севастополь, 5–9 сентября 2022 г.).

12. II Всероссийском орнитологическом конгрессе (Санкт-Петербург, 30 января–4 февраля 2023 г.).

Публикации

По теме диссертации опубликовано 4 статьи (в журналах из перечня ВАК), 12 тезисов (устных докладов, постерных сессий).

Структура и объём диссертации

Диссертация состоит из Введения, глав «Обзор литературы», «Материал и методы», «Результаты и обсуждение», Заключение, Выводов, Списка литературы. Работа изложена на 107 страницах. Список литературы насчитывает 176 источников, из них 121 на иностранном языке. Диссертация иллюстрирована 36 рисунками и содержит 11 таблиц.

Благодарности

Автор выражает глубокую признательность Г. Л. Атаеву за чуткое руководство и помощь на всех этапах выполнения диссертационного исследования. Автор искренне благодарен Е. Е. Прохоровой и А. С. Токмаковой за всестороннюю помощь в подготовке диссертации. Особую благодарность автор выражает коллективу кафедры зоологии и

генетики РГПУ им. А. И. Герцена за помощь в сборе материала и постановке экспериментов. Автор крайне признателен А. А. Виноградовой за ценные советы и помощь в работе над экспериментом, А. Е. Жохову за предоставленный материал. Автор сердечно благодарен А. А. Добровольскому за поддержку и ценные советы. За помощь в сборе материала автор также благодарен Р. Р. Усманову, Н. А. Усмановой и Р. Р. Усманову.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 20-34-90012 «Размножение и развитие партенит рода *Leucochloridium*», а также гранта Министерства Просвещения РФ в рамках государственного задания (№ проекта VRFY-2023-0009).

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ, ИСПОЛЬЗУЕМЫХ В ТЕКСТЕ

- 18S – ядерный ген, кодирующий 18S рРНК;
28S – ядерный ген, кодирующий 28S рРНК;
5,8S – ядерный ген, кодирующий 5,8S рРНК;
ГМ – герминальная масса;
ГК – генеративная клетка;
Н. – нуклеотид;
НК – недифференцированная клетка;
П. з. – после заражения;
П. н. – пара нуклеотидов;
ПЦР – полимеразная цепная реакция;
ВА – Байесовский анализ;
Cox1 – митохондриальный ген I субъединицы цитохром с-оксидазы;
CytB – митохондриальный ген цитохрома b;
ETS1 – внешний транскрибируемый спейсер;
ITS1, ITS2 – внутренние транскрибируемые спейсеры;
ML – метод максимального правдоподобия;
rDNA – гены, кодирующие рибосомную РНК.

Глава I. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

I. 1. История исследований трематод рода *Leucochloridium*

Исследования трематод р. *Leucochloridium* берут начало в XIX веке. Первыми были описаны *мариты* под видовым названием *Fasciola macrostomum* (Rudolphi, 1803).

Позже Монтичелли ввёл в литературу родовое название *Urogenimus*, к которому автор отнёс *Distomum macrostomum* (син. *Fasciola macrostomum*) (Monticelli, 1888). И в начале XIX века в работах, посвящённых этим трематодам, использовались оба названия.

Первоописание *спороцист* трематод р. *Leucochloridium* выполнено Арэнсом. Изначально он не отнёс спороцист к трематодам, а отростки воспринимал как личинок насекомого. Позднее Арэнс отказался от этой идеи и посчитал, что содержимое отростков представляет собой яйца (Ahrens, 1810). Арэнс не присвоил видового названия объекту исследований. Не дал видовое название спороцисте и Рудольфи, описавший её десятилетием позже (Rudolphi, 1819).

Родовое название *Leucochloridium* ввёл Карус (Carus, 1835) для описания спороцист с жёлто-зелёными пигментированными отростками, которых исследователь обнаружил в моллюске *S. amphibia*. В 1833 г. Карус исследовал заражённую янтарку, и заключил, что содержимое отростков спороцисты не является яйцами. Исследователь также отметил, что отростки представляют собой не часть улитки, а формируются независимо в печени моллюска из системы переплетённых между собой трубочек.

Важным для исследований р. *Leucochloridium* было сообщение Вигманна (Wiegmann, 1835), который выразил серьёзные сомнения касательно присвоения родового названия исследуемому объекту, так как спороцисты, по его мнению, являлись лишь частью жизненного цикла. Его поддержал Нордманн, ссылаясь на тогда ещё нераспространённые взгляды Стинструпа касательно смены поколений в жизненном цикле трематод. Нордманн предположил, что спороциста *L. paradoxum* является своеобразной «кормилицей» (от нем. «*amte*»), содержащей большое количество трематод, а не яиц (Nordmann, 1840).

Дужардин в соответствии с разработанной в то время терминологией, называет обнаруженную в янтарке стадию развития трематод р. *Leucochloridium* спороцистой. Соответственно, её содержимое исследователи воспринимают как церкарий. После этого метацеркарии *L. paradoxum* появляются на систематических схемах рядом с церкариями других трематод (Dujardin, 1845).

Следующий шаг в исследованиях делает Зибольд (Siebold, 1853). Он наблюдает процесс развития спороцисты в целом и подтверждает, что спороцисты не происходят из тканей моллюска, а также тот факт, что внутри отростков формируются зародыши трематод, для которых характерен процесс инцистирования. Этот исследователь

подчёркивает, что у церкарий р. *Leucochloridium* нет хвоста, для них характерна пассивная стратегия заражения окончательного хозяина. За передачу инвазии, согласно взглядам Зибольда, отвечают окрашенные и подвижные отростки спороцисты. Зибольд также первый отмечает сходство церкарий *L. paradoxum* с ранее описанными половозрелыми червями видов *Distomum macrostomum* и *D. holostomum*.

В дальнейшем существование родов *Urogonimus* и *Leucochloridium*, а также *Distomum* стало предметом дискуссий (Kharoo, 2011). Это привело к тому, что представителей морфологически схожих видов исследователи стали описывать под разными видовыми и родовыми названиями.

Первая ревизия подсем. Leucochloridiinae Poche, 1907 была проведена Каган. Исследователь провёл синонимизацию многих видов (Kagan, 1952b). В пределах семейства Каган было выделено четыре рода на основании морфологии марит: *Urogonimus* Monticelli, 1888, *Leucochloridium* Carus, 1835, *Neoleucochloridium* Kagan, 1952 и *Urotocus* Looss, 1899.

Название сем. Leucochloridiidae Dollfus, 1934 было принято Ямагучи (Yamaguti, 1958). В пределах семейства автор выделил три подсемейства: Urotocinae Yamaguti, 1958, Urogyminae Yamaguti, 1958 и Leucochloridiinae Poche, 1907. Также Ямагучи упразднил р. *Urogonimus* и р. *Neoleucochloridium*, включив их представителей в р. *Leucochloridium*.

В дальнейшем мнение исследователей менялось не только относительно родов, входящих в состав семейства (Bakke, 1980; Pojmanska, 2002), но и касательно его систематического положения. Мера считал, что Leucochloridiidae следует воспринимать не в статусе отдельного семейства, а в статусе подсемейства в составе Brachylaimidae (Mehra, 1962).

Первая попытка изучения **жизненного цикла** трематод р. *Leucochloridium* была сделана Целлером (Zeller, 1874). Он использовал для заражения метацеркариями певчих птиц, в кишечнике которых спустя 6 дней обнаружил мариты. Этот исследователь отмечал крайне высокую степень сходства между маритами *D. macrostomum* и *D. holostomum*. Однако в данной работе воспроизведена лишь часть жизненного цикла (Zeller, 1874).

До монографии Гекерта (Heckert, 1889) оставались неясными многие вопросы, касающиеся реализации жизненного цикла трематод р. *Leucochloridium*. В монографии приводится наиболее полное его исследование, включающее анализ стадий мариты, мирацидия, спороцисты, метацеркарии. Работа описывает объект не только на уровне общей морфологии, но и на гистологическом уровне. Особенно ценны рисунки автора, описывающие строение мирацидия, спороцисты на ранних стадиях развития. После работ по постановке жизненного цикла в научной литературе закрепляется родовое название

Leucochloridium. Его принимают и обосновывают в своих статьях Пош и Люэ (Roche, 1907; Lühe, 1909). Последний в систематической сводке даёт описание рода.

В дальнейшем работы, посвящённые р. *Leucochloridium*, были нацелены на исследование видового разнообразия. Люэ в своей работе отмечает на территории Германии только один вид, *L. macrostomum* (Lühe, 1909). Однако исследователи отмечали, что определение по морфологии мариты видов данного рода крайне затруднительно. Это, по-видимому, и привело к тому, что разные исследователи описывали разное их количество (Король, 2004).

Многие авторы отмечали важность использования в видовом определении признаков спорцист в связи с тем, что их окраска может являться видоспецифической (Bakke 1978, 1980). Первым высказал такое предположение Мэгат (Magath, 1920), который описал вид *L. problematicum*, отметив его сходство с *L. insignis*. Однако впоследствии ряд авторов выступали против использования признака окраски для видовой идентификации (Wesenberg-Lund, 1931; Mönnig, 1932).

Современные исследования сем. Leucochloridiidae проводятся с использованием методов молекулярной генетики. При этом изучаются как филогенетические связи данного семейства с другими таксонами трематод (Olson et al, 2003), так и видовое разнообразие семейства, внутривидовой полиморфизм (Heneberg et al., 2016; Rząd, 2013; Ataev et al., 2016 и др.).

Так в работе Олсон с соавторами (Olson et al, 2003) представлено два варианта трактовки связей между сем. Leucochloridiidae и Brachylaimidae, исходя из анализа схем, построенных на основе анализа последовательностей генов рДНК (малой и большой субъединиц рибосом). Согласно первому из них, Brachylaimidae – парафилетическая группа, включающая сем. Leucochloridiidae. В другой трактовке связей между семействами, эти группы представляют собой сестринские таксоны (Olson et al, 2003).

В книге «Keys to Trematoda» Leucochloridiidae представляются в ранге семейства, в состав которого входят р. *Urotocus*, р. *Urogonimus*, р. *Leucochloridium* (син. *Neoleucochloridium*) (Pojmanska, 2002).

I. 2. Жизненный цикл трематод рода *Leucochloridium*

Подробное описание жизненного цикла трематод р. *Leucochloridium* в литературе отсутствует, несмотря на интерес исследователей, который вызывают уникальные спорцисты, характеризующиеся несвойственной для паразитов окраской.

Жизненный цикл включает двух хозяев. В роли промежуточного хозяина выступают наземные моллюски, в основном, представители сем. Succineidae (янтарки). В кишечник моллюска попадает яйцо, из которого вылупляется мирацидий. Данных касательно его

трансформации и миграции в тканях хозяина в литературе практически нет. Наиболее полное исследование было проведено Гекертом (Heckert, 1889). Было показано, что мирацидий проникает в гемоцель моллюска через эпителий передней кишки. Затем личинка мигрирует в гепатопанкреас улитки. Между ацинусами гепатопанкреаса формируется спороциста, имеющая сложное строение. В её отростках накапливаются метацеркарии. Зрелые отростки характеризуются видоспецифичной окраской и способны к движению. Также они могут проникать в глазные щупальца моллюсков. Окраска и характерные движения делают отростки похожими на гусениц насекомых, что привлекает внимание птиц.

Кроме того, было показано, что спороцисты *L. paradoxum* влияют на поведение моллюсков *S. putris*. Заражённые моллюски больше передвигаются, предпочитают наиболее открытые и освещённые участки по сравнению с незаражёнными янтарками. Это, по мнению исследователей, делает инфицированных моллюсков и, соответственно, спороцист в них, более доступными для птиц (Wesolowska, Wesolowski, 2014).

Птицы заражаются, склёвывая отростки или моллюсков целиком. Мариты паразитируют в клоаке и в Фабрициевой сумке окончательных хозяев. В их роли выступают представители подотряда Певчих воробьиных (Леонов и др., 1965), отрядов Ржанкообразные, Журавлеобразные и других (Гинецинская, Наумов, 1958; Быховская-Павловская, 1962; Гвоздев, Соболева, 1978 и др.).

Особый интерес представляет явление развития церкарий в мариты непосредственно в моллюсках *S. putris*. Предполагается, что развитие происходит в гемоцеле моллюска, куда через повреждения покровов, образовавшиеся при аутономии отростков спороцисты, проникают метацеркарии (Атаев, Токмакова, 2015).

Строение марит р. *Leucochloridium*. Мариты р. *Leucochloridium* характеризуются овальной формой тела, их покровы представлены тегументом с тонкими шипами. Ротовая и брюшная присоски развиты и располагаются близко к друг другу (Rojmanska, 2002).

Для пищеварительной системы трематод р. *Leucochloridium* характерна глотка, которая плотно прилегает к ротовой присоске. Передняя кишка переходит в среднюю, состоящую из двух ветвей, которые достигают заднего края тела мариты.

Половая система марит представлена гонадами, которые располагаются треугольником. Центральное положение занимает яичник, по бокам лежат два семенника (Rojmanska, 2002).

Матка марит образует многочисленные петли, поднимается до уровня ротовой присоски или бифуркации кишки, в некоторых случаях и выше. Затем она пересекает тело горизонтально между оральной и брюшной присосками, переходит на другую сторону и

спускается к половому атриуму. Петли матки занимают область между ветвями кишечника, но у некоторых видов (*L. actitis*) выходят за эти границы (Быховская-Павловская, Дубинина, 1951). Для *L. paradoxum* характерна матка, не выходящая за пределы межкишечной области. Помимо этого, её единственная петля, расположенная над ацетабулюмом, достигает середины оральной присоски (Прохорова и др., 2018).

Желточники формируют длинные поля, которые распространяются от оральной присоски до конца кишечных ветвей и ниже. Мариты характеризуются длинным циррусом, поверхность которого может быть как гладкой, так и нести шипы. Совокупительный орган расположен в объёмной и мускулистой сумке (Kagan, 1952b).

Строение спороцист р. *Leucochloridium*. Гекерт считал, что тело спороцисты подразделяется на две части, которые отличны друг от друга морфологически и функционально (Heckert, 1889). Первая часть представлена сетью тонких трубочек с ветвистыми концами. К этой части приурочено образование новых церкарий, то есть она выполняет репродуктивную функцию. По мере того, как церкарии достигают определённого размера, они перемещаются в специальные камеры (отростки), которые представляют собой вторую часть. Отростки увеличиваются в объёме, приобретают окраску и проникают в глазные щупальца моллюсков, начиная ритмично двигаться. Отростки способны прорывать покровы хозяина и проникать во внешнюю среду. Церкарии, содержащиеся в них, не выходят наружу благодаря наличию клапана – структуры, состоящей из крупных светлых клеток с отчётливыми ядрами и ядрышками (Heckert, 1889). В своей монографии Гекерт приводит также данные касательно развития зародышей метацеркарий и трансформации стенки тела спороцисты по мере её развития.

В настоящее время исследователями принято выделять в строении спороцист р. *Leucochloridium* следующие морфофункциональные участки: центральная часть, трубчатые участки, отростки (Mönnig, 1922; Bakke, 1980; Pojmanska, Machaj, 1991; Атаев и др., 2013; Атаев et al., 2016). Выделяемые зоны характеризуются следующими функциями и особенностями строения:

- Центральная часть выполняет репродуктивную функцию (Атаев и др., 2013). Пластинка тегумента несёт на своей поверхности немногочисленные микроворсинки, некоторые из них разветвлены. На поверхности тегумента располагается покровный слой, высота которого превышает микроворсинки. В дистальной части он характеризуется большей плотностью. В пластинке тегумента обнаруживается большое количество везикул, а также митохондрии. Рядом с последними располагаются параллельно идущие микротрубочки, также здесь расположены паракристаллические включения. Базальная пластинка подстилается волокнистым слоем. Лежащий ниже слой мышц развит слабо.

Цитоплазматические мостики, соединяющие цитоны с пластинкой тегумента, содержат микротрубочки и большое количество везикул. Ядра цитонов круглые, митохондрии разного размера, хорошо развит ЭПР (Pojmanska, Machaj, 1991). В цитонах запасаются гранулы гликогена и липиды (рис. 1) (Storch, Welsch, 1970).

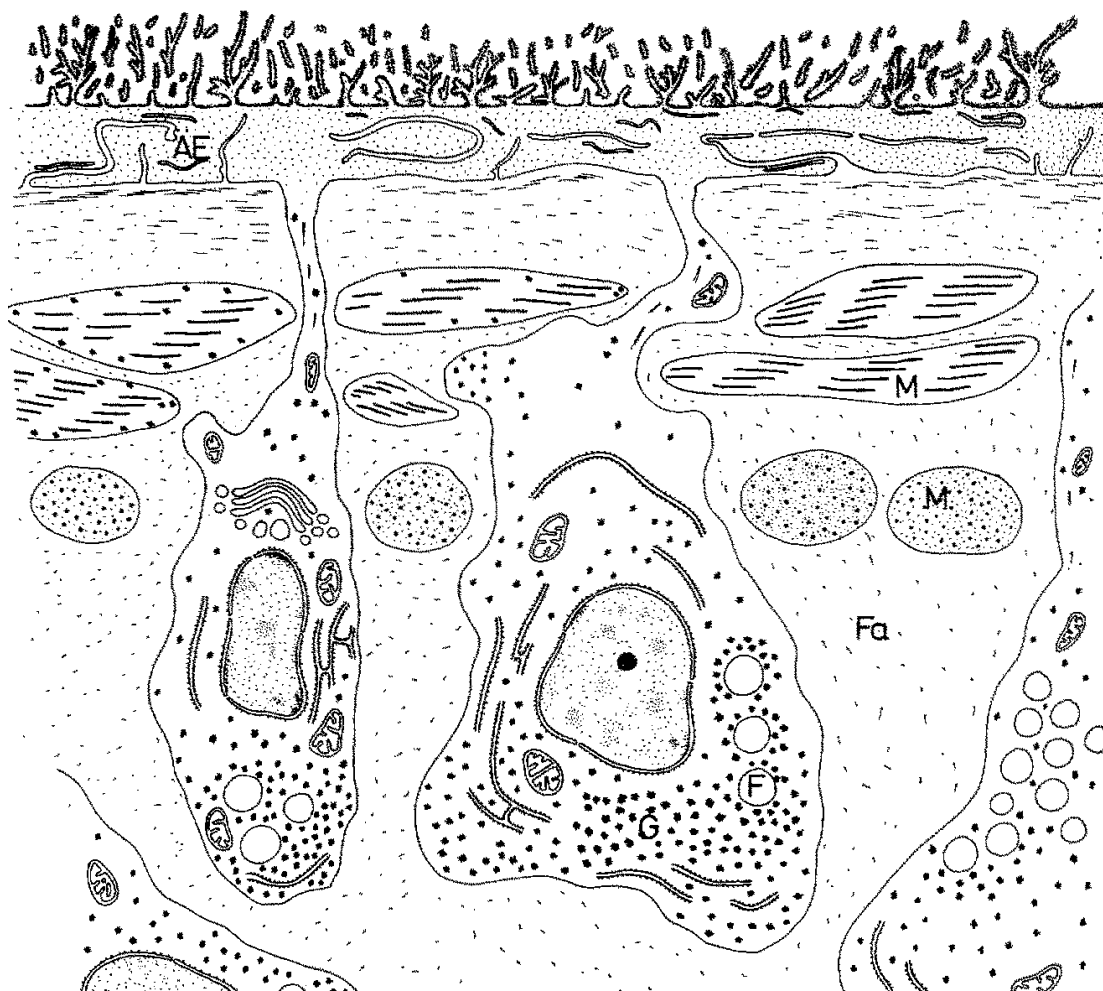


Рисунок 1. Стенка тела спорозисты р. *Leucochloridium*. Условные обозначения: ae – наружная пластинка с микроворсинками и соединенными с ней цитонами, g – гликоген, f – липидные включения, fa – межклеточные фибриллярные волокна, m – продольные и поперечные мышечные волокна (Storch, Welsch, 1970, с изм.).

- По трубчатым участкам метацеркарии попадают в отростки. На поверхности тегумента трубчатых участков столона расположено большое количество сильно разветвлённых микроворсинок. Между микроворсинками на поверхности тегумента располагается вещество равномерной плотности (скорее всего, речь идёт о гликокаликсе). В тегументе не обнаружено включений, а его внутренняя мембрана формирует инвагинации. Базальная пластинка заметно толще, в ней наблюдается электронно-плотный слой. Продольные и кольцевые мышцы многочисленны, окружены волокнистым

материалом. Между цитонами тегумента и мышцами расположены овальные пигментные гранулы разного размера (Pojmanska, Machaj, 1991).

- Отросток покрыт тегументом с наиболее развитыми микроворсинками: они располагаются близко друг к другу, сильно разветвлены. В пластинке тегумента многочисленны крупные митохондрии с сильно развитыми кристами, вакуоли разного размера. Базальную пластинку подстилает толстый слой фиброзного материала, который также окружает мышцы и цитоны тегумента. В цитонах расположено множество митохондрий (Pojmanska, Machaj, 1991).

В полости отростков находятся метацеркарии, окруженные муциноподобным веществом, окрашивающимся в голубой цвет при окраске по Маллори (Начева и др., 1981). Их количество может достигать 373 особей (Атаев и др., 2013). Однако в целом спороциста может производить за свою жизнь несколько тысяч метацеркарий (Wesenberg-Lund, 1931).

Количество отростков спороцисты варьирует, они могут находиться на разных стадиях развития (Heckert, 1889). Чаще всего исследователи отмечают наличие 3–5 окрашенных отростков у партенит вида *L. paradoxum*, при большем числе имеет место множественное заражение моллюска-хозяина (Woodhead, 1936; Kagan, 1952a; Bakke, 1980; Ataev et al., 2016). Ранее был описан уникальный случай обнаружения в моллюске 19 отростков одного типа окраски, что авторы трактуют как результат множественного заражения янтарки трематодами *L. paradoxum* (Атаев, Токмакова, 2015). Везенберг-Лунд отмечает, что количество отростков спороцисты может зависеть от того, как скоро первый (самый крупный) созревший отросток покинет тело моллюска. Так один крупный отросток, как правило, замещают 6–8 небольших (Wesenberg-Lund, 1931). Следует отметить, что возможно множественное заражение янтарок трематодами разных видов р. *Leucochloridium*, при этом число окрашенных отростков также превышает 5 (Атаев et al., 2016).

Остаётся открытым вопрос о питании спороцист. Исследователи не обнаружили крипты, которые свидетельствовали бы о пиноцитозном питании (Pojmanska, Machaj, 1991). Также вызывает вопросы наиболее интенсивное развитие микроворсинок в области отростков, тогда как считается, что основную трофическую функцию берёт на себя центральная часть (Pojmanska, Machaj, 1991). Однако потребности в питании подвижных отростков также велики, что может объяснять данную особенность морфологии (Pojmanska, Machaj, 1991).

Практически отсутствуют в литературе данные касательно нервной системы спороцист. Пойманская и Махай обнаружили структуру, напоминающую ресничный корешок чувствительной клетки, сопровождаемый параллельно идущими

микротрубочками. Также эти авторы отметили нервные отростки в пластинке тегумента отростков. В них были выявлены различные типы везикул: мелкие электронно-прозрачные, крупные электронно-прозрачные и везикулы с плотным центральным содержимым (Pojmanska, Machaj, 1991).

В литературе высказываются разные мнения касательно того, к какой генерации партенит относятся разветвлённые спороцисты рассматриваемого семейства. Ряд исследователей придерживается мнения, что партениты представлены только генерацией материнской спороцисты, а дочерняя утрачивается (Гвоздев, Соболева, 1978; Ждярска, Соболева, 1986). Согласно альтернативному мнению, поколение спороцист является дочерним (Galaktionov, Dobrovolskij, 2003).

Размножение спороцист р. *Leucochloridium*. Первые предположения касательно механизмов размножения спороцист р. *Leucochloridium* были высказаны Гекертом в 1889 г. (Heckert, 1889). Этот исследователь описал эмбрионы, которые назвал «зародышевыми шарами». Зародышевые шары, по мнению Гекерта, появляются в результате бесполого размножения. Такие структуры изначально связаны со стенкой тела спороцисты и возникают из особых клеток (вероятно, генеративных), отличающихся от остальных клеток в составе стенки гомогенной цитоплазмой и более тёмной окраской. По мере разрастания субтегументарного матрикса спороцисты выделить эти клетки становится сложнее. Тем не менее, их можно отличить по наличию множества мелких гранул в цитоплазме, которые, по мнению Гекерта, представляют собой резервные вещества (Heckert, 1889).

В дальнейшем исследования механизмов размножения партенит р. *Leucochloridium* не проводились до начала XXI века. Только в статье Пойманской и Махай (Pojmanska, Machaj, 1991) упоминается, что эмбрионы формируются в центральной части спороцисты.

Наиболее же полное описание механизма размножения спороцист приводится в статьях Атаева с соавторами (Атаев и др., 2013; Атаев, Токмакова, 2015). Исследователями было показано, что эмбрионы церкарий закладываются в центральной части спороцисты («репродуктивная зона»), где локализуются ГМ, которые считаются универсальными органами размножения партенит трематод (Dobrovolskij, Ataev, 2003; Атаев, 2017). В состав ГМ входит 2 типа клеток:

1. Недифференцированные клетки (НК) – способны к делению, соответствуют первичным гониям женской гонады.

2. Генеративные клетки (ГК) – клетки, в результате дробления которых образуются эмбрионы. При этом зрелые ГК не способны к пролиферации (см. Атаев, 2017).

Эмбрионы, образуемые за счёт дробления ГК, на ранних стадиях входят в состав ГМ, а также остаются связанными с ними пластинчатыми структурами после формирования

зародышевой мембраны (стадия 15–30 бластомеров). После этого они переходят к флотированию в схизоцеле спороцисты. Часто отделение эмбрионов от ГМ происходит целыми группами (Атаев и др., 2013; Атаев, Токмакова, 2015).

В зависимости от состояния НК и ГК и их соотношения в составе ГМ, последние классифицируются на три морфологических типа:

1. Молодые ГМ – содержат, в основном, НК, несколько созревающих ГК.
2. Зрелые ГМ – содержат в своём составе, помимо НК и ГК, развивающиеся эмбрионы.
3. Дегенерирующие ГМ – отличаются нарушениями в структуре: клетки в их составе лежат более рыхло, во многих наблюдаются процессы дегенерации, некоторые превращаются в пикнотические тельца. ГК наблюдаются крайне редко, эмбрионы характеризуются признаками дегенерации: многие бластомеры пикнотизируются, деление клеток прекращается, о чём свидетельствует отсутствие митотических картин (Атаев и др., 2013; Атаев, Токмакова, 2015).

Предполагается, что репродуктивная функция спороцисты переходит от одного из участков столона к другому по мере исчерпания репродуктивного потенциала первого (Атаев и др., 2013).

Во время благоприятного для жизни и размножения спороцист сезона, можно наблюдать динамику в изменениях морфологии спороцист и строения ГМ (Атаев, Токмакова, 2015).

С мая по сентябрь встречаются зрелые спороцисты, которые отличаются окрашенными, подвижными отростками, количество которых обычно составляет 2–3. Помимо зрелых окрашенных отростков наблюдается множество молодых, растущих отростков. В таких спороцистах наблюдается закладка эмбрионов в составе ГМ (Атаев и др., 2013).

Во второй половине лета на территории Ленинградской области в моллюсках *S. putris* чаще встречаются молодые спороцисты. Они обнаруживаются только при вскрытии улиток и характеризуются отсутствием зрелых отростков. Центральная часть столона небольшая, слабо разветвлённая. Зародышевая полость таких спороцист только начинает формироваться, пространство внутри столона заполнено паренхиматозным матриксом (Атаев и др., 2013).

Весной и во второй половине лета, чаще в августе, в моллюсках часто можно обнаружить дегенерирующие спороцисты (6–18%). Для них характерны зрелые отростки, желтоватая окраска центральной части столона, более плотные покровы (Атаев и др., 2013). Тегумент таких спороцист формирует складки, характерные для дегенерирующих

спороцист и других видов трематод (Ataev et al., 1997). Отростки таких партенит вяло пульсирующие, большинство эмбрионов в их полости дегенерирует. Однако в схизоцеле есть и жизнеспособные метацеркарии, что позволяет считать спороцист из группы дегенерирующих условно инвазионными (Атаев и др., 2013).

Эти наблюдения позволили авторам сделать вывод о том, что инвазия моллюсков происходит в течении лета. Моллюски уходят на зимовку с незрелыми или с молодыми спороцистами, в зависимости от времени заражения. С потеплением неокрашенные или слабоокрашенные отростки, наличием которых характеризуются такие спороцисты, достигают инвазионной зрелости, пик их активности приходится на июнь – июль. К августу – сентябрю дегенерационные процессы приводят к гибели этих спороцист (Атаев, Токмакова, 2015).

Таким образом, на территории северной Европы моллюски и птицы заражаются трематодами р. *Leucochloridium* на протяжении всего тёплого сезона. На зиму паразит депонируется как в птицах, так и в моллюсках (Атаев, Токмакова, 2015). Эти предположения подтверждаются данными Вудхеда (Woodhead, 1935), который отмечал пик инвазии молодыми спороцистами в течение лета и осени.

Окраска отростков спороцист р. *Leucochloridium*. Особое внимание исследователи уделяли окраске отростков спороцист (Гинецинская, 1953, 1968; Rojmanska, 1967; Bakke, 1980 и др.). Было показано, что она имеет таксономическое значение и может быть использована для определения спороцист разных видов р. *Leucochloridium* (Гинецинская, 1953; Жукова и др., 2012; Ataev et al., 2016).

Вудхед в своей работе (Woodhead, 1935) выделил 4 основных варианта пигментации отростков спороцист:

(1) Зелёная спороциста («the green sporocyst»). На дистальном конце на зелёном фоне расположены тёмно-красные бугорки. Затем следует поперечная и продольные полосы зелёного цвета, чередующиеся с белыми полосами или пятнами. Более зрелые отростки характеризуются тёмно-оливково-зелёным цветом. Остальные две трети отростка – жёлтого цвета с заметными светло-жёлтыми кольцами.

(2) Оранжевая спороциста («the orange sporocyst»). На дистальном конце расположены многочисленные, маленькие, красно-коричневые «бородавки». Ниже находится область тёмно-жёлтого цвета с узкими оранжевыми прожилками. Затем следует широкая красно-коричневая полоса. Остальная часть спороцисты бесцветна, за исключением примерно десяти узких продольных полос светлого коричневато-красного цвета в проксимальной части отростка.

(3) Красно-коричневая спороциста («the red-brown sporocyst»). Вершина отростка красно-коричневого цвета. Ниже расположено узкое кольцо кремово-белого цвета, за которым следует широкие полосы тёмного красно-коричневого цвета и кремово-белого цвета. Затем расположена широкая область красно-коричневого цвета с вкраплениями двух нечётких, кремово-белых колец. Ниже находится широкая область кремово-жёлтого цвета, и следующая за ним широкая полоса красно-коричневого пигмента. У основания отросток испещрён пятнами жёлто-коричневого цвета. По мнению Вудхеда, данный тип пигментации отростка является наиболее часто встречающимся в окрестностях озера Эри.

(4) Коричневая спороциста («the brown sporocyst»). В первой трети отростка выделяется только одна ярко окрашенная кольцевая полоска коричневого цвета.

Т. А. Гинецинская (Гинецинская 1953, 1954) по окраске отростков разделила спороцист р. *Leucochloridium* на 6 типов:

(1) Зелёная спороциста. Окраска отростков совпадает с описанием, выполненным Карусом (Carus, 1835) для *L. paradoxum*.

(2) Оранжевая спороциста. Описание соответствует оранжевой спороцисте Вудхеда (см. выше).

(3) Жёлто-коричневая спороциста. Дистальная часть отростков коричневая, далее чередуются полосы белого, охристого и шоколадно-коричневого цвета. Пигментированная часть покровов несёт несколько рядов белых пятен.

(4) Буро-зелёная спороциста. Вершина отростков окрашена в бурый цвет, ниже переходящий в зелёный. Далее следуют жёлто-белое и бурое кольца. Пигментированная часть покровов покрыта рядами белых пятен.

(5) Бородавчатая спороциста (*L. vogtianum*). Верхняя треть зрелых отростков спороцисты кофейного цвета с коричневыми и белыми пятнами. Непигментированная часть несёт продольные ряды бородавчатых выростов, которые у своей вершины приобретают коричневую окраску.

(6) Буря спороциста (*L. problematicum*). В окраске преобладают желтовато-бурые тона. На верхушке отростка – красно-коричневая шапочка, ниже неё – ряд колец, чередующихся с непигментированными участками. Окраска колец от вершины к основанию отростка переходит от красно-бурого к бурому и жёлтому.

В работах Л. В. Начевой с соавторами (Начева и др., 1981) упоминается о спороцистах только трёх видов (1) зелёная спороциста *L. paradoxum*; (2) буря спороциста *L. problematicum*; (3) буро-зелёная спороциста (вид не указан). Их описания не приводятся.

Природа пигмента зрелых отростков спороцист р. *Leucochloridium*. Несмотря на интерес исследователей к окраске отростков спороцист, природа пигмента до настоящего

времени неясна. Одна из попыток исследования была предпринята с использованием в качестве модели *L. paradoxum* (Bakke, 1982; Zdarska et al., 1982; Ataev et al., 2013). Было выявлено, в тегументе спороцисты *L. paradoxum* расположены гранулы жёлто-коричневого пигмента, а также секреторные клетки. Сторч и Уэлш (Storch, Welsch, 1970) предположили, что перемещение пигментных гранул во внешний слой цитоплазмы пигментных клеток осуществляется за счёт микротрубочек. Бакке, однако, не смог обнаружить специализированных структур цитоскелета в пигментных клетках (Bakke, 1982). Авторы статьи (Ataev et al., 2013) проследили закономерности перехода пигментных гранул во внешний слой тегумента. Гранулы обеспечивают жёлтую окраску отростков, а также коричневый цвет выпуклых пятен на кончике отростка. Было показано, что окраска не обусловлена белками, нуклеотидами, липидами и углеводами. Положительный результат получен при окрашивании на желчные пигменты. Однако вопрос о природе зелёного пигмента остается открытым. Известно, что этот цвет в окраске зелёных полос обеспечивают крупные глыбки, расположенные в тегументе. Однако источник этого пигмента, а также его химическая природа не ясны (Ataev et al., 2013). Существует предположение, что глыбки формируются в результате слияния жёлто-коричневых гранул (Начева и др., 1981; Ataev et al., 2013), о чём косвенно свидетельствует то, что глыбки зелёного цвета вдвое больше гранул, а также относительная нестабильность зелёного пигмента (Ataev et al., 2013).

Существуют разные гипотезы касательно возникновения пигментных гранул. Начева с соавторами (Начева и др., 1983) предположили, что распределение гранул вызвано взаимной адаптацией паразита и хозяина. Спороциста получает питательные вещества из пищеварительной железы моллюска и влияет на питание последнего. Напротив, ткани гепатопанкреаса моллюска частично адаптируются к присутствию паразита и потребляют пищу из стенки тела спороцисты. Последний процесс, по мнению авторов, объясняет накопление различных типов пигментных гранул в пищеварительных железах одного вида моллюсков в зависимости от паразитирующих в нём спороцист р. *Leucochloridium* (Начева и др., 1983). Однако исследователи не приводят эмпирических данных, подтверждающих эту гипотезу.

Существует другое мнение (Monnig, 1922; Wesenberg-Lund, 1931; Pojmanska, 1967; Bakke, 1982), согласно которому пигментация отростков р. *Leucochloridium* проявляется только под действием дневного света, после того как они попадают в прозрачные глазные щупальца моллюсков. То есть образование пигментов связано с действием солнечного света. Однако это предположение не подтвердили результаты наблюдений других авторов

(Ataev et al., 2013). Предполагается также, что пигментные клетки играют важную роль в физиологических реакциях спороцист, например, в пульсации отростков (Lewis, 1977).

Движение зрелых отростков спороцист р. *Leucochloridium*. Отростки спороцист характеризуются специфической окраской, а также способны к движению, что было подробно исследовано Халиком в 1931 г. (Halik, 1931). Исследователь выделил три типа движения отростков: перистальтические, маятниковые и ритмичные. Движения первого типа направлены на перемещение отростков в теле улитки. Маятниковые движения используются для поиска оптимального положения, проникновения в полость глазного щупальца. Ритмичные движения имитируют движения личинок насекомых, тем самым привлекая птиц. Движения последнего типа начинаются ещё до проникновения отростка в полость щупальца, однако они заметно учащаются после этого. Все типы движения реализуются только при дневном свете. В его отсутствии отростки не выходят в щупальца улиток. Основным стимулирующим фактором является свет яркостью 11,9 люкс, причём реакция отростков наблюдается только на свет синего и фиолетового спектра. Свет других длин волн воспринимается как отсутствие освещённости. Из этого автор сделал вывод о том, что чувствительность спороцист основана на фотохимических процессах, так как специализированные фоторецепторные органы отсутствуют (Halik, 1931).

I. 3. Промежуточные хозяева трематод рода *Leucochloridium*

Основными промежуточными хозяевами трематод р. *Leucochloridium* являются моллюски сем. Succineidae (Pulmonata) (табл. 1). Случаи паразитирования трематод этого рода в других промежуточных хозяевах отмечаются редко. Так Мэгат отмечает, что в роли промежуточного хозяина могут выступать катушки, *Planorbis trivolis* (Planorbidae). Удивительно то, что процент заражённых особей этого вида почти вдвое превышал экстенсивность инвазии моллюсков *S. retusa*, собранных в той же местности (Magath, 1920). Каган предполагает, что спороцисты, о которых идёт речь, были неверно идентифицированы Мэгатом и относятся к сем. Vucsephalidae (Kagan, 1952a).

Таблица 1. Промежуточные хозяева трематод р. *Leucochloridium*.

Вид трематод р. <i>Leucochloridium</i>	Промежуточный хозяин	Ссылки
<i>L. perturbatum</i>	<i>Succinea lauta</i> , <i>S. putris</i> , <i>S. pfeifferi</i> , <i>S. altaica</i> , <i>S. sarsi</i>	Соболева, Осиповская, 1979; Casey et al., 2003; Ataev et al., 2016; Nakao et al., 2019

<i>L. paradoxum</i>	<i>S. lauta, S. putris, S. altaica</i>	Соболева, Осиповская, 1979; Bakke, 1980; Casey et al., 2003; Ataev et al., 2016; Nakao et al., 2019
<i>L. passeri</i>	<i>S. lyrata</i>	Nakao et al., 2019
<i>L. vogtianum</i>	<i>S. putris, S. sarsi</i>	Соболева, Осиповская, 1979; Ataev et al., 2016
<i>L. problematicum</i>	<i>S. retusa, Planorbis trivolis</i>	Magath, 1920
<i>L. holostomum</i>	<i>S. elegans, S. sarsi</i>	Соболева, Осиповская, 1979
<i>L. variae</i>	<i>S. ovalis</i>	Lewis, 1974; Bakke, 1982
<i>Leucochloridium</i> sp.	<i>S. retusa</i>	Woodhead, 1935
<i>Leucochloridium</i> sp.	<i>S. elegans</i>	Гинецинская, 1953
<i>Leucochloridium</i> sp.	<i>S. pfeifferi</i>	Bakke, 1978
<i>Leucochloridium</i> sp.	<i>Oxyloma hirasei</i>	Nakao et al., 2019

В Европейской части Евразии в качестве промежуточного хозяина трематод исследователи обычно отмечают янтарку – *S. putris*. *S. putris* – широко распространенный вид моллюсков, ареал которого включает европейскую (исключая северные окраины и Средиземноморье) и сибирскую (до Забайкалья) территории (Gusarov, 1999; Kuznik-Kowalska, 2013). Улитки этого вида населяют влажные местообитания, предпочитая околководную растительность, заливные высокотравные луга, где их можно обнаружить на растениях из сем. Urticaceae (Крапивовые), Typhaceae (Рогозовые), Apiaceae (Зонтичные) и др. (Gusarov, 1999). Обычно *S. putris* избегают избыточной влажности, то есть не встречается на мокрой земле у уреза воды (Шилейко, Лихарев, 1986). По некоторым данным, эти улитки питаются зелёными частями растений, хотя для большинства моллюсков из сем. Succineidae характерно питание мелкими споровыми организмами (грибами, нитчатými водорослями и диатомеями) (Barker, 2001).

Янтарки отличаются высоким уровнем внутривидового полиморфизма по признакам раковины (Quick, 1933; Patterson, 1971). В связи с этим систематический статус вида на протяжении нескольких веков оставался дискуссионным. По данным некоторых исследователей, *S. putris* следует считать не единым видом, а надвидовым комплексом (Hoagland, Davis, 1987; Круглов, Стыгар, 2003).

Продолжительность жизни моллюсков *S. putris*, по данным разных авторов, варьирует от 15–20 (Rigby, 1964; Datkauskienė, 2005) до 25 месяцев в условиях умеренных широт (Zemoglyadchuk, 2015). Размножение янтарок происходит с марта по октябрь, однако

наибольшее количество спаривающихся пар наблюдается в конце марта – начале апреля и в конце августа – сентябре, что позволяет говорить о двух пиках размножения. Во многом время размножения зависит от температуры воздуха: при слишком низких апрельских температурах пик размножения может сместиться на май. Развитие молоди из кладок продолжается от 10 до 30 дней в лабораторных условиях и сильно зависит от температуры, а также от того, об улитках какого лабораторного поколения идёт речь (F_1 развиваются быстрее F_2) (Datkauskienė, 2005).

Вышесказанное обуславливает картину распределения моллюсков разных размерных классов в популяции, обитающей в средних широтах. Весной (апрель – май) в популяции встречаются моллюски двух размерных классов: с высотой раковины 6–14 мм и 18 мм. Моллюски высотой раковины около 14 мм гибнут к концу лета, а моллюски из второго класса массово – в первой половине лета. В августе в популяции максимальное число особей приходится на моллюсков размером раковины 2 мм и 10–12 мм (Zemoglyadchuk, 2015). Существование подобных же размерных классов улиток в популяции отмечали и другие исследователи. Так, согласно наблюдениям Везенберг-Лунда во второй половине августа в популяции *S. putris* наблюдается наличие моллюсков трёх классов: мелких, средних и очень крупных. После зимовки остаются улитки только двух последних классов. Первый класс включает молодь этого года, улиткам среднего размера – 1 год, самые крупные особи – возрастом 2 или даже 3 года (Wesenberg-Lund, 1931).

Исходя из этих данных, сезонная динамика популяции моллюсков представляется следующим образом: весной популяцию моллюсков составляют молодые особи, вышедшие из кладок во второй половине прошлого лета, а также моллюски, которые уже пережили зиму (или две). Весной моллюски второй группы приступают к размножению, к середине – концу лета большинство из них погибает. Молодь, которая появляется из кладок, не достигает половой зрелости в этом сезоне и уходит на зимовку.

Моллюски из первой группы, которые пережили только одну зиму, к концу лета достигают половой зрелости и приступают к размножению. Появившиеся из кладок улитки уходят на зимовку и приступят к размножению только в конце следующего сезона (Zemoglyadchuk, 2015).

Взаимоотношения трематод р. Leucochloridium с промежуточными хозяевами.

Паразито-хозяинные отношения моллюсков сем. Succineidae и паразитов р. *Leucochloridium* практически не изучены. В исследованиях конца XIX века встречаются данные о том, что спороциста в улитке покрыта волокнистым слоем соединительной ткани, который, состоит из оболочек оттеснённых паразитом органов. Слой увеличивается, растёт по мере роста паразита (Heckert, 1889). Помимо этого, Гекерт подчёркивает, что для спороцист в янтарках

не характерна мантия из гемоцитов, которая была описана вокруг партенит в прудовиках (Heckert, 1889).

Эти данные были опровергнуты в исследованиях с использованием сканирующей электронной микроскопии (Ataev et al., 2013). На поверхности спороцисты была обнаружена мантия, которая покрывает как центральную часть столона, так и отростки спороцисты (рис. 2 А). На поверхности центральной части гемоциты формируют свободную сеть с большими промежутками между клетками, ядра клеток гемолимфы хорошо различимы (рис. 2 Б). На поверхности отростков гемоциты формируют тонкий сплошной слой, при этом их ядра не видны, однако выявляются на гистологических срезах (Ataev et al., 2013) и при окрашивании флюоресцентным красителем (рис. 3, 4) (Токмакова, 2018).

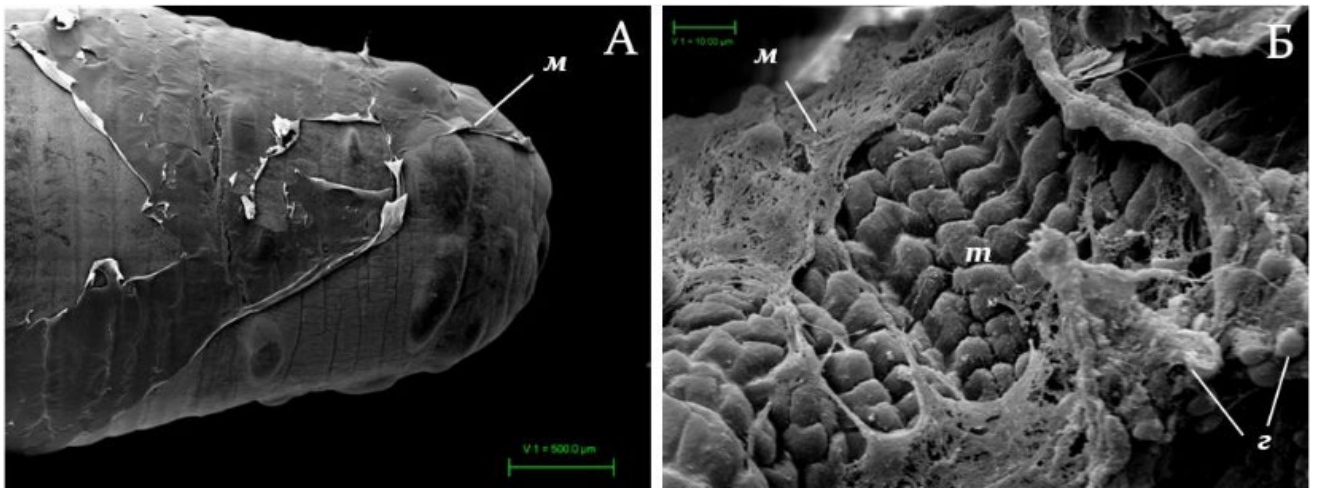


Рисунок 2. Микрофотографии спороцисты *Leucochloridium paradoxum* со сканирующего электронного микроскопа (А–Б). А — зрелый отросток. Б — стolon спороцисты. Условные обозначения: г — гемоцит, м — мантия, т — тегумент (Токмакова, 2018).

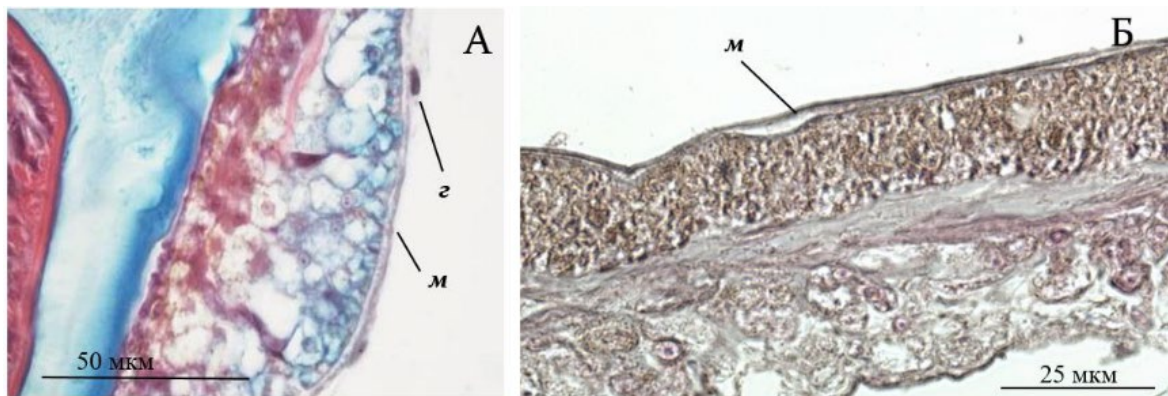


Рисунок 3. Гистологические срезы через отросток спороцисты *Leucochloridium paradoxum*. А — окрашивание альтиановым синим. Б — окрашивание гематоксилином Эрлиха). Условные обозначения: г — гемоцит, м — мантия (Токмакова, 2018).

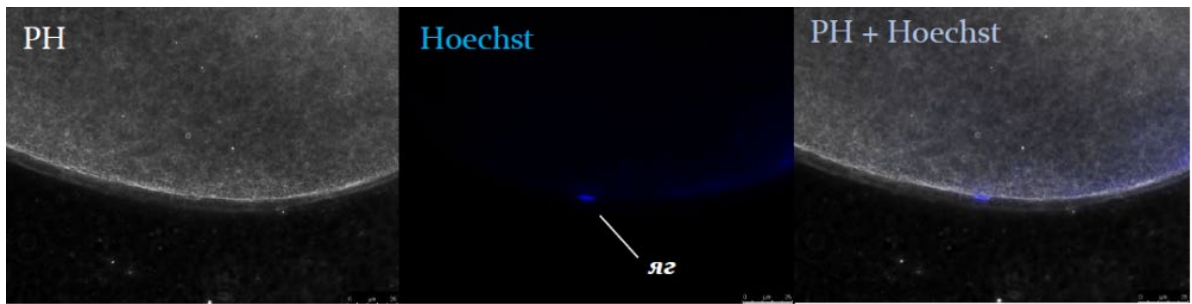


Рисунок 4. Мантия на поверхности отростка спороцисты *Leucochloridium paradoxum*. PH – снимок в режиме фазового контраста. Hoechst – снимок в режиме флуоресценции, окраска Hoechst. PH+Hoechst – снимок в комбинированном режиме. Условные обозначения: яг – ядро гемоцита (Токмакова, 2018).

Также у моллюсков *S. putris*, заражённых *L. paradoxum*, наблюдается увеличение количества клеток, входящих в состав амёбоцито-продуцирующего органа (Токмакова, 2018). Этот орган является гемопоэтической структурой пульмонат (Pan, 1958), которая активируется в том числе в ответ на трематодную инвазию (Токмакова, 2018).

Начева с соавторами приводят данные о том, что паразитирование спороцист р. *Leucochloridium* между ацинусами пищеварительной железы хозяина приводит к изменению структуры и нарушению секреторного цикла ацинозных клеток. Кроме того, через стенку гепатопанкреаса к спороцисте поступают питательные вещества, что нарушает питание пищеварительной железы (Начева и др., 1983). Дегенеративные процессы возникают и в других тканях моллюсков за счёт механического давления спороцисты, растущей в теле хозяина: в половой железе, кровеносных сосудах, перикарде, что связывают с блокировкой кровоснабжения указанных органов, а также с токсикогенным воздействием паразитов (Сумбаев, 2011).

У исследователей возникают противоречия касательно репродукции заражённых моллюсков. По данным одних авторов (Burky, Hornbach, 1979), инфицированные улитки характеризуются сниженным репродуктивным потенциалом. По данным Везенберг-Лунда, заражённые улитки не оставляют потомство (Wesenberg-Lund, 1931). Для них характерно уменьшение размера белковой железы или её полное исчезновение, сильное истощение гермафродитного протока. То же самое касается и других протоков половой системы. Собственно гермафродитная железа может сохраняться, однако в ней наблюдается формирование только сперматозоидов. Однако и эта стадия не длится долго, в итоге происходит паразитарная кастрация (Wesenberg-Lund, 1931). Но Каган описал копуляцию и откладывание яиц заражёнными моллюсками (Kagan, 1952a).

Иных данных относительно клеточных взаимодействий моллюска и спороцисты в литературе нет. Однако в XX веке проводились исследования, направленные на изучение

биохимического взаимодействия организмов в этой системе. Было выявлено, что в гепатопанкреасе заражённых моллюсков происходит перераспределение суммарного белка и уменьшение содержания мукопротеинов, тогда как в стенке спороцисты и в церкариумах запасы белков и углеводов достаточно велики (Начева и др., 1983).

Также показано, что у заражённых улиток количество тканей значимо меньше по индексу сухой массы, чем у незаражённых с тем же размером раковины. При этом процентное содержание белков, жиров, углеводов значимо не отличается у заражённых и незаражённых улиток (Burky, Hornbach, 1979).

I. 4. Систематика трематод рода *Leucochloridium*

Вопросы видового состава р. *Leucochloridium* и его систематического положения остаются дискуссионными на протяжении полутора столетий. Это, в свою очередь, привело к тому, что в литературе существует множество синонимичных видов, с одной стороны, и разных видов, описанных под одним названием, с другой.

Первый наиболее полный обзор видовой разнообразия р. *Leucochloridium* был выполнен в 1932 г. Макинтошем (McIntosh, 1932). В нём автор дал описание семи видам, которые были обнаружены в пищеварительной системе птиц из окрестностей биологической станции Мичиганского университета. Макинтош также привёл описания ряда других видов с территории Америки. В определительном ключе статьи содержатся сведения о 19 таксонах. Автор отметил, что при описании наибольшее внимание было уделено протяжённости желточников и расположению половых желёз. Однако уже в этой работе было уделено внимание высокой внутривидовой изменчивости по данным признакам (McIntosh, 1932).

Позднее, в 1952 г. ревизию подсем. Leucochloridiinae Poche, 1907 провёл Каган (Kagan, 1952b). В Leucochloridiinae, помимо р. *Leucochloridium*, автор включил р. *Neoleucochloridium*, р. *Urogonimus* и р. *Urotocus*. В составе р. *Leucochloridium* исследователь выделил следующие 10 видов: *L. paradoxum* (синоним *Distomum macrostomum* Zeller, 1874), *Leucochloridium heckerti* (синонимы *Distomum macrostomum* Heckert, 1889, Szidat, 1936, *Leucochloridium insigne* Witenberg, 1925, Szidat, 1936), *Leucochloridium sp.* Hohorst, 1937, *L. cyanocittae* (синоним *L. actitis* McIntosh, 1932), *L. variaae* (синоним *L. pricei*, McIntosh, 1932). *L. melospizae*, *L. musculare*, *L. passeri*, *L. sime*, *L. australiense*.

Наиболее поздний обзор рода был сделан Бэйком (Bakke, 1980). Важность данной работы заключается в том, что в ней были высказаны общие принципы, на основании которых следует проводить видовую идентификацию представителей р. *Leucochloridium*. Ранее Бэйк высказывал предположение о том, что разные стадии жизненного цикла представителей р. *Leucochloridium* приписывались разным видам, что привело к

многочисленным ошибкам (Bakke, 1978). Бэйк предложил строить систематику рода преимущественно на спороцистах, опираясь на их различия. По материалу из Норвегии и Швеции исследователь подробно описал вид *L. paradoxum* на разных стадия жизненного цикла. По мнению Бэйка, в состав рода входят следующие виды: *L. paradoxum*, *L. variae* (*L. perturbatum* как европейская форма данного вида), *L. cyanocittae*, *L. australiense*, *L. passeri* и ещё 3 неопределённых вида (Bakke, 1978).

Отечественные исследователи также проводили исследования видового разнообразия р. *Leucochloridium*. Во втором томе монографии «Трематоды животных и человека» Скрябина приводятся описания 25-ти видов р. *Leucochloridium*. Однако, в своём обзоре Константин Иванович отмечает, что, скорее всего, при тщательной ревизии часть видов будет синонимизирована (Скрябин, 1948).

Эту работу в 1951 г. провела Быховская-Павловская (Быховская-Павловская, 1951). Ею в составе рода было описано 10 видов. Ирина Евгеньевна также определила критерии, которые непригодны в качестве видовых и систематических в виду их высокой вариабельности: размеры тела, положение ротовой присоски, относительные размеры глотки, толщина ветвей кишечника, передняя граница протяжения желточников, форма и размеры (как абсолютные, так и относительные) половых желёз, степень их сближенности или удалённости друг от друга. Основными признаками, использованными для систематических построений, были задняя граница протяжения желточников, положение матки относительно межкишечного пространства, относительное расположение половых желёз.

Хочется отметить, что практически во всех данных работах ревизия проводилась только по отдельным стадиям жизненного цикла. На большем протяжении прошлого века полноценное описание вида со всеми стадиями развития, было возможно только при постановке жизненного цикла. Сейчас для сопоставления данных по разным стадиям возможно использование методов молекулярной генетики. С их помощью на территории Палеарктики на сегодняшний день доказано существование пяти видов: *L. paradoxum*, *L. perturbatum*, *L. holostomum*, *L. subtilis*, *L. vogtianum* (Heneberg, 2016).

Исследователями из Японии (Nakao et al., 2019) были получены данные о виде *L. passeri* (предположительно) с территории острова Окинава. Также в 2021 г. в базе данных GenBank появились последовательности ещё одного неопределённого вида с территории острова Хонсю (Япония) (Sasaki et al., 2022). Помимо Японских островов, трематоды р. *Leucochloridium* встречаются и на территории острова Тайвань – *L. hypotaenidiarum* (Tubanguí, 1932).

Выше были приведены данные о видовом разнообразии, в основном, Европы и Северной Америки. Однако, согласно данным исследователей, р. *Leucochloridium* характеризуется всеветным распространением. Так с территории Южной Америки были описаны виды *L. flavum* и *L. parvum* (Travassos, 1928). На территории Индии отмечены следующие виды: *L. indicum* (Singh, 1962), *L. gallinuli* (Kharoo, Dhar, 1981), *L. mehrii*, *L. sime* (Kharoo, 2011).

Относительно мало данных касательно видов р. *Leucochloridium*, которых можно встретить в Австралии. На этом континенте был отмечен только один вид – *L. australiense* (Johnston, Cleland, 1938). Однако в своей работе Каган (Kagan, 1952b) замечает, что с большой вероятностью это не единственный обитающий на этом континенте вид.

Таким образом, данные по видовому составу рода до сих пор остаются разрозненными и требуют систематизации.

I. 5. Молекулярно-генетические исследования трематод рода *Leucochloridium*

Первая последовательность 18S рДНК одного из видов трематод р. *Leucochloridium* – *L. perturbatum* была опубликована в 2003 г. в базе данных GenBank (Olson, 2003). Однако исследование Олсон (Olson, 2003) включало большой круг трематод из различных семейств и было нацелено на изучение систематики класса в целом.

Представители р. *Leucochloridium* – *L. perturbatum* и *L. paradoxum* стали объектами в исследовании Кейси с соавторами (Casey et al., 2003). В нём была обоснована валидность признака окраски зрелых отростков спороцист как видоспецифического с использованием генетических маркеров (фрагментов рибосомных генов 5,8S, 28S и внутренних транскрибируемых спейсеров, ITS1 и ITS2).

Анализ последовательностей внутренних транскрибируемых спейсеров позволяет различать и марит трематод р. *Leucochloridium*. Их определение с использованием морфологических признаков затруднено в виду широкого диапазона изменчивости формы тела, соотношения размеров присосок, а также тем, что органы, используемые для видовой диагностики, у половозрелой мариты практически полностью перекрываются петлями матки, заполненной тёмными яйцами (Rzad et al., 2023). Процент дивергенции последовательностей *L. perturbatum* и *L. paradoxum* составляет 8,2% и 5,1% для ITS1 и ITS2 соответственно (Casey et al., 2003).

В работах Жуковой с соавторами были получены последовательности протяжённых фрагментов ДНК длиной 4444 п. н., включающие участки 18S, 5,8S, 28S рДНК, ITS1, ITS2, а также внешнего транскрибируемого спейсера ETS1 видов *L. perturbatum* и *L. paradoxum* (Жукова и др., 2012; Zhukova et al., 2014). В дальнейшем были получены данные о нуклеотидной последовательности этого же участка рДНК спороцист вида *L. vogtianum*

(Ataev et al., 2016). В данных работах была показана не только степень межвидовой дивергенции, но и внутривидовая изменчивость по изученным маркерам. Было выявлено, что в пределах одного вида особи полностью гомологичны по участку рДНК. Данные маркеры (18S, 5,8S, 28S рДНК, ITS1, ITS2, ETS1), таким образом, позволяют различать виды в пределах р. *Leucochloridium*, однако не подходят для изучения внутривидового полиморфизма, популяционной структуры вида ввиду своей высокой консервативности, которая была показана и для других родов трематод (см. Tatonova et al., 2012).

Для этих целей используются гены митохондриальной ДНК, обладающие более высокой разрешающей способностью. Часто в роли маркера используется ген цитохром-с оксидазы (*cox1*) (Tatonova et al., 2013). Именно его фрагмент был использован в исследованиях трематод р. *Leucochloridium* с территории Японии и Чехии. Было показано, что средняя внутривидовая генетическая дистанция, посчитанная на основе выравнивания нуклеотидной последовательности фрагмента гена *cox1*, между спороцистами *L. paradoxum* с территории острова Хоккайдо составляет 0,0030 при нуклеотидном разнообразии 0,0015 (Nakao et al., 2019). Для трематод из Чехии внутривидовые дистанции составили: *L. paradoxum* – 0,001±0,001 (по участку ITS2), 0,005±0,003 (по гену *cox1*), 0,007±0,003 (по гену первой субъединицы NADH дегидрогеназы, *ndl*); *L. perturbatum* – 0,001±0,001 (по участку ITS2), 0,010±0,006 (по гену *cox1*); *L. vogtianum* – 0,004±0,003 (по гену *cox1*), 0,004±0,002 (по гену *ndl*) (Heneberg et al., 2016).

Митохондриальный ген *cox1* в современных исследованиях используется не только для изучения внутривидового полиморфизма, но и в качестве маркера для видовой идентификации (Усманова, Прохорова, 2022; Rząd et al., 2023).

ГЛАВА II. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

II. 1. Изучение промежуточных хозяев трематод *L. paradoxum*

Точки сбора. Моллюски р. *Succinea* были собраны в 2008–2022 гг. в географических точках, перечисленных в таблице 2.

Таблица 2. Точки сбора моллюсков р. *Succinea*.

Страна	Географическая точка	Координаты	Обозначение	Кем собран материал
Россия	Ленинградская область	59°24'42.3"N 30°19'08.1"E	Rus_L	Токмакова С. Ю., Токмакова А. С., Усманова Р. Р.
	Кировская область	58°47'13.7"N 52°14'38.0"E	Rus_K	Калинин Р. С.
	Московская область	55°33'52.4"N 37°54'45.6"E	Rus_M	Калинин Р. С.
	Калининградская область	55°08'48.9"N 20°49'41.3"E	Rus_Kd	Жукова А. А.
Белоруссия	Витебская область	54°43'38.1"N 29°42'31.0"E	Bel_V	Войтюк А. М.
	Гомельская область	53°29'32.9"N 30°17'00.8"E	Bel_G	Атаев Г. Л.

Морфологический анализ. Размеры раковин моллюсков измеряли при помощи штангенциркуля. При сравнении пропорций раковин улиток из разных популяций были использованы индекс раковины и индекс устья, представляющие собой отношения ширины к высоте раковины и ширины к высоте устья соответственно. Сравнение проводили при помощи критерия Краскела-Уоллиса с последующим парным сравнением групп post hoc тестом Данна с применением поправки Бонферрони при оценке значения p ($\leq 0,05$) при помощи компьютерной программы Past v. 3.26.

В целях изучения внутренней морфологии проводили анатомирование улиток с использованием стереомикроскопов Leica M165C, Leica M125 и Leica EZ4.

Сканирующая электронная микроскопия. Для изучения скульптуры раковины, а также строения радулы и челюсти улиток образцы фиксировали в 70% этаноле, затем обезвоживали в спиртах возрастающей концентрации. После этого препараты напыляли золотом (напылитель Quorum Technologies SC7620). Исследование проводили на растровом электронном микроскопе (Carl Zeiss EVO-40).

II. 2. Изучение трематод *L. paradoxum* из природнозаражённых моллюсков

Сборы моллюсков, природнозаражённых трематодами *L. paradoxum* проводились с 2008 г. по 2022 г. (табл. 3). Всего было исследовано 1386 янтарок. 626 моллюсков были заражены спороцистами *L. paradoxum* или спороцистами р. *Leucochloridium* без окрашенных отростков. Моллюсков анатомировали с использованием стереомикроскопов Leica M165C, Leica M125 и Leica EZ4. Партенит после извлечения из тканей моллюска фиксировали в смеси Буэна для последующих гистологических исследований или помещали на хранение при температуре -80°C (морозильная камера Sanyo MDF-U3286).

Оценку экстенсивности инвазии проводили по формуле: экстенсивность инвазии = $3M/n \times 100\%$, где $3M$ – количество заражённых моллюсков, n – общее число исследованных моллюсков. Важно отметить, что для оценки использовались только спороцисты из моллюсков бокситогорской популяции, собранные в 2018–2022 гг. Поскольку различить спороцисты *L. paradoxum* и *L. perturbatum* на ювенильной стадии развития по морфологическим признакам не представлялось возможным, для подсчёта экстенсивности инвазии данные по этим двум видам суммировали. В 2018–2022 гг. в улитках бокситогорской популяции было обнаружено 6 спороцист *L. perturbatum*.

Для сравнения экстенсивности инвазии и распределения спороцист на разных стадиях развития в зависимости от месяца сбора, а также сравнения распределения спороцист с разным количеством отростков в зависимости от месяца сбора использовали критерий критерий χ^2 . Все статистические тесты рассчитывали для уровня значимости $p \leq 0,05$.

Таблица 3. Сборы моллюсков *Succinea putris* из разных географических точек на предмет заражённости трематодами р. *Leucochloridium*.

Год сбора	Кем предоставлен материал	Месяц сбора	Количество исследованных моллюсков	Количество моллюсков, зараженных трематодами <i>L. paradoxum</i>	Количество моллюсков, заражённых трематодами р. <i>Leucochloridium</i> без окрашенных отростков	Точка сбора	Координаты (указаны единой для каждой точки сбора)
2008	Токмакова С. Ю., Токмакова А. С.	июнь – сентябрь	61	61		Ленинградская область, Вырица	59°24'42.3"N 30°19'08.1"E
2009	Токмакова С. Ю., Токмакова А. С.	май – август	20	20		Ленинградская область, Вырица	
						Ленинградская область, Любань	59°20'49.8"N 31°13'53.2"E
2010	Токмакова С. Ю., Токмакова А. С.	май – август	14	14		Ленинградская область, Вырица Санкт-Петербург, Петергоф	59°53'35.2"N 29°50'17.5"E
2011	Токмакова С. Ю., Токмакова А. С., Атаев Г. Л.	май – июнь, ноябрь	31	31		Ленинградская область: Вырица, Любань	
						Санкт-Петербург, Пушкин	59°41'18.7"N 30°27'25.9"E
						Ленинградская область, Осельки	60°11'28.1"N 30°29'16.2"E
2012	Токмакова С. Ю., Токмакова А. С.,	апрель, июнь – август	46	46	1	Ленинградская область: Вырица, Любань	
						Санкт-Петербург, Зеленогорск	60°11'20.4"N 29°41'52.2"E
2013	Токмакова С. Ю., Токмакова А. С.	апрель – август	38	38	1	Ленинградская область: Вырица, Любань; Санкт-Петербург, Петергоф	
2014	Токмакова А. С., Усманова Р. Р., Усманов Р. Р., Жукова А. А., Исакова Н. П.	июнь – август	59	59		Ленинградская область: Вырица, Любань	
						Ленинградская область: Луга	58°44'43.6"N 29°52'13.8"E

						Ленинградская область: Бокситогорск	59°28'27.2"N 33°47'58.9"E
						Ленинградская область: Трубников Бор	59°16'01.9"N 31°24'11.5"E
2015	Токмакова А. С., Усманова Р. Р.	май, июль – сентябрь	55	55	1	Ленинградская область: Вырица, Бокситогорск; Санкт-Петербург: Петергоф	
2016	Токмакова А. С., Усманова Р. Р., Войтюк А. М.	июнь – июль	40	40	3	Ленинградская область: Вырица, Бокситогорск	
						Ленинградская область: Ропша	59°43'41.4"N 29°52'04.9"E
2017	Токмакова А. С., Усманова Р. Р., Жохов А. Е.	июнь – сентябрь	51	51		Ленинградская область: Вырица, Бокситогорск, Любань	
						Ярославская область: Борок	58°03'50.9"N 38°14'59.3"E
2018	Токмакова А. С., Усманова Р. Р., Войтюк А. М.	май – сентябрь	45	45	2	Ленинградская область: Вырица, Любань, Бокситогорск	
						Витебская область Белоруссии: Буй	54°43'38.1"N 29°42'31.0"E
	Усманова Р. Р.	июнь	80	3	5	Ленинградская область: Бокситогорск	
	Войтюк А. М. Усманова Р. Р.	июль	46	5		Ленинградская область: Бокситогорск	
						Витебская область Белоруссии: Буй	
2019	Токмакова А. С., Усманова Р. Р., Войтюк А. М., Атаев Г. Л., Жукова А. А., Жудрявцева П. С.	май – сентябрь	49	48	1	Ленинградская область: Вырица, Любань, Бокситогорск	
						Ленинградская область: Хиттолово,	60°13'55.4"N 30°31'28.3"E
						Ленинградская область: Железо	58°55'54.9"N 29°48'25.2"E
						Ленинградская область: Лисий нос	60°00'10.3"N 30°00'44.7"E
						Ленинградская область: Кузьмолово	60°08'09.5"N 30°28'40.1"E
						Витебская область Белоруссии: Буй	
Гомельская область Белоруссии	53°29'32.9"N 30°17'00.8"E						
2020	Токмакова А. С., Усманова Р. Р.	май – июль	15	10	5	Ленинградская область: Вырица, Бокситогорск	
	Усманова Р. Р.	май	42	4	1	Ленинградская область: Бокситогорск	
	Усманова Р. Р.	июнь	132	4	8	Ленинградская область: Бокситогорск	
	Усманова Р. Р.	июль	21			Ленинградская область: Вырица	
2021	Токмакова А. С., Усманова Р. Р., Войтюк А. М., Богачёва Т. А., Лопатина О. А.	май – сентябрь	18	12	6	Ленинградская область: Вырица, Бокситогорск, Лисий нос, Любань; Витебская область Белоруссии: Буй	
	Усманова Р. Р., Усманов Р. Р., Усманова Н. А.	май	68	2	3	Ленинградская область: Бокситогорск	
	Войтюк А. М.	май	14	1		Витебская область Белоруссии: Буй	
	Усманова Р. Р.	май	77	1		Ленинградская область: Вырица	

	Усманова Р. Р.	июнь	14		1	Ленинградская область: Бокситогорск	
	Усманова Р. Р.	июль	24	1		Ленинградская область: Вырица	
	Усманова Р. Р.	июль	65	1	5	Ленинградская область: Бокситогорск	
	Войтюк А. М.	август	26			Витебская область Белоруссии: Буй	
	Усманова Р. Р.	август	22	1	1	Ленинградская область: Лисий Нос	
	Усманова Р. Р.	август	44			Ленинградская область: Вырица	
	Усманова Р. Р.	сентябрь	37			Ленинградская область: Бокситогорск	
2022	Токмакова А. С., Усманова Р. Р., Войтюк А. М., Атаев Г. Л., Крылова Н. А.	май – август	20	14	6	Ленинградская область: Вырица, Бокситогорск, Трубников Бор, Кузьмолowo Санкт-Петербург	60°00'20.7"N 30°18'51.6"E
	Усманова Р. Р., Усманов Р. Р.	май	62		2	Ленинградская область: Бокситогорск	
	Усманова Р. Р.	июнь	43	4		Ленинградская область: Вырица	
	Усманова Р. Р.	август	7	1		Ленинградская область: Бокситогорск	

II. 3. Изучение трематод *L. paradoxum* из экспериментально заражённых моллюсков

Постановка жизненного цикла трематод *L. paradoxum* в лабораторных условиях. Эксперименты по постановке жизненного цикла проводились в 2021 г. и в 2022 г. и состояли из трёх этапов:

1. Выведение стерильных цыплят *Gallus gallus domesticus* и их заражение метацеркариями *L. paradoxum*. Использовали цыплят пород кучинская юбилейная, доминант, ломан браун (рис. 5). Инкубацию оплоднх яиц проводили на протяжении 21 дня в инкубаторе «Несушка-36» согласно инструкции производителя.



Рисунок 5. Маркировка цыплят *Gallus gallus domesticus*, использованных в роли окончательных хозяев *Leucochloridium paradoxum* в рамках эксперимента.

Для заражения цыплят предварительно собирали заражённых спороцистами *L. paradoxum* моллюсков *S. putris* в указанных ранее географических точках (табл. 3). Для эксперимента выбирали зрелые яркоокрашенные отростки спороцист. Часть тканей спороцист, использованных для заражения, замораживали при температуре -80°C для последующих молекулярно-биологических исследований.

Отростки анатомировали в растворе Рингера, извлекая необходимое количество метацеркарий. При выборе последних ориентировались на состояние оболочки: согласно литературным данным (Lewis, 1977; Соболева, Осиповская, 1979), прозрачная циста характерна для зрелых особей. Доза заражения составила 40–50 метацеркарий на цыплёнка (рис. 6).

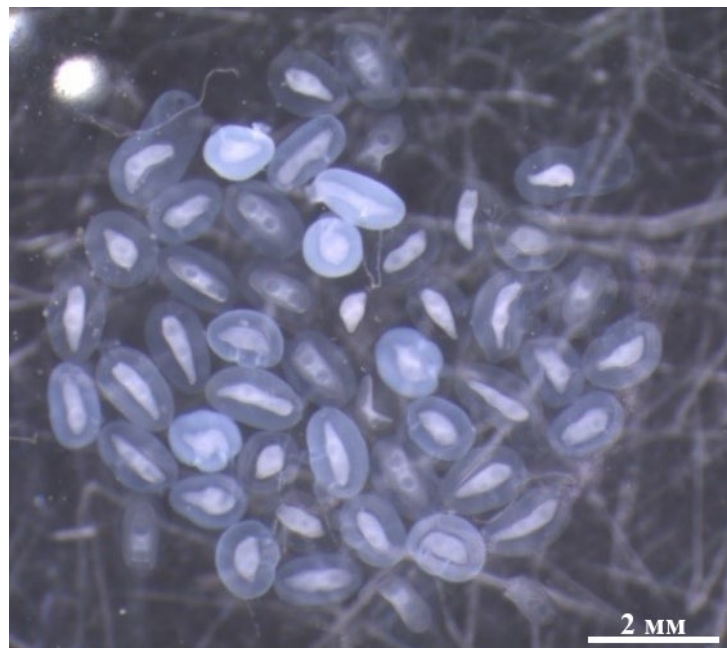


Рисунок 6. Метацеркарии *Leucochloridium paradoxum* из зрелых окрашенных отростков спороцисты.

2. Получение марит *L. paradoxum*. Цыплят содержали на протяжении 21–23 дней. Начиная с 13-го дня после заражения (п. з.) проводили копроскопический анализ, выявляя яйца марит. Для этого готовили временные препараты, просматривая их под микроскопом. Первые яйца в помёте были обнаружены через 13 дней п. з.

Через 21–23 дня п. з. проводили вскрытие цыплят. Мариты локализовались в клоаке и Фабрициевой сумке. Червей помещали в раствор Рингера комнатной температуры и использовали для заражения улиток.

3. Заражение моллюсков *S. putris* яйцами марит *L. paradoxum*. Для заражения использовали моллюсков лабораторной линии, а также собранных в природе (пос. Вырица

Ленинградской области). Последних предварительно на протяжении двух месяцев содержали в лабораторных условиях.

Улитки (лабораторной линии, а также собранные в природе) содержались в проветриваемых террариумах объемом 2 л с минеральным грунтом в качестве субстрата. Для питания использовали огурец и листья салата. В террариумах поддерживалась постоянная влажность (на уровне 80%) и температура (18 ± 1 °C). За два дня до заражения улиткам переставали давать пищу.

Для заражения использовали ломтики огурцов размером $0,5 \times 0,5 \times 0,1$ см. На субстрат помещали мариату, механически высвобождая яйца из дистальных отделов матки. Каждая мариата была использована для заражения двух моллюсков. При заражении не проводили подсчёт яиц. В дальнейшем улиток содержали при описанных выше условиях.

Исследование мирацидиев *L. paradoxum in vivo*. Для проведения прижизненных наблюдений за мирацидиями *L. paradoxum* получали временные препараты яиц. Для этого улиткам *S. putris* скармливали яйца из дистальных отделов матки мариат, полученных в ходе эксперимента. Через 15 минут производили вскрытие моллюсков, извлекая содержимое зоба, желудка, средней кишки. Содержимое пищеварительной системы переносили в каплю раствора Рингера на предметном стекле, изготавливая временный препарат. Для подсчёта количества клеток в составе личинок препараты предварительно окрашивали акридиновым оранжевым. Наблюдения проводили при помощи микроскопа Leica DM5000, микрофотографии и видео получали с помощью цифровой камеры TrueChrome 4K Pro.

II. 4. Гистологическое спороцист *L. paradoxum*

Для изучения размножения и развития спороцист использовали гистологические препараты. Ткани спороцист из экспериментально и природнозаражённых ($n=48$) моллюсков *S. putris* фиксировали в смеси Буэна. Экспериментально заражённых моллюсков фиксировали на сроках 7 ($n=1$), 14 ($n=2$), 22 ($n=3$), 55 ($n=1$), 72 ($n=1$), 95 дней ($n=1$) п. з.

Фиксированный материал промывали в трёх сменах 70% этанола и после последующего обезвоживания заливали в парафин согласно стандартной методике. Приготовленные на микротоме Leica RM2235 срезы толщиной 4–5 мкм окрашивали гематоксилином Эрлиха с подкраской 0,1% спиртовым раствором эозина. Анализ препаратов проводили на световом микроскопе Leica DM5000 и Nikon Eclipse E200 в режиме светлого поля. Снимки срезов делали с помощью фотокамер Nikon DS-Fi1 TrueChrome 4K Pro. Анализ микрофотографий выполняли в программном обеспечении ImageScope и ImageJ.

II. 5. Изучение спорцист *L. paradoxum* с использованием конфокальной микроскопии

Для исследований спорцист с помощью конфокального микроскопа образцы фиксировали в 4% параформальдегиде, приготовленном на 1x PBS буфере (pH 7,4). После проводили двухкратную промывку в 1x PBS буфере и инкубацию образцов в 0,2% растворе Triton X-100. Затем препарат окрашивали флуоресцентными красителями: родамин-фаллоидин (594 нм), Hoechst 33342 (465 нм). Изучение флуоресцентных препаратов проводили на микроскопе Zeiss LSM880 (ЦКП ИБР им Н.К. Кольцова РАН). Фотографии предоставлены Токмаковой А. С.

II. 6. Молекулярно-генетическое исследование моллюсков и трематод

Образцы тканей моллюсков и спорцист хранили при температуре -80°C . Для выделения ДНК использовали коммерческий набор ДНК-сорб-С-М («Аплисенс», Россия). Выделение проводили согласно инструкции производителя. Оценку качества выделенной ДНК, а также концентрации ДНК в образце проводили посредством электрофореза в 0,8% агарозном геле и спектрофотометрии (Implen NanoPhotometer) соответственно.

Для проведения ПЦР были использованы специфические праймеры (табл. 2). Праймеры CytB (прямой и обратный), а также CoxL были сконструированы при помощи программы Primer 3 (Untergasser et al., 2012) с использованием нуклеотидных последовательностей митохондриальных генов цитохрома b (*cytb*) *S. putris* (JN627206.1) и *cox1* *Leucochloridium paradoxum* (LC466790.1) из GenBank соответственно. Подбор условий для проведения ПЦР-реакции проводился экспериментальным путём. ПЦР-смесь готовили согласно инструкции производителя DreamTaq-ДНК-полимеразы (Thermo Scientific, Литва).

ПЦР проводили по следующему протоколу с температурой отжига (табл. 4), специфичной для каждой пары праймеров (помечена звёздочкой):

1. 94°C – 5 мин;
2. 45 циклов: 94°C – 1 мин; 55°C^* – 1 мин; 72°C – 1 мин 10 сек;
3. 72°C – 7 мин;
4. 4°C – ∞.

Таблица 4. Специфические праймеры, использованные в исследованиях.

Название праймера (F – прямой праймер, R – обратный)		Длина праймера (н.)	Температура отжига ($^{\circ}\text{C}$)	Последовательность нуклеотидов (5'→3')	Длина амплифицируемого фрагмента ДНК (± 50 н.)	Целевой фрагмент ДНК
CytB	F	25	54,3	GCATTTTTAGGTTATGTTTTACCGT	450	<i>cytb</i> моллюсков <i>S. putris</i>
	R	25		GGCGAATAAAAAGTATCATTACAGGT		
COI (Folmer et al., 1994 с изм.)	F	25	56,2	GGTCAACAATCATAAAAGATATTGG	1100	<i>cox1</i> моллюсков <i>S. putris</i>
	R	26		TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA		

JB3 (Bowles, McManus, 1993)	F	21	55	TCCTCCCCAGACCAGTCATAG	900	<i>cox1</i> трематод <i>L. paradoxum</i>
Cox_L	R	24		TTTTTTGGGCATCCTGAGGTTTAT		

Секвенирование по Сэнгеру проводили в коммерческих фирмах ООО «Бигль», ЗАО «Евроген». Анализ секвенограмм, сборку и выравнивание нуклеотидных последовательностей проводили с помощью программ BioEdit v. 7.2.5 (Hall, 1999), MEGA v. 10.2.4 (Kumar et al. 2018). Медианные сети гаплотипов строили при помощи программы PopArt v. 4.8.4 (Leigh, Bryant, 2015).

Для подсчёта генетических расстояний (p-distance) использовали MEGA v. 10.2.4 (Kumar et al., 2018). Математическая модель для расчета генетических дистанций при построении филогенетических реконструкций была выбрана с использованием критерия Акаике и Байесовского информационного критерия в jModelTest v. 2.1.7 (Darriba et al., 2012). Филогенетические реконструкции с использованием метода максимального правдоподобия (ML) проводили в программе MEGA v. 10.2.4 (Kumar et al. 2018). Бутстреп-поддержка для деревьев, построенных методом ML, была посчитана на основе 1000 реплик (Felsenstein, 1985). Байесовский анализ (BA) проводили в программе BEAST v. 2.5 (Bouckaert et al., 2019) с одновременным запуском четырёх цепей в 10 млн поколений с отбором каждого 1000-го. Достоверность топологии BA-деревьев оценивали по рассчитанной величине апостериорной вероятности. Для визуализации филогенетических деревьев, сгенерированных с помощью программы TreeAnnotator v. 1.7.5, использовали программу FigTree v. 1.4.0.

Данные об использованных в молекулярно-генетических исследованиях образцах представлены в таблице 5. Всего было исследовано 19 моллюсков *S. putris* и 45 спороцист *L. paradoxum* из разных географических точек.

Таблица 5. ДНК моллюсков *Succinea putris* и трематод *Leucochloridium paradoxum*, собранных в разных географических точках, с соответствующими номерами последовательностей из базы данных GenBank. Координаты точек сбора представлены в таблицах 2 и 3.

Моллюски <i>Succinea putris</i>					
	Географическая точка	Обозначение	№ образца ДНК (№ изолята)	№ последовательности в GenBank	
				<i>cytb</i>	<i>cox1</i>
Россия	Ленинградская область	Rus_L	39-15	MH352224.1	MH352219.1
			12-16	MK344421.1	MK344409.1
			44-14	MK344420.1	MK344408.1
	Кировская область	Rus_K	89-16	MH352222.1	MH352217.1
			86-16	MK344419.1	MN223674.1
			91-16	MN017768.1	MN017772.1
	Московская область	Rus_M	58-16	MH352221.1	MN017771.1
			66-16	MK344417.1	MK344414.1
			50	MK344418.1	MK344415.1
	Калининградская область	Rus_Kd	20-13	MH352223.1	MH352218.1

			27-13	MK344422.1	MK344410.1
			24-13	MN223675.1	MN017769.1
Белоруссия	Витебская область	Bel_V	45-13	MK344425.1	-
			47-13	MK344428.1	MN017770.1
			46-13	MK344424.1	MK344411.1
			44-13	MK344423.1	MK344416.1
	Гомельская область	Bel_G	75-11	MH352220.1	MH352216.1
			82-11	MK344427.1	MK344413.1
69-11			MK344426.1	MK344412.1	
Трематоды <i>L. paradoxum</i>					
	Географическая точка	Обозначение	№ образца ДНК (№ изолята)	№ последовательности в GenBank	
Россия	Ленинградская область, Бокситогорск	Bok	62-14		MZ676715.1
			67-14		MZ676716.1
			32-18		MZ676717.1
			29-18		ON526785.1
			30-18		ON526786.1
	Ленинградская область, Кузьмолово	Kuz	9-19		MZ676735.1
			15-19		MZ676736.1
			18-21		ON526788.1
			20-21		ON526789.1
			23-21		ON526790.1
	Ленинградская область, Вырица	Vyr	3-14		MZ676722.1
			21-20		MZ676729.1
			25-20		MZ676730.1
			42-18		ON526793.1
			17-17		ON626797.1
			4-14		MZ676723.1
			17-14		MZ676724.1
			11-21		MZ676725.1
			13-21		MZ676726.1
			14-21		MZ676727.1
			58-19		MZ676728.1
			26-20		MZ676731.1
			12-21		ON526791.1
			15-21		ON526792.1
			59-18		ON526794.1
			5-16		ON526795.1
			17-16		ON626796.1
	36-17		ON626798.1		
	21-19		ON626799.1		
	30-19		ON526800.1		
	Ленинградская область, Любань	Lub	8-14		MZ676732.1
			9-18		MZ676733.1
			13-13		MZ676734.1
12-18				ON526801.1	
17-18				ON526802.1	
Ярославская область, Борок	Bor	55		MZ676718.1	
		58		MZ676719.1	
		75		MZ676720.1	
		76		MZ676721.1	
		94		ON526787.1	
Белоруссия	Витебская область	Bel	50-19		MZ676737.1
			61-19		MZ676738.1
			62-19		MZ676739.1
			36-18		ON526803.1
			7-21		ON526804.1

ГЛАВА III. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

III. 1. Видовая идентификация промежуточного хозяина

Результаты

Видовая идентификация моллюсков *S. putris* с использованием морфологических признаков. Раковина всех исследованных моллюсков турбоспиральная, правозакрученная, остро яйцевидной формы (рис. 7). Она светло-жёлтого цвета, характеризуется тонкими стенками. Раковину составляют 2,0–3,5 оборота, разграниченные явственными швами. Структура поверхности первых оборотов отличается наличием многочисленных мелких углублений, последующие – слабо исчерчены. Дефинитивный оборот составляет большую часть раковины, открывается во внешнюю среду устьем овальной формы. Оно заострено в области колюмеллы.

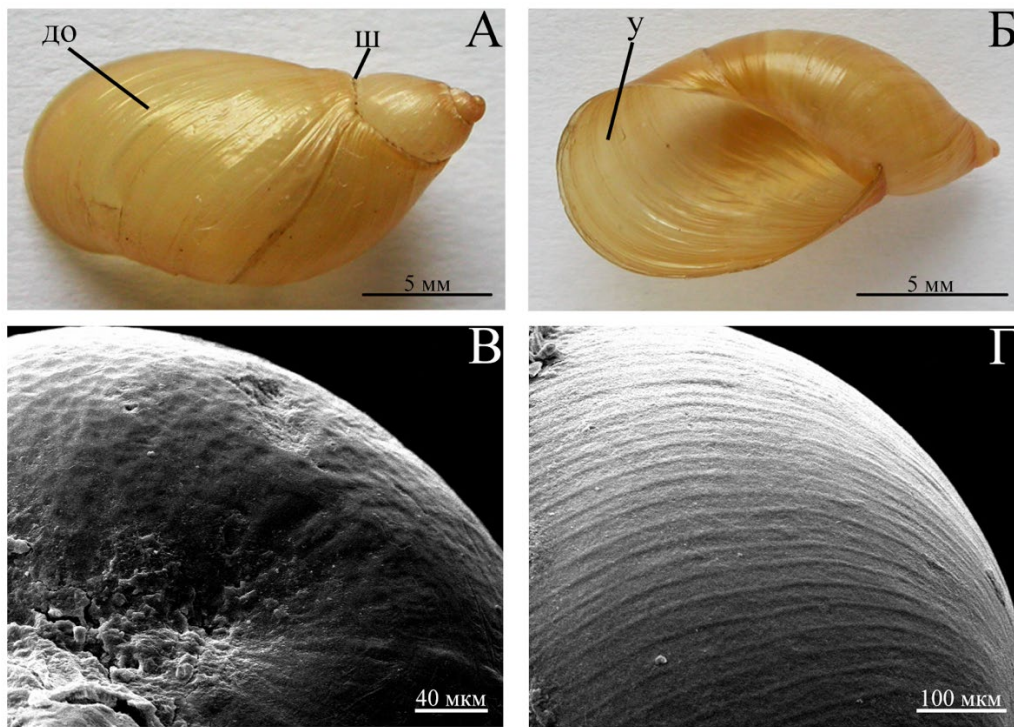


Рисунок 7. Раковина моллюсков *Succinea putris*. А – вид раковины с дорзальной стороны. Б – вид раковины со стороны устья. В – структура поверхности эмбрионального оборота. Г – структура поверхности дефинитивного оборота. Условные обозначения: до – дефинитивный оборот раковины, у – устье, ш – шов.

Размеры раковин моллюсков из разных точек сбора варьируют. В таблице 6 приведены данные размерных характеристик раковины для некоторых популяций. Наибольшим внутривидовым размахом по размеру раковины характеризуются моллюски из Ленинградской области. Максимальные размеры раковины составили 20,5×11,7 мм (Гомельская область).

В результате сравнения раковин моллюсков из разных популяций по индексу раковины и индексу устья были выявлены достоверные отличия моллюсков витебской популяции от остальных.

Внешне изученные моллюски отличаются не только по размерам раковины, но и по цвету (рис. 8). Последний варьирует от светло-жёлтого до тёмно-коричневого, практически чёрного. Все моллюски из Гомельской области Белоруссии характеризуются тёмной окраской. В остальных популяциях встречаются как тёмно- так и светлоокрашенные особи. Окраска обусловлена пигментацией наружных покровов улиток: пустые раковины тёмно- и светлоокрашенных моллюсков не отличаются по цвету.

Таблица 6. Размеры раковин моллюсков р. *Succinea* исследованных популяций. Точки сбора – см. табл. 2.

	Rus M (n=25)	Rus K (n=32)	Rus L (n=30)	Bel V (n=30)
Длина раковины, мм				
Медиана	12,30	10,80	12,65	15,75
25-й процентиль	11,20	10,33	11,78	15,03
75-й процентиль	13,20	11,53	13,73	16,53
Ширина раковины, мм				
Медиана	6,50	5,70	6,60	7,95
25-й процентиль	6,15	5,25	6,25	7,40
75-й процентиль	7,10	5,98	7,10	8,53
Высота устья, мм				
Медиана	8,70	7,50	8,85	10,90
25-й процентиль	8,10	7,30	8,30	10,40
75-й процентиль	9,70	7,80	9,73	11,65
Ширина устья, мм				
Медиана	5,80	5,10	5,90	7,10
25-й процентиль	5,50	4,70	5,60	6,68
75-й процентиль	6,40	5,40	6,40	7,50



Рисунок 8. Моллюски *Succinea putris* из одной популяции, характеризующиеся разной степенью пигментации покровов.

В ходе исследования были изучены особенности морфологии, которые имеют важное систематическое значение и используются для видового определения наземных лёгочных моллюсков.

Челюсть янтарок состоит из основания и режущей пластинки (рис. 9 А). Последняя вытянута в поперечном направлении и имеет выгнутую форму. На пластинке расположено три выступа, средний из которых характеризуется большим размером.

Радула моллюсков представляет собой ленту, на которой расположены зубы. Радулярная формула имеет вид 22:12:1:12:22 ($n=3$). Центральный зуб несёт три зубца: экто-, мезо- и эндокон, средний из которых – наибольший по длине (рис. 9 В). Латеральные зубы характеризуются крупным мезоконом и меньшим по размеру эктоконом (рис. 9 Б). Эндокон практически не развит и представляет собой небольшой выступ на медиальной стороне зуба. Маргинальные, или краевые, зубы отличаются наличием на месте эктокона мелких зубчиков. По направлению к латеральному краю радулы дифференцировка на эндо-, мезо- и эктокон становится малозаметна.

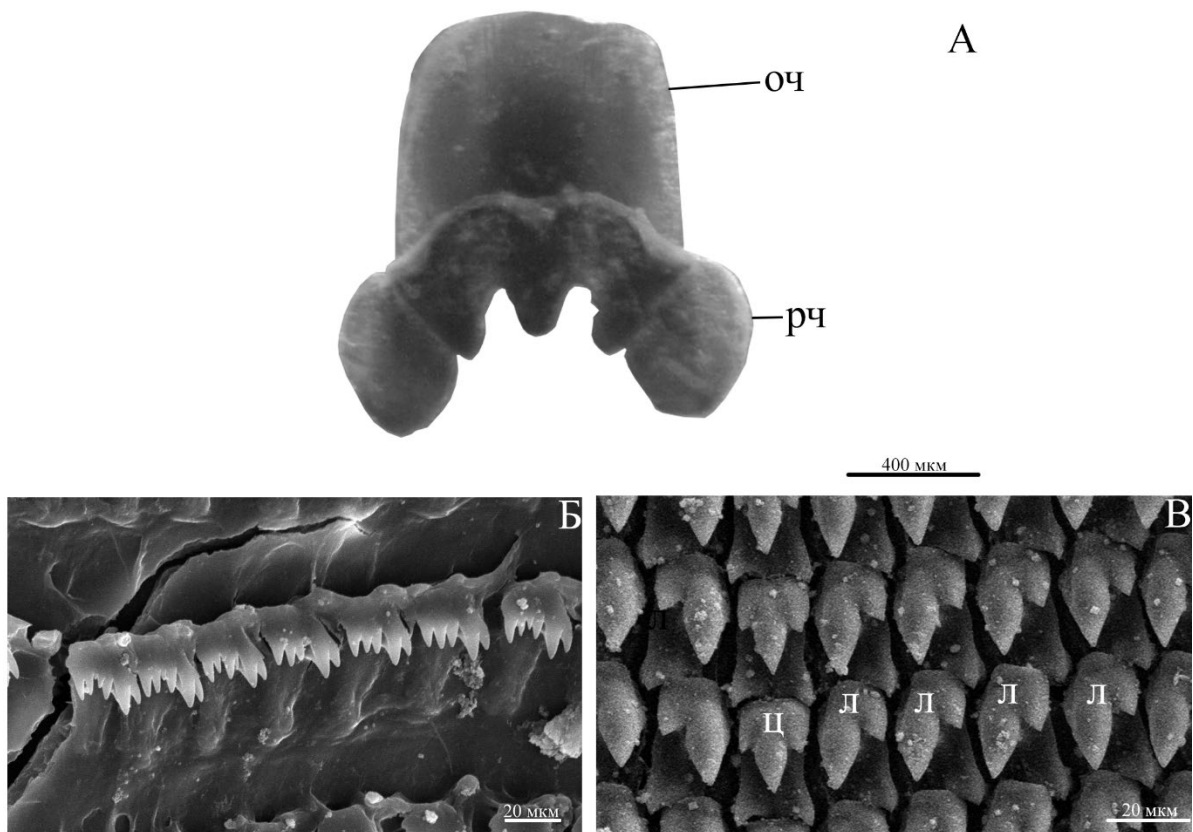


Рисунок 9. А – челюсть моллюсков *Succinea putris*. Б – боковой участок радулы с маргинальными зубами. В – центральный участок радулы. Условные обозначения: л – латеральный зуб, оч – основание челюсти; рч – режущая пластинка челюсти, ц – центральный зуб. Снимки со сканирующего электронного микроскопа.

Половая система моллюсков устроена следующим образом: гермафродитная железа, её проток и семенной пузырьёк имеют типичное для пульмонат строение и располагаются в верхних оборотах висцерального мешка (рис. 10). Гермафродитный проток впадает в карреофур, с которым соединены два семяприёмника, лежащие в углублении массивной

белковой железы и покрытые общим пигментированным соединительнотканым чехлом. Продолжается половой тракт семяйцеводом. Последний в области округлой простаты разделяется на яйцевод и семяпровод. Яйцевод имеет складчатую структуру, переходит в короткое влагалище в месте впадения протока от крупной сперматеки.

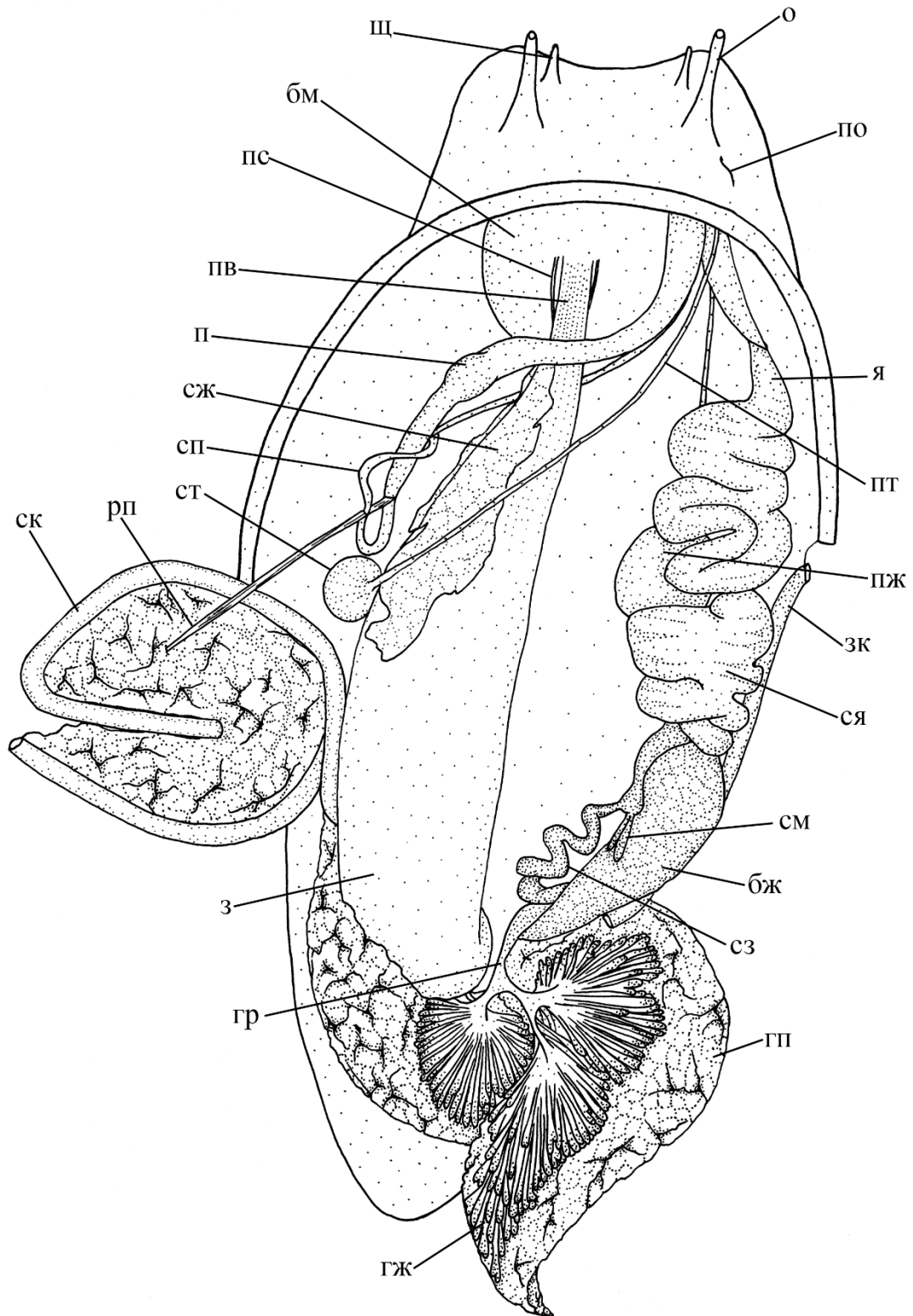


Рисунок 10. Общая морфология *Succinea putris*. Условные обозначения: бж – белковая железа; бм – буккальная масса; гж – гермафродитная железа; гп – гепатопанкреас;

гр – гермафродитный проток; з – зуб; зк – задняя кишка; о – омматофор; п – пенис; пв – пищевод; пж – простатическая железа; пс – проток слюнной железы; пт – проток сперматеки; рп – ретрактор пениса; сж – слюнная железа; ск – средняя кишка; сп – семяпровод; см – семяприёмник; сз – семенной пузырьёк; ст – сперматека; ся – семяйцевод; щ – щупальце; я – яйцевод.

Пенис покрыт мышечным чехлом и подразделяется на 3 части: передний, интеркалярный и задний отделы. Внутренний эпителий пениса образует многочисленные бороздки и папиллы, хаотично разбросанные по поверхности. К пениальному чехлу крепится ретрактор, он охватывает семяпровод в дистальной части.

Видовая идентификация моллюсков *S. putris* с использованием митохондриальных маркеров. В результате исследования было получено 18 последовательностей фрагмента гена *cox1* и 19 последовательностей фрагмента гена *cytb* моллюсков *S. putris*. Длина фрагментов составила 911–1048 и 453–456 пар нуклеотидов (п. н.) соответственно. Полученные нуклеотидные последовательности, а также данные из GenBank были использованы для филогенетического анализа (табл. 7).

Таблица 7. Номера (GenBank) нуклеотидных последовательностей фрагментов генома моллюсков *Succinea putris*, использованные для построения сетей гаплотипов и филогенетических реконструкций. Последовательности, полученные в данном исследовании, помечены звёздочкой. Остальные последовательности – из базы данных GenBank.

Вид	Точка сбора	Номер последовательности в базе данных GenBank. В скобках указан изолят (ваучер).			Условное обозначение
		rDNA	<i>cytb</i>	<i>cox1</i>	
<i>S. putris</i>	Ленинградская область	MF148319.1 (39-15)	MH352224.1 (39-15)*	MH352219.1 (39-15)*	Rus_L
		-	MK344421.1 (12-16)*	MK344409.1 (12-16)*	
		MF148320.1 (44-14)	MK344420.1 (44-14)*	MK344408.1 (44-14)*	
		-	-	MH352215.1 (5-8x)*	
	Московская область	MF148317.1 (58-16)	MH352221.1 (58-16)*	MN017771 (58-16)*	Rus_M
		MF148318.1 (66-16)	MK344417.1 (66-16)*	MK344414.1 (66-16)*	
		-	MK344418.1 (50)*	MK344415.1 (50)*	
	Калининградская область	MF148314.1 (20-13)	MH352223.1 (20-13)*	MH352218.1 (20-13)*	Rus_Kd
		-	MK344422.1 (27-13)*	MK344410.1 (27-13)*	
		MF148315.1 (24-13)	MN223675.1 (24-13)*	-	
	Кировская область	MF148313.1 (89-16)	MH352222.1 (89-16)*	MH352217.1 (89-16)*	Rus_K
		MF148312.1 (86-16)	MK344419.1 (86-16)*	MN223674 (86-16)*	
		-	MN017768.1 (91-16)*	MN017772 (91-16)*	
	Витебская область	MF148321.1 (45-13)	MK344425.1 (45-13)*	-	Bel_V
		-	MK344428.1 (47-13)*	MN017770 (47-13)*	
		MF148322.1 (46-13)	MK344424.1 (46-13)*	MK344411.1 (46-13)*	
		-	MK344423.1 (44-13)*	MK344416.1 (44-13)*	
	Гомельская область	MF148310.1 (64-11)	-	-	Bel_G
		MF148311.1 (75-11)	MH352220.1 (75-11)*	MH352216.1 (75-11)*	
-		MK344427.1 (82-11)*	MK344413.1 (82-11)*		
-		MK344426.1 (69-11)*	MK344412.1 (69-11)*		
Франция	-	JN627206.1 (CASIZ 180491)	JN627206.1 (CASIZ 180491)	Fr	
Канада	Ontario, Rouge National Urban Park	-	MF544159.1, MF544405.1, MF544506.1, MF544818.1, MF544758.1, MF544210.1, MF544231.1, MF544653.1, MF544490.1, MF544322.1, MF544587.1, MF544418.1, MF544382.1, MF544228.1, MF545158.1, MF544873.1, MF544897.1, MF544973.1,	Can_O_RNUP	

				MF545126.1, MF545157.1, MF544742.1, MF544756.1, MF544686.1	
	Ontario, Cambridge	-	-	KT705746.1, MG423283.1, MG421557.1, MG423488.1, MG422613.1, MG421340.1, MG422589.1, MG422586.1, MG422578.1, MG422577.1, MG422570.1, MG422428.1, KT708385.1, MG422385.1, MG421915.1, MG422108.1, MG422553.1, KT706849.1, MG422232.1, KT705530.1, KT706619.1, MG422821.1, MG422340.1, MG422176.1, MG423161.1, KT708412.1, MG422717.1, KT706446.1, KT708055.1, MG423402.1, MG421524.1, MG421235.1	Can_O_Cam
	New Brunswick	-	-	MG421566.1, MG421590.1, MG421662.1, MG422354.1	Can_NB
	Ontario, Claireville	-	-	MG422810.1 MG423393.1 MG421240.1 MG422360.1	Can_O_Cla
	Ontario, Nashville	-	-	MG423177.1	Can_O_Nash
	Ontario, Kortright	-	-	MG421924.1, MG422206.1, MG421473.1, MG422512.1	Can_O_Kor
	Ontario, Seneca	-	-	MG421460.1, MG422624.1, MG421869.1, MG422800.1	Can_O_Sen
	Ontario, Speed river trail	-	-	MG422544.1, MG421653.1	Can_O_Srt
	Ontario, McMichael	-	-	MG422616.1	Can_O_MM
	Ontario	-	-	MG421231.1	Can_O
	Prince Edward Island	-	-	MF544242.1	Can_PEI

По результатам анализа фрагмента гена *cox1* (выравнивание 95 последовательностей длиной 565 п. н.) выявлено 18 гаплотипов (табл. 8, рис. 11). Большая часть гаплотипов относится к моллюскам, исследованным в Канаде (Telfer et al., 2015). На медианной сети выявляется две группы: одна преимущественно включает последовательности моллюсков из Канады с преобладанием гаплотипа Har_4. Вторая группа представлена последовательностями европейских моллюсков. Среди последних выявлено 11 гаплотипов. Они отличаются друг от друга одной-двумя нуклеотидными заменами. Исключение составляет гаплотип, характеризующий моллюска из Франции, который отдалён от остальных на значительное расстояние (28 нуклеотидных замен). Следует отметить, что гаплотипы некоторых моллюсков, собранных на территории Европы, кластеризуются с канадскими образцами (Har_9) и наоборот (Har_7, Har_8 и др.).

Таблица 8. Анализ нуклеотидных последовательностей фрагмента гена *cox1* моллюсков *Succinea putris* из разных географических точек.

Страна	Точка сбора	Количество последовательностей	Количество гаплотипов	Гаплотипическое разнообразие
Россия	Rus L	4	4 (Har 1, Har 9, Har 10, Har 11)	1,000
	Rus Kd	2	2 (Har 1, Har 12)	1,000
	Rus K	3	2 (Har 10, Har 13)	0,667
	Rus M	3	3 (Har 14, Har 16, Har 17)	1,000
Белоруссия	Bel G	3	2 (Har 10, Har 15)	0,667
	Bel V	3	1 (Har 14)	0
Канада	Can O RNUP	23	4 (Har 1, Har 2, Har 3, Har 4)	0,447
	Can O Cla	4	1 (Har 4)	0
	Can O Cam	32	5 (Har 4, Har 5, Har 6, Har 7, Har 8)	0,687
	Can O Kor	4	2 (Har 2, Har 4)	0,667

	Can O Sen	4	1 (Hap 4)	0
	Can NB	4	2 (Hap 3, Hap 4)	0,500
	Can O Srt	2	1 (Hap 4)	0
	Can O MM	1	1 (Hap 4)	0
	Can O	1	1 (Hap 4)	0
	Can PEI	1	1 (Hap 4)	0
	Can O Nash	1	1 (Hap 3)	0
Франция	Fr	1	1 (Hap 18)	0

Среди последовательностей фрагмента *cox1* моллюсков с территории Канады выявлено 8 гаплотипов, с территории Европы – 11. Генетические дистанции между гаплотипами составили в среднем $0,015 \pm 0,001$. Гаплотип Hap_18 янтарки из Франции отдалён от остальных на большую генетическую дистанцию (в среднем $0,053 \pm 0,001$). Без учёта данного образца генетические дистанции между гаплотипами составили в среднем $0,010$.

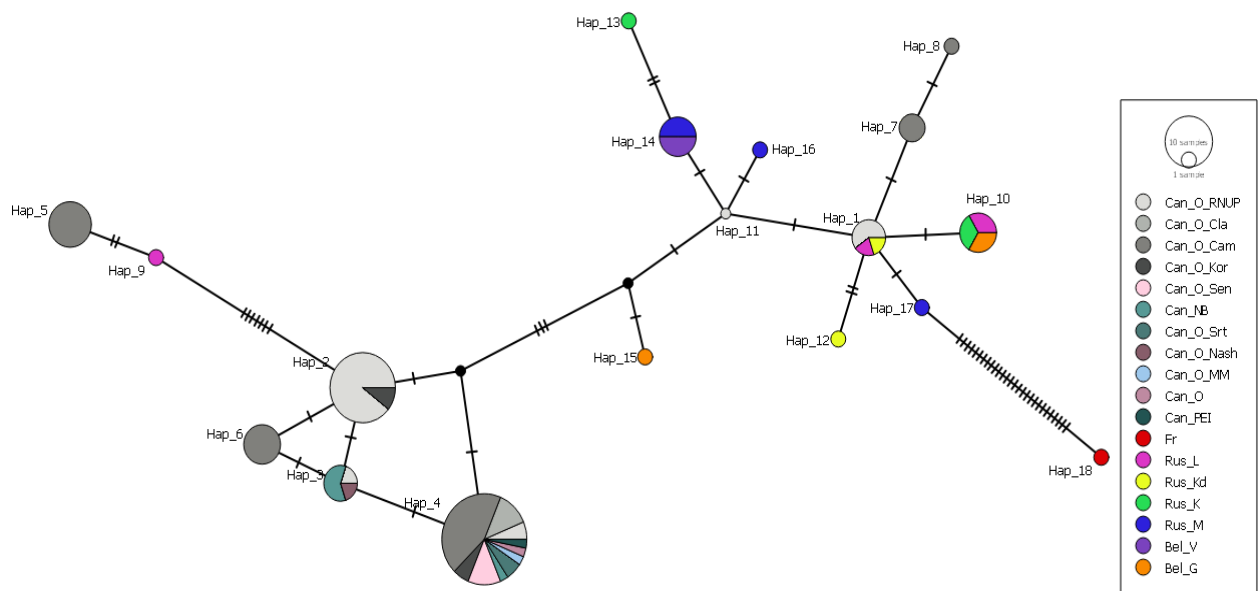


Рисунок 11. Разнообразие гаплотипов моллюсков *Succinea putris* по фрагменту митохондриального гена *cox1* (565 п. н.). Размер кругов пропорционален частоте встречаемости гаплотипа. Штрихами обозначены нуклеотидные замены. Чёрные круги без обозначений – гипотетические гаплотипы. Используемые последовательности и обозначения точек сбора представлены в таблице 7.

При анализе фрагмента митохондриального гена *cytb* (выравнивание на основе 19-ти нуклеотидных последовательностей длиной 452 п. н.) было выявлено 11 гаплотипов (табл. 9, рис. 12). Последовательность фрагмента гена моллюска из Франции представляет отдельный гаплотип Hap_11, отдалённый от остальных на значительное количество нуклеотидных замен (средняя генетическая дистанция $0,064 \pm 0,001$). Генетические дистанции между гаплотипами по фрагменту *cytb* составили в среднем $0,018 \pm 0,003$. Без учёта образца из Франции в среднем $0,008 \pm 0,001$.

Таблица 9. Анализ нуклеотидных последовательностей фрагмента гена *cytb* моллюсков *Succinea putris* из разных географических точек.

Страна	Точка сбора	Количество исследованных последовательностей	Количество гаплотипов	Гаплотипическое разнообразие
Россия	Rus L	3	2 (Hap 6, Hap 7)	0,667
	Rus Kd	3	1 (Hap 7)	0
	Rus K	3	3 (Hap 3, Hap 4, Hap 5)	1,000
	Rus M	3	3 (Hap 1, Hap 2, Hap 3)	1,000
Белоруссия	Bel G	3	3 (Hap 8, Hap 9, Hap 10)	1,000
	Bel V	4	2 (Hap 3, Hap 8)	0,500
Франция	Fr	1	1 (Hap 11)	0

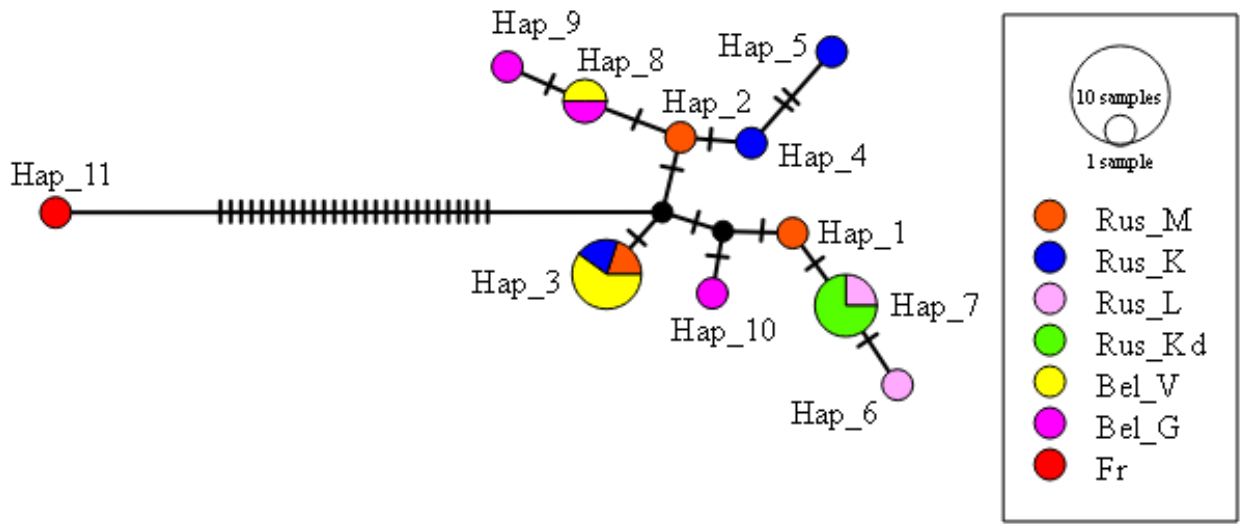


Рисунок 12. Разнообразие гаплотипов моллюсков *Succinea putris* по фрагменту митохондриального гена *cytb* (452 п. н.). Размер кругов пропорционален частоте встречаемости гаплотипа. Штрихами обозначены нуклеотидные замены. Чёрные круги без обозначений – гипотетические гаплотипы. Используемые последовательности и обозначения точек сбора представлены в таблице 7.

Обсуждение

По результатам морфологического анализа были выявлены статистически значимые отличия моллюсков из витебской популяции от остальных улиток по индексам, характеризующим раковину (табл. 4). Улитки из этой популяции достоверно крупнее моллюсков из других точек сбора, что может объясняться более южным ареалом их обитания (см. Шилейко, Лихарев, 1986). Также было отмечено, что улитки из гомельской популяции характеризуются пигментированными наружными покровами.

Однако анализ внутренней морфологии, в частности, строения половой системы, позволяет сделать вывод о том, что все исследованные моллюски относятся к одному виду, несмотря на отмеченные различия. Согласно полученным результатам и их сравнению с данными из литературы (Шилейко, Лихарев, 1986; Patterson, 1971 и др.), все исследованные моллюски принадлежат к виду *S. putris*.

Таким образом, выявленные отличия моллюсков из нескольких популяций укладываются в рамки внутривидовой изменчивости, высокая степень которой характеризует сем. Succineidae в целом (Branson, 1962). Изменчивость по характеристикам раковины была отмечена для янтарок другими авторами и ранее (Cockerell, 1924; Patterson, 1971; Шилейко, Лихарев, 1986; Круглов, Стыгар, 2003). Однако характеристики внутренней морфологии считаются более надёжными для использования в целях систематики как р. *Succinea*, так и в систематике других родов наземных гастропод (Branson, 1962).

Молекулярно-генетический анализ по митохондриальным генам *cox1* и *cytb* был проведён по каждому маркеру отдельно. Результаты исследования фрагмента *cox1* показывают, что гаплотипическое разнообразие янтарок из Европы выше, чем янтарок из Канады несмотря на то, что для последних изучено большее количество образцов. Это может быть связано с процессами расселения вида. Так в исследованиях наземных моллюсков *Arianta arbustorum* было отмечено (Бондарева и др., 2016), что при заселении новой территории популяцией с низкой численностью может наблюдаться «эффект основателя» (см. Дубинин, Ромашов, 1932): в таком случае для её генофонда будет характерно низкое генетическое разнообразие. Это предположение подкрепляется сведениями о том, что самые ранние находки представителей сем. Succineidae – с территории Европы (Barker, 2001), а также сведениями о том, что *S. putris* для Северной Америки является инвазивным видом, чей изначальный ареал включал именно Европу (Ponder et al., 2020).

Интересно также отметить, что на гаплосети по фрагменту гена *cox1* (рис. 11) гаплотипы европейских моллюсков оказываются в группе с канадскими и наоборот. Это можно объяснить случайным завозом моллюсков с одного континента на другой (Анистратенко, 1991; Сон, 2007; Haase et al., 2010 и др.).

Несмотря на выявленное разнообразие по изученным фрагментам митохондриального генома, генетические дистанции между гаплотипами невелики. Показатели внутривидовой изменчивости сравнимы с показателями другого изученного в этом отношении вида – *S. caduca*, для которого среднее генетическое расстояние между популяциями составило 0,028 (Holland, Cowie, 2007). Популяции другого вида из сем. Succineidae, *Oxyloma salleanum* оказались схожи на 95,55%±0,10% по фрагменту гена *cox1* (Perez et al., 2021).

Среднее генетическое расстояние между *S. putris* и другими представителями р. *Succinea* (*S. lumbaris*, *S. lutulenta*, *S. canella* и *S. caduca*) по гену *cox1* составляет 0,177±0,01 (Prokhorova et al., 2020a). Подсчитанные для исследованных образцов (за исключением гаплотипа моллюска из Франции) дистанции на порядок меньше – в среднем 0,015. Таким

образом, выявленные генетические различия свидетельствуют о высокой степени генетической однородности моллюсков из разных популяций.

Митохондриальный геном *S. putris* из Франции заслуживает особого внимания: анализ фрагментов обоих митохондриальных генов показал большое количество нуклеотидных замен, отделяющих гаплотипы Нар_18 и Нар_11 от других. Среднее генетическое расстояние составило $0,053 \pm 0,001$ и $0,064 \pm 0,001$ по участкам *cox1* и *cytb* соответственно, что ближе к различиям межвидового уровня. К сожалению, морфологическое описание французской улитки отсутствует (White et al., 2011), что не позволяет сопоставить данные молекулярно-генетического и морфологического анализа.

Ранее в лаборатории экспериментальной зоологии РГПУ им. А. И. Герцена был проанализирован фрагмент кластера рДНК тех же моллюсков *S. putris* (Prokhorova et al., 2020a). Участок рДНК, включенный в анализ, содержал внутренние транскрибируемые спейсеры (ITS), а также 5,8S рДНК: ITS1-5,8S-ITS2. Сравнение последовательностей (фрагмент длиной 1700 п. н.) данного участка моллюсков из разных популяций показало их идентичность, тогда как гомология нуклеотидных последовательностей рДНК *S. putris* и *S. striata* (Wade et al., 2006) составила 89,5%. Наибольшие различия выявлены на участке ITS2, для которого гомология между видами составила 83,5% (Prokhorova et al., 2020a).

Другие лёгочные моллюски, для которых изучены внутренние транскрибируемые спейсеры, характеризуются незначительной внутривидовой изменчивостью этих участков генома. Для видов из родов *Biomphalaria*, *Bulinus* и *Planorbarius* показано, что их нуклеотидные последовательности ITS1-5,8S-ITS2 полностью идентичны или гомология составляет 99% (Prokhorova et al., 2020a). В частности, степень гомологии последовательностей улиток *P. corneus* из Калининградской и Ленинградской области составляет около 0,03% (Прохорова и др., 2015).

Таким образом, данные анализа участка ядерного генома, включающего ITS1-5,8S-ITS2, как и результаты анализа митохондриальных генов, свидетельствуют том, что все исследованные янтарки относятся к одному виду – *S. putris*. Результаты морфологического анализа также подтверждают эту гипотезу. Отличия, которые выявлены при исследовании генов *cytb* и *cox1* соответствуют внутривидовым.

III. 2. Видовая идентификация спороцист трематод *L. paradoxum*

Результаты

Анализ окраски зрелых отростков спороцист *L. paradoxum*. Окраска отростков спороцист *L. paradoxum* представляет собой чередование полос зелёного, белого и чёрного цветов. Однако оттенок, расположение или количество полос варьирует. Изменчивость связана как с онтогенезом, так и с индивидуальными особенностями спороцист.

В ходе исследования был проведен анализ фотографий зрелых отростков спороцист ($n=591$). Зрелые отростки спороцист *L. paradoxum* характеризуются следующими признаками в окраске (рис. 13). В дистальной части отростков заметны тёмно-коричневые бугорки. Затем расположены широкие сплошные полосы. За ними тело отростка имеет более светлую окраску: в средней части имеются прерывистые линии зелёного цвета, а ближе к проксимальной части доминируют линии жёлтого цвета.

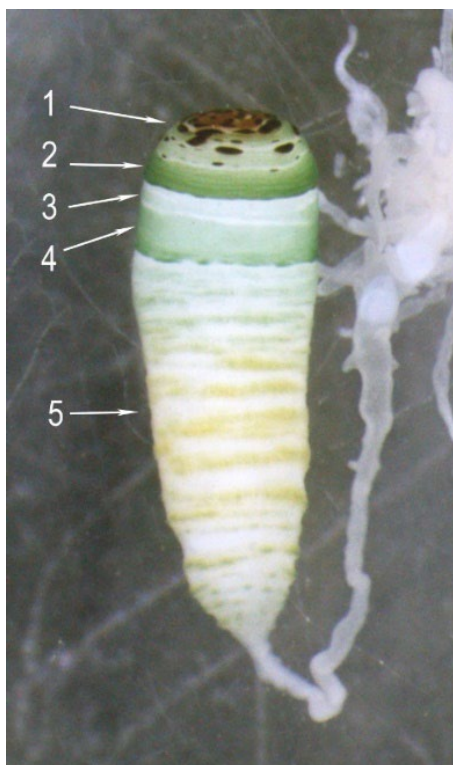


Рисунок 13. Зрелый отросток спороцисты *Leucochloridium paradoxum*. Условные обозначения: 1 — тёмно-коричневые бугорки; 2 — верхняя полоса; 3 — светлая зона; 4 — нижняя полоса; 5 — проксимальная часть с полосами светло-жёлтого и зелёного цвета.

Анализ зрелых отростков спороцист *L. paradoxum* показал большое разнообразие вариантов их окраски. Были выделены четыре основных типа (рис. 14), которые отражают индивидуальные особенности спороцист. При выделении основных типов окраски отростков использовались только принципиальные различия.

1-й тип (рисю 14 А): дистальный участок отростка окрашен в тёмно-коричневый цвет. Ниже на оливково-коричневом фоне расположены тёмно-коричневые бугорки. Дальше окраска отростка меняется на зеленоватую или желтоватую, однако на уровне его верхней трети имеется широкое тёмно-зелёное кольцо.

2-й тип (рис. 14 Б): дистальный конец отростка также окрашен в тёмно-коричневый цвет. Но расположенные ниже тёмно-коричневые пятна расположены на светло-зелёном

фоне. Далее также расположено оливково-коричневое кольцо. В остальном этот вариант схож с 1-м типом.

3-й тип (рис. 14 В): отличается от первых двух типов отсутствием оливково-коричневого кольца и наличием на светлом фоне двух тёмно-зелёных колец.

4-й тип (рис. 14 Г): основное отличие заключается в том, что второе тёмно-зелёное кольцо является не сплошным, а прерывается светлыми участками.

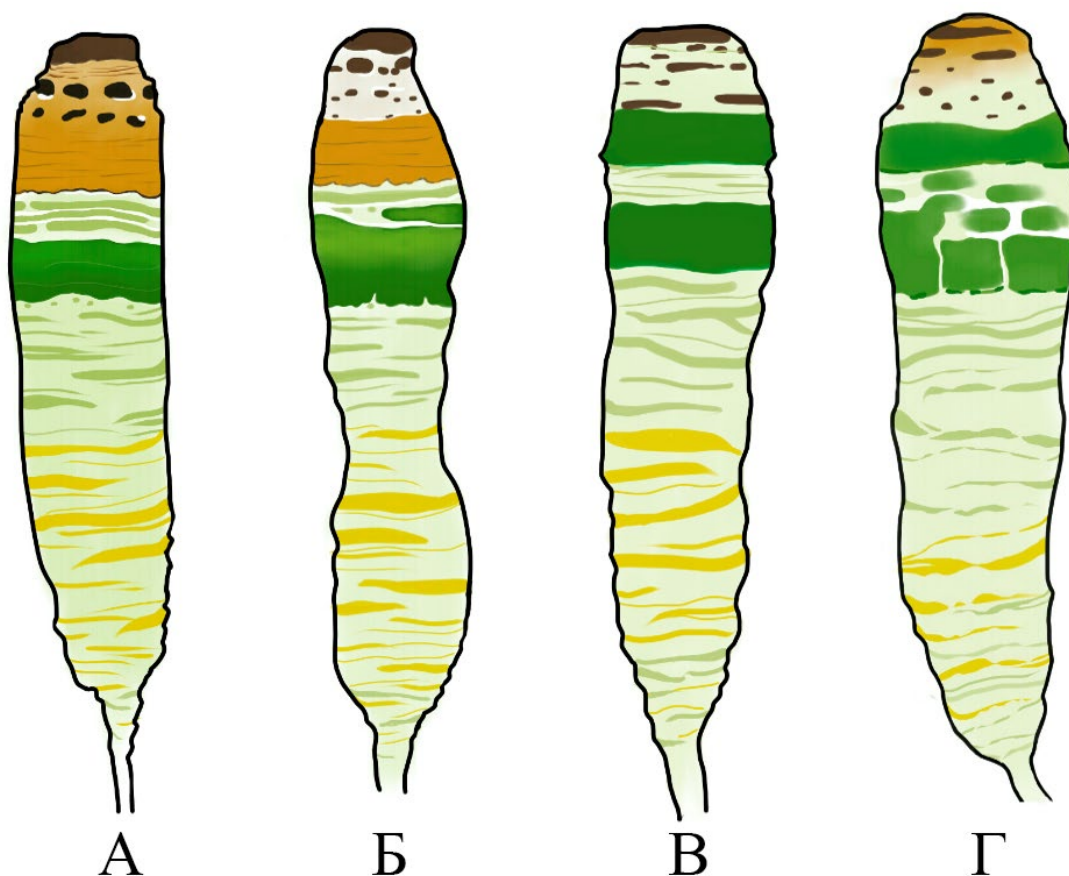


Рисунок 14. Схема окраски зрелых отростков спороцист *Leucochloridium paradoxum*. А- 1-й тип окраски. Б – 2-й тип окраски. В- 3-й тип окраски. Г – 4-й тип окраски. Рисунок Богачевой Т. А.

Анализ генетического полиморфизма трематод L. paradoxum по фрагменту митохондриального гена cox1. В результате исследования было получено и аннотировано в базу данных GenBank 45 последовательностей фрагмента гена *cox1* спороцист *L. paradoxum* длиной 769–833 п. н. (табл. 10).

Таблица 10. Гаплотипическое разнообразие трематод *Leucochloridium paradoxum* по фрагменту митохондриального гена *cox1*. Звёздочкой помечены точки сбора, моллюски из которых были исследованы в ходе выполнения данной работы. Географические координаты точек сбора указаны в таблице 3.

Точка сбора (код)	Номер последовательности в базе данных GenBank	Гаплотипическое разнообразие	Гаплотипы по анализу участка <i>cox1</i> длиной 757 п. н.	Гаплотипы по анализу участка <i>cox1</i> длиной 255 п. н.
На основе анализа фрагмента гена <i>cox1</i> длиной 757 п. н.				
Бокситогорск (Bok)*	MZ676715.1, MZ676716.1, MZ676717.1, ON526785, ON526786	0,900	4 (Hap_1, Hap_2, Hap_3, Hap_4)	3 (Hap_1, Hap_2, Hap_3)
Борок (Bor)*	MZ676718.1, MZ676719.1, MZ676720.1, MZ676721.1, ON526787.1	0,900	4 (Hap_3, Hap_5, Hap_6, Hap_7)	3 (Hap_1, Hap_4, Hap_5)
Кузьмолово (Kuz)*	MZ676735.1, MZ676736.1, ON526788.1, ON526789.1, ON526790.1	0,700	3 (Hap_3, Hap_8, Hap_9)	2 (Hap_1, Hap_4)
Вырица (Vyr)*	MZ676722.1, MZ676723.1, MZ676724.1, MZ676725.1, MZ676726.1, MZ676727.1, MZ676728.1, MZ676729.1, MZ676730.1, MZ676731.1, ON526791.1, ON526792.1, ON526793.1, ON526794.1, ON526795.1, ON626796.1, ON626797.1, ON626798.1, ON626799.1, ON526800.1	0,805	11 (Hap_2, Hap_3, Hap_10, Hap_11, Hap_12, Hap_13, Hap_14, Hap_15, Hap_16, Hap_17, Hap_18)	6 (Hap_1, Hap_2, Hap_6, Hap_7, Hap_8, Hap_9)
Любань (Lub)*	MZ676732.1, MZ676733.1, MZ676734.1, ON526801.1, ON526802.1	0,700	3 (Hap_3, Hap_14, Hap_19)	2 (Hap_1, Hap_2)
Буй (Bel)*	MZ676737.1, MZ676738.1, MZ676739.1, ON526803.1, ON526804.1	0,900	4 (Hap_3, Hap_20, Hap_21, Hap_22)	3 (Hap_1, Hap_2, Hap_10)
Япония (Jap) (Nakao et al., 2019)	LC466790.1, LC466791.1, LC466792.1, LC466793.1, LC466794.1, LC466795.1	0,933	5 (Hap_23, Hap_24, Hap_25, Hap_26, Hap_27)	4 (Hap_11, Hap_12, Hap_13, Hap_14)
На основе анализа фрагмента гена <i>cox1</i> длиной 255 п. н.				
Польша (Pol) (Rzad et al., 2023)	MK882504.1, MK882503.1, MK882502.1, MK882501.1, MK882500.1	1,000	-	5 (Hap_3, Hap_15, Hap_16, Hap_17, Hap_18)
Чехия (Cz) (Heneberg et al., 2016)	KP903662.1, KP903661.1, KP903660.1, KP903659.1, KP903652.1, KP903651.1, KP903650.1, KP903649.1, KP903648.1, KP903647.1, KP903646.1, KP903643.1, KP903642.1	0,385	-	2 (Hap_1, Hap_19)

Изученная нуклеотидная последовательность участка гена *cox1* *L. paradoxum* включает 48 переменных сайтов. В большинстве случаев наблюдаются замены нуклеотидов в третьем положении триплета. В ряде последовательностей в некоторых локусах заменён первый нуклеотид в триplete, что приводит к замене аминокислоты валина на метионин при трансляции (Hap_23–Hap_27).

При анализе полученных данных, а также последовательностей из GenBank (выравнивание 51 последовательности длиной 757 п. н.) (табл. 10), было выявлено 27 гаплотипов. Наиболее часто встречающимся оказался гаплотип Hap_3, характерный для всех исследованных географических точек, за исключением Японии (рис. 15). Большая часть гаплотипов (21) являются уникальными и представлены только одной последовательностью. Наибольшее число гаплотипов выявлено в Вырице (11 гаплотипов). Для этой точки было исследовано максимальное число образцов (20 спороцист). Однако гаплотипическое разнообразие спороцист из этой точки сбора (0,805) сопоставимо или даже меньше, чем в других исследованных точках, таких как Бокситогорск (0,900), Борок (0,900), Буй (0,900).

Выявленные гаплотипы незначительно отличаются друг от друга: в большинстве случаев количество замен не превышает трёх. При этом на гаплогосети можно выделить две группы: одна из них представлена гаплотипами трематод с территории Европейской части Евразии, вторую группу составляют гаплотипы японских спороцист, которые отличаются от гаплотипов первой группы более чем на 20 нуклеотидных замен. В целом гаплогосеть характеризуется звездообразной структурой.

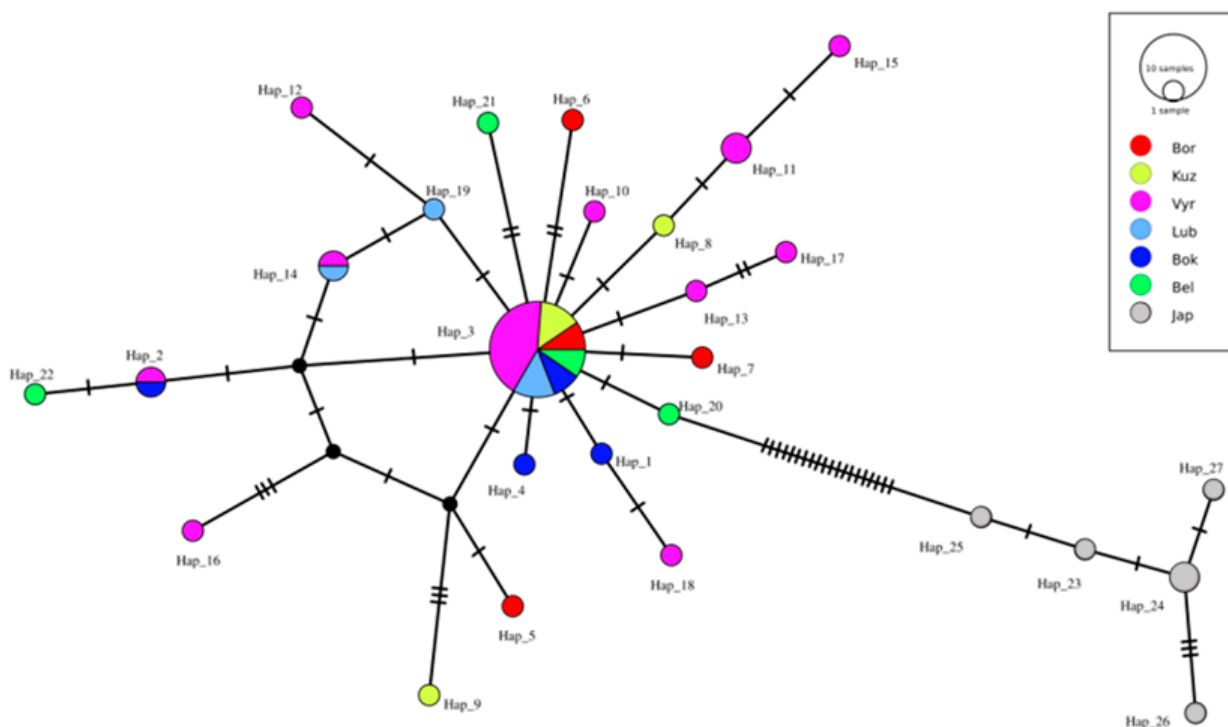


Рисунок 15. Разнообразие гаплотипов трематод *Leucochloridium paradoxum* по фрагменту митохондриального гена *cox1* (757 п. н.). Размер кругов пропорционален частоте встречаемости гаплотипа. Штрихами обозначены нуклеотидные замены. Чёрные круги без обозначений – гипотетические гаплотипы. Используемые последовательности и обозначения точек сбора представлены в таблице 10.

Средняя генетическая дистанция между всеми гаплотипами составила $0,013 \pm 0,001$. Средняя генетическая дистанция между гаплотипами спороцист, собранных на территории Европейской части Евразии – $0,005$. Значительно большая дистанция между всеми Европейскими и Японскими спороцистами – $0,032 \pm 0,001$.

Для более полного анализа в работе также были использованы представленные в GenBank нуклеотидные последовательности участка гена *cox1* трематод *L. paradoxum*, собранных на территории Польши и Чехии. Однако эти последовательности имеют меньшую длину (255 п. н.), поэтому была построена вторая гаплогосеть (рис. 16) с учётом всех имеющихся гаплотипов по короткому фрагменту гена *cox1* (выравнивание 69 последовательностей длиной 255 п. н.).

Полученная гаплосеть имеет структуру, схожую с сетью, построенной на основе выравнивания длиной 757 п. н. (рис. 15). Основная масса гаплотипов сформирована нуклеотидными последовательностями гена *cox1* европейских спороцист. В центре сети находится гаплотип *Нар_1*, присутствующий практически во всех точках сбора. Остальные гаплотипы отличаются от него одной – двумя нуклеотидными заменами.

Средняя генетическая дистанция между всеми гаплотипами составляет $0,019 \pm 0,001$. На гаплосети можно выделить несколько групп: основную, в центре которой располагается *Нар_1*, а также группы гаплотипов спороцист из Японии и Польши. Если последняя не отдалена на значительное генетическое расстояние от основной (средняя генетическая дистанция $0,011 \pm 0,001$), то группу гаплотипов японских спороцист (*Нар_11–Нар_14*) отделяет от основной относительно большое количество нуклеотидных замен (генетическая дистанция составляет в среднем $0,037 \pm 0,001$). Внутригрупповая дистанция для японских гаплотипов составляет в среднем $0,008 \pm 0,001$, для европейских – $0,010$.

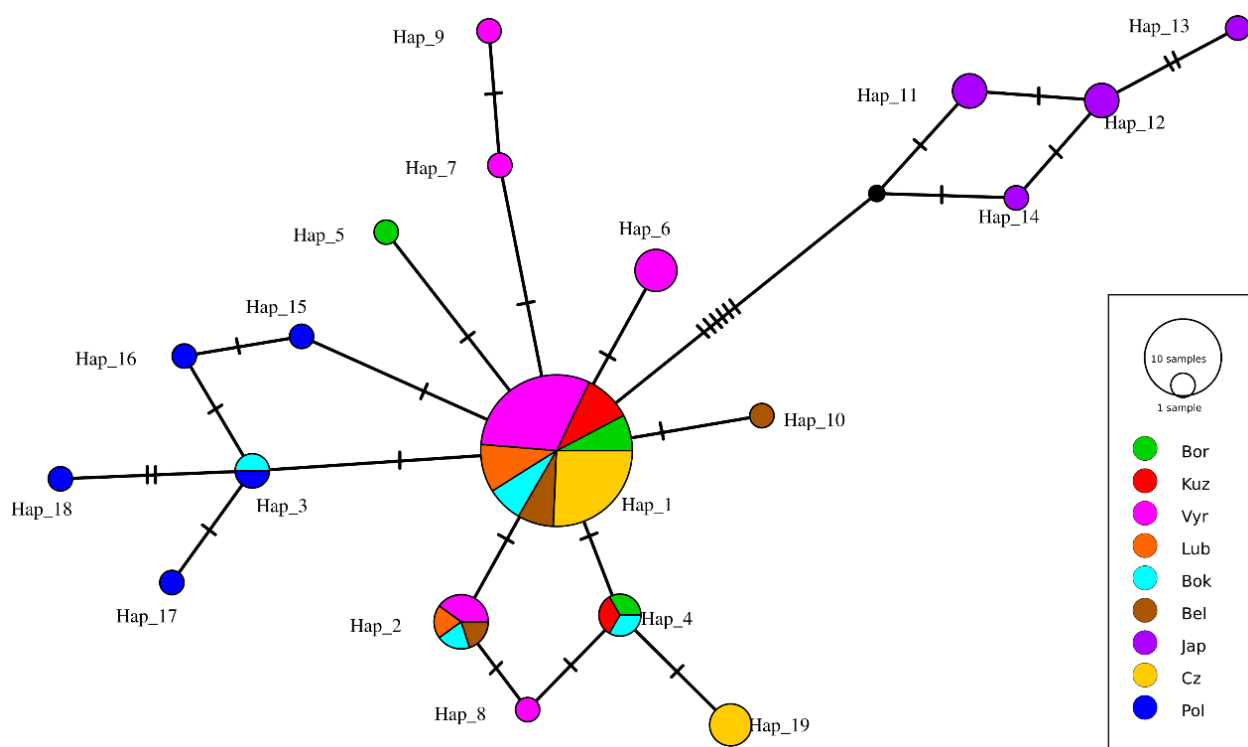


Рисунок 16. Разнообразие гаплотипов трематод *Leucochloridium paradoxum* по фрагменту митохондриального гена *cox1* (255 п. н.). Размер кругов пропорционален частоте встречаемости гаплотипа. Штрихами обозначены нуклеотидные замены. Чёрные круги без обозначений – гипотетические гаплотипы. Используемые последовательности и обозначения точек сбора представлены в таблице 10.

Полученные последовательности были использованы для филогенетической реконструкции (рис. 17). Последовательности *cox1* трематод с территории Европы

формируют единую кладу с высокой степенью поддержки. При этом обособляется японская группа гаплотипов *L. paradoxum*.

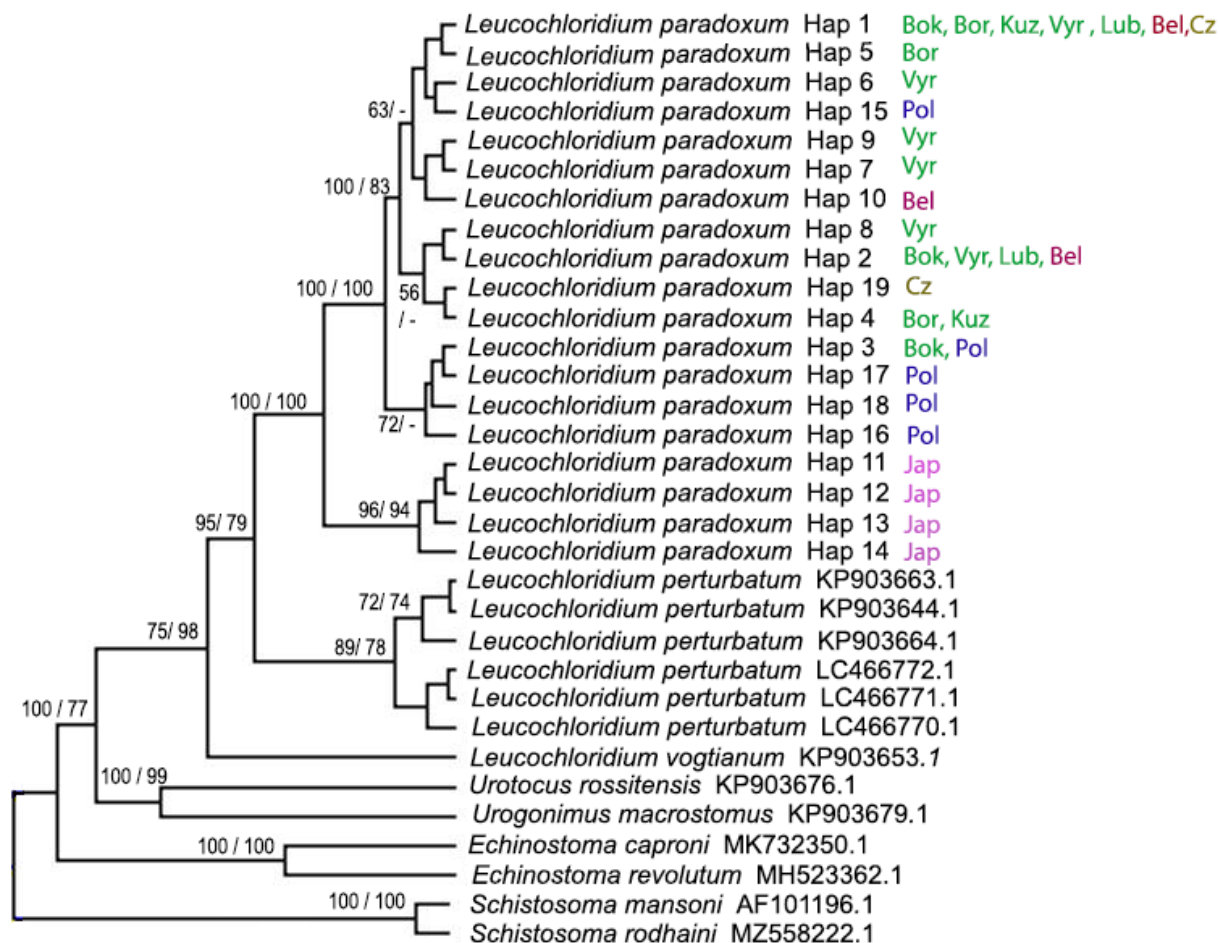


Рисунок 17. Байесовская филогенетическая реконструкция трематод сем. Leucochloridiidae на основе выравнивания фрагмента гена *cox1* (255 п. н.). Дерево, полученное методом ML, имело схожую топологию. Числа в узлах обозначают значения апостериорных вероятностей для ВА и бутстрепные поддержки для 1000 реплик для ML. Используемые последовательности и обозначения точек сбора представлены в таблице 10. Для внешних групп указаны номера последовательностей в GenBank.

Обсуждение

Вопрос о химической природе пигментов и механизме их распределения в тегументе отростков спороцист р. *Leucochloridium* до настоящего времени не решён (Атаев et al. 2013). Окраска отростков *L. paradoxum* безусловно зависит от степени их зрелости – меняется рисунок и цвет окраски (Usmanova et al., 2023). В частности, в дистальной части отростка изменяется цвет пигментированных пятен и штрихов с зелёного в бурый. Также при созревании отростков их окраска становится более яркой.

Тем не менее, выделенные четыре типа окраски спороцист *L. paradoxum* характеризуют внутривидовую вариабельность пигментации их отростков. Несмотря на установленные отличия, для всех вариантов окраски спороцист этого вида имеются общие

признаки (рис. 13). Так, для всех изученных спороцист характерны: тёмно-коричневый дистальный конец и расположенные ниже тёмно-коричневые пятна, и бугорки, а также два широких кольца тёмно-зелёного или оливково-коричневого цвета.

В пределах р. *Leucochloridium* описано ещё несколько видов со спороцистами, для которых характерно наличие в окраске отростков тех же цветов (рис. 18). Таковы, например, «зелёные» спороцисты, обнаруженные Вудхедом в моллюсках *S. retusa* на территории США (Woodhead, 1935) и буро-зелёные спороцисты из моллюсков *S. putris* с территории Ленинградской, а также Астраханской областей (Лутта, 1939; Гинецинская, 1954; Усманова, Прохорова, 2022). Но во всех этих случаях рисунок окраски отростков принципиально отличается от окраски обнаруженных спороцист *L. paradoxum*: так во всех представленных вариантах в верхней трети располагается полоса коричневого цвета разной ширины.

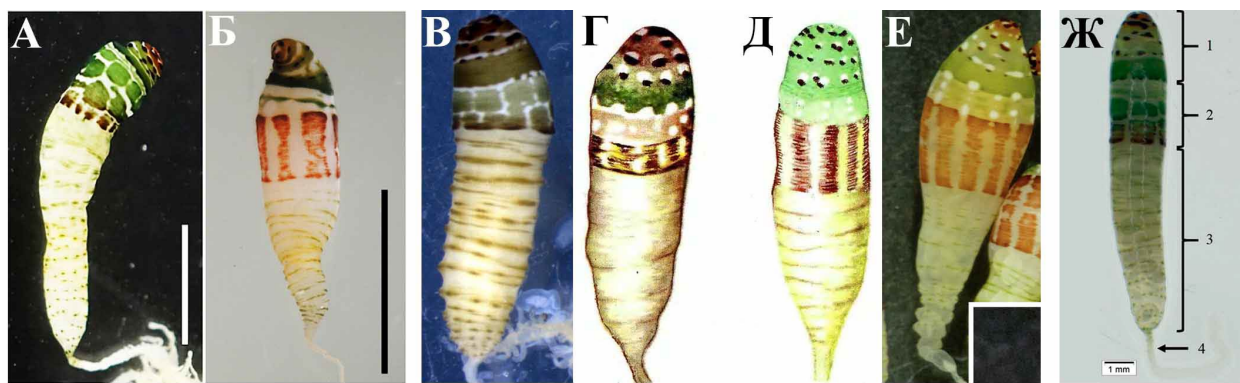


Рисунок 18. Зрелые отростки спороцист р. *Leucochloridium*, для которых характерна «зелёная» окраска. А – *L. paradoxum* из Японии, Б – *Leucochloridium* sp. из Японии (Nakao et al., 2019, с изм.), В – *Leucochloridium* sp. с территории Ленинградской области (Усманова, Прохорова, 2022, с изм.), Г – *Leucochloridium* sp. («буро-зелёная спороциста»), Д – зелёная спороциста Вудхеда (Гинецинская, 1968, с изм.), Е – *Leucochloridium* sp. из Японии (Sasaki et al., 2022, с изм.), Ж – *Leucochloridium* sp. из Японии (Ohari et al., 2019, с изм.).

В настоящее время для видовой идентификации беспозвоночных наряду с морфологическим анализом используется генотипирование по маркерным генам. Чаще других в роли маркеров используют гены рДНК.

Трематоды *L. paradoxum* характеризуются значительной генетической консервативностью по ядерным маркерам. Ранее было установлено, что все спороцисты *L. paradoxum* с территории России полностью идентичны по протяжённым последовательностям (около 5000 п. н.) рДНК, включая самые вариабельные её части – ITS1 и ITS2 (Zhukova et al., 2014). Незначительны отличия по участку рДНК и между близкими видами в пределах рода. Между *L. paradoxum* и *L. perturbatum* они составили 1,56% (Ataev et al. 2016). В то же время для других представителей сем. Leucochloridiidae – видов р.

Urogonimus – показаны намного большие межвидовые различия. По участкам ITS2 и 5,8S рДНК виды *U. certhiae* и *U. macrostomus* различаются на 6,50 и 6,10%, соответственно (Prokhorova et al., 2020b).

Вид *L. paradoxum* проявляет генетическую консервативность и по изученному митохондриальному маркеру. Несмотря на наличие более чем 20 гаплотипов фрагмента гена *cox1*, они незначительно отличаются друг от друга. В целом, значения генетических дистанций внутри вида *L. paradoxum* сопоставимы с внутривидовыми дистанциями других трематод сем. Leucochloridiidae. Для вида *L. perturbatum* они составляют 0,005–0,024, *L. vogtianum* – 0,004±0,003, *Urotocus rossitensis* – 0,036 (Heneberg et al., 2016; Nakao et al., 2019).

Топология филогенетической реконструкции на основе участка митохондриального генома (рис. 17) схожа с топологией реконструкции на основе участка ITS1-5.8S-ITS2 и фрагмента гена 28S (рис. 19) (Usmanova et al., 2023). В обоих случаях выделяются две основные клады *L. paradoxum* – японская и европейская.

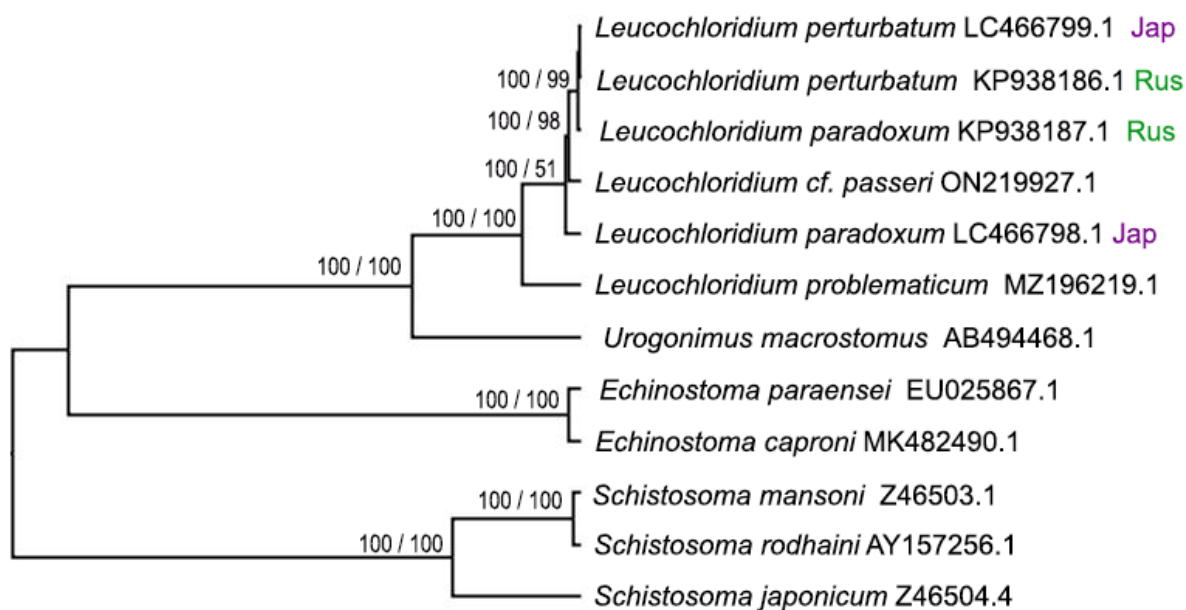


Рисунок 19. Байесовская филогенетическая реконструкция, построенная на основе выравнивания фрагмента 28S рДНК трематод (Usmanova et al., 2023). Дерево, полученное методом ML, имело схожую топологию. Числа в узлах обозначают значения апостериорных вероятностей для ВА и бутстрепные поддержки для 1000 реплик для ML. Условные обозначения: Rus – последовательности спороцист трематод р. *Leucochloridium* с территории России, Jap – с территории Японии. Для внешних групп указаны номера последовательностей в GenBank.

Обособляется японская группа гаплотипов *L. paradoxum* и на гаглосетях (рис. 15, 16). Различия между группами японских и европейских спороцист (0,0324) намного больше, чем средние внутривидовые генетические дистанции в сем. Leucochloridiidae, составляющие 0,005–0,010 (Heneberg et al., 2016). Таким образом, проведённый

морфологический и генетический анализ позволяют сделать предположение о принадлежности японских спороцист к отличному от *L. paradoxum* виду.

Трематоды *L. paradoxum* специфичны в отношении промежуточного хозяина – моллюсков *S. putris*, которые также характеризуется невысоким генотипическим разнообразием (Prokhorova et al., 2020a). Небольшое генотипическое разнообразие трематод и моллюсков может являться одним из условий существования специфичной паразит-хозяинной системы (см. Lively, Dybdahl, 2000; Carius et al., 2001; Mitta et al., 2017).

В литературе можно встретить данные о том, что *L. paradoxum* является паразитом и других представителей р. *Succinea*: *S. lauta* (Nakao et al., 2019), а также *S. altaica* (Соболева, Осиповская, 1979). Это подкрепляет сомнения в определении японских спороцист как *L. paradoxum*.

Также стоит отметить, что как для *S. lauta*, так и для *S. altaica* не проведена видовая идентификация с использованием генетических маркеров и в литературе приводятся только морфологические описания данных видов. Их таксономический статус нуждается в уточнении в виду широкого полиморфизма, характерного для сем. *Succineidae*. В разное время предлагалось около 30 названий янтарок родового ранга (Лихарев, Раммельмейер, 1983). По сведениям Шилейко, за последние два столетия было описано «бесчисленное множество видов «*Succinea*», анатомия многих из которых до сих пор неизвестна. Это привело к тому, что количество видов для большинства родов указывается только приблизительно, для многих из них неизвестны области распространения (Shileyko, 2007). Для территории СССР приводились данные о 18 видах из 6 родов сем. *Succineidae* (Лихарев, Раммельмейер, 1983). По данным на 2003 г. с территории Европы описано четыре вида из трёх родов (см. Datkauskienė, 2005). В современной монографии, посвящённой моллюскам с территории Чешской и Словацкой республик, описано всего четыре вида из четырёх родов (Horsák et al., 2013). Однако в подавляющем большинстве авторы при описании видов в определителях и монографиях опираются на морфологические критерии, что в случае с полиморфными янтарками нельзя считать достоверным.

В отношении окончательных хозяев трематоды р. *Leucochloridium*, по-видимому, менее специфичны. Так, мариты *L. paradoxum* могут заражать большинство видов птиц Европы (Kagan, 1952b; Леонов и др., 1965; Гвоздев, Соболева, 1978 и др.). Полученные нами данные свидетельствуют о том, что одни и те же гаплотипы характерны для спороцист, извлечённых из моллюсков и марит, извлечённых из птиц с территории Польши и Чехии – *Phylloscopus collybita*, *Parus major*, *Cyanistes caeruleus* (Нап_1 и Нап_3 по анализу участка *cox1* длиной 255 п. н.) (Heneberg et al., 2016; Rząd et al., 2023).

Возможно, мобильность птиц в период сезонных миграций и расселения в районе гнездований обеспечивает условия для генотипического разнообразия трематод *L. paradoxum*, развивающихся в улитках *S. putris*, относящихся к разным популяциям. Скорее всего, именно окончательный хозяин – птицы, который в данном жизненном цикле характеризуется большей мобильностью, влияет на генетическую структуру популяций паразита.

Подобное предположение высказывается относительно и других видов трематод. Так, Галактионов и Гончар отмечают подобную закономерность как свойственную для трематод *Tristriata anatis*. Их промежуточным хозяином являются литторины – *Littorina saxatilis* and *L. sitkana*, которые являются «местоприспособленными», в роли окончательного хозяина выступают утки. Именно птицы, активные хозяева, в данном жизненном цикле обеспечивают распространение паразита, а также обеспечивают генетический обмен между изолированными популяциями паразита (Gonchar, Galaktionov, 2020).

Наличие в жизненном цикле способных к миграциям активных хозяев – птиц, скорее всего, не единственный фактор, обуславливающий генетический полиморфизм *L. paradoxum*. Существует мнение о том, что на генетическую структуру популяций паразита влияет и степень специфичности к окончательному хозяину: чем ниже специфичность, тем выше генетическая изменчивость и ниже дифференциация из-за большего количества возможностей для потока генов (см. Vázquez-Prieto et al., 2015). Это применимо и к *L. paradoxum*, который является паразитом большого количества видов птиц.

III. 3. Развитие и размножение спорцист *L. paradoxum*

III. 3. 1. Развитие и размножение в экспериментальных условиях

Результаты

Развитие. Яйца *L. paradoxum* заполняют матку мари на всём её протяжении (рис. 20 А). В дистальном участке матки расположены зрелые яйца (рис. 20 Б), содержащие сформированных мирацидиев. Скорлупка яиц окрашена в коричневый цвет. Яйца овальной формы, для них характерна асимметричность: поверхность одной стороны более выпуклая по сравнению с противоположной (рис. 20 В). Размеры зрелых яиц составляют $26,0 \pm 0,7 \times 16,7 \pm 0,6$ мкм. На верхнем полюсе яйца расположен оперкулум.

Во внешней среде яйца находятся в покоящемся состоянии. Триггером вылупления мирацидиев является попадание яйца в кишечник моллюска (рис. 21 А).



Рисунок 20. А – марита *Leucochloridium paradoxum* возрастом 21 день. Б – участок тела мариты *L. paradoxum*. В – яйца *L. paradoxum* после прохождения через кишечник моллюска *Succinea putris*. Условные обозначения: б – брюшная присоска, к – оперкулум, пм – петля матки, р – реснички, с – яйцевая скорлупка. Звёздочка – яйцо с мирацидием.

После открывания крышечки из яйца выходит мирацидий каплевидной формы. Его размеры составляют $23,2 \pm 2,0 \times 10,7 \pm 0,5$ мкм. В мирацидии заметны около 10 клеток (рис. 21 Б). В передней части тела личинки расположено четыре крупных клетки со светлыми ядрами диаметром $3,3 \pm 0,2$ мкм (рис. 21 Г, Д). Эти клетки по морфологии схожи с секреторными клетками мирацидиев других видов (Атаев, Токмакова, 2018). Имеется ещё несколько клеток меньших размеров в каудальной части мирацидия. На переднем конце тела мирацидия располагается светопреломляющая структура заострённой формы длиной $3,3 \pm 0,2$ мкм – стилет (рис. 21 В–Д). Реснички не полностью покрывают тело личинки, а расположены двумя продольными рядами с одной стороны тела. Реснички длинные (4–5 мкм), в каудальной части образуют цирры, достигающие длины 8–10 мкм (рис. 21 В, Г).

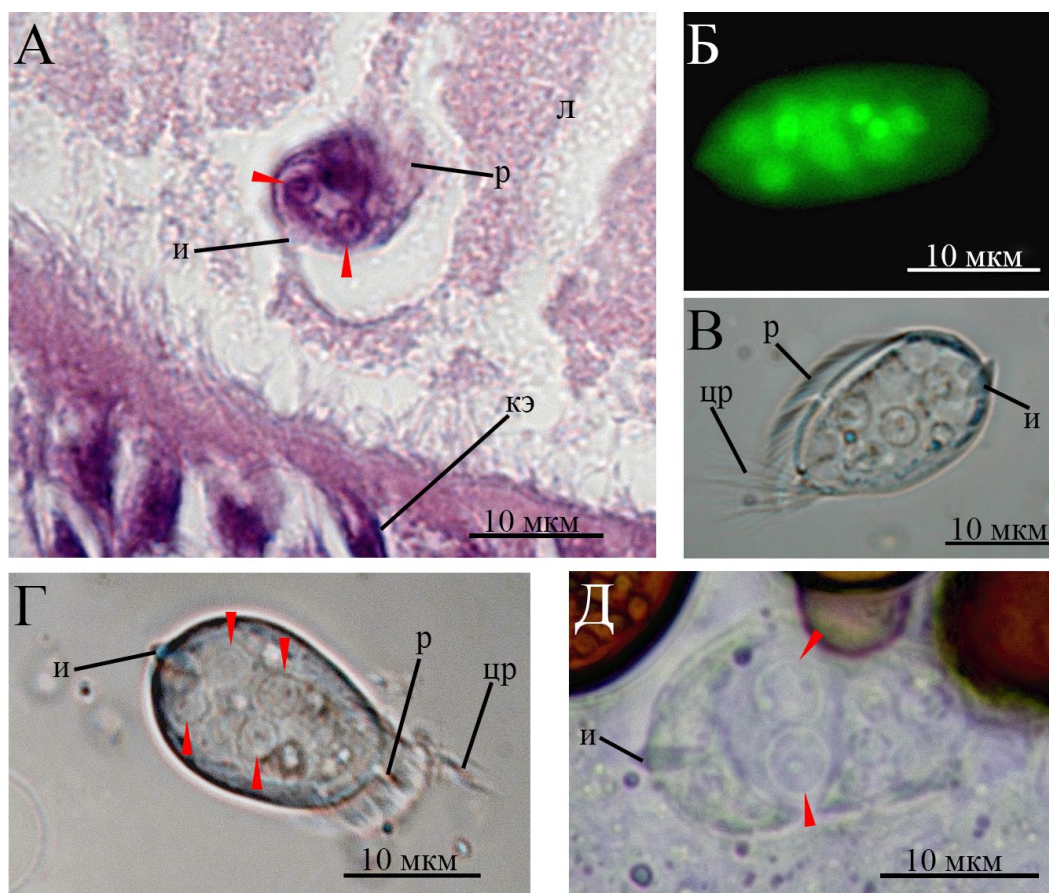


Рисунок 21. Мирацидий *Leucochloridium paradoxum*. А – мирацидий в кишечнике моллюска *Succinea putris* (гистологический срез). Б – мирацидий *in vitro*, окраска акридиновым оранжевым. Зелёный цвет – ядра клеток. В, Г, Д – мирацидий *in vitro*, режим фазового контраста. Условные обозначения: и – стилет, к – кишечный эпителий моллюска, л – просвет кишечника, р – реснички, ц – цирры. Красными стрелками показаны ядра предположительно секреторных клеток.

Через **7 дней** п. з. в просвете между ацинусами гепатопанкреаса видны округлые скопления клеток диаметром около 15 мкм (рис. 22 А). Они представляют собой эмбрионы партенит на стадии 10–12 бластомеров, в основном представленных макромерами (диаметр клетки $6,9 \pm 0,4 \times 5,7 \pm 0,5$ мкм; ядра $5,1 \pm 0,5 \times 4,2 \pm 0,2$ мкм; $n=6$). Характер дробления (полное, неравномерное), размеры и расположение бластомеров являются типичными для эмбрионального развития трематод (см. Galaktionov, Dobrovolskij, 2003).

Через **14 дней** п. з. спороцисты представлены эмбрионами овальной формы размером $34,1 \pm 2,1 \times 23,5 \pm 2,5$ мкм ($n=8$) (рис. 22 Б). В их состав входит 26–38 бластомеров, диаметр которых составляет в среднем $5,6 \pm 0,8 \times 4,5 \pm 0,7$ мкм, диаметр ядра – $4,6 \pm 0,4 \times 3,6 \pm 0,3$ мкм ($n=17$). На поверхности эмбрионов отчётливо видна зародышевая мембрана, что свидетельствует о достижении ими стадии «зародышевый шар» (Cheng, 1961).

Через **22 дня** п. з. эмбрионы увеличиваются до $37,7 \pm 4,0 \times 29,7 \pm 3,4$ мкм ($n=10$). Они состоят из более, чем 90 бластомеров, диаметр которых составляет $5,7 \pm 0,3 \times 4,8 \pm 0,5$ мкм,

диаметр ядра – $4,3 \pm 0,4 \times 3,6 \pm 0,3$ мкм ($n=17$). В центре зародыша появляется зачаток схизоцеля (рис. 22 В).

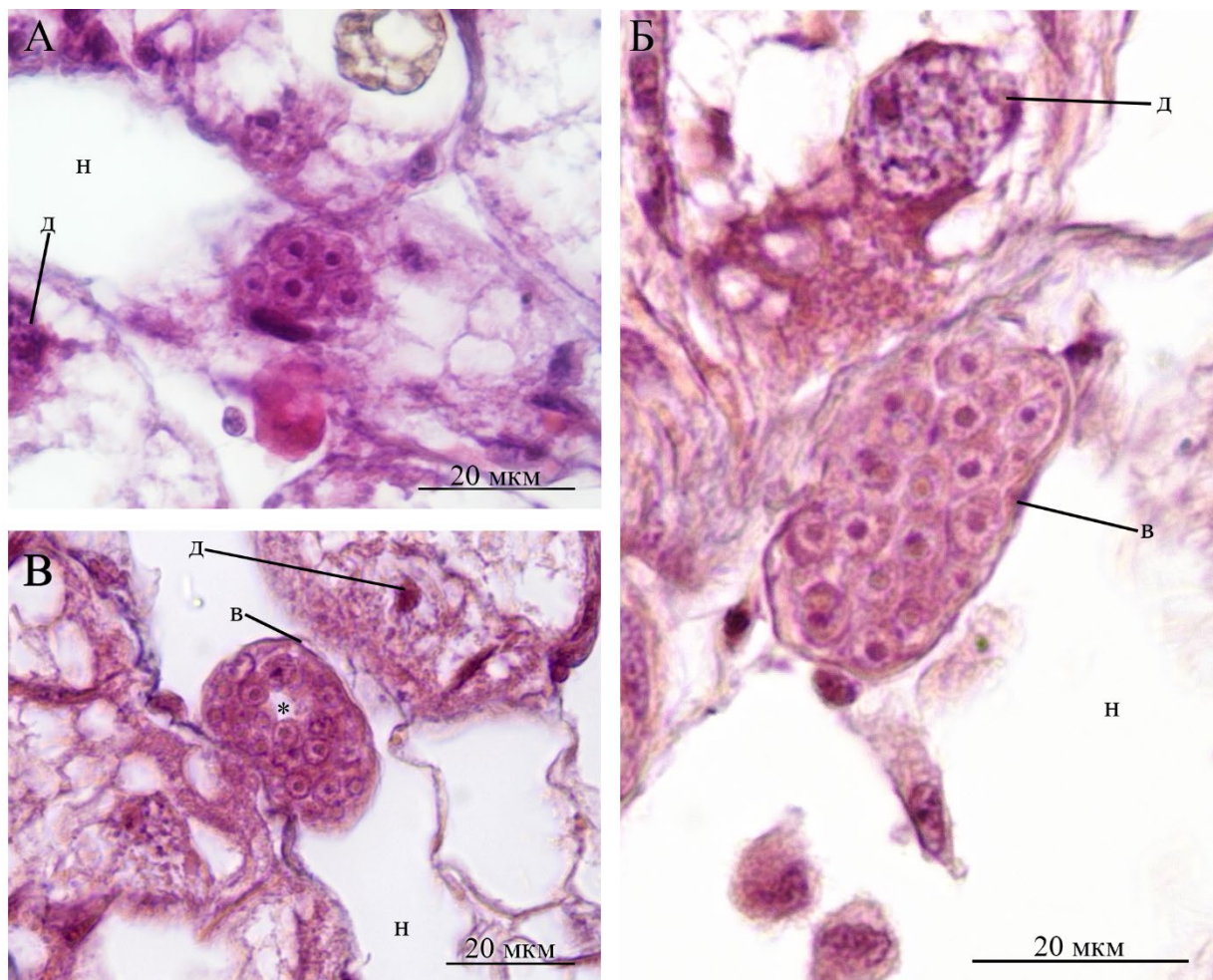


Рисунок 22. Спороциста *Leucochloridium paradoxum*: А - 7 дней п. з., Б – 14 дней п. з., В – 22 дня п. з. Условные обозначения: в – зародышевая мембрана, д – клетка гепатопанкреаса, н – пространство между ацинусами гепатопанкреаса. Звездочка – зачаток схизоцеля.

Через **55 дней** п. з. тело спороцисты уже представляет собой столон, размеры центральной части которого составляют 380×130 мкм. У спороцисты формируется до пяти отростков, длина наиболее крупных из них достигает 260 мкм (рис. 23). Однако отростки лишены просвета.

Развитие схизоцеля центральной части stolона сопровождается разрушением пристеночного слоя паренхимы, сохраняются только крупные скопления клеток, которые приурочены к местам формирования отростков. Появляются многочисленные пикнотические тельца и звёздчатые клетки. В результате в паренхиматозном матриксе образуются микрополости, в которых развиваются генеративные элементы. Последние представлены как эмбрионами метацеркарий, так и ГК. Наиболее крупные эмбрионы,

состоящие из 70–80 бластомеров, достигают 25 мкм в диаметре. Герминальные элементы развиваются либо в субтегументарной паренхиме либо в составе специализированных органов размножения партенит – в ГМ (см. р. «Размножение»).

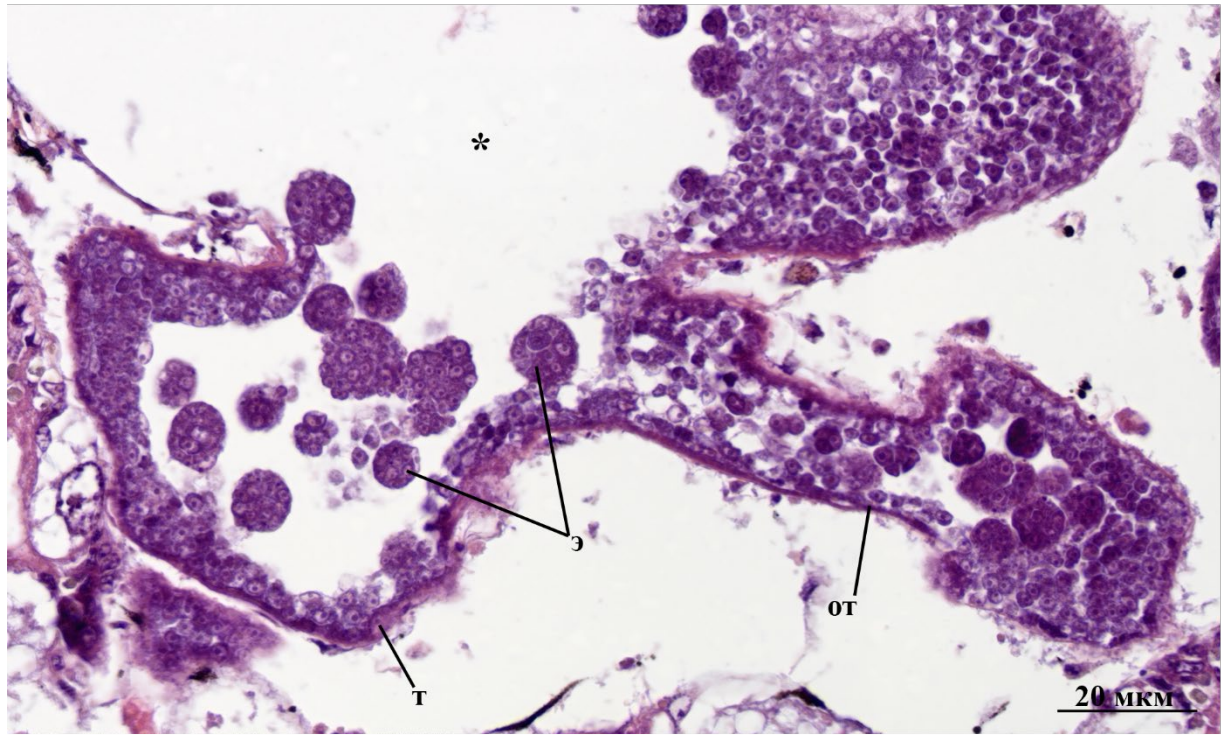


Рисунок 23. Спороциста *Leucochloridium paradoxum* через 55 дней п. з. Условные обозначения: от – отросток спороцисты, т – тегумент спороцисты, э – эмбрион метацеркарии. Звёздочка – схизоцель.

Через 72 дня п. з. размеры центральной части столона спороцисты достигают 270×145 мкм (рис. 24). Обширная зародышевая полость заполнена разновозрастными эмбрионами, диаметр самых крупных достигает 25 мкм. Здесь же расположены флотирующие или ещё контактирующие со стенкой тела ГМ. Полость схизоцеля отграничена от паренхимы выстилкой, образованной цитоплазматическими отростками звёздчатых клеток.

Спороциста имеет более пяти отростков, длина наиболее крупных из них достигает 356 мкм. В таких отростках уже сформирована полость, в которой находятся многочисленные эмбрионы. Однако в основании и апикальной части отростков остаются крупные скопления клеток. За счёт клеток в апикальной части происходит рост отростка в длину, а скопления клеток в основании участвуют в образовании боковых выростов отростков, которые формируются в процессе дальнейшего развития спороцисты.

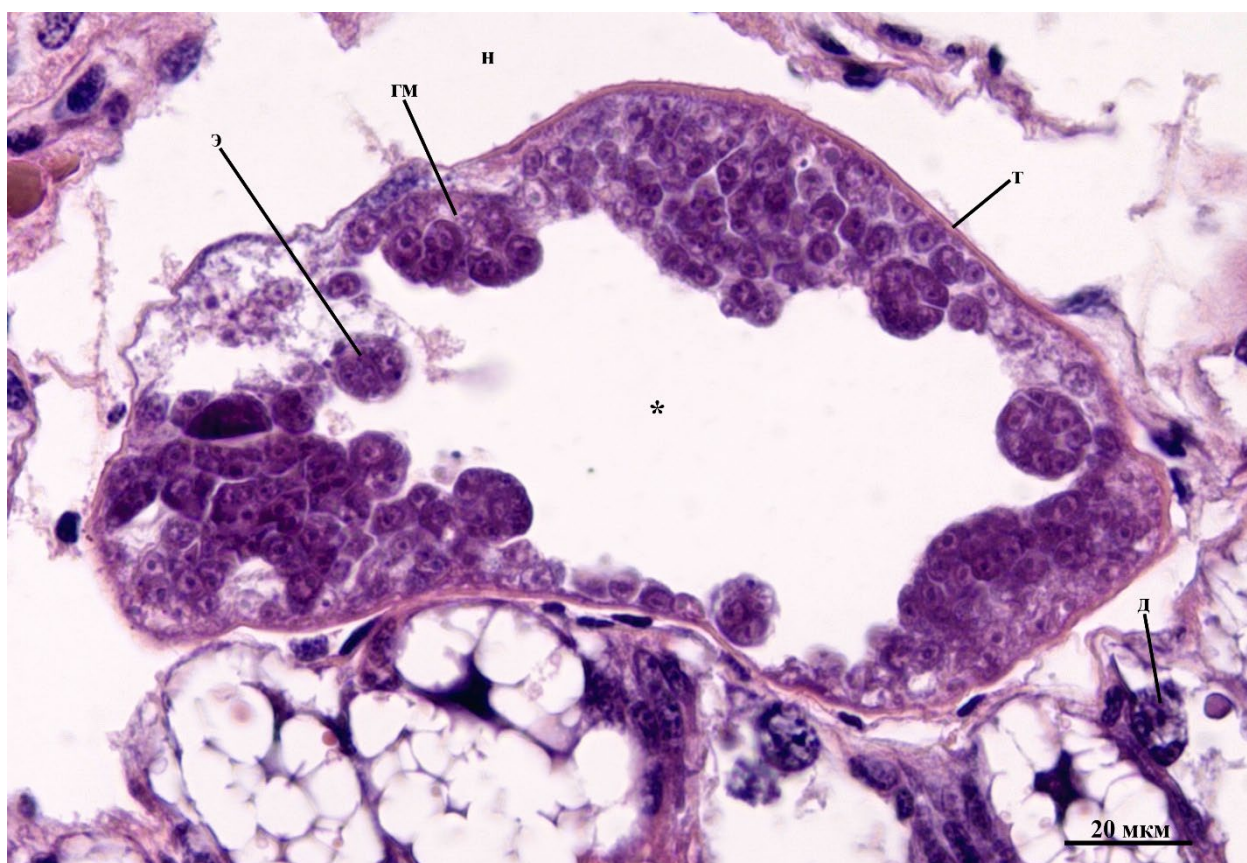


Рисунок 24. Центральная часть спороцисты *Leucochloridium paradoxum* через 72 дня п. з. Условные обозначения: гм – герминальная масса, д – клетка гепатопанкреаса, н – пространство между ацинусами гепатопанкреаса, т – тегумент спороцисты, э – эмбрион метацеркарии. Звёздочка – схизоцель.

Через **95 дней** п. з. спороцисты принимают сложную форму. Центральная часть столона разрастается в разных направлениях, её размер достигает 554×1120 мкм (рис. 25). Спороциста имеет более 5 отростков, их длина достигает 675 мкм. Самые крупные отростки характеризуются развитым схизоцелем, в проксимальной части от них отходят боковые выросты (рис. 25 Б).

Стенка тела центральной части столона спороцисты истончается. В зародышевой полости заметны многочисленные эмбрионы, большинство из которых находится на ранних стадиях развития, однако встречаются и зародыши, в которых заметны морфогенетические преобразования. Диаметр наиболее крупных из них, имеющих в своём составе более 600 бластомеров, достигает 70–80 мкм.

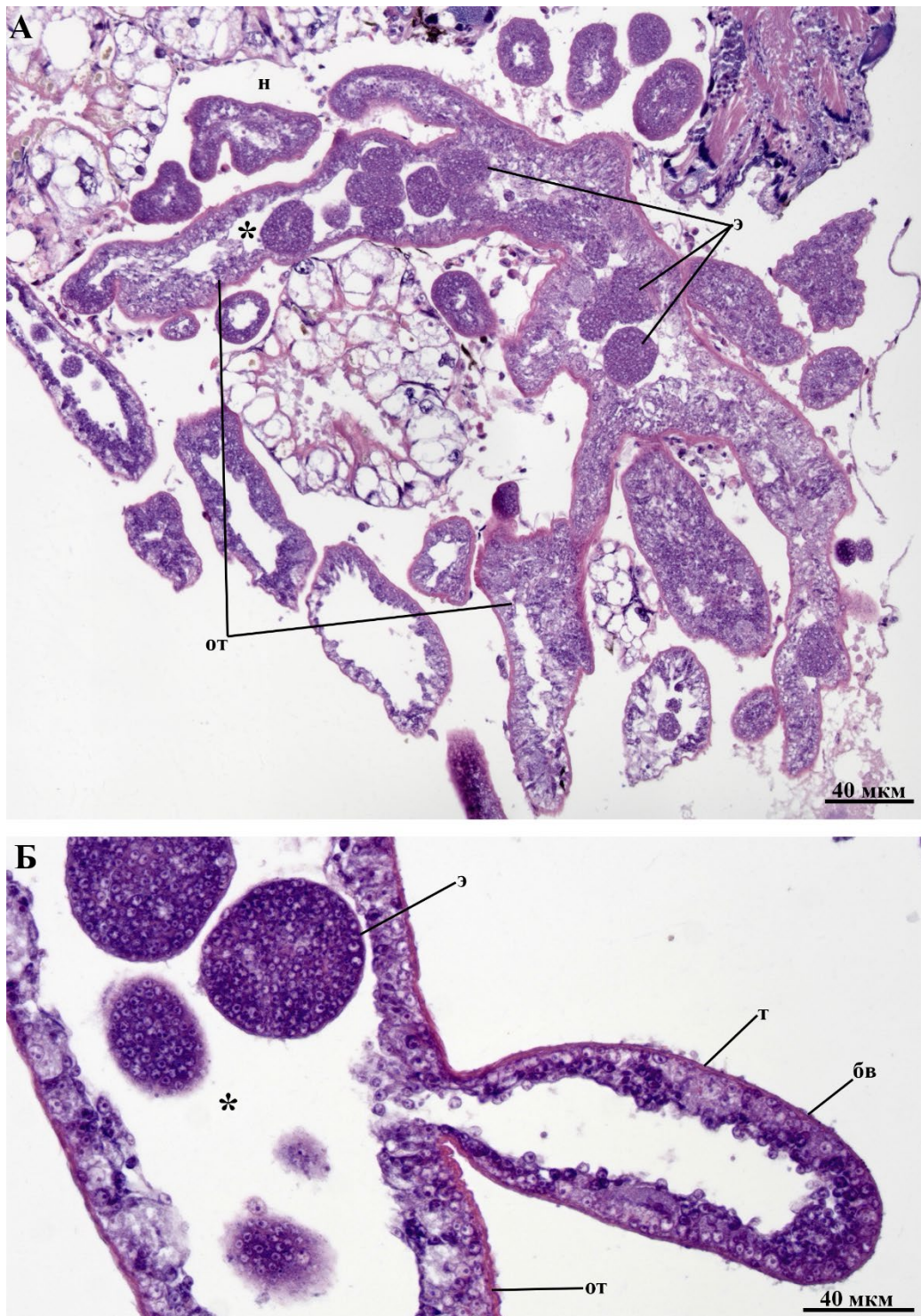


Рисунок 25. Спорциста *Leucochloridium paradoxum* через 95 дней п. з. А – центральная часть столона с отростками. Б – участок отростка с боковым выростом. Условные обозначения: бв – боковой вырост отростка, н – пространство между ацинусами гепатопанкреаса, от – отросток, т – тегумент спорцисты, э – эмбрион метацеркарии. Звёздочка – схизоцель.

Размножение. Через 55 дней п. з. в спорцисте обнаруживаются генеративные элементы. В таком возрасте тело спорцисты представляет собой стolon с формирующимися отростками. ГК и эмбрионы развиваются как в расположенном субтегументарно паренхиматозном матриксе, так и в составе ГМ.

Мы предлагаем обозначать ГК, которые развиваются вне ГМ как «свободные» ГК. В результате их дробления образуются эмбрионы, ранние этапы развития которых проходят в паренхиматозном матриксе. По мере дегенерации матрикса и роста эмбрионов последние открепляются от стенки тела и переходят к самостоятельному флотированию в схизоцеле центральной части столона. Свободные ГК и эмбрионы отмечаются и в паренхиме, полностью заполняющей отростки (зародышевая полость в которых ещё не сформирована).

Одновременно как в субтегументарной паренхиме центральной части столона спороцисты, так и в паренхиме отростков видны ГМ. На этом сроке развития партенит встречаются молодые ГМ (рис. 26 А). Они представляют собой впаянные в субтегументарную паренхиму или связанные с ней пластинчатыми структурами образования из 15–20 клеток размером не более 14×18 мкм. Среди клеток можно выделить 2 типа, которые отличаются особенностями морфологии и размерами. У клеток первого типа крупные светлоокрашенные ядра размером $6,21 \pm 0,34 \times 4,95 \pm 0,26$ ($n=10$). Клетки второго типа имеют размер $6,04 \pm 0,12 \times 5,45 \pm 0,18$, тёмноокрашенное ядро – $4,90 \pm 0,41 \times 3,71 \pm 0,10$ ($n=15$). В составе таких ГМ можно наблюдать эмбрионы на стадии нескольких бластомеров.

Крупные герминальные массы этого возраста имеют овальную форму, их размеры достигают 30×40 мкм (рис. 26 Б). По мере роста в них закладываются эмбрионы, и герминальные массы приобретают радиальную структуру: в центре расположены ГК и маленькие эмбрионы, а по периферии – более крупные эмбрионы. Количество клеток в маленьких эмбрионах не превышает 10–15. Они лишены защитных структур и называются «голый эмбрион» (Cheng, 1961). В дальнейшем вокруг эмбриона формируется зародышевая мембрана. После её формирования, зародыши состоят из 25–30 бластомеров и достигают стадии зародышевого шара. Достигшие этой стадии развития эмбрионы могут открепляться от ГМ, попадая в схизоцель.

Разрушение паренхимы может приводить к откреплению одной или нескольких герминальных масс от стенки тела спороцисты и переходу к флотированию в схизоцеле рядом с эмбрионами. Открепляются эмбрионы и герминальные массы не одновременно, а некоторое время остаются связанными со стенкой тела за счет цитоплазматических отростков звёздчатых клеток. В результате по границе схизоцеля выстраиваются многочисленные герминальные массы и эмбрионы. В небольших отростках свободные ГК, эмбрионы и герминальные массы ещё впаяны в паренхиматозный матрикс.

Через 72 дня п. з. общая картина развития герминального материала в спороцисте в целом сохраняется. Основное отличие заключается в относительном увеличении зародышевой полости центральной части столона, а также формировании просвета внутри

отростков. В схизоцеле находятся многочисленные разновозрастные эмбрионы и ГМ размером 30×40 мкм, в которых развивается до 10 эмбрионов. Дегенерационные процессы в паренхиме приводят к её разрыхлению и истончению в центральной части столона. Между её клеток появляются большие пустоты, встречаются скопления пикнотических телец. В результате герминальный материал распределён в субтегументарном слое неравномерно.

Через **95 дней** п. з. стенка центральной части столона истончается. В сохранившейся здесь паренхиме встречаются отдельные эмбрионы. Основные процессы созревания герминального материала теперь приурочены к зародышевой полости, где уже встречаются крупные эмбрионы, в которых начинаются морфогенетические преобразования (см. р. «Развитие метацеркарий»). Однако наряду с ними в схизоцеле флотируют небольшие эмбрионы. Важно отметить, в это время в спороцисте заметно снижается количество ГК, как свободных, так и развивающихся в составе ГМ. Последние имеют неправильную, близкую к овальной форму, их размер достигает 90×50 мкм (рис. 26 В). В составе ГМ наблюдается 20–40 эмбрионов, самые крупные из них расположены по периферии и достигают диаметра 30 мкм.

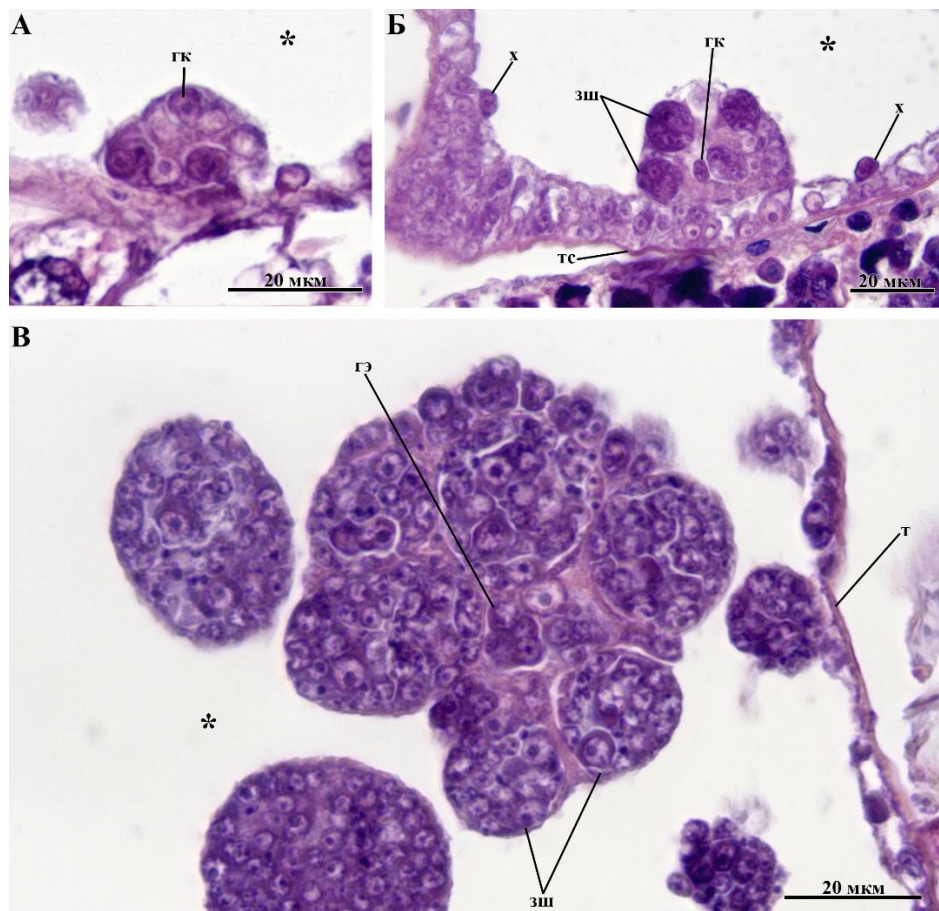


Рисунок 26. Герминальные массы спороцист *Leucochloridium paradoxum*. А – молодая. Б – зрелая герминальная масса, занимающая пристеночное положение. В –

флотирующая зрелая герминальная масса. Условные обозначения: гк – генеративная клетка, гэ – голый эмбрион, зш – зародышевый шар, т – тегумент спороцисты, х – свободная генеративная клетка, . Звёздочка – схизоцель.

Развитие метацеркарий. Метацеркарии формируются в результате дробления ГК, которые лежат свободно в схизоцеле рядом со стенкой тела спороцисты, или ГК в составе ГМ.

Результатом первых дроблений является формирование эмбрионов, состоящих из 4–6 бластомеров (размер клеток $5,48 \pm 0,29 \times 4,80 \pm 0,23$ мкм, диаметр ядра $4,03 \pm 0,22 \times 3,48 \pm 0,22$ мкм, $n=15$) (рис. 27 А). В результате дальнейших дроблений формируются зародышевые шары – эмбрионы, покрытые зародышевой мембраной, диаметром от 14 до 70 мкм (рис. 27 Б, В). Клетки в их составе также отличаются по размерам и варьируют от 3 до 6–7 мкм в диаметре (размер ядра $4,54 \pm 0,09 \times 3,93 \pm 0,08$ мкм, $n=30$). В ходе дальнейшего развития практически нивелируются различия в размерах между клетками в составе эмбриона, такие зародыши имеют овальную форму, длину более 70 мкм, диаметр 60–70 мкм. Затем начинается морфогенез: происходит закладка ротовой и брюшной присоски, а также ветвей кишечника (рис. 27 В). Такие эмбрионы имеют в составе более 600 бластомеров (размер ядра $5,40 \pm 1,10 \times 4,73 \pm 0,08$, $n=30$). У метацеркарии на поздних этапах морфогенеза различимы ротовая и брюшная присоска, глотка, ветви кишечника, а также зачаток половой системы (рис. 27 Г).

Зрелые инвазионные метацеркарии были обнаружены в спороцистах из природнозаражённых моллюсков. Они характеризуются наличием полупрозрачной цисты (рис. 6), размерами 1200×800 мкм.

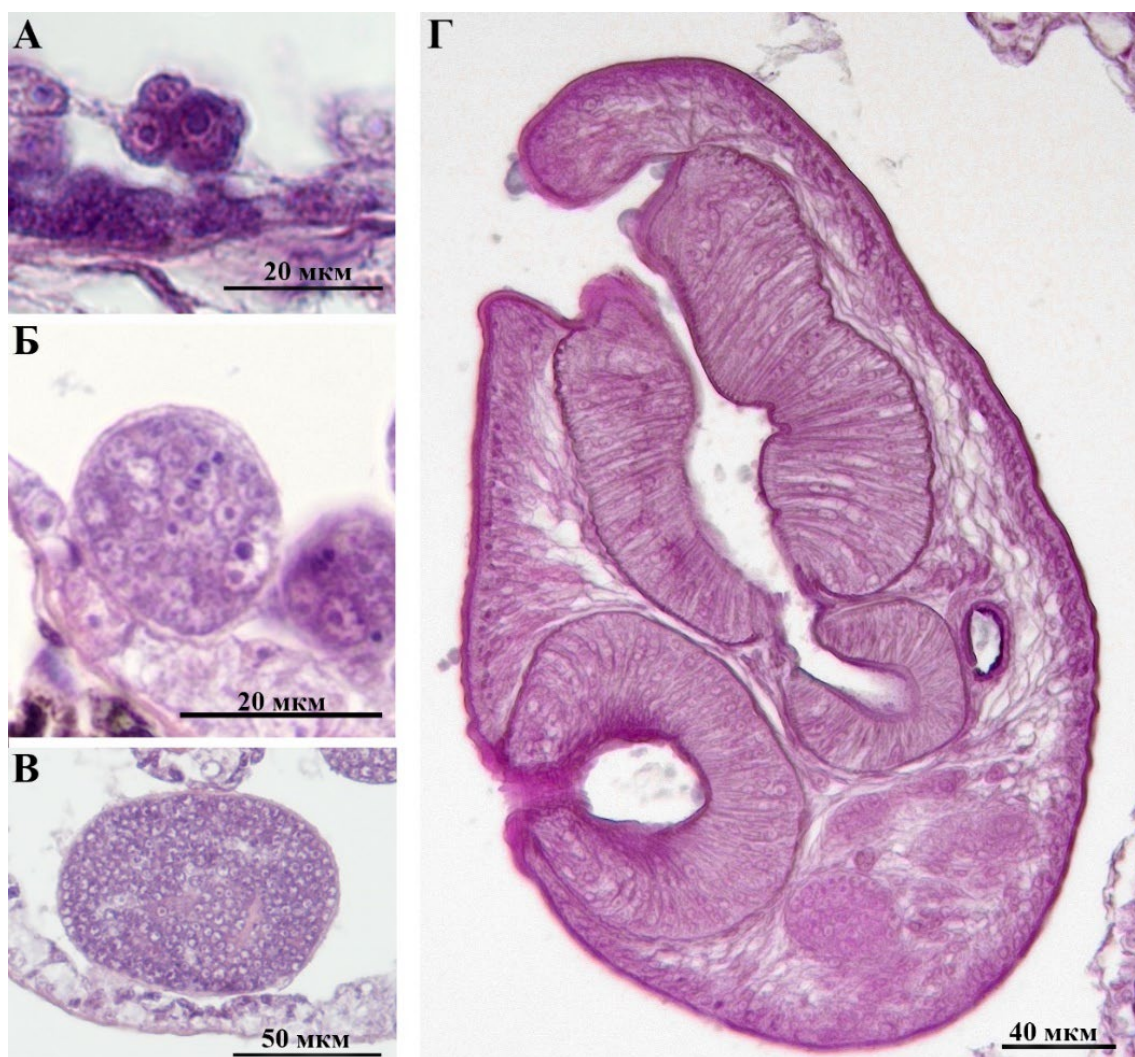


Рисунок 27. Этапы развития метацеркарий *L. paradoxum*. А – эмбрион метацеркарии на стадии нескольких бластомеров. Б – эмбрион метацеркарии на стадии зародышевого шара. В – эмбрион метацеркарии на ранних этапах морфогенеза. Г – поздние этапы морфогенеза метацеркарии.

Обсуждение

Мирацидий. В литературе содержится мало сведений о строении мирацидиев сем. Leucochloridiidae, наиболее полное описание выполнено Каган для личинки вида *Neoleucochloridium problematicum* (Kagan, 1952a). Есть данные о строении мирацидиев трематод из филогенетически близкого сем. Brachylemidae: *Postharmoostomum helicis* (Ulmer, 1951). Все эти исследования выполнены на светооптическом уровне.

Мирацидии *L. paradoxum* характеризуются пассивной стратегией заражения промежуточного хозяина. Это характерно и для других представителей сем. Leucochloridiidae, жизненный цикл которых протекает в наземной среде (Галактионов, Добровольский, 1998; Rojmanska, 2002). Мирацидий трематод исследуемого вида – небольших размеров ($23,2 \pm 2,0$ мкм). Размеры других личинок трематод с пассивной

стратегией заражения промежуточного хозяина также не превышают 60 мкм, в то время как мирацидии с активной стратегией значительно крупнее – 80–150 мкм (Семёнов, 1991).

Реснички личинки *L. paradoxum* приурочены к ограниченной области тела, что может свидетельствовать о редукции числа эпителиальных пластинок (см. Галактионов, Добровольский, 1998). Подобная особенность морфологии характерна как для личинок сем. Leucochloridiidae, так и близкородственного сем. Brachylemidae (Robinson, 1949). Каган отмечает, что покровы мирацидия *Neoleucochloridium problematicum* представлены пятью ресничными пластинками, причём расположенная на заднем конце тела несёт длинные каудальные реснички. Подобным образом устроен и ресничный аппарат личинки *L. paradoxum*. Видимо, именно длинные реснички Гекерт (Heckert, 1889) принял за хвост.

Несмотря на редукцию ресничного аппарата, мирацидии *L. paradoxum* активно перемещаются в кишечнике хозяина, что удалось наблюдать на мазках кишечного содержимого. В свободном пространстве локомоция осуществляется за счёт ресничек. При столкновении личинки с какими-либо объектами, можно наблюдать перистальтические движения, которые, очевидно, реализуются за счёт мышечного аппарата.

На переднем конце тела мирацидия расположен аппарат проникновения, связанный с церебраториумом. У мирацидиев с пассивной стратегией заражения он упрощается (Галактионов, Добровольский, 1998). Исследования, проведённые на светооптическом уровне, не позволяют с точностью говорить об организации аппарата проникновения *L. paradoxum*. Однако, нам удалось обнаружить крупную светопреломляющую структуру на переднем конце тела личинки – стилет. Стилет ранее был описан как для представителей сем. Leucochloridiidae (Kagan, 1952a), так и для брахилемид (Ulmer, 1951; Lewis, 1969) и трематод из других семейств (McMichael-Phillips et al., 1992; Smirnov, Dobrovolskij, 2019). Мирацидий *L. paradoxum*, вероятнее всего, использует стилет для проникновения через кишечный эпителий янтарки, а также последующей миграции к месту окончательной локализации.

В целом для мирацидиев с пассивной стратегией заражения характерна малоклеточность. Нами было обнаружено порядка 10 клеток в составе личинки, Гекерт свидетельствует о 20 клетках, составляющих тело *L. paradoxum* (Heckert, 1889), у близкородственного вида *Neoleucochloridium problematicum* отмечено 12 клеток (Kagan, 1952a). Особый интерес представляют небольшие клетки в задней части тела мирацидия, среди которых, по нашему мнению, располагается и ГК.

Дочерняя спороциста. Самый ранний срок, на котором нам удалось обнаружить спороцисту – 7 дней п. з. В этом возрасте она представляет собой эмбрион, у которого ещё не сформирована зародышевая мембрана. Это свидетельствует о том, что спороциста *L.*

paradoxum является дочерней. Скорее всего, сома мирацидия после миграции личинки к месту окончательной локализации, не претерпевает регрессивный метаморфоз, а подвергается дегенерации. Развитие дочерней спороцисты, вероятно, осуществляется за счёт ГК, которые начинают дробиться, формируя эмбрион.

В результате постановки жизненного цикла *L. paradoxum* в лабораторных условиях, нам удалось получить спороцист на разных сроках развития – 7, 14, 22, 55, 72 и 95 дней п. з. Подобные исследования этого вида дигеней были выполнены в конце XIX века Гекертом (Heckert, 1889). Анализ полученных в ходе эксперимента данных позволяет отметить разницу в темпах развития спороцист: спороциста в возрасте 14 дней п. з. (рис. 22 Б) соответствует по морфологии спороцисте в возрасте 6 дней, описанной Гекертом (Heckert, 1889), спороциста в возрасте 22 дня п. з. (рис. 22 В) – спороцисте в возрасте 10 дней, спороциста в возрасте 55 дней п. з. (рис. 23) – спороцисте в возрасте 28–35 дней, спороциста в возрасте 95 дней п. з. (рис. 25) – спороцисте в возрасте 49–56 дней.

Полученные нами результаты схожи с данными этого исследователя, но спороцисты развивались примерно в полтора раза медленнее. Однако следует отметить, что в обоих случаях развитие происходило по схожей схеме: увеличение количества клеток в составе эмбриона на ранних стадиях, последующее формирование схизоцеля, оформление сложного столона, дифференцированного на центральную часть и отростки. Быстрее идёт развитие и близкородственного вида *Neoleucochloridium problematicum*. Первые инцистированные метацеркарии обнаруживаются в спороцисте через 58 дней п. з., а у спороцисты *L. cyanocittae* через 53 или 118 дней п. з. появляются окрашенные отростки (Kagan, 1952a).

Разницу в темпах развития можно объяснить совокупностью факторов. Первый из них – это температура. К сожалению, в монографии Гекерт не приводит данных о температурных показателях окружающей среды, хотя этот фактор является важнейшим регулятором скорости развития и размножения партенит трематод (Pfluger, 1980; Атаев, 1991).

Помимо этого, на скорость развития могла повлиять интенсивность инвазии. Нам не известна доза заражения моллюсков мирацидиями, но интенсивность инвазии превышала 10 спороцист, а в отдельных случаях составляла несколько десятков.

Размножение спороцист. У спороцист в возрасте 55 дней были обнаружены ГМ. Эти структуры в настоящее время признаются универсальными органами размножения партенит трематод (Dobrovolskij, Ataev, 2003). Выделяют разные варианты организации ГМ: от впаянных в субтегументарный матрикс до свободно флотирующих в схизоцеле (Атаев, 2017). Описанные для дочерних спороцист *L. paradoxum* ГМ закладываются в

субтегументарном матриксе, а затем переходят к флотированию в схизоцеле. Подобный вариант ГМ был ранее описан для трематод *Xiphidiocercaria* sp. VII (Trematoda: Plagiorchiidae) (Мухамедов, 1979).

По мере перехода ГМ к флотированию наблюдаются изменения в её структуре. Когда ГМ связана с субтегументарной паренхимой, эмбрионы располагаются только на стороне, обращённой в схизоцель. У флотирующих ГМ наблюдаются эмбрионы по периферии с разных сторон.

В состав «классической» ГМ входят НК, ГК и эмбрионы (Dobrovolskij, Ataev, 2003). Однако было показано, что на гистологическом уровне НК и ГК неразличимы (Ataev et al., 2018). В составе ГМ *L. paradoxum* были обнаружены крупные клетки с пузырьковидным ядром, похожие на ГК других видов трематод. Можно предположить, что в составе ГМ нет НК. Это может быть связано с особенностями биологии спороцист: ранее было отмечено, что в случае, когда дочерние организмы не покидают тело материнского, в состав ГМ могут входить «возрастные» («even-aged») ГК. В этом случае пролиферация НК заканчивается на ранних этапах развития спороцист. Сформированные ГК в составе ГМ только созревают и дробятся (Dobrovolskij, Ataev, 2003). Подобный пример, когда размножение партениты, по сути, заканчивается на ранних этапах её развития, характерен для микрофаллид. Например, у *Microphallus pygmaeus* метацеркарии становятся инвазионными прямо в спороцисте и сохраняются в ней достаточно долго (см. Добровольский и др., 1983).

Функционирующие ГМ наблюдаются у спороцист, начиная с 55 дней п. з. Однако уже в этом возрасте в схизоцеле партенит присутствуют эмбрионы на ранних стадиях развития. Это свидетельствует о возможности закладки первых зародышей в спороцисте до появления оформленных ГМ с характерной структурой. Ранее «свободные ГК», расположенные на внутренней стенке тела спороцисты ранее были описаны как «диффузная» ГМ (см. Dobrovolskij, Ataev, 2003). У *Haplometra cylindracea* закладка таких центров мультипликации идёт следующим образом: герминальный материал, представляющий собой единый зачаток, распределяется в материнском организме по мере формирования схизоцеля (Dobrovolskij, Ataev, 2003). В онтогенезе партенит *L. paradoxum* свободные ГК появляются раньше ГМ. За счёт их деятельности может происходить наполнение эмбрионами метацеркарий растущих отростков. По-видимому, наличие как свободных ГК, так и оформленной ГМ играет важную роль в пространственной изоляции сформированных асинхронно эмбрионов: так развивающиеся в составе оформленных ГМ зародыши изолированы от формирующихся в схизоцеле подвижных метацеркарий (см. Добровольский и др., 1983).

Собственные результаты и анализ литературных источников позволяют предположить, что для развития метацеркарий *L. paradoxum* характерен прогенез: в зрелых личинках заметны основные элементы половой системы (Zeller, 1874; Heckert, 1889 и др.), что ускоряет процесс маритогонии в окончательном хозяине. Первые яйца в условиях эксперимента были обнаружены через 13 дней п. з., спустя 21–23 дня п. з. яйца были уже инвазионными. По сведениям других исследователей, инвазионные яйца появляются через 6–14 дней п. з. (Zeller, 1874; Heckert, 1889; Lewis, 1977). Т. А. Гинецинская отмечает, что в тех случаях, когда органогенез осуществляется на фазе метацеркарии, мариты трематод зачастую характеризуются широкой специфичностью по отношению к окончательному хозяину (см. Гинецинская, 1968). Это характерно и для *L. paradoxum* (см. р. I. 2.).

Кроме того, такая способность метацеркарий к прогенезу может являться ещё одним способом для более успешной передачи инвазии промежуточному хозяину. Вероятно, благодаря прогенезу личинок, мигрирующие птицы успевают не только заразиться трематодами *L. paradoxum* в определённом биотопе, но и заразить яйцами этого паразита новых улиток, обитающих в нём или на соседних территориях, куда перелетают в поисках мест для гнездовья или питания. Возможность такого распространения инвазии может быть связана с мозаичным распространением янтарок в природе. Подобная экологическая стратегия наиболее выражена среди представителей таких семейств трематод как Microphallidae и Gymnophallidae: их мариты начинают производить яйца уже через несколько часов п. з., что позволяет рассеять их в близких от мест заражения биотопах. Это, в свою очередь повышает вероятность заражения первого промежуточного хозяина (Галактионов, 2016).

III. 3. 2 Развитие и размножение спороцист *L. paradoxum* в природнозаражённых моллюсках

Результаты

На протяжении тёплого сезона (с апреля до сентября) в природе встречаются моллюски *S. putris*, заражённые разновозрастными спороцистами *L. paradoxum*. С учётом результатов экспериментального изучения жизненного цикла трематод этого вида (см. р. III. 3. 1) мы выделяем в развитии спороцист несколько основных стадий. Важно отметить, что тело самых молодых спороцист из природнозаражённых моллюсков уже представляло собой столон с формирующимися отростками. Более ранние этапы развития (эмбриональные) мы наблюдали только в экспериментально заражённых улитках (см. раздел III. 3. 1.).

(1) Стадия ювенильной спороцисты включает развитие спороцист от появления первых отростков до формирования зрелых отростков. Минимальные размеры партенит из

природнозаражённых янтарок составили $1,2 \times 1,0$ мм (рис. 28). Покровы таких спороцист полупрозрачные. В схизоцеле центральной части столона располагаются эмбрионы метацеркарий. Имеется 10–15 тонких отростков, их длина составляет 0,5–1,9 мм.

Позднее центральная часть столона увеличивается до $2,3 \times 0,9$ мм. От неё отходит множество отростков, среди которых выделяется до 10 более крупных (длина 6,1–9,0 мм), с боковыми выростами у основания. В полости этих отростков, как и в центральной части столона расположены разновозрастные зародыши метацеркарий.

Стенка тела спороцисты на стадии ювенили сохраняет мощный субтегументарный слой (толщина 120 мкм). Единый схизоцель занимает центральную часть столона и заходит в крупные отростки, в то время как маленькие выросты столона заполнены паренхиматозным матриксом.

В пристеночной паренхиме центральной части столона видны ГМ. В их составе находятся ГК, а также эмбрионы на ранних стадиях развития (голый эмбрион, зародышевый шар).

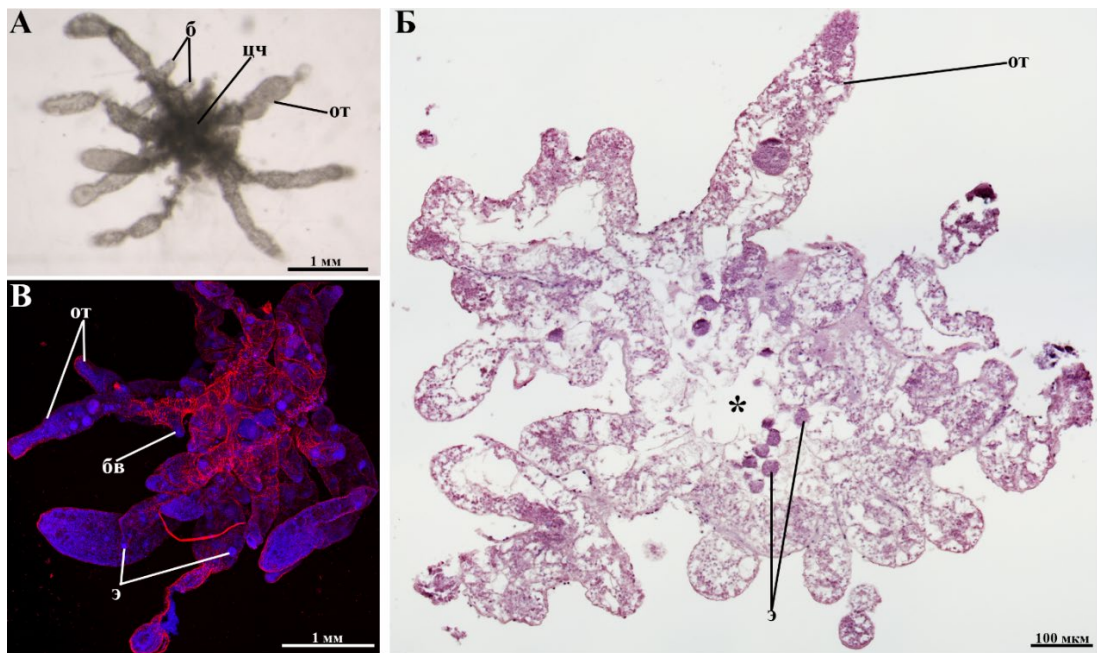


Рисунок 28. Спороциста р. *Leucochloridium* на ювенильной стадии развития. А – внешний вид, Б – гистологический срез. В – снимок с конфокального микроскопа: красный цвет – актиновые микрофиламенты, синий – ядра клеток. Условные обозначения: бв – боковой вырост отростка, от – отросток, цч – центральная часть столона, э – эмбрион метацеркарии. Звёздочка – схизоцель.

(2) Стадия зрелой спороцисты. Основное отличие этой стадии от предыдущей заключается в наличии у спороцисты 1–5 окрашенных отростков (рис. 29). Центральная часть столона представляет собой переплетение тонких выростов, непрозрачные покровы которых имеют желтоватый оттенок. Её размеры достигают $11,9 \times 11,9$ мм.

От центральной части столона отходит множество отростков разной длины. Среди них есть более молодые тонкие отростки с полупрозрачными покровами (длиной от 2,5 мм), в полости которых заметны отдельные эмбрионы метацеркарий. Наиболее крупные отростки достигают длины 17,8 мм. Они плотно заполнены инвазионными метацеркариями в многослойных цистах (наибольшее число 373). Такие отростки ярко окрашены, соединены с центральной частью столона сократимыми трубчатыми участками и способны к пульсации. Наряду с бесцветными и зрелыми яркоокрашенными отростками спороцисты могут иметь несколько отростков, покровы которых слабо окрашены. Они также заполнены метацеркариями и зачастую способны к пульсации.

В партенитах на стадии зрелой спороцисты наблюдаются как одиночные эмбрионы, так и зародыши в составе ГМ. Последние располагаются как в пристеночной паренхиме, так и в зародышевой полости центральной части столона. В отростках на этой стадии развития центров размножения не обнаружено.

Партениты на стадии зрелости характеризуются высокой репродуктивной активностью. У них продолжается образование новых эмбрионов за счёт свободных и развивающихся в составе ГМ ГК, а в схизоцеле наблюдаются многочисленные зародыши на разных стадиях развития.

Однако уже на этой стадии у спороцист становятся заметны признаки дегенерации, проявляющиеся в снижении репродуктивной активности. Постепенно истончается паренхиматозный матрикс. Многие клетки в его составе превращаются в пикнотические тельца, либо разрушаются. В паренхиме становятся все более редки генеративные элементы.

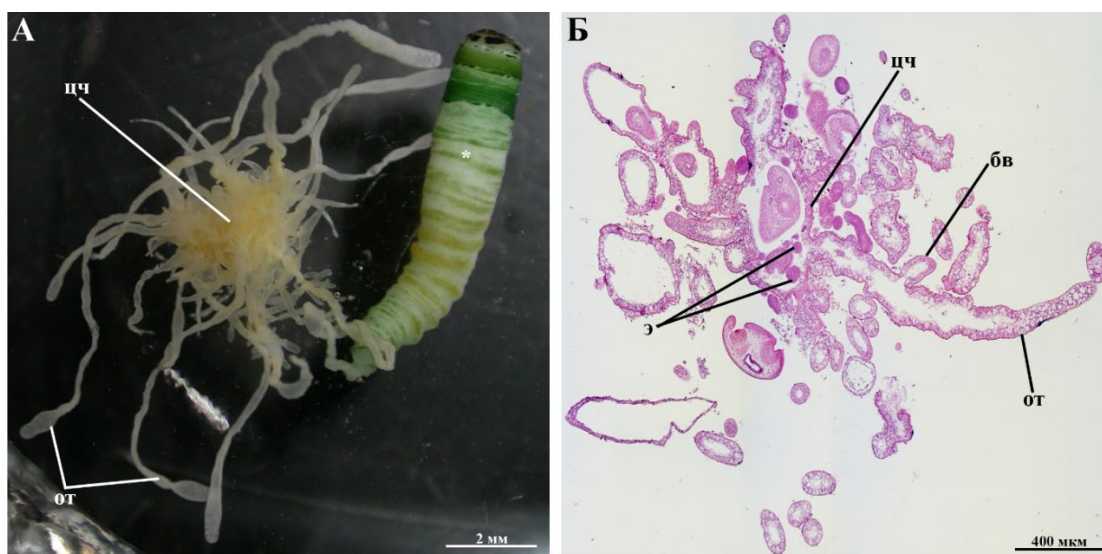


Рисунок 29. Спороциста *Leucochloridium paradoxum* на стадии зрелости. А – внешний вид, Б – гистологический срез. Условные обозначения: бв – боковой вырост

отростка, от – отросток спороцисты, цч – центральная часть спороцисты, э – эмбрион метацеркарии. Звёздочкой отмечен зрелый окрашенный отросток.

(3) Стадия дегенерирующих спороцист. Признаки дегенерации партенит, отмеченные для предыдущей стадии их развития, приводят к завершению размножения. В схизоцеле еще заметны эмбрионы, однако они явно не закончат развития: бластомеры дезинтегрируются, некоторые из них пикнотизируются. В то же время встречаются отдельные жизнеспособные метацеркарии. Слой пристеночной паренхимы сильно истончается, её клетки, включая цитоны тегумента, также разрушаются (рис. 30). Среди них уже не обнаруживаются генеративные элементы.

Центральная часть столона становится компактной (1,6×1,2 мм). Её тегумент приобретает более насыщенную жёлтую или коричневую окраску. У таких спороцист наблюдаются отростки разной степени зрелости, наиболее крупные и яркие из них заполнены инвазионными метацеркариями. Процессы дегенерации, отмеченные для других частей спороцисты, их не затрагивают. Эти отростки остаются способными к пульсации и сохраняют окраску, порой даже более интенсивную, чем у зрелых спороцист.

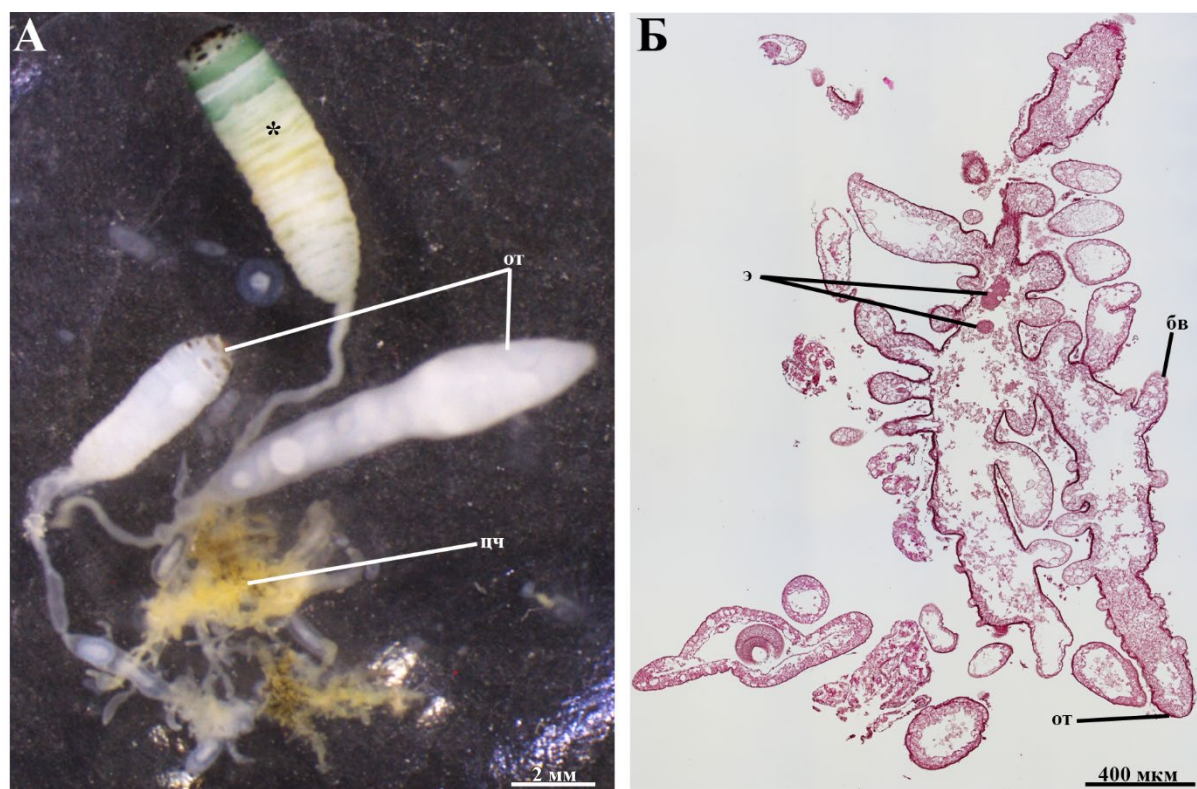


Рисунок 30. Спороциста *Leucochloridium paradoxum* на стадии дегенерации. А – внешний вид, Б – гистологический срез. Условные обозначения: бв – боковой вырост, отр – отросток спороцисты, цч – центральная часть спороцисты, э – эмбрион метацеркарии. Звёздочка – зрелый окрашенный отросток.

Анализ сезонной заражённости моллюсков *Succinea putris* трематодами р. *Leucochloridium*. Для оценки экстенсивности инвазии нами были проведены вскрытия янтарок бокситогорской популяции, собранных с мая по сентябрь 2018–2022 гг. (n=635). При расчётах были объединены результаты для видов *L. paradoxum* и *L. perturbatum*, поскольку их спороцисты не отличимы на ювенильной стадии развития.

В результате анализа было выявлено, что экстенсивность инвазии не меняется в течении года и составляет максимум 10,1% в июле, минимальное количество заражённых моллюсков обнаруживается в августе-сентябре – 6,8% (рис. 31). Наибольшее количество спороцист на ювенильной стадии развития было обнаружено в июне (5,7%), на стадии зрелой спороцисты – в июле (5,9%).

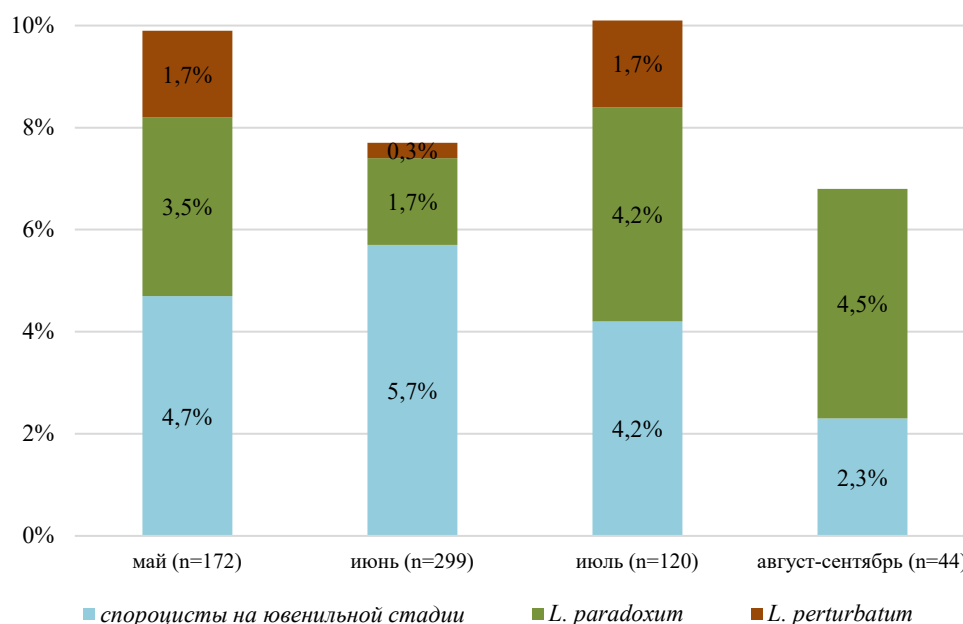


Рисунок 31. Экстенсивность инвазии спорозистами *Leucochloridium paradoxum* и *L. perturbatum* на стадии зрелости и ювенильной спорозисты моллюсков *Succinea putris* (бокситогорская популяция) по результатам анализа 2018–2022 гг. сбора (n=635).

Также было рассмотрено соотношение количества спорозист *L. paradoxum* на стадиях зрелости и дегенерации, собранных в 2017–2022 гг. на территории Ленинградской области (n=178) (рис. 32). Достоверных отличий в распределении спорозист в зависимости от месяца сбора не выявлено. Максимальное число спорозист на стадии зрелости приходится на май (95,1%), минимальное – на июнь (81,3%). Максимальное число спорозист на стадии дегенерации наблюдается в июне (18,7%), минимальное – в мае (4,9%).

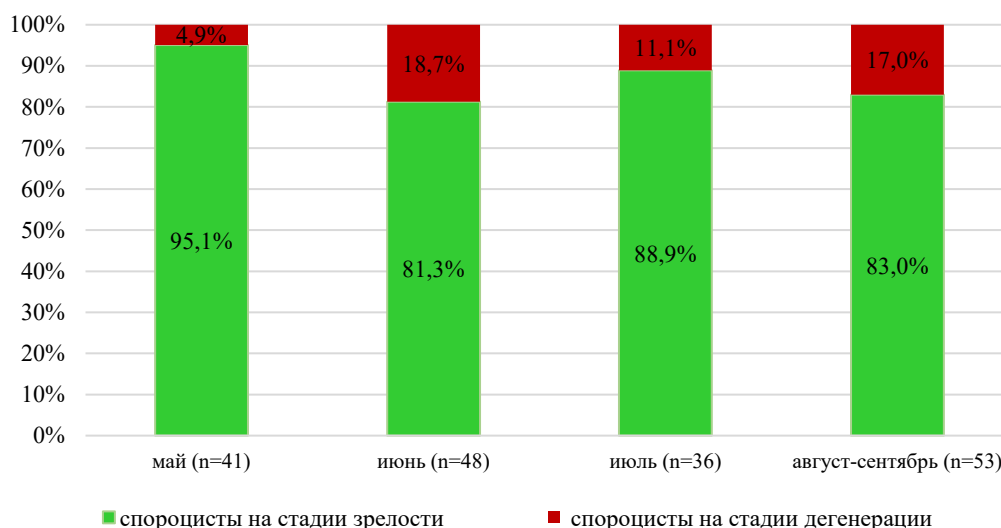


Рисунок 32. Соотношение спорозид *Leucochloridium paradoxum* на стадиях зрелости и дегенерации в зависимости от времени сбора. В анализе были использованы данные сборов в Ленинградской области 2017–2022 гг. (n=178).

Нами было посчитано соотношение количества спорозид *L. paradoxum* на стадиях зрелости и дегенерации с разным числом окрашенных отростков, собранных в 2012–2022 гг. на территории Ленинградской области (n=382). Было выявлено, что на протяжении тёплого сезона сохраняется доля спорозид, несущих от одного до трёх отростков (рис. 33). Наибольшее число приходится на спорозиды с одним зрелым отростком (35,5–53,1%), реже встречаются спорозиды с двумя (30,6–38,7%) и тремя отростками (8,2–20,4%). Спорозиды с четырьмя и более отростками были отмечены реже, чем в 5,4% случаев.

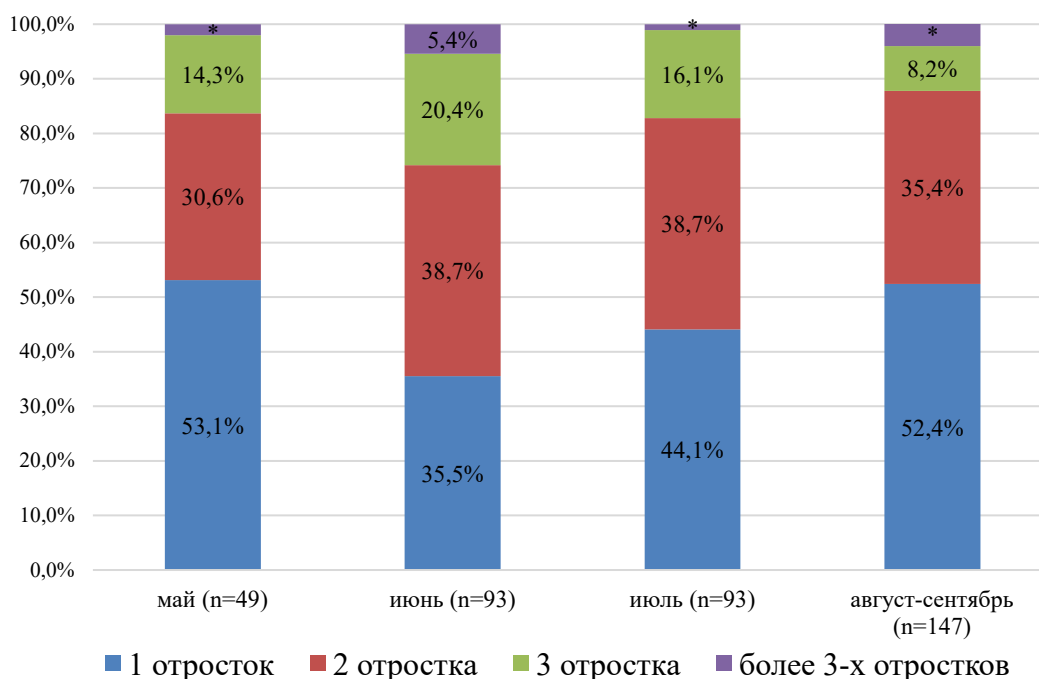


Рисунок 33. Распределение спорозид *L. paradoxum* на стадии зрелости и дегенерации с разным количеством окрашенных отростков в зависимости от времени сбора.

В анализе были использованы данные сборов в Ленинградской области 2012–2022 гг. (n=382). Звёздочка – значение не превышает 5%.

Анализ заражённых моллюсков, собранных в Ленинградской области и Белоруссии в 2018–2022 гг. (n=224) показал, в 90,6% случаев янтарки заражены одной спороцистой, случаи двойного и тройного заражения моллюсков фиксировались 21 раз. Их доля от общего количества заражений составила: двойными заражениями – 7,6%, тройными – 1,8%.

Интересно отметить, что в случае множественного заражения спороцисты могли находиться на разных стадиях развития (рис. 34), что свидетельствует о разнице в их возрасте.



Рисунок 34. Спороцисты р. *Leucochloridium*, обнаруженные в одном моллюске *Succinea putris*. Условные обозначения: зр – спороциста *L. paradoxum* на стадии зрелости, ю – спороциста р. *Leucochloridium* на стадии ювенили.

Обсуждение

На основании исследования спороцист из экспериментально и природнозаражённых моллюсков *S. putris* выполнена периодизация развития спороцист трематод *L. paradoxum*. Выделенные стадии отличаются по репродуктивной активности, а также по способности к инвазии. В работах других исследователей (Лутта, 1939; Гинецинская, 1954) используются такие определения как «незрелая», «молодая», «зрелая» по отношению к спороцистам. Однако в текстах статей не приводятся описания данных стадий, кроме указания на то, что у незрелых спороцист нет «резко» окрашенных отростков (Лутта, 1939). Это не позволяет сопоставить данные о соотношении количества спороцист на разных стадиях развития в зависимости от времени сбора.

Нами было выявлено, что экстенсивность инвазии в целом сохраняется на одном уровне меняется в течение тёплого сезона. Вероятно, это свидетельствует о том, что

заражение моллюсков происходит с мая по сентябрь. Однако мы предполагаем, что этот процесс протекает неравномерно: наблюдаются два пика в экстенсивности инвазии: в мае и в июле. Первый из них обусловлен активным заражением партенит, которое произошло во второй половине прошлого лета, второй – заражением в первой половине этого лета.

Следует отметить, что среди обнаруженных спороцист особенно мала доля тех, которые находятся на стадии дегенерации. Это можно объяснить тем, что такие спороцисты элиминируются вследствие гибели моллюсков – промежуточных хозяев как во время зимнего анабиоза, так и во второй половине лета.

Подобные исследования были выполнены в прошлом веке (табл. 11). Вудхэд отмечает, что экстенсивность инвазии моллюсков р. *Succinea* трематодами р. *Leucochloridium* сохраняется на одном уровне на протяжении тёплого времени года (Woodhead, 1935). По его мнению, это свидетельствует о том, что заражение янтарок происходит на протяжении всех летних месяцев, а также о сохранении спороцист в моллюсках во время зимовки. Полученные результаты несколько расходятся с данными Лутты и Гинецинской, которые отмечали увеличение экстенсивности инвазии в конце тёплого сезона (сентябрь – октябрь) (Лутта, 1939; Гинецинская, 1954).

Таблица 11. Экстенсивность инвазии моллюсков *Succinea putris* трематодами р. *Leucochloridium*, по данным разных авторов.

Точка сбора	Май	Июнь	Июль	Август	Сентябрь	Октябрь
Озеро Эри (Woodhead, 1935)	3,72%	6,43%	6,34%	0,4%	5%	
Петергоф (Лутта, 1939)		1,43%	0,73%		0,66%	6,70%
Астраханский заповедник (Гинецинская, 1954)	1,00%	0,90%	1,20%	3,30%	7,20%	
Бокситогорск (оригинальные данные)	9,90%	7,70%	9,30%	6,80%		

На протяжении тёплого периода незначительно изменяется доля спороцист, несущих разное количество отростков (рис. 35). Однако в большинстве случаев для партенит характерно наличие одного-двух отростков. По-видимому, последние сохраняются в ходе зимнего анабиоза янтарок (рис. 35), что, в свою очередь, даёт спороцистам возможность инвазии окончательного хозяина при наступлении положительных температур.

Интересно отметить, что для паразитов характерно неравномерное пространственное распределение: в некоторых исследованных точках не было обнаружено

заражённых моллюсков. Подобное явление было отмечено ранее Везенберг-Лундом (Wesenberg-Lund, 1931), Луттой (Лутта, 1939) и Гинецинской (Гинецинская, 1954) для р. *Leucochloridium*, а также для других трематод (см. Добровольский, Галактионов, 1998). По-видимому, это связано как с наличием в определённых биотопах промежуточных и окончательных хозяев, так и с малой подвижностью промежуточного хозяина, очаговым распределением инвазионного начала во внешней среде, климатическими факторами и др. Так Лутта и Гинецинская отмечали, что заражённые моллюски обнаруживались во влажных, но при этом хорошо освещённых местах (Лутта, 1939; Гинецинская, 1954).

По литературным данным, развитие спороцисты от мирацидия до первого окрашенного отростка занимает около трёх месяцев (Heckert, 1889). Такой же срок развития, по мнению Каган, характерен для спорцист *Neoleucochloridium problematicum* (Kagan, 1952a). Однако это не абсолютная величина, которая, скорее всего, зависит от различных биотических и абиотических факторов (Combes, 2001), среди которых выделяется температура, при которой идёт развитие (см. Атаев, 1991; 1993; Ataev et al., 1997). Незнание объективной картины условий развития партенит в природнозаражённых моллюсках затрудняет оценку их возраста. Спороцисты минимальных размеров, найденные при вскрытии таких моллюсков ещё не имели окрашенных отростков (рис. 30) и по возрасту не превосходили 95-тидневную спороцисту, выращенную в эксперименте (рис. 25).

Нами не было отмечено зависимости между заражённостью партенитами и возрастом промежуточного хозяина. Спороцистами на ювенильной стадии развития были заражены как моллюски с небольшой высотой раковины, так и крупные моллюски. Отсутствие закономерности отмечал в своих исследованиях Везенберг-Лунд (Wesenberg-Lund, 1931). По мнению Гекерта (Heckert, 1889) и Лутты (Лутта, 1939), молодые моллюски заражены маленькими спороцистами, а старые – большими. Однако не исключена возможность обнаружения в молодых моллюсках крупных спороцист (Лутта, 1939). Точка зрения последних двух исследователей кажется нам более обоснованной, поскольку моллюски с большими размерами раковины характеризуются большим возрастом и, соответственно, могут быть заражены спороцистами, у которых был более длительный период развития.

В большинстве случаев нами было обнаружено по одной спороцисте в заражённых моллюсках. Однако немалую долю от общего числа заражений составляют двойные и тройные, что свидетельствует о множественной инвазии. Она могла произойти в результате одновременного проникновения в ткани моллюска двух мирацидиев или же в результате повторного заражения моллюска, что подтверждается находками в одной янтарке спороцист на разных стадиях развития. В свою очередь, Лутта считала, что повторное

заражение моллюска тем же паразитом невозможно (Лутта, 1939). По мнению Везенберг-Лунда, улитка может заглотить и несколько яиц с мирацидиями, но выживет только та спороциста, которая сформировалась в наиболее подходящем месте (Wesenberg-Lund, 1931).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Видовая идентификация трематод *L. paradoxum* и их промежуточных хозяев – моллюсков *S. putris*. В современной биологии для определения беспозвоночных животных недостаточно использовать данные морфологического исследования. В целях видовой идентификации применяются комплексные подходы, включающие наравне с анализом морфологии, генетический анализ. Необходимость использования такого комплексного подхода определяется накопленными данными, которые свидетельствуют не только о наличии большого числа криптических видов (см. Taylor, Harris, 2012), но и о широкой внутривидовой изменчивости, которая характеризует целый ряд групп беспозвоночных (см. Barker, 2001).

Широкая внутривидовая изменчивость, на основании которой в прошлом веке малакологами в рамках отдельных видов выделялись самостоятельные таксономические группы видового статуса, характерна для гастропод. Так *Radix auricularia* из сем. Lymnaeidae ранее считался состоящим из двух видов – *R. auricularia* s. str. и *R. intercisa* (см. Schneibs et al., 2022). Однако дальнейшие работы с применением комплексного подхода позволили доказать наличие лишь одного вида – *R. auricularia* (Schneibs et al., 2022). Ранее считался комплексом двух видов (*Lymnaea stagnalis* s. str. и *L. fragilis*) другой широко известный вид прудовиков, *L. stagnalis* (Kruglov, Starobogatov, 1985). Позднее в результате анализа данных генетических исследований была доказана валидность только одного из них – *L. stagnalis* s. str. (Vinarski et al., 2012).

Моллюски *S. putris* также характеризуются широкой внутривидовой изменчивостью, что давало основания исследователям описать этот вид как комплекс таксонов видового уровня (см. Шилейко, Лихарев, 1986). Помимо этого, по конхологическим признакам представители р. *Succinea* схожи с представителями р. *Oxyloma* из сем. Succineidae (рис. 35).



Рисунок 35. Раковины представителей сем. Succineidae: *Succinea putris* (слева) и *Oxyloma* sp. (справа).

Особенно сложно определение взрослых особей, поскольку представители обоих родов отличаются широким полиморфизмом даже в форме раковины (Horzak et al., 2013). Точное определение возможно только при анатомировании половой системы, которая характеризуется отличиями в строении её дистальных частей у представителей двух упомянутых родов. Однако ещё более точную идентификацию позволяет провести молекулярно-генетический анализ.

Проведённое исследование позволило уточнить систематическое положение изучаемых моллюсков. Было выявлено, что исследованные особи, в частности, заражённые трематодами *L. paradoxum*, относятся к одному виду, *S. putris*. Это подтверждено результатами как морфологического анализа с использованием в качестве основных признаков особенностей строения раковины, радулы, челюсти и половой системы, так и молекулярно-генетического анализа фрагментов митохондриальных генов *cox1* и *cytb* исследуемых моллюсков.

Видовая идентификация трематод также затруднена в связи с наличием криптических видов, которые встречаются среди дигеней чаще, чем среди других гельминтов (Pérez-Ponce de León, Poulin, 2018). Наиболее ярким примером в этом отношении является таксономия р. *Echinostoma*. Всех эхиностом с характерными 37-ю шипами на воротничке, относят к группе *E. revolutum*, в рамках которой ранее выделялось 56 видов. По данным на 2020 г. валидными признаны 16 из них, ещё 10 видов нуждаются в дальнейшей проверке (Chai et al., 2020). Следует отметить, что количество видов, которые описывают с использованием комплексного подхода, включающего молекулярно-генетический анализ, продолжает расти. В 2022 году был описан вид *E. maldonadoi*, также входящий в группу *E. revolutum* (Valadão et al., 2022).

Представители другого семейства трематод, Notocotylidae, представляют собой не менее сложную для видовой идентификации группу. Определение по морфологии марит возможно только до уровня рода, с использованием морфологии церкарий – лишь до семейства в виду единообразия их строения, а также пигментированности (Gonchar et al., 2019). Разграничивать виды помогает комплексный подход, включающий не только морфологический и генетический анализ, но и анализ жизненного цикла, в частности, специфичности к промежуточному хозяину (см. Gonchar et al., 2019).

В целях видовой идентификации трематод в большинстве случаев используются признаки, характеризующие гермафродитное поколение – церкарий и марит. Однако, для трематод р. *Leucochloridium* возможно проведение видовой идентификации по партенитам. Это обусловлено не только наличием у спороцист отростков с видоспецифичной окраской, но сложностью определения видов этого рода по морфологии марит. Дело в том, что у

зрелой мариты затруднено рассмотрение систематических признаков (в частности, строения половой системы) вследствие заполнения петель матки многочисленными яйцами (Rzad et al., 2023). Однако, для спороцист р. *Leucochloridium* также характерна внутривидовая изменчивость окраски отростков. Только комплексный подход с использованием как морфологического, так и молекулярно-генетического анализа, позволяет не только точно идентифицировать виды, но и исследовать внутривидовую изменчивость.

Проведённый морфологический анализ позволил выявить внутривидовую изменчивость в окраске зрелых отростков спороцист *L. paradoxum*, состоящей из чередования полос зелёного, белого и чёрного цветов. Пигментацией с преобладанием этих цветов в окраске отростков спороцист характеризуется не только данный вид (см. р. III. 2). Однако анализ рисунка окраски, а также молекулярно-генетический анализ позволяет во многом уточнять видовую принадлежность исследуемых спороцист (см. Усманова, Прохорова, 2022).

Как для моллюсков *S. putris*, так и для трематод *L. paradoxum* характерна внутривидовая морфологическая и генотипическая изменчивость. Однако проведённый анализ позволил убедиться в том, что в ходе выполнения исследования и постановки экспериментов были использованы модельные организмы этих двух видов. Это, в свою очередь, позволило с уверенностью экстраполировать данные, полученные в ходе экспериментальной постановки жизненного цикла на анализ природных заражений.

Развитие спороцист *L. paradoxum*. Изучение развития инфрапопуляции партенит трематод любого вида трематод – сложная задача, требующая проведения природных и экспериментальных наблюдений с использованием разнообразных методов и подходов. Особенно большие трудности связаны с изучением мирацидиев и их трансформацией в спороцисту, а также определением механизма размножения партенит любой генерации. Тем не менее среди трематод выделено несколько групп, которые отличаются характером размножения материнских спороцист (Dobrovolskij, Ataev, 2003; Ataev, 2017). Все отличия могут быть сведены к составу генеративных элементов, представленных в мирацидиях. Основными из них являются НК и ГК, а также эмбрионы.

Если в личинке есть НК половой природы, то её размножение приурочено к паразитической фазе развития материнской спороцисты, на которой пролиферация этих клеток обеспечит появление многочисленных ГК. В результате дробления последних формируются эмбрионы партенит дочерних генераций.

Однако, если НК в мирацидии отсутствуют, а имеется ограниченное количество ГК или (и) эмбрионов, то размножения на паразитической фазе материнской спороцисты не

будет – она функционально выполняет роль выводковой камеры – доразвивает герминальный материал, образованный еще при формировании мирацидия в яйце. В таких случаях мы наблюдаем различные варианты педогенетических мирацидиев, крайними из которых являются личинки трематод таких семейств как *Phylophthalamidae* (в мирацидии формируется единственная материнская редия), либо некоторые *Microphalidae* (с развитием ГК в гемоцеле моллюска-хозяина). Главным отличием таких трематод является разрушение сомы мирацидия в процессе заражения моллюска. Соответственно паразитическая фаза развития материнской спороцисты отсутствует. А первой генерацией партенит становятся материнские редии или дочерние спороцисты (Добровольский, Галактионов, 1998; Атаев, 2017).

Установление отсутствия в жизненном цикле паразитической фазы материнской спороцисты особенно затруднено для спороцистозидных видов, когда по морфологии партенит нельзя определить к материнскому или дочернему поколению они относятся (см. *Pojmanska, 2003*). Окончательно решить этот вопрос возможно только в результате изучения мирацидия после его проникновения в моллюска-хозяина.

Отношение к внутримоллюсковому развитию партенит надсемейства *Brachylaimoidea*, включая сем. *Leucochloridiidae*, во многом основано на противоречивых и разрозненных данных. В целом они относятся к группе трематод, для которых характерно «раннее подавление развитие сомы материнской спороцисты и развитие генеративных элементов непосредственно в гемоцеле моллюска» (Атаев, 2017). На практике это выражается в том, что трансформации мирацидия в спороцисту не происходит, то есть отсутствует паразитическая стадия развития материнской спороцисты. После проникновения мирацидия в ткани моллюска-хозяина наблюдается разрушение сомы личинки и высвобождение генеративных элементов, из которых развиваются партениты дочернего поколения. Эта тенденция самостоятельного развития герминального материала, вероятно, прослеживается у ряда представителей *Microphalidae* (Добровольский, Галактионов, 1998; *Ochetosomatidae* (Jordan, Byrd, 1967), *Heronimidae* (Crandall, 1960) и др.

Однако экспериментально отсутствие материнского поколения подтверждено лишь для отдельных видов. В работах разных авторов спороцисты р. *Leucochloridium* относятся либо к материнскому поколению (Woodhead, 1935; Гинецинская, 1968), либо к дочернему (Галактионов, Добровольский, 1998), однако зачастую вопрос об их принадлежности к определённой генерации вовсе не рассматривается (Kagan, 1952; *Pojmanska, 2003* и др.). Следовательно, несмотря на большой интерес к биологии спороцист этого рода, среди исследователей отсутствует общее мнение о происхождении разветвлённых спороцист.

Решение этого вопроса стало одной из основных задач данного исследования. Потребовались многократные попытки экспериментальной постановки жизненного цикла *L. paradoxum* с целью получения информации о мирацидиях этого вида, их проникновении в моллюска и дальнейшем развитии. Выяснилось, что вылупление личинок происходит в пищеварительной системе моллюска-хозяина – в желудке или в дистальной части средней кишки. В результате пенетрации мирацидии проникают в район гепатопанкреаса, где происходит разрушение их сомы. При этом ГК (предполагаем, что по одной из каждой личинки) оказываются в просвете между ацинусами и начинают развиваться самостоятельно в эмбрион дочерней спороцисты. Таким образом, разветвлённые спороцисты с окрашенными отростками относятся к дочернему поколению партенит – единственному в жизненном цикле трематод *Leucochloridium*. Следовательно, инфрапопуляция партенит этих трематод относится к лимитированному типу (Атаев, 2017) и не является по определению микрогемипопуляцией, а подобно церкариям в водоеме образует гемипопуляцию (см. Беклемишев, 1959; Шульман, Добровольский, 1977).

На основании собственных и литературных данных (Heckert, 1889; Wesenberg-Lund, 1931; Woodhead, 1935) о развитии дочерних спороцист *L. paradoxum* в экспериментально- и природнозаражённых моллюсках (см. р. III. 3. 1 и III. 3. 2) были получены данные, позволяющие выделить в их онтогенезе следующие функциональные стадии.

(1) Эмбриональная стадия – начинается с дробления ГК, сформированной в мирацидии, но высвобождающейся в результате разрушения его сомы. Продолжается до появления в зародыше единой полости схизоцеля (до 55 дней п. з.).

(2) Ювенильная стадия – включает постэмбриональное развитие спороцисты вплоть до появления окрашенных отростков, заполненных инвазионными метацеркариями (около 90 дней п. з.).

(3) Стадия зрелости – продолжается до завершения образования новых эмбрионов метацеркарий и проявления признаков дегенерации центральной части столона (в среднем продолжается до 130 – 150 дней п. з.).

(4) Стадия дегенерации – продолжается до гибели спороцисты.

Важно отметить, что развитие партенит трематод зависят от различных факторов, важнейшим из которых является температура окружающей среды (Атаев, 1991). Особенно это сказывается в холодный период года, когда развитие спороцист приостанавливается до потепления (см. р. III.3.2). Соответственно, указанные выше сроки достижения определённой стадии онтогенеза являются усреднёнными и характерны для летнего времени года.

Реализация жизненного цикла L. paradoxum в природе. Изучение развития партенит внутри моллюсков в лабораторных условиях позволяет оценить скорость морфогенеза и выделить его важнейшие этапы. Однако в природных условиях существует множество факторов, которые влияют как на развитие партенит, так и на передачу инвазии от промежуточного к окончательному хозяину.

Инвазия окончательных хозяев, по нашим предположениям, происходит двумя путями. Птицы могут заражаться при заглатывании заражённых моллюсков целиком или же при склёвывании отдельного отростка. Последний может самостоятельно выходить из моллюска. На подобное явление ранее обращали внимание Везенберг-Лунд (Wesenberg-Lund, 1931), а также Вудхед и Атаев с соавторами (Woodhead, 1935; Ataev et al., 2016). Эти исследователи предполагали, что, в основном, инвазия птиц идёт за счёт вышедших из тела улиток отростков. Мы также придерживаемся данной точки зрения, которая подкрепляется тем, что отросток может сохранять жизнеспособность, а также пульсировать во внешней среде от одного (Ataev et al., 2016) до пяти часов (Woodhead, 1935). Для вида *Neoleucochloridium probelamticum* описана способность окрашенного отростка сохранять подвижность во внешней среде до 20 часов (Kagan, 1952a). Вудхед высказал предположение, что триггером для самостоятельного выхода отростков из хозяина является повышение давления в тканях моллюска при повышенной влажности в окружающей среде в сырую погоду или при погружении заражённых улиток в воду (Woodhead, 1935).

В роли окончательных хозяев лейкохлоридиума выступает большое количество птиц, имеющих различную пищевую специализацию. Мариты *L. paradoxum* были обнаружены в птицах отрядов Воробьинообразные (скворец, дрозд-белобровик, большая синица, лазоревка, дрозд-белобровик), Ржанкообразные (малый зуек, чибис, перевозчик, черныш, белохвостый песочник, золотистая ржанка, галстучник, круглоносый плавунчик, малый веретенник, средний кроншнеп, фифи, большой улит, поручейник, травник, турухтан, курочка-крошка, камнешарка, обыкновенная крачка), Журавлеобразные (лысуха, коростель, погоньш, камышница) (Белопольская, 1966; Быховская-Павловская, 1974; Гвоздев, 1962; Головин, 1960; Костюнин, 1979; Леонов и др., 1965; Бондаренко, 1964; Rząd et al., 2023 и др.). Большинство этих птиц являются всеядными или насекомоядными. Однако возможно заражение и растительноядных видов птиц. Это подтверждается успешным заражением в условиях эксперимента представителей отряда Курообразные – *Gallus gallus*, а также литературными данными (Бондаренко, 1964; Ito et al., 2011 и др.). В природе растительноядные птицы могут заражаться в молодом возрасте, когда родители выкармливают их животным кормом (Прокофьева, 2008). Кроме того, моллюски представляют собой важный элемент питания и взрослых птиц (самок) во время

гнездования, что связано с повышенной потребностью в кальции для формирования скорлупы яиц и скелета птенцов (Бельский и др., 1998; Прокофьева, 2008). Важно также отметить, что наиболее часто моллюски встречаются в корме птиц в первой половине тёплого сезона (Сребродольская, Павлюк, 1974; Прокофьева, 2008).

На заражение птиц, возможно, влияет не только тип питания окончательного хозяина, но и его местообитание. Благоприятные условия для инвазии возникают вблизи водоёмов или переувлажненных участков, где образуются большие скопления улиток Succineidae (Шилейко, Лихарев, 1986). Стоит обратить внимание на то, что многие птицы, в которых были обнаружены мариты *L. paradoxum*, относятся к отрядам, представители которых ведут околородный образ жизни (см. выше).

Моллюски сем. Succineidae распространены на большинстве континентов. В Европе встречается в основном вид *S. putris*, а в Азии (включая японские острова) – *S. lauta*. В южных регионах Евразии распространены моллюски р. *Oxyloma*, например, *O. elegans* (син. *S. elegans*) (Шилейко, Лихарев, 1986). Среди них также встречаются особи, зараженные трематодами р. *Leucochloridium* (Гинецинская, 1954).

В условиях Северо-Запада в популяциях моллюсков *S. putris* наблюдается наличие двух основных групп: весной из зимовки выходят (1) молодые моллюски, вылупление из яиц которых произошло в конце предыдущего летнего сезона, а также (2) взрослые моллюски, перезимовавшие второй раз (подробнее см. р. I. 3). К середине лета моллюски первой группы достигают половой зрелости и в августе из отложенных ими яиц появляется молодь. После спаривания улитки первой группы могут вновь уйти на зимовку. Часть моллюсков второй группы может размножиться на второй год жизни в начале лета, однако с середины лета наблюдается их массовая гибель.

Анализ данных по природно-заражённым моллюскам, а также экспериментальных данных позволяет представить сезонную динамику инвазии моллюсков, а также механизм реализации жизненного цикла трематод *L. paradoxum* в природе следующим образом (рис. 36).

Инвазия промежуточных и окончательных хозяев происходит на протяжении всего тёплого времени года – с конца апреля до начала сентября. Однако наиболее активно птицы и моллюски заражаются в мае – августе. На протяжении холодного периода и зимующие, и перелётные птицы освобождаются от инвазии, но спороцисты сохраняются до весны в моллюсках. При этом заметных изменений с партенитами не происходит, и весной они продолжают развитие с того состояния, в котором ушли на зимовку. Соответственно, в заражённых улитках в конце апреля – начале мая обнаруживаются разновозрастные

спороцисты *L. paradoxum*, относящиеся к разным когортам – группам особей одинакового возраста, родившихся на протяжении одного сезона размножения (Шилов, 1997).

Первую когорту составляют спороцисты сформированные в конце июля – августе. До похолодания они не успевают достичь зрелости и на зимовку уходят на стадии ювенили. Их созревание происходит в первой половине лета следующего года. Именно они обеспечивают основное заражение птиц в июне – июле, а затем погибают в августе.

В случае, если спороцисты начали своё развитие в начале лета, то они составляют вторую когорту. В августе они достигают стадии зрелости и обеспечивают заражение птиц в конце лета – начале осени. На зимовку они уходят на стадии зрелости или на различной стадии дегенерации. Тем не менее, до весны они могут сохранять окрашенные отростки с инвазионными метацеркариями, которыми ранней весной заражаются птицы. Уже через 2–3 недели сформировавшиеся в них мариты массово откладывают яйца, которыми заражаются моллюски.

Таким образом, в жизненном цикле трематод *L. paradoxum* в условиях Северо-Запада России именно промежуточные хозяева – моллюски *S. putris* – выполняют депонирующую роль. В них на протяжении зимнего сезона сохраняются ДС с отростками, содержащими инвазионные метацеркарии. Именно последними в начале тёплого сезона заражаются птицы, освободившиеся за зиму от инвазии. Ранее депонирующая роль первых промежуточных хозяев в поддержании жизненных циклов трематод в условиях умеренных широт отмечалась и для водных моллюсков (Ataev et al., 2000).

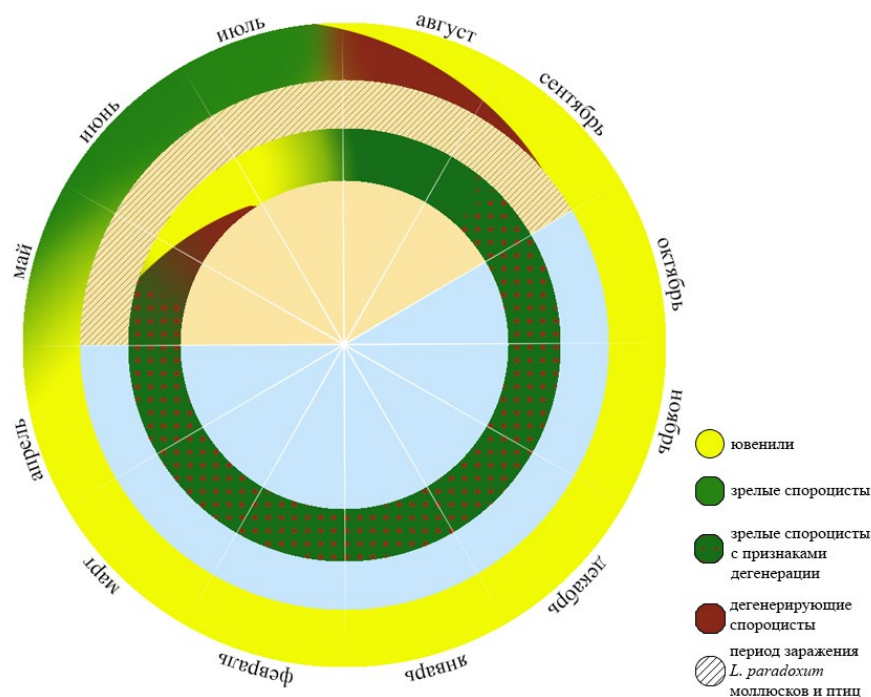


Рисунок 36. Динамика реализации жизненного цикла трематод *Leucochloridium paradoxum* в условиях умеренных широт.

ВЫВОДЫ

1. Для всех обнаруженных трематод *Leucochloridium paradoxum* в роли промежуточного хозяина выступают моллюски *Succinea putris*. Выявленные морфологические и генетические различия между моллюсками из разных популяций являются внутривидовыми.

2. Спороцисты трематод с отростками зелёного цвета, обнаруженные на территории Ленинградской, Ярославской областей России, а также Витебской и Гомельской области Белоруссии относятся к виду *Leucochloridium paradoxum*. Отростки спороцист характеризуются изменчивостью окраски, однако результаты генотипирования по митохондриальному гену *cox1* доказывают их принадлежность к виду *Leucochloridium paradoxum*.

3. Вылупление мирацидиев *Leucochloridium paradoxum* из яиц происходит в желудке и средней кишке моллюска. Через эпителий пищеварительной системы личинки проникают в гепатопанкреас, где происходит разрушение сомы мирацидия. В результате высвобождаются генеративные клетки, которые развиваются в разветвлённую спороцисту. Таким образом, в моллюсках паразитирует только одно поколение партенит, представленное дочерними спороцистами.

4. Размножение дочерних спороцист *Leucochloridium paradoxum* осуществляется за счет мультипликации генеративных клеток. Последние расположены либо в субтегументарном паренхиматозном матриксе, либо в составе специализированных органов размножения – герминальных масс. Соответственно, генеративные клетки и эмбрионы метацеркарий также могут развиваться самостоятельно или в герминальных массах. По мере созревания метацеркарии заполняют отростки, выполняющие функцию выводковой камеры.

5. В условиях умеренных широт на протяжении весенне-летнего сезона формируются две когорты спороцист *Leucochloridium paradoxum*: первая когорта представлена спороцистами, которые сформировались во второй половине лета, вторая когорта – спороцистами, сформировавшимися весной. Спороцисты первой когорты переживают зимний сезон на ювенильной стадии. Спороцисты второй когорты переживают зимний сезон на стадии дегенерации, сохраняя инвазионную способность. Метацеркариями из этих спороцист заражаются птицы весной. Таким образом в условиях умеренных широт моллюски *Succinea putris* выполняют депонирующую роль в поддержании жизненного цикла *Leucochloridium paradoxum*.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Анистратенко, В. В. Моллюски группы *Hydrobia sensu lato* Черного и Азовского морей / В. В. Анистратенко // Бюллетень московского общества испытателей природы. Отдел биологический. – 1991. – Т. 96, № 6. – С. 73–81.
2. Атаев, Г. Л. Развитие микрогемипопуляции партенит трематод *Philophthalmus rhionica* / Г. Л. Атаев, А. А. Добровольский // Паразитология. – 1990. – Т. 24, № 6. – С. 499–508.
3. Атаев, Г. Л. Влияние температуры на развитие и биологию редий и церкарий *Philophthalmus rhionica* (Trematoda) / Г. Л. Атаев // Паразитология. – 1991. – Т. 25, № 4. – С. 349–359.
4. Атаев, Г. Л. Влияние температуры и освещенности на биологию мирацидиев *Philophthalmus rhionica* (Trematoda) / Г. Л. Атаев // Паразитология. – 1993. – Т. 27, № 2. – С. 134–139.
5. Атаев, Г. Л. Размножение партенит трематод *Leucochloridium paradoxum* (Trematoda: Leucochloridiida) / Г. Л. Атаев, А. А. Добровольский, А. С. Токмакова // Паразитология. – 2013. – Т. 47, № 2. – С. 178–182.
6. Атаев, Г. Л. Сезонные изменения в биологии *Leucochloridium paradoxum* (Trematoda: Leucochloridiomorphidae) / Г. Л. Атаев, А. С. Токмакова // Паразитология. – 2015. – Т. 49, № 3. – С. 200–207.
7. Атаев, Г. Л. Размножение партенит трематод. Обзор основных теорий. / Г. Л. Атаев. – СПб: Наука, 2017. – 87 с.
8. Беклемишев, В. Н. Пространственная и функциональная структура популяций / В. Н. Беклемишев // Бюллетень Московского общества испытателей природы. – 1960. – Т. 65. – С. 41–45.
9. Белопольская, М. М. Трематоды куликов Белого моря / М. М. Белопольская // Труды гельминтологической лаборатории академии наук СССР. – 1966. – Т. 17. – С. 9–18.
10. Бельский, Е. А. Моллюски в питании некоторых лесных птиц в южной тайге Урала / Е. А. Бельский, И. М. Хохуткин, М. Е. Гребенников // Русский орнитологический журнал. – 1998. – Экспресс-выпуск № 44. – С. 13–18.
11. Бондарева, О. В. Генетическая изменчивость древесной улитки *Arianta arbustorum* L. в Ленинградской области по данным анализа фрагмента последовательности митохондриального гена *COI* / О. В. Бондарева, М. И. Орлова, Н. И. Абрамсон // Экологическая генетика. – 2016. – Т. 14, № 2. – С. 19–27.

12. Бондаренко, С. К. Гельминтофауна белых куропаток низовья Енисея / С. К. Бондаренко // Научная конференция Всесоюзного общества гельминтологов ч. 1: материалы конференции. – М.: [б. и.], 1964. – С. 40.
13. Быховская-Павловская, И. Е. Изменчивость морфологических признаков и значение её в систематике сосальщиков рода *Leucochloridium* Carus, 1835 / И. Е. Быховская-Павловская // Паразитологический сборник Зоологического института АН СССР. – 1951. – Т. 13. – С. 45–74.
14. Быховская-Павловская, И. Е. Новый вид сосальщика *Leucochloridium phragmitophila* sp. nov. из воробьиных птиц / И. Е. Быховская-Павловская, М. Н. Дубинина // Доклады АН СССР. – 1951. – Т. 76, № 1. – С. 161–162.
15. Быховская-Павловская, И. Е. Трематоды птиц фауны СССР / И. Е. Быховская-Павловская. – М., Л.: АН СССР, 1962. – 407 с.
16. Быховская-Павловская, И. Е. Трематоды пролетных птиц Куршской косы / И. Е. Быховская-Павловская // Паразитологический сборник Зоологического института АН СССР. – 1974. – Т. 26. – С. 39–80.
17. Галактионов, К. В. Происхождение и эволюция жизненных циклов трематод / К. В. Галактионов, А. А. Добровольский. – СПб: Наука, 1998. – 404 с.
18. Галактионов, К. В. Модульный принцип в морфофункциональной организации спороцист некоторых трематод / К. В. Галактионов, И. М. Подвязная, А. А. Добровольский // Современные проблемы эволюционной морфологии животных. Материалы II Всероссийской конференции с международным участием к 105-летию со дня рождения академика А.В. Иванова: сб. науч. тр. – СПб: изд. ЛЕМА, 2011. – С. 94–97.
19. Галактионов, К. В. Эволюция морфофункциональной организации партеногенетических поколений трематод / К. В. Галактионов, А. А. Добровольский, И. М. Подвязная // Зоологический журнал. – 2014. – Т. 93, № 3. – С. 426–442.
20. Галактионов, К. В. Эволюция и биологическая радиация трематод: краткий очерк идей и мнений // В кн. «Коэволюция паразитов и хозяев», К. В. Галактионов (ред.) // Труды Зоологического института РАН, Приложение 4. – СПб: Изд-во ЗИН РАН, 2016. – С. 74–126.
21. Гвоздев, Е. В. Сосальщики охотничье-промысловых птиц Южного Казахстана. Паразиты диких животных Казахстана / Е. В. Гвоздев // Труды института зоологии АН Каз. ССР. – Альма-Ата. – 1962. – Т. 16. – С. 98–124.
22. Гвоздев, Е. В. Биология, систематика, эволюция и филогения трематод надсемейства Brachylaimoidea Allison / Е. В. Гвоздев, Т. Н. Соболева // В кн. «Жизненные циклы, экология и морфология животных Казахстана», 1978. – С. 17–31.

23. Гинецинская, Т. А. Значение окраски спороцист трематод рода *Leucochloridium* для диагностики вида / Т. А. Гинецинская // Доклады АН СССР. – 1953. – Т. 88, № 1. – С. 177–179.
24. Гинецинская, Т. А. Вопросы экологии и систематики партеногенетического поколения сосальщиков рода *Leucochloridium*. / Т. А. Гинецинская // Труды ленинградского общества естествоиспытателей. – 1954. – Т. 72, № 4. – С. 38–56.
25. Гинецинская, Т. А. К гельминтофауне некоторых видов куликов Белого моря / Т. А. Гинецинская, Д. В. Наумов // Сборник работ по гельминтологии к 80-летию академика К. И. Скрябина: сб. науч. тр. – М.: Изд-во АН СССР, 1958. – С. 99–108.
26. Гинецинская, Т. А. Трематоды, их жизненные циклы, биология и эволюция / Т. А. Гинецинская. – Л.: Наука, 1968. – 411 с.
27. Головин, О. В. Уродства трематод рода *Leucochloridium* / О. В. Головин // Научные труды Калининского отделения Московского общества испытателей Природы. – 1960. – Т. 2. – С. 101–109.
28. Добровольский, А. А. Партеногенетические поколения трематод / А. А. Добровольский, К. В. Галактионов, [и др.] // Труды Ленинградского общества естествоиспытателей. – 1983. – Т. 82, Вып. 4. – С. 1–108.
29. Дубинин, Н. П. Генетическое строение вида и его эволюция / Н. П. Дубинин, Д. Д. Ромашов // Биологический журнал. – 1932. – Т. 1, № 5/6. – С. 52–95.
30. Ждьярска, З. Ультраструктура партенит и личинок брахилаймоидей / З. Ждьярска, Т. Соболева // В кн. «Функциональная морфология личинок трематод и цестод», 1986. – С. 83–96.
31. Жукова, А. А. Генотипирование трематод рода *Leucochloridium*, обитающих на территории Ленинградской области / А. А. Жукова, Е. Е. Прохорова, Н. В. Цымбаленко [и др.] // Паразитология. – 2012. – Т. 46, № 5. – С. 414–419.
32. Король, Э. Н. Обнаружение личинок трематод рода *Leucochloridium* Carus, 1835 в Украине / Э. Н. Король // Эколого-функціональні та фауністичні аспекти дослідження молюсків, їх роль у біоіндикації стану навколишнього середовища: сб. науч. тр. – Житомир: Видавництво ЖДУ ім. І. Франка, 2004. – С. 85–88.
33. Костюнин, В. М. К трематодофауне воробьиных птиц Астраханской области / В. М. Костюнин // В кн. «Фауна, систематика, биология и экология гельминтов и их промежуточных хозяев», 1979. – С. 42–45.
34. Круглов, Н. Д. Методические подходы к оценке таксономического потенциала раковины и половой системы моллюсков семейства янтарок (Gastropoda, Pulmonata,

Succineidae) / Н. Д. Круглов, Л. В. Стыгар // Труды Зоологического института РАН. – 2003. – С. 132–137.

35. Лихарев, И. М. Наземные моллюски фауны СССР: определитель по фауне СССР. Выпуск 43 / И. М. Лихарев, Е. С. Раммельмейер. – М.–Л.: Изд-во АН СССР, 1952. – 511 с.

36. Леонов, В. А. Трематоды сухопутных птиц Камчатки / В. А. Леонов, О. И. Белогуров, А. К. Цимбалюк, З. Н. Синичкин // В кн. «Паразитические черви домашних и диких животных. К 40-летию научной и педагогической деятельности профессора А. А. Соболева», 1965. – С. 121–129.

37. Лутта, А. С. К биологии *Leucochloridium paradoxum* (Carus) / А. С. Лутта // Учёные записки ЛГУ. – 1939. – Т. 35, № 9. – С. 96–102.

38. Мухамедов, Г. К. Сезонная динамика развития и размножения партеногенетических поколений *Xiphidocercaria* sp. VII Odening, 1962 (Trematoda: Plagiorchiidae) в моллюске *Coretus corneus* / Г. К. Мухамедов // Паразитология. – 1979. – Т. 12. – С. 444–448.

39. Начева, Л. В. Сравнительная гистология спороцист *Leucochloridium paradoxum* и *L. problematicum* (Trematoda: Leucochlorididae) / Л. В. Начева, Т. Н. Соболева, Л. Л. Осиповская // В кн. «Паразиты – компоненты водных и наземных биоценозов Казахстана», 1981. – С. 147–155.

40. Начева, Л. В. Гистологические исследования взаимоотношений в системе паразит-хозяин на примере спороцист рода *Leucochloridium* (Carus, 1835). / Л. В. Начева, Т. Н. Соболева, Л. Л. Осиповская // Всесоюзный съезд паразитологов. Тезисы докладов: сборник научных трудов – Киев: Изд-во АН СССР, 1983. – С. 230–231.

41. Прокофьева, И. В. Моллюски в пище воробьиных птиц и дятлов // И. В. Прокофьева // Русский орнитологический журнал. – 2008. – Т. 17, Экспресс-выпуск № 405. – С. 375–379.

42. Прохорова, Е. Е. Видовая идентификация спороцист *Leucochloridium paradoxum* (Trematoda) / Е. Е. Прохорова, А. А. Виноградова, А. С. Токмакова, Г. Л. Атаев // Паразитология. – 2018. – Т. 52, № 6. – С. 442–448.

43. Прохорова, Е. Е. Анализ ITS1 и ITS2 рибосомной ДНК в популяциях моллюсков *Planorbarius corneus* (Gastropoda) в Ленинградской и Калининградской областях / Е. Е. Прохорова, Е. А. Жемчужникова, Г. Л. Атаев // Сибирский экологический журнал. – 2015. – № 6. – С. 883–889.

44. Семёнов, О. Ю. Мирацидии: структура, биология, взаимоотношения с моллюсками / О. Ю. Семёнов // Труды ленинградского общества естествоиспытателей. – 1991. – Т. 83., Вып. 4. – 1–204 с.
45. Скрябин, К. И. Трематоды животных и человека: основы трематодологии / К. И. Скрябин. – М.–Л.: Наука, 1948. – Т.2. – С. 257–292.
46. Соболева, Т. Н. Личинки трематод рода *Leucochloridium* Carus, 1839 в Казахстане / Т. Н. Соболева, Л. Л. Осиповская // Известия АН КазССР, Серия биологическая. –1979. –№ 1 – С. 26–34.
47. Соболева, Т. Н. Трематоды подотряда Brachylaimata La Rue, 1957 Казахстана и Кыргызстана / Т. Н. Соболева, Л. Л. Осиповская. – Алматы: Иргетас, 2003. – 88 с.
48. Сон, М. О. Моллюски-вселенцы в пресных и солоноватых водах Северного Причерноморья / М. О. Сон. — Одесса: Друк, 2007. – 132 с.
49. Сребродольская, Н.И. Роль водных моллюсков в питании водоплавающих и болотных птиц / Н. И. Сребродольская, Р. С. Павлюк // Материалы 6-й Всесоюзной орнитологической конференции. Ч. I. Москва: Издательство МГУ, 1974. – С. 298–299.
50. Сумбаев, Е.А. Микроморфологические особенности взаимоотношений в системе «Паразит–хозяин» на примере паразитирования сосальщиков рода *Leucochloridium* в моллюске рода *Succinea* / Е. А. Сумбаев // Теория и практика борьбы с паразитарными болезнями. – 2011. – № 12. – С. 488–490.
51. Токмакова, А. С. Клеточные реакции лёгочных моллюсков на трематодную инвазию: дис. ... канд. биол. наук: 03.02.11, 03.03.04 / А. С. Токмакова. – СПб, 2018. – 136 с.
52. Усманова, Р. Р. Обнаружение в моллюске *Succinea putris* спороцисты рода *Leucochloridium* необычной окраски / Р. Р. Усманова, Е. Е. Прохорова // Паразитология, – 2022. – Т. 56, № 6. – С. 460–468.
53. Шилейко, А. А. Наземные моллюски семейства янтарок (Succineidae) фауны СССР / А. А. Шилейко, И. М. Лихарев // Сборник трудов Зоологического музея. – 1986. – Т. 24. – С. 197–238.
54. Шилов, И. А. Экология / И. А. Шилов. – М.: Высшая школа, 1997. – 512 с.
55. Шульман, С. С. Паразитизм и смежные с ним явления / С. С. Шульман, А. А. Добровольский // Паразитологический сборник. – 1977. – Т. 27. – С. 230–249.
56. Ahrens, A. Abhandlung uber Wurmer, welche in einer Erdschnecke entdeckt worden sind / A. Ahrens // Der Gesellschaft Naturforschender Freunde zu Berlin Magazin. – 1810. – Vol. 4. – P. 292–295.

57. Albert, J. Comparison of carbon and nitrogen content of infected and uninfected snails, *Succinea ovalis*, and the trematode *Leucochloridium variae* / J. Albert, J. Hornbach // The Journal of Parasitology. – 1979. – Vol. 65, N. 3. – P. 371–374.
58. Ataev, G. L. Migration and development of mother sporocysts of *Echinostoma caproni* (Digenea: Echinostomatidae) / G. L. Ataev, A. A. Dobrovolskij, A. Fournier, J. Jourddane // Journal of Parasitology – 1997. – Vol. 83, N. 3. – P. 444–453.
59. Ataev, G. L. Multiple infection of amber *Succinea putris* snails with sporocysts of *Leucochloridium spp.* (Trematoda) / G. L. Ataev, A. A. Zhukova, A. S. Tokmakova, E. E. Prokhorova // Parasitology Research. – 2016. – Vol. 115, N. 8. – P. 3203–3208.
60. Ataev, G. L. Reproduction of *Echinostoma caproni* mother sporocysts / G. L. Ataev, A. S. Tokmakova // Parasitology research. – 2018. – Vol. 117, N. 8. – P. 2419–2426.
61. Ataev, G. L., Kozminsky E.V., Dodrovolskij A.A. The significance of molluscs in conservation of trematode life cycles / G. L. Ataev, E. V. Kozminsky, A. A. Dodrovolskij // Bulletin of the Scandinavian Society for Parasitology. – 2000. – Vol. 10, N. 2. – P. 96.
62. Ataev, G. L. The study of the sporocyst broodsacs coloring in *Leucochloridium paradoxum* (Trematoda: Brachylaemidae) / G. L. Ataev, P. S. Babich, A. S. Tokmakova // Parazitologiya. – 2013. – Vol. 47, N. 5. – P. 372–379.
63. Bakke, T. A. Intraspecific variation of adult *Leucochloridium sp.* (Digenea) from natural and experimental infections / T. A. Bakke // Canadian Journal of Zoology – 1978. – Vol. 56. – P. 94–102.
64. Bakke, T. A. A revision of the family Leucochloridiidae Poche (Digenea) and studies on the morphology of *Leucochloridium paradoxum* Carus, 1835 / T. A. Bakke // Systematic Parasitology. – 1980. – Vol. 1. – P. 189–202.
65. Bakke, T. A. Histology and biology of the larval stages of *Leucochloridium* Carus, 1835 (Trematoda, Digenea) as revealed by light and electron microscopy / T. A. Bakke // Fauna norvegica Serie A. – 1982. – Vol. 3. – P. 41–56.
66. Barker, G. M. Gastropods on land: phylogeny, diversity and adaptive morphology / G. M. Barker. – Wallingford: CABI Publishing, 2001. – 558 p.
67. Bouckaert, R. BEAST 2.5: an advanced software platform for Bayesian evolutionary analysis / R. Bouckaert, T. G. Vaughan, J. Barido-Sottani [et al.] // PLoS Computational Biology. – 2019. – Vol. 15. – P. 1–28.
68. Bowles, J. Rapid discrimination of *Echinococcus* species and strains using a polymerase chain reaction-based RFLP method / J. Bowles, D. P. McManus // Molecular and Biochemical Parasitology. – 1993. – Vol. 57. – P. 231–240.

69. Branson, B. A. The Recent Gastropoda of Oklahoma, V. Terrestrial Species, Valloniidae, Achatinidae and Succineidae / B. A. Branson // Proceedings of the Oklahoma Academy of Science. – 1962. – Vol. 43. – P. 77.
70. Burky, A. J Comparison of carbon and nitrogen content of infected and uninfected snails, *Succinea ovalis*, and the trematode *Leucochloridium variae* / A. J. Burky, D. J. Hornbach // Journal of parasitology. – 1979. – Vol. 65, N. 3. – P. 371–374.
71. Casey, S. P. Use of ITS rDNA for discrimination of European green- and brown-banded sporocysts within the genus *Leucochloridium* Carus, 1835 (Digenea: Leucochloridiidae) / S. P. Casey, T. A. Bakke, P. D. Harris, J. Cable // Systematic Parasitology. – 2003. – Vol. 56, N. 3. – P. 163–168.
72. Carus, C. Beobachtungen über einen merkwürdigen schöngefärbten eingeweidewurm *Leucochloridium paradoxum* mihi und dessen parasitische erzeugung in einer landschnecke *Succinea amphibia* Drap., *Helix putris* / C. Carus // Nova acta physico-medica Academiae Caesareae Leopoldino-Carolinae Naturae Curiosum. – 1835. – Vol. 17, N. 1. – P. 85–100.
73. Carius, H. J. Genetic variation in a host–parasite association: potential for coevolution and frequency-dependent selection / H. J. Carius, T. J. Little, D. Ebert // Evolution. – 2001. – Vol. 55. – P. 1136–1145.
74. Chai, J. Y. Taxonomy of *Echinostoma revolutum* and 37-Collar-Spined *Echinostoma* spp.: a historical review / J. Y. Chai, J. Cho, T. Chang, [et al.] // Korean journal of parasitology. – 2020. – Vol. 58, N. 4. – P. 343–371.
75. Cheng, T. C. Studies on the morphogenesis, development and germ cell cycle in the sporocysts and cercariae of *Clythelmins pennsylvaniensis* Cheng, 1961 (Trematoda: Brachyocoeliidae) / T. C. Cheng // Journal of the Pennsylvania Academy of Science. – 1961. – Vol. 35. – P. 10–22.
76. Cockerell, T. D. A. Snails of the genus *Succinea* from the Maritime Province of Siberia / T. D. A. Cockerell // Journal of the Washington Academy of Sciences. – 1924. – Vol. 14, N. 15. – P. 366–369.
77. Combes, C. Parasitism. The ecology and evolution of intimate interactions / C. Combes. – Chicago, Illinois: University of Chicago Press, 2001. – 552 p.
78. Crandall, R. B. The life history and affinities of the turtle lung fluke, *Heronimus chelydrae* MacCallum, 1902 / R. B. Crandall // Journal of parasitology. – 1960. – Vol. 46. – P. 289–307.
79. Darriba, D. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing / D. Darriba, G. L. Taboada, R. Doallo, D. Posada // Nature Methods. – 2012. – Vol. 9, N. 8 – P. 772.

80. Āatkauskienē, I. Characteristic of lifespan and reproduction period of *Succinea putris* (L.) (Gastropoda: Styllomatophora) / I. Āatkauskienē // *Ekologija*. – 2005. – Vol. 3. – P. 28–33.
81. Dobrovolskij, A. A. The nature of reproduction of trematodes rediae and sporocysts / A. A. Dobrovolskij, G. L. Ataev // *Taxonomy, Ecology and Evolution of Metazoan Parasites*. Presses Universitaires de Perpignan. – 2003. – Vol. 1. – P. 249–272.
82. Dujardin, F. Histoire naturelle des helminthes ou vers intestinaux / F. Dujardin. – Paris: Librairie encyclopedique de Roret, 1845. – 654 p.
83. Felsenstein, J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap / J. Felsenstein // *Evolution*. – 1985. – Vol. 39. – P. 783–791.
84. Folmer, O. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates / O. Folmer, M. Black, W. Hoeh, [et al.] // *Molecular marine biology and biotechnology journal*. – 1994. – Vol. 3. – P. 294–299.
85. Galaktionov, K. V. The biology and evolution of trematodes: an essay on the biology, morphology, life cycles, transmission, and evolution of digenetic trematodes / K. V. Galaktionov, A. A. Dobrovolskij – Boston, Dordrecht, London: Kluwer Academic Publishing, 2003. – 620 p.
86. Gonchar A. Transatlantic discovery of *Notocotylus atlanticus* (Digenea: Notocotylidae) based on life cycle data / A. Gonchar, D. Jouet, K. Skirnisson, [et al.] // *Parasitology research*. – 2019. – Vol. 118. – P. 1145–1456.
87. Gonchar, A. Short communication: New data support phylogeographic patterns in a marine parasite *Tristriata anatis* (Digenea: Notocotylidae) / A. Gonchar, K. V. Galaktionov // *Journal of Helminthology*. – 2020. – Vol. 94 – e79.
88. Gusarov, A. Succineidae. Treasure of Russian shells / A. Gusarov // Moscow: Colus-Doverie. Vol 3. – 26 p.
89. Haase, M. *Ecrobia grimmi* in brackish Lake Sawa, Iraq: indirect evidence for long-distance dispersal of hydrobiid gastropods (Caeno-gastropoda: Rissooidea) by birds / M. Haase, M. D. Naser, T. Wilke // *Journal of Molluscan Studies*. – 2010. – Vol.76. – P.101–105.
90. Halík, L. Über die rhythmischen bewegungen der in bernsteinschnecken parasitierenden sporozystenschläuche von *Leucochloridium macrostomum* Rud. (= *paradoxum* Carus) / L. Halík // *Zeitschrift für vergleichende Physiologie*. – 1931. – Vol. 14. – P. 462–478.
91. Hall, T. A BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT / T. A. Hall / *Nucleic Acids Symposium Series*. – 1999. – Vol. 41. – P. 95–98.
92. Heckert, G. A. Untersuchungen über die Entwicklungs- und Lebensgeschichte des *Distomum macrostomum* / G. A. Heckert // *Bibliotheca Zoologica*. – 1889. – Vol. 1, N. 4. – P. 5–66.

93. Heneberg, P. Molecular and comparative morphological analysis of central European parasitic flatworms of the superfamily Brachylaimoidea Allison, 1943 (Trematoda: Plagiorchiida) / P. Heneberg, J. Sitko, J. Bizos // Parasitology. – 2016. – V. 143, N. 4 – P. 455–474.
94. Hoagland, K. E. The succineid snail fauna of Chittenango Falls / K. E. Hoagland, G. M. Davis // Proceedings of the Academy of Natural Sciences of Philadelphia. – 1987. – Vol. 139. – P. 465–526.
95. Holland, B. S. A geographic mosaic of passive dispersal: population structure in the endemic Hawaiian amber snail *Succinea caduca* (Mighels, 1845) / B. S. Holland, R. H. Cowie // Molecular Ecology. – 2007. – Vol. 16, N. 12. – P. 2422–2435.
96. Horsák, M., Check-list of the molluscs (Mollusca) of the Czech Republic / M. Horsák, L. Juříčková, L. Beran. – Zlin: Nakladatelství KABOUREK, 2013. – 264 p.
97. Ito, H. Parasitic helminths obtained from the hazel grouse, *Bonasa bonasia vicinitas* Riley, 1915, in Hokkaido and Russia / H. Ito, T. Yoshino, D. Endoh, [et al.] // Japanese journal of zoo and wildlife medicine. 2012. – Vol. 17. – P. 21–25.
98. Johnston, T. H. Larval trematodes from Australian terrestrial and freshwater molluscs. Part III. *Leucochloridium australiense* n. sp. / T.H. Johnston, E.R. Cleland // Transactions of the Royal Society of South Australia. – 1938. – Vol. 62. – P. 25–33.
99. Jordan, H. E. The life cycle of *Brachycoelium mesorchium* Byrd, 1937 (Trematoda: Brachycoeliinae) / H. E. Jordan, E. E. Byrd // Zeitschrift für Parasitenkunde. – 1967. – Vol. 29. – P. 61–84.
100. Kagan, I. G. Further Contributions to the Life History of *Neoleucochloridium problematicum* (Magath, 1920) new comb. (Trematoda: Brachylaemidae) / I. G. Kagan // Transactions of the American Microscopical Society. – 1952a. – Vol. 71, N.1. – P. 20–44.
101. Kagan, I. G. Revision of the Subfamily Leucochloridiinae Poche, 1907 (Trematoda: Brachylaemidae) / I. G. Kagan // The American Midland Naturalist. – 1952b. – Vol. 48, N. 2. – P. 257–301.
102. Kharoo, V. K. Studies on the trematode genus *Leucochloridium* Carus, 1835 (Digenea: Leucochloridiidae (Poche, 1907) Dollfus, 1934 with description of *Leucochloridium mehrii* sp. nov. From the spotted redshank *Totanus fuscus* / V. K. Kharoo // Biochemical and cellular archives. – 2011. – Vol. 11, N. 1. – P. 237–243.
103. Kharoo V. K. Studies on the trematode genus *Leucochloridium* Carus, 1835 (Digenea: Leucochloridiidae (Poche, 1907) Dollfus, 1934 with description of *Leucochloridium mehrii* sp. nov. from the spotted redshank *Totanus fuscus* / V. K. Kharoo // Biochemical and cellular archives. – 2011. – Vol. 11, N. 1. – P. 237–243.

104. Kharoo, V. K. On a new species of trematode *Leucochloridium gallinuli* from the Indian moorhen *Gallinula chloropus* from Kashmir / V. K. Kharoo, R. L. Dhar // Indian journal of helminthology. – 1981. – Vol. 33. – P. 15–19.
105. Kruglov, N. D. Methods of experimental hybridization and some results of its applications in the taxonomy of Lymnaeidae / N. D. Kruglov, Y. I. Starobogatov // Malacological Review. – 1985. – Vol. 18. – P. 21–35.
106. Kumar, S. MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms / S. Kumar, G. Stecher, M. Li, [et al.] // Molecular Biology and Evolution. – 2018. – Vol. 35. – P. 1547–1549.
107. Kuznik-Kowalska, E. On the population dynamics, reproductive biology and growth of *Succinea putris* (Linnaeus, 1758) (Gastropoda: Pulmonata: Succineidae) / E. Kuznik-Kowalska, B. M. Pokryszko, M. Proćków, [et al.] // Folia malacological. – 2013. – Vol. 21, N. 4. – P. 215–224.
108. Leigh, J. W. PopART: Full-feature software for haplotype network construction / J. W. Leigh, D. Bryant // Methods in Ecology and Evolution. – 2015. – Vol. 6. – P. 1110–1116.
109. Lewis, J. W. Studies on the life history of *Brachylaimus oesophagei* Shaldybin, 1953 (Digenea: Brachylaimidae) / J. W. Lewis // Journal of Helminthology. – 1969. – Vol. 43, N. 1/2. – P. 79–98.
110. Lewis, P.D., Jr. Helminths of terrestrial molluscs in Nebraska. II. Life cycle of *Leucochloridium variae* McIntosh, 1932 (Digenea: Leucochloridiidae) / P. D. Lewis Jr. // Journal of Parasitology. – 1974. – Vol. 60. – P. 251–255.
111. Lewis, P. D. Jr. Adaptations for the transmission of species of *Leucochloridium* from molluscan to avian hosts / P. D. Lewis Jr. // Proceedings of the Montana Academy of Sciences. – 1977. – Vol. 37. – P. 70–81.
112. Lively, C. M. Parasite adaptation to locally common host genotypes / C. M. Lively, M. F. Dybdahl // Nature. – 2000. – Vol. 405. – P. 679–681.
113. Lühe, M. Parasitische Plattwürmer. I. Trematodes / M. Lühe // Die Süßwasserfauna Deutschlands. – 1909. – Vol. 17. – P. 1–217.
114. Magath, T. B. *Leucochloridium problematicum* n. sp. / T. B. Magath // The Journal of Parasitology. – 1920. – Vol. 6, N. 3. – P. 105–114.
115. Matthews, B. F. *Lecithochirium furcolabiatum* (Jones, 1933) Dawes, 1947: the miracidium and mother sporocyst / B. F. Matthews, R. A. Matthews // Journal of helminthology. – 1991. – Vol. 65, N. 4. – P. 259–269.

116. McIntosh, A. Some new species of trematode worms of the genus *Leucochloridium* Carus, parasitic in birds from Northern Michigan, with a key and notes on other species of the genus / A. McIntosh // The Journal of Parasitology. – 1932. – Vol. 19, N. 1. – P. 32–53.
117. McMichael-Phillips, D. F. Ultrastructural studies on the miracidium of *Sanguinicola inermis* (Digenea: Sanguinicolidae) / D. F. McMichael-Phillips, J. W. Lewis, M. C. Thorndyke // Parasitology. – 1992. – Vol. 105, N. 3. – P. 435–443.
118. Mehra, H. R. Revision of Brachylaemidae Joyeux et Foley, 1930 with new subfamilies Thapariellinae and Urotrematinae and new family Harmotrematinae with its subfamilies, Harmotrematinae Yamaguti, 1938 and Helicotrematinae n. subf. / H. R. Mehra // Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences. – 1962. – Vol. 32. – P. 319–334.
119. Mitta, G. The compatibility between *Biomphalaria glabrata* snails and *Schistosoma mansoni*: an increasingly complex puzzle / G. Mitta, B. Gourbal, C. Grunau [et al.] // Advances in Parasitology. – 2017. – Vol. 97. – P. 111–145.
120. Mönnig, H. O. Über *Leucochloridium macrostomum* (*Leucochloridium paradoxum* Carus), ein Beitrag Zur Histologie der Trematoden / H. O. Mönnig. – Jena: Gustav Fischer, 1922. – 61 p.
121. Monticelli, F. S. Saggio di una morfologia dei Trematodi / F. S. Monticelli. – Napoli: Stabilimento Tipografico Flli. Ferrante, 1888. – 130 p.
122. Nakao, M. Distribution records of three species of *Leucochloridium* (Trematoda: Leucochloridiidae) in Japan, with comments on their microtaxonomy and ecology / M. Nakao, M. Sasaki, T. Waki [et al.] // Parasitology International. – 2019. – Vol. 72. – 101936.
123. Nordmann, M. Histoire Naturelle des Helminthes ou Vers Intestinaux / M. Nordmann. – Paris: Librairie Encyclopédique de Roret, 1840. – 770 p.
124. Ohari, Y. Morphological and genetic characterization of green-banded broodsacs of *Leucochloridium* (Leucochloridiidae: Trematoda) sporocysts detected in *Succinea lauta* in Hokkaido, Japan / Y. Ohari, Y. Kuwahara, T. Itagaki // Parasitology international. – 2019. – Vol. 68, N. 1. – P. 53–56.
125. Olson, P. D. Phylogeny and classification of the Digenea (Platyhelminthes: Trematoda) / P. D. Olson, T. H. Cribb, V. V. Tkach, R. A. Bray, D. T. Littlewood // International Journal for Parasitology. – 2003. – Vol. 33, N. 7. – P. 733–755.
126. Pan, C. T. The general histology and topographic microanatomy of *Australorbis glabratus* / C. T. Pan // Bulletin of Museum of Comparative Zoology. – 1958. – Vol. 119. – P. 237–299.

127. Patterson, C. M. Taxonomic studies of the land snail family Succineidae / C. M. Patterson // *Malacological Review*. – 1971. – Vol. 4. – P. 131–202.
128. Perez, K. E. A fresh start in ambersnail (Gastropoda: Succineidae) taxonomy: finding a foothold using a widespread species of *Oxyloma* / K. E. Perez, M. A. Martinez Cruz, W. Brent, [et al.] // *European Journal of Taxonomy*. – 2021. – Vol. 757. – P. 102–126.
129. Pérez-Ponce, de L. Taxonomic distribution of cryptic diversity among metazoans: not so homogeneous after all / L. de Pérez-Ponce, R. Poulin // *Biology letters*. – 2016. – Vol. 12. – 20160371.
130. Pfluger, W. Experimental epidemiology schistosomiasis. I. The prepatent period and cercarial production of *Schistosoma mansoni* in *Biomphalaria snails* at various constant temperatures / W. Pfluger // *Zeitschrift für Parasitenkunde*. – 1980. – Vol. 63. – P. 159–169.
131. Poche, F. Einige Bemerkungen zur Nomenklatur der Trematoden / F. Poche // *Zoologischer Anzeiger*. – 1907. – Vol. 31. – P. 124–126.
132. Pojmanska, T. Variability of *Leucochloridium paradoxum* Carus, 1835 (= *L. heckerti* Kagan, 1952) (Trematoda: Brachylaimidae) in natural and experimental conditions / T. Pojmanska // *Acta Parasitologica Polonica*. – 1967. – Vol. 14. – P. 381–398.
133. Pojmanska, T. Differentiation of the ultrastructure of the body wall of the sporocyst of *Leucochloridium paradoxum* / T. Pojmanska, K. Machaj // *International Journal for Parasitology*. – 1991. – Vol. 21, N. 6. – P. 651–659.
134. Pojmanska, T. Family Leucochloridiidae Poche, 1907 / In *Keys to the Trematoda*, D. I. Gibson, A. Jones, R. A. Bray (Eds.) // London, CABI Publishing, 2002. – P. 47–51.
135. Ponder, W. F. *Biology and evolution of the Mollusca. Volume 1.* / W. F. Ponder, D. R. Lindberg, J. M. Poner. – London: CRC Press, 2020. – 900 p.
136. Prokhorova, E. E. An analysis of morphological and molecular genetic characters for species identification of amber snails *Succinea putris* (Succineidae) / E. E. Prokhorova, R. R. Usmanova, G. L. Ataev // *Invertebrate Zoology*. – 2020a. – Vol. 17. – P. 1–17.
137. Prokhorova, E. E. The first record of the trematode *Urogonimus certhiae* (Trematoda: Leucochloridiidae) in the Eurasian nuthatch *Sitta europaea* / E. E. Prokhorova, A. A. Vinogradova, A. S. Tokmakova, G. L. Ataev // *Zoosystematica Rossica*. – 2020b. – Vol. 29, N. 2. – P. 238–246.
138. Prokhorova, E. E. RAPD markers for species identification of trematodes from the genus *Leucochloridium* / E. E. Prokhorova, A. A. Zhukova, N. V. Tsymbalenko, [et al.] // *Parazitologiya*. – 2017. – Vol. 51, N. 4. – P. 339–344.
139. Quick, H. E. The anatomy of british *Succinea* / H. E. Quick // *Proceedings of the malacological society*. – 1933. – Vol. 20, N. 6. – P. 295–318.

140. Rigby, J. E. *Succinea putris*: a terrestrial opisthobranch mollusc / J. E. Rigby // Proceedings of the Zoological Society of London. – 1965. – Vol. 144. – P. 445–485.
141. Robinson, E. J. Jr. The life history of *Postharmostomum helicis* (Leidy, 1847) n. comb. (Trematoda: Brachylaemidae) / E. J. Robinson Jr. / The journal of parasitology. – 1949. – Vol. 35, N. 5. – P. 513–533.
142. Rudolphi, C. A. Neue Beobachtungen uber die Eingeweidewurmer / C. A. Rudolphi // Archiv für Zoologie und Zootomie. – 1803. – Vol. 3. – P. 1–32.
143. Rudolphi, C. A. Entozoorum synopsis cui accedunt mantissa duplex et indices locupletissimi / C. A. Rudolphi. – Berlin: Sumtibus A. Rücker, 1819. – 811 p.
144. Rząd, I. Morphological and molecular characterization of adult worms of *Leucochloridium paradoxum* Carus, 1835 and *L. perturbatum* Pojman'ska, 1969 (Digenea: Leucochloridiidae) from the great tit, *Parus major* L., 1758 and similarity with the sporocyst stages / I. Rząd, P. Hofsoe, R. Panicz, J. K. Nowakowski // Journal of Helminthology. – 2014. – Vol. 88. – P. 506–510.
145. Rząd, I. Helminth community of tits *Cyanistes caeruleus* and *Parus major* (Paridae) during their autumn migration on the Southern Baltic Coast / I. Rząd, A. Okulewicz, R. Sałamatın [et al.] // Animals. – 2023. – Vol. 13. – P. 421.
146. Sasaki, M. An unknown species of *Leucochloridium* (Trematoda: Leucochloridiidae) from northern Honshu, Japan / M. Sasaki, T. Iwaki, T. Waki, M. Nakao // Parasitology International. – 2022. – Vol. 87. – 102491.
147. Schileyko, A. A. Treatise on recent terrestrial pulmonate molluscs, part 15. Oopeltidae, Anadenidae, Arionidae, Philomycidae, Succineidae, Athoracophoridae / A. A. Schileyko // Ruthenica, Supplement 2. – 2007. – P. 2049–2210.
148. Schniebs, K. Morphological and genetic variability in *Radix auricularia* (Mollusca: Gastropoda: Lymnaeidae) of Lake Baikal, Siberia: the story of an unfinished invasion into the ancient deepest lake / K. Schniebs, T. Y. Sitnikova, M. V. Vinarski // Diversity. – 2022. – Vol. 14. – 527.
149. Siebold, C. T. Uber *Leukochloridium paradoxum* / C. T. von Siebold // Zeitschrift für wissenschaftliche Zoologie. – 1853. – Vol. 4. – P. 425–437.
150. Singh, K. S. Parasitological survey of Kumaon region. Part III. *Leucochloridium indicum* n.sp. (Trematoda: Leucochloridiidae) from the Himalayan Red Crowned Jay / K. S. Singh // Indian Journal of Helminthology. – 1962. – Vol. 14. – P. 57–61.
151. Smirnov, P. A. What is hidden under an eggshell? Ultrastructural evidence on morphology of “passive” *Prosorhynchus squamatus* miracidium (Digenea: Bucephalidae) / P. A. Smirnov, A. A. Dobrovolskij // Invertebrate Zoology. – 2019. – Vol. 16, N. 4. – P. 361–376.

152. Storch, V. Der Bau der Körperwand von *Leucochloridium paradoxum* / V. Storch, U. Welsch // Zeitschrift für Parasitenkunde. – 1970. – Vol. 35. – P. 67–75.
153. Tatonova, Y. V. Genetic diversity of nuclear ITS1–5.8S–ITS2 rDNA sequence in *Clonorchis sinensis* Cobbold, 1875 (Trematoda: Opisthorchiidae) from the Russian Far East / Y. V. Tatonova, G. N. Chelomina, V. V. Besprosvannykh // Parasitology International. – 2012. – Vol. 61, N. 4. – P. 664–674.
154. Tatonova, Y. V. Genetic diversity of *Clonorchis sinensis* (Trematoda: Opisthorchiidae) in the Russian southern Far East based on mtDNA cox1 sequence variation / Y. V. Tatonova, G. N. Chelomina, V. V. Besprosvannykh // Folia Parasitologica. – 2013. – Vol. 60, N. 2. – P. 155–162.
155. Taylor, H. R. An emergent science on the brink of irrelevance: a review of the past 8 years of DNA barcoding // H. R. Taylor, W. E. Harris // Molecular Ecology Resources. – 2012. – Vol. 12. – P. 377–388.
156. Telfer, A. Biodiversity inventories in high gear: DNA barcoding facilitates a rapid biotic survey of a temperate nature reserve / A. Telfer, M. Young, J. Quinn, [et al.] // Biodiversity Data Journal. – 2015. – Vol. 3. – 6313.
157. Travassos, L. Faune helminthologique du Mato Grosso / L. Travassos // Memórias do Instituto Oswaldo Cruz. – 1928. – Vol. 21, N. 2. – P. 309–341.
158. Tubangui, M. A. Trematode parasites of Philippine Vertebrates. V. Flukes from birds / M. A. Tubangui // Philippine Journal of Science. – 1932. – Vol. 47. – P. 369–404.
159. Untergasser, A. Primer3 – new capabilities and interfaces / A. Untergasser, I. Cutcutache, T. Koressaar [et al.] // Nucleic Acids Research. – 2012. – Vol. 40. – e115.
160. Ulmer, M. J. *Postharmostomum helicis* (Leidy, 1847) Robinson 1949, (Trematoda), its life history and a revision of the subfamily Brachylaeminae: Part I. / M. J. Ulmer // Transactions of the American Microscopical Society. – 1951. – Vol. 70, N. 3. – P. 189–238.
161. Usmanova, R. R. Genotypic and morphological diversity of trematodes *Leucochloridium paradoxum* / R. R. Usmanova, G. L. Ataev, A. S. Tokmakova [et al.] // Parasitology research. – 2023. – Vol. 122. – P. 997–1007.
162. Vázquez-Prieto, S. Influence of life history traits on the population genetic structure of parasitic helminths: a minireview / S. Vázquez-Prieto, R. Vilas, E. Paniagua, F. M. Ubeira // Folia Parasitologica. – 2015. – Vol. 62. – 060.
163. Valadão, M. C. A new cryptic species of *Echinostoma* (Trematoda: Echinostomatidae) closely related to *Echinostoma paraensei* found in Brazil / M. C. Valadão, P. V. Alves, D. López Hernández // Parasitology. – 2023. – Vol. 150. – P. 337–347.

164. Vinarski, M. V. Preliminary phylogeography of *Lymnaea stagnalis*: are there cryptic species of the great pond snail? / Vinarski, M. V., Schniebs K, Glöer P, [et al.] // XI International Congress on Medical and Applied Malacology: Abstracts book. Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Malacologia, 2012. – p. 66.
165. Wade, M.C. Evolutionary relationships among the Pulmonate land snails and slugs (Pulmonata, Stylommatophora) / M. C. Wade, B. F. Mordan, F. Naggs // Biological Journal of the Linnean Society. – 2006. – Vol. 87, N.4. – P.593–610.
166. Wesołowska, W. Do *Leucochloridium* sporocysts manipulate the behaviour of their snail hosts? / W. Wesołowska, T. Wesołowski // Journal of Zoology. – 2014. – Vol. 292. – P. 151–155.
167. Wesenberg-Lund, C. Contribution to the development of the trematoda Digenea. Part I. The biology of *Leucochloridium paradoxum* / C. Wesenberg-Lund // Det Kongelige Danske videnskabernes selskabs skrifter Naturvidenskabelig og matematisk afdeling. – 1931. – Vol. 9. – P. 94–142.
168. White, T. R. Ten new complete mitochondrial genomes of pulmonates (Mollusca: Gastropoda) and their impact on phylogenetic relationships / T. R. White, M. M. Conrad, R. Tseng // BMC Ecology and Evolution. – 2011. – Vol. 11, N. 295. – P.1–15.
169. Wiegmann, A. F. A. Bericht über die Fortschritte der Zoologie im Jahre 1834 / A. F. A. Wiegmann // Archiv für Naturgeschichte. – 1835. – Vol. 1, N. 1. – P. 301–361.
170. Woodhead, E. The mother sporocysts of *Leucochloridium* / E. Woodhead // The Journal of Parasitology. – 1935. – Vol. 21, N. 5. – P. 337–346.
171. Woodhead, E. An extraordinary case of multiple infection with the sporocysts of *Leucochloridium* / E. Woodhead // The Journal of Parasitology. – 1936. – Vol. 22, N. 2. – P. 227–228.
172. Yamaguti, S. Systema Helminthum. Vol. I. The digenetic trematodes of vertebrates. / S. Yamaguti – New York: Interscience Publishers Inc., 1958. – 979 p.
173. Zeller, E. On *Leucochloridium paradoxum* and the development of the larvæ contained in it into distoma / E. Zeller // The Annals and magazine of natural history; zoology, botany, and geology. – 1874. – Vol. 15, N. 4. – P. 162–164.
174. Zemoglyadchuk K. Dimensional structure features of the population of *Succinea putris* (Gastropoda, Pulmonata) / K. Zemoglyadchuk // Journal of Wetlands Biodiversity. – 2015. – Vol. 5. – P. 57–61.
175. Zdarska, Z. Ultrastructure of the tegument and associated structures of *Leucochloridium paradoxum* sporocyst and metacercaria / Z. Zdarska, T. N. Soboleva, L. L. Ospovskaya // Folia parasitologica. – 1982. – Vol. 29. – P. 247–251.

176. Zhukova, A. A. Identification of species *Leucochloridium paradoxum* and *L. perturbatum* (Trematoda) based on rDNA sequences / A. A. Zhukova, E. E. Prokhorova, A. S. Tokmakova [et al.] // Parazitologiya. – 2014. – Vol. 48, N.3. – P. 185–192.