

УДК 576.895.122

ОБНАРУЖЕНИЕ В МОЛЛЮСКЕ *SUCCINEA PUTRIS* СПОРОЦИСТЫ РОДА *LEUCOCHLORIDIUM* НЕОБЫЧНОЙ ОКРАСКИ

© 2022 г. Р. Р. Усманова^{а,*}, Е. Е. Прохорова^а

^аРоссийский государственный педагогический университет имени А.И. Герцена,
Лаборатория экспериментальной зоологии, кафедра зоологии и генетики,
наб. р. Мойки, д. 48, Санкт-Петербург, 191186 Россия

* e-mail: rregina.usmanova@gmail.com

Поступила в редакцию 10.11.2022 г.

После доработки 23.11.2022 г.

Принята к публикации 27.11.2022 г.

На территории Бокситогорского района Ленинградской области (Россия) в моллюске *Succinea putris* L., 1758 обнаружена спороциста *Leucochloridium* sp. со зрелым окрашенным отростком. Показано, что пигментация отростка отличается от таковой спороцист других видов рода *Leucochloridium* Carus, 1835, ранее описанных на территории Европы. Наиболее близкими по окраске к отросткам найденной спороцисты оказались партениты с территории Японии. Проведено генотипирование обнаруженной спороцисты по фрагментам рДНК (полные ITS1, ITS2, 5.8S и частичные 18S и 28S нуклеотидные последовательности). Генетические дистанции между исследуемой спороцистой и представителями ранее описанных видов рода *Leucochloridium* в большинстве случаев превышают средние внутривидовые. Это, а также данные морфологического анализа, могут свидетельствовать о принадлежности обнаруженной спороцисты к самостоятельному, ранее не описанному в Европе виду рода *Leucochloridium*.

Ключевые слова: трематоды, *Leucochloridium*, рДНК, генотипирование, окраска отростков спороцист, *Succinea putris*

DOI: 10.31857/S0031184722060023; **EDN:** FHOEXO

Определение трематод, как правило, осуществляется по таким стадиям развития, как мариты и церкарии. Однако строение партенит трематод рода *Leucochloridium* Carus, 1835 (Trematoda, Leucochloridiidae) позволяет проводить видовую идентификацию по спороцистам. Спороцисты разных видов этого рода различаются формой и окраской зрелых отростков (см.: Гинецинская, 1968). Валидность этих морфологических признаков была подтверждена молекулярно-генетическими методами (Casey et al., 2003; Zhukova et al., 2014; Ataev et al., 2016).

В результате многолетнего (с 2008 г.) анализа зараженности моллюсков *Succinea putris* L., 1758 (Gastropoda, Succineidae) на территории европейской части России и Белоруссии нами были выявлены три вида трематод рода *Leucochloridium*: *L. paradoxum* Carus, 1835, *L. vogtianum* Baudon, 1881 и *L. perturbatum* Pojmanska, 1969.

Наиболее часто встречаются спороцисты вида *L. paradoxum*, отличающиеся зеленой окраской отростков. При этом отмечается определенная вариабельность рисунка окраски (Усманова, 2021).

В 2017 г. в Бокситогорском районе Ленинградской области была обнаружена спороциста со зрелым отростком, также окрашенным в зеленый цвет, но характер пигментации заметно отличался от ранее описанных нами и другими авторами для *L. paradoxum* на территории Европы (Гинецинская, 1953; Heckert, 1889; Casey et al., 2003; Ataev et al., 2016). В то же время, окраска отростка оказалась близка видам *Leucochloridium* spp. из Японии (Nakao et al., 2019; Ohari et al., 2019). Для определения видовой принадлежности найденной спороцисты было проведено молекулярно-генетическое исследование.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Моллюски *Succinea putris*, зараженные спороцистами *Leucochloridium* sp. и *L. paradoxum*, были обнаружены на территории Ленинградской области (59°28'36.6 N, 33°48'21.0 E). Спороциста *L. paradoxum* была идентифицирована ранее по морфологическим признакам, а также генотипирована по фрагменту митохондриального гена I субъединицы цитохром с-оксидазы (GenBank MZ676717.2) (Усманова и др., 2021). Анализ окраски отростков спороцист проводили с использованием стереомикроскопа Leica M165C и фотокамеры Leica DFC290. Спороцисты *Leucochloridium* sp., извлеченную из моллюска, хранили при температуре – 80°C. ДНК выделяли при помощи коммерческого набора ДНК-сорб-С-М (cat. № K1-6-50-Mod) (АмплиСенс, Россия) согласно инструкции производителя. Генотипирование спороцисты осуществляли по участку рДНК, включающему полные ITS1, ITS2, 5.8S и частичные 18S и 28S нуклеотидные последовательности рДНК. Для ПЦР были использованы три пары специфических праймеров Br – dig11 (Tkach et al., 2000), dig12 – 1500R (Tkach et al., 2003) и RiboN_F – L2 (Zhukova et al., 2014). Праймер RiboN_F был сконструирован при помощи программы Primer 3 (Untergasser et al., 2012) с использованием нуклеотидной последовательности *L. paradoxum* (GenBank, KP938187.1). ПЦР проводили с использованием TaqDNA полимеразы (cat. № EP0401) (ThermoFisher Scientific, Литва) по описанному ранее протоколу (Prokhorova et al., 2020) с температурами отжига 54.7, 56.0 и 64.0°C соответственно. Выделение ПЦР-продуктов из агарозного геля и их очистку производили при помощи коммерческого набора Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (cat. № A9281) (Promega, США) согласно инструкции производителя. Секвенирование по Сэнгеру осуществляли в коммерческой организации ООО «Синтол».

Анализ секвеннограмм, сборку и выравнивание нуклеотидных последовательностей проводили с помощью программ BioEdit v. 7.2.5 (Hall, 1999) и MEGA v. 10.2.4 (Kumar et al., 2018).

Для подсчета 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 software (Darrriba et al., 2012). Для

филогенетических реконструкций по ITS1-5.8S-ITS2 участку рДНК была использована двухпараметрическая модель Джукса-Кантора (Jukes, Cantor, 1969). Филогенетические реконструкции с использованием метода максимального правдоподобия (ML) проводили в программе MEGA v. 7.0 (Kumar et al., 2016). Бутстреп-поддержка для деревьев, построенных методом ML, была посчитана на основе 1000 реплик (Felsenstein, 1985). Байесовский анализ (BI) 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 BI-деревьев оценивали по рассчитанной величине апостериорной вероятности. Для визуализации филогенетических деревьев, сгенерированных с помощью программы TreeAnnotator 1.7.5, использовали программу FigTree 1.4.0 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>). Номера использованных нуклеотидных последовательностей из GenBank представлены на филогенетических деревьях. Для подсчёта внутривидовых генетических дистанций использовали последовательности *L. paradoxum* (KP938187.1, LC466801.1, MH101511.1, KP903688.1, JF346883.1, JF274482.1, KP903686.1, KP903685.1, KP903686.1, JN639012.1, MK377352.1), *L. perturbatum* (LC466802.1, KP938186.1, KP903687.1, MK377349.1, MK377351.1, JF331664.1) и *L. vogtianum* (KU351661.1, KP903691.1, KP903689.1, KP903690.1) из GenBank.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Морфологический анализ

Основным морфологическим признаком для видовой идентификации спороцист трематод рода *Leucochloridium* является форма и окраска зрелых отростков (Гинецинская, 1953; Casey et al., 2003; Ataev et al., 2016). У изучаемой спороцисты обнаружены молодой (неокрашенный) и зрелый (окрашенный) отростки (рис. 1А).

Дистальный участок зрелого отростка окрашен в коричневый цвет. Далее, на коричнево-зелёном фоне видны темные бугорки и две поперечные белые полосы. Ниже выделяется участок, где на белом фоне мозаично расположены зелёные квадраты. За этим участком хорошо заметна прерывистая полоса коричневого цвета. Остальная часть отростка окрашена в жёлтый цвет. Покровы спороцисты образуют здесь кольцевые складки, окрашенные прерывистыми коричневыми полосками.

Ранее на территории Европы спороцисты с отростками вышеописанного типа окраски не регистрировались. Наиболее близкими по характеру пигментации являются спороцисты *L. paradoxum* (Гинецинская, 1953; Усманова, 2021; Heckert, 1889; Mönnig, 1922; Bakke, 1980; Casey et al., 2003; Ataev et al., 2016 и др.), у которых в окраске преобладают зелёный и коричневый цвета (рис. 1В). Однако в окраске отростков спороцист *L. paradoxum* с территории Европы не отмечается наличие коричневой полосы после зелёного участка (рис. 1В). Кроме того, у отростков *L. paradoxum* проксимальная часть окрашена иначе (сплошные полосы на светлом фоне) и лишена кольцевой складчатости.

Из известных описаний отростков спороцист рода *Leucochloridium* наиболее близки по окраске к найденной в Бокситогорском районе спороцисты с территории Японии, которые были определены как виды *Leucochloridium* sp. (Ohari et al., 2019) и *L. paradoxum* (Nakao et al., 2019).

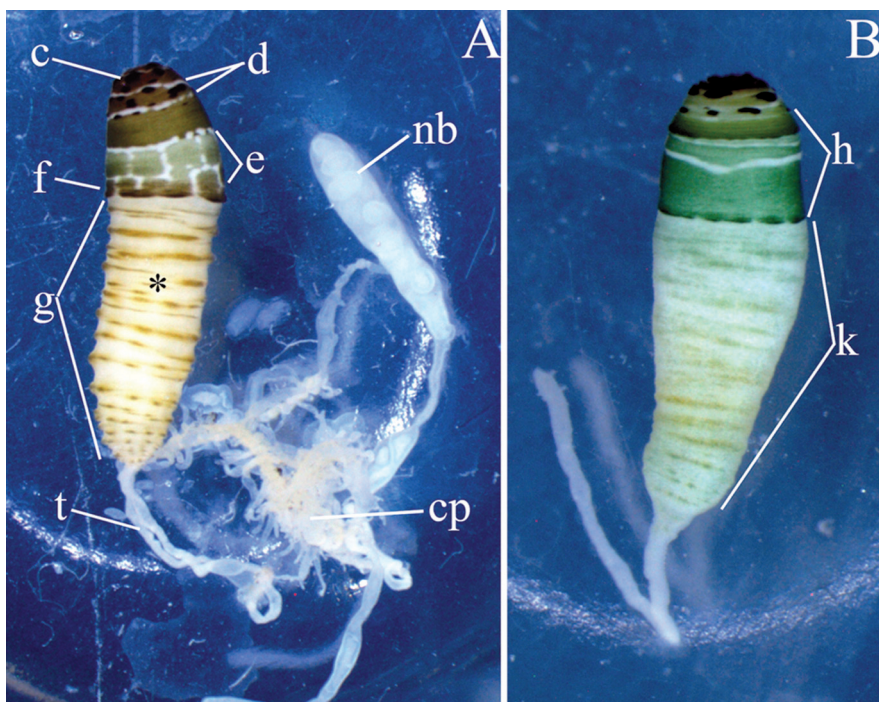


Рисунок 1. Спороцисты рода *Leucochloridium*: А – спороциста *Leucochloridium* sp., обнаруженная в моллюске *Succinea putris* (с – дистальный участок, окрашенный в коричневый цвет; d – поперечные белые полосы; e – участок белого цвета, на фоне которого мозаично расположены зелёные квадраты; f – прерывистая полоса коричневого цвета; g – часть отростка жёлтого цвета с характерными светло-коричневыми складками; ср – центральная часть спороцисты; nb – неокрашенный отросток; t – трубчатые участки. Звёздочка – окрашенный отросток); В – отросток *L. paradoxum* (h – зелёный участок; k – проксимальная часть отростка).

Figure 1. Sporocysts of *Leucochloridium* trematodes. А – sporocyst of *Leucochloridium* sp., found in *Succinea putris* snail (с – distal area of brown color; d – white transverse bands; e – white area with mosaically arranged green square blocks; f – brown dotted band; g – yellow-colored part of the broodsac with peculiar lightly brown folds; ср – central part of sporocyst's stolon; nb – non-colored broodsac; t – tube. Asterix – colored broodsac). В – broodsac of *L. paradoxum* (h – green area; k – proximal part of the broodsac).

Молекулярно-генетический анализ

В результате исследования обнаруженной спороцисты *Leucochloridium* sp. был получен участок рДНК протяженностью 1548 п. н. (GenBank, OP709269), включающий полные нуклеотидные последовательности ITS1, ITS2, 5.8S и частичные 18S и 28S.

На филогенетической реконструкции по фрагменту ITS1-5.8S-ITS2 рДНК (1279 п. н.) представители семейства Leucochloridiidae формируют одну кладу (рис. 2). Отдельные ветви образованы представителями родов *Urogonimus* Monticell, 1888 и *Urotocus* Looss, 1899, *Leucochloridium*. Исследуемая спороциста оказывается в одной группе с *L. paradoxum* из Японии, *Leucochloridium* sp. с о-ва Окинава, зелёной спороцистой из Европы и располагается ближе всего к *L. vogtianum*.

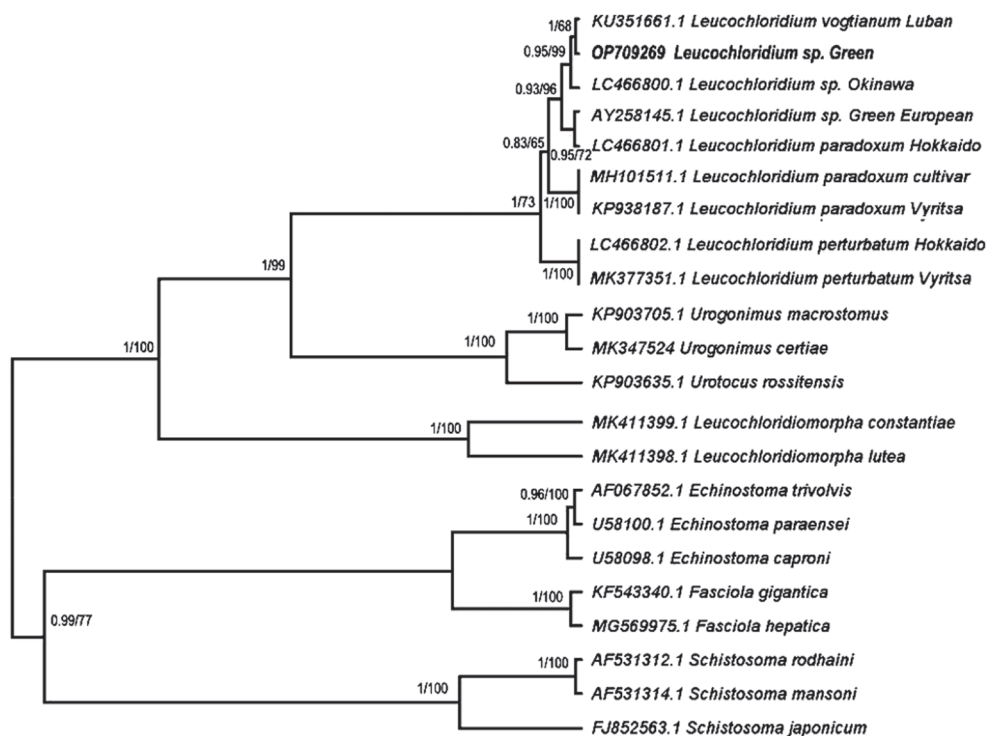


Рисунок 2. Байесовская филогенетическая реконструкция, выполненная по нуклеотидной последовательности ITS1-5.8S-ITS2 рДНК (1279 п. н.) с использованием модели Джукса-Кантора. Топология дерева совпадает с реконструкцией, полученной методом максимального правдоподобия. Указаны значения апостериорных вероятностей для ВІ и бутстрепные поддержки для 1000 реплик для ML. Указаны номера использованных последовательностей в GenBank.

Figure 2. The Bayesian phylogenetic reconstruction based on nucleotide sequences of ITS1-5.8S-ITS2 rDNA (1279 b. p.) with the use of Jukes and Cantor model. Tree obtained by the maximum likelihood method had the same topology. Number at the branch nodes indicates posterior probability for BI and percentage bootstrap support for 1000 replicates for ML. Numbers of used sequences from GenBank are shown.

Генетические дистанции по данному фрагменту генома между последовательностями, использованными для построения дерева (рис. 2), представлены в табл. 1. Для сравнения выявляемых между образцами различий были посчитаны средние внутривидовые генетические дистанции для представителей рода *Leucochloridium* (табл. 2). В анализе была использована последовательность меньшей длины, чем при построении дерева (рис. 2), которая, однако, позволила включить в выравнивание большее число образцов.

Средние генетические дистанции между исследуемой спороцистой и другими видами рода *Leucochloridium* по фрагменту ITS1-5.8S-ITS2 рДНК превышают среднюю внутривидовую дистанцию для представителей рода *Leucochloridium* (табл. 2).

Таблица 1. Генетические дистанции (p-distance) между представителями рода *Leucochloridium* по фрагменту ITS1-5.8S-ITS2 рДНК (1146 п. н.)

Table 1. Genetic distances (p-distance) between *Leucochloridium* trematodes by the ITS1-5.8S-ITS2 rDNA fragment (1146 b. p.)

	Вид	<i>Leucochloridium</i> sp. OP709269	1	2	3	4	5
1	<i>Leucochloridium</i> sp. Green European AY258145.1	0.01438					
2	<i>Leucochloridium paradoxum</i> Europe KP938187.1, MH101511.1	0.04167	0.03820				
3	<i>Leucochloridium paradoxum</i> Hokkaido LC466801.1	0.01530	0.00278	0.03989			
4	<i>Leucochloridium vogtianum</i> KU351661.1	0.00668	0.01918	0.04840	0.02199		
5	<i>Leucochloridium</i> sp. Okinawa LC466800.1	0.00769	0.01157	0.04086	0.01420	0.01442	
6	<i>Leucochloridium perturbatum</i> LC466802.1	0.03693	0.03122	0.03400	0.03152	0.04369	0.03700

Таблица 2. Внутривидовые и межвидовые генетические дистанции (p-distance) для рода *Leucochloridium* по фрагменту ITS1-5.8S-ITS2 рДНК (946 п. н.)

Table 2. Intraspecific and interspecific genetic distances (p-distance) for *Leucochloridium* trematodes by the ITS1-5.8S-ITS2 rDNA fragment (946 b. p.)

Показатель	<i>L. paradoxum</i>	<i>L. perturbatum</i>	<i>L. vogtianum</i>
Средняя внутривидовая p-distance	0.01987	0.00762	0.00059
Средняя внутривидовая p-distance для рода <i>Leucochloridium</i>		0.00936	
Межвидовая p-distance с <i>L. paradoxum</i>		0.03329	0.02148
Средняя межвидовая p-distance		0.02878	
p-distance с <i>Leucochloridium</i> sp. OP709269	0.02118	0.03127	0.00029
Средняя p-distance между <i>Leucochloridium</i> sp. OP709269 и другими видами рода <i>Leucochloridium</i>		0.01758	

Исключение составляют *L. vogtianum* и *Leucochloridium* sp. с о-ва Окинава: между последовательностями этих трематод и изучаемой трематоды генетическая дистанция меньше средней внутривидовой. Максимальные дистанции по данному участку между исследуемой спороцистой и видами *L. perturbatum* и *L. paradoxum* превышают средние межвидовые для рода.

В результате исследования была получена последовательность 28S рДНК небольшой длины (339 п. н.). Этот фрагмент генома является относительно консервативным: между разными видами рода *Leucochloridium* генетические дистанции по данному маркеру не превышают 0.009 (Nakao et al., 2019). Проведённый анализ позволил выявить единичные (1–4) замены в пределах данного участка (табл. 3). Наибольшие

различия наблюдаются между исследуемой спороцистой и *L. vogtianum*, наименьшие – между исследуемой спороцистой и *L. paradoxum* из Японии. Эти данные не согласуются с результатами анализа участка рДНК, включающего внутренние транскрибируемые спейсеры и 5.8S рДНК, что может объясняться консервативностью 28S, а также короткой длиной сравниваемого фрагмента.

Таблица 3. Количество замен в нуклеотидных последовательностях фрагмента 28S рДНК (339 п. н.) трематод рода *Leucochloridium*

Table 3. Number of differences in sequences of 28S rDNA fragment (339 b. p.) *Leucochloridium* trematodes. Line – the absence of differences

Вид	<i>Leucochloridium</i> sp. OP709269	1	2	3	4
1 <i>Leucochloridium paradoxum</i> Europe KP938187.1, MH101511.1	1				
2 <i>Leucochloridium paradoxum</i> Hokkaido LC466801.1	–	1			
3 <i>Leucochloridium perturbatum</i> LC466799.1	1	–	1		
4 <i>Leucochloridium passeri</i> ON219927.1	1	–	1	–	
5 <i>Leucochloridium vogtianum</i> KU351661	3	4	3	4	4

Прочерк – отсутствие замен.

По результатам филогенетического анализа фрагмента ITS1-5.8S-ITS2 рДНК к обнаруженной спороцисте наиболее генетически близки *Leucochloridium* sp. с о-ва Окинава (Nakao et al., 2019) и *L. vogtianum*. Отростки данных спороцист значительно отличаются по морфологии (форме и/или окраске) от отростка исследуемой спороцисты. Партенита *L. paradoxum* из Японии (Nakao et al., 2019) похожа на обнаруженную нами по пигментации отростков, однако на филогенетической реконструкции оказывается на большем расстоянии, чем спороцисты с несхожей окраской отростков.

Полученные в ходе морфологического и молекулярно-генетического анализа данные могут свидетельствовать о высокой степени морфологической изменчивости какого-либо из известных видов или же о принадлежности обнаруженной спороцисты к самостоятельному виду рода *Leucochloridium*, не описанному ранее для Европейского региона. Последнее предположение мы считаем более вероятным, поскольку все генотипированные виды рода *Leucochloridium* характеризуются высокой внутривидовой консервативностью рДНК (Усманова и др., 2021; Zhukova et al., 2014; Neneberg, 2016) и в литературе не описаны случаи обнаружения у спороцист одного вида принципиально разных по окраске отростков.

БЛАГОДАРНОСТИ

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 20-34-90012. Филогенетический анализ выполнен при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 20-54-15003 НЦНИ_а.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Гинецинская Т.А. 1953. Значение окраски спороцист трематод рода *Leucochloridium* для диагностики вида. Доклады АН СССР 88 (1): 177–179. [Ginetsinskaya T.A. 1953. Znachenie okraski sporocist trematod roda *Leucochloridium* dlya diagnostiki vida. Doklady USSR Academy of Sciences 88: 177–179. (In Russian)].
- Гинецинская Т.А. 1968. Трематоды, их жизненные циклы, биология и эволюция. Ленинград, СССР, Наука, 411 с. [Ginetsinskaya T.A. 1968. Trematodes, their life cycles, biology and evolution. Leningrad, USSR, Nauka, 411 pp. (in Russian)].
- Усманова Р.Р. 2021. Полиморфизм трематод *Leucochloridium paradoxum*. Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов-2021», Москва, Россия, 12–23 апреля 2021, 124781. [Usmanova R.R. 2021 Polimorfizm trematod *Leucochloridium paradoxum*. 28th International Scientific Conference for Undergraduate and Graduate Students and Young Scientists “Lomonosov”, Moscow, Russia, 12-23 april 2021, 124781 (in Russian)].
- Усманова Р.Р., Токмакова А.С., Лопатина О.Д., Прохорова Е.Е. 2021. Генетический полиморфизм трематод *Leucochloridium paradoxum* на территории Ленинградской области по фрагменту митохондриального гена *cox1*. Паразитология 55 (5): 355–361. <https://doi.org/10.31857/S003118472105001X>. [Usmanova R.R., Tokmakova A.S., Lopatina O.D., Prokhorova E.E. 2021. Geneticheskij polimorfizm trematod *Leucochloridium paradoxum* na territorii Leningradskoj oblasti po fragmentu mitohondrial'nogo gena *cox1*. Parazitologiya 55 (5): 355–361. <https://doi.org/10.31857/S003118472105001X>. (in Russian)].
- Ataev G.L., Zhukova A.A., Tokmakova A.S., Prokhorova E.E. 2016. Multiple infection of amber snails *Succinea putris* with sporocysts of *Leucochloridium* spp. (Trematoda). Parasitology Research 115 (8): 3203–3208. <https://doi.org/10.1007/s00436-016-5082-6>
- Bakke T.A. 1980. A revision of the family Leucochloridiidae Poche (Digenea) and studies on the morphology of *Leucochloridium paradoxum* Carus, 1835. Systematic Parasitology 1 (3): 189–202. <https://doi.org/10.1007/BF00009845>
- Bouckaert R., Vaughan T. G., Barido-Sottani J., Duchêne S., Fourment M., Gavryushkina A., Heled J., Jones G., Kühnert D., De Maio N., Matschiner M., Fábio Mendes K.F., Müller F.N., Ogilvie H., du Plessis L., Poppinga A., Rambaut A., Rasmussen D., Siveroni I., Suchard A.M., Wu C.-H., Xie D., Zhang C., Stadler T., Drummond J.A. 2019. BEAST 2.5: An advanced software platform for Bayesian evolutionary analysis. PLOS Computational Biology 15 (4): e1006650. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1006650>
- Carus C. 1835. Beobachtungen über einen merkwürdigen Schöngefärbten Eingeweidewurm *Leucochloridium paradoxum* mihi und dessen parasitische Erzeugung in einer Landschnecke *Succinea amphibia* Drap., *Helix putris*. Nova acta physico-medica Academiae Caesareae Leopoldino-Carolinae Naturae Curiosum 17 (1): 85–100.
- Casey S.P., Bakke T.A., Harris P.D., Cable J. 2003. Use of ITS rDNA for discrimination of European green-and brown-banded sporocysts within the genus *Leucochloridium* Carus, 1835 (Digenea: Leucochloridiidae). Systematic Parasitology 56 (3): 163–168. <https://doi.org/10.1023/b:sypa.0000003809.15982.ca>
- Darriba D., Taboada G.L., Doallo R., Posada D. 2012. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. Nature Methods 9(8): 772. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2109>
- Felsenstein J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. Evolution 39: 783–791. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.1985.tb00420.x>
- Hall T.A. 1999. BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucleic Acids Symposium Series 41: 95–98.
- Heckert A. 1889. Untersuchungen über die Entwicklungs- und Lebensgeschichte des *Distomum macrostomum*. Bibliotheca Zoologica 1 (4): 5–66.
- Heneberg P., Sitko J., Bizos J. 2016. Molecular and comparative morphological analysis of central European parasitic flatworms of the superfamily Brachylaimoidea Allison, 1943 (Trematoda: Plagiorchiida). Parasitology 143 (4): 455–474. <https://doi.org/10.1017/S003118201500181X>
- Jukes T.H., Cantor C.R. 1969. Evolution of protein molecules. In: Munro H.N. (ed.). Mammalian protein metabolism. New York, Academic Press. 21–132. <https://doi.org/10.1016/C2013-0-12458-0>
- Kumar S., Stecher G., Tamura K. 2016. MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for Bigger Datasets. Molecular Biology and Evolution 33 (7): 1870–1874. <https://doi.org/10.1093/molbev/msw054>

- Kumar S., Stecher G., Li M., Knyaz C., Tamura K. 2018. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Molecular Biology and Evolution* 35 (6): 1547–1549. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>
- Mönnig H.O. 1922. Über *Leucochloridium macrostomum* (*Leucochloridium paradoxum* Carus), ein Beitrag Zur Histologie der Trematoden. Jena, Gustav Fischer, 61 pp.
- Nakao M., Sasaki M., Waki T., Iwaki T., Morii Y., Yanagida K., Watanabe M., Tsuchitani Y., Saito T., Asakawa M. 2019. Distribution records of three species of *Leucochloridium* (Trematoda: Leucochloridiidae) in Japan, with comments on their microtaxonomy and ecology. *Parasitology International* 72: 101936. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2019.101936>
- Ohari Y., Kuwahara Y., Itagaki T. 2019. Morphological and genetic characterization of green-banded broodsacs of *Leucochloridium* (Leucochloridiidae: Trematoda) sporocysts detected in *Succinea lauta* in Hokkaido, Japan. *Parasitology international* 68 (1): 53–56. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2018.10.004>
- Prokhorova E.E., Usmanova R.R., Ataev G.L. 2020. An analysis of morphological and molecular genetic characters for species identification of amber snails *Succinea putris* (Succineidae). *Invertebrate Zoology* 17 (1): 1–17. <https://doi.org/10.15298/invertzool.17.1.01>
- Tkach V.V., Pawlowski J., Sharpilo V.P. 2000. Molecular and morphological differentiation between species of the *Plagiorchis vespertilionis* group (Digenea, Plagiorchiidae) occurring in European bats, with a re-description of *P. vespertilionis* (Müller, 1780). *Systematic Parasitology* 47: 9–22. <https://doi.org/10.1023/A:1006358524045>
- Tkach V.V., Littlewood D.T.J., Olson P.D., Kinsella M.J., Swiderski Z. 2003. Molecular phylogenetic analysis of the Microphalloidea Ward, 1901 (Trematoda: Digenea). *Systematic Parasitology* 56: 1–15. <https://doi.org/10.1023/A:1025546001611>
- Untergasser A., Cutcutache I., Koressaar T., Ye J., Faircloth B.C., Remm M., Rozen S.G. 2012. Primer3 – new capabilities and interfaces. *Nucleic acids research* 40 (15): e115. <https://doi.org/10.1093/nar/gks596>
- Zhukova A.A., Prokhorova E.E., Tokmakova A.S., Tsymbalenko N.V., Ataev G.L. 2014. Identification of species *Leucochloridium paradoxum* and *L. perturbatum* (Trematoda) based on rDNA sequences. *Parazitologiya* 48 (3): 185–192. <https://doi.org/10.13140/RG.2.1.1740.0168>

FINDING OF UNUSUALLY COLORED SPORO CYST OF GENUS *LEUCOCHLORIDIUM* IN *SUCCINEA PUTRIS* SNAIL

R. R. Usmanova, E. E. Prokhorova

Keywords: trematodes, *Leucochloridium*, rDNA, genotyping, coloration of sporocyst's broodsacs, *Succinea putris*

SUMMARY

Leucochloridium sp. Carus, 1835 sporocyst with a mature colored broodsac was found in the Boksitogorsk District of Leningrad Region (Russia) in *Succinea putris* L., 1758 snail. The pigmentation of the sporocyst's broodsac was shown to differ from ones of other *Leucochloridium* Carus, 1835 species, previously described for Europe. The obtained sporocyst is most similar by the coloration of its broodsac to the trematodes of the same genus from Japan. The genotyping of the investigated sporocyst by the rDNA (ITS1, ITS2, 5.8S complete and 18S и 28S partly sequences) gene fragments was conducted. Genetic distances between obtained sporocyst and previously described species of *Leucochloridium* genus are higher than intraspecific ones in the most cases. This data and data of morphological analysis can imply that the investigated sporocyst belongs to the separate species of *Leucochloridium* genus, previously not discovered in the European region.