

УСМАНОВА
Регина Рустамовна

РАЗМНОЖЕНИЕ И РАЗВИТИЕ СПОРОЦИСТ
***LEUCOCHLORIDIUM PARADOXUM* CARUS, 1835**
(TREMATODA: LEUCOCHLORIDIIDAE)

1.5.12 – Зоология

Автореферат диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Санкт-Петербург
2023

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Российский государственный педагогический университет им. А. И. Герцена»

Научный руководитель:

Атаев Геннадий Леонидович, доктор биологических наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Российский государственный педагогический университет им. А. И. Герцена», заведующий кафедрой зоологии и генетики.

Официальные оппоненты:

Прокофьев Владимир Викторович, доктор биологических наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Псковский государственный университет», кафедра зоологии и экологии животных, заведующий кафедрой;

Юрлова Наталья Ильинична, кандидат биологических наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт систематики и экологии животных Сибирского отделения Российской академии наук, лаборатория паразитологии, ведущий научный сотрудник.

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт общей и экспериментальной биологии Сибирского Отделения Российской академии наук, г. Улан-Удэ.

Защита состоится _____ г. в _____ часов на заседании диссертационного совета Д 003.033.01 при Институте систематики и экологии животных СО РАН по адресу: 630091, Новосибирск, ул. Фрунзе, 11.

Факс: (383)2170-09-73

E-mail: dis@eco.nsc.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института Систематики и экологии животных СО РАН и на сайте <http://www.eco.nsc.ru>.

Автореферат разослан «__» _____ 2023 г.

Ученый секретарь
Диссертационного совета,
к.б.н.



Петрожицкая Людмила
Владимировна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность 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 остаётся открытым вопрос даже 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*. Для изучения развития их спороцист потребовалась видовая идентификация промежуточного хозяина – моллюска *Succinea putris* (янтарка).

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 работы заключается в проведении комплексного анализа участников паразито-хозяинной системы «*L. paradoxum* – *S. putris*». Несмотря на известность и широкую распространённость этих видов, часто возникают ошибки в их видовой идентификации. Впервые выполнен морфологический анализ и генотипирование моллюсков *S. putris* из разных популяций, а также *L. paradoxum*, паразитирующих в них. При этом впервые выполнен дизайн

праймеров для участка митохондриальной ДНК *S. putris*. Также впервые проведён анализ внутривидовой изменчивости окраски отростков 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 (МС).

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

Семейство Leucochloridiidae, куда входит р. *Leucochloridium*, является одной из базальных групп дигеней. В то же время эти трематоды обладают двуххозяиным 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 МС трематод *L. paradoxum*. Разветвлённая спороциста относится к дочерней генерации и производит только метацеркарий. Полученные результаты о механизме размножения дочерней спороцисты (ДС) *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 может быть использована зоологами, паразитологами и экологами. 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.

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 (ГК), из которых развивается дочерняя спороциста, представляющая единственное поколение партенит.

4. Закладка эмбрионов метацеркарий в спороцисте происходит субтегументарно и приурочена к ГМ. 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.

Апробация результатов

Результаты работы представлены на 12 конференциях, 6 из которых – международного уровня: Международная конференция «VI Съезд паразитологического общества» (Санкт-Петербург, 15–19 октября 2018 г.), V Международная конференция «Концептуальные и прикладные аспекты научных исследований и образования в области зоологии беспозвоночных» (Томск, 26–28 октября 2020 г.), Международный молодежный научный форум «Ломоносов-2020» (Москва, 10–27 ноября 2020 г.), Международная научная конференция «Изучение водных и наземных экосистем: история и современность» (Севастополь, 13–18 сентября 2021 г.), Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов-2021» (Москва, 12–23 апреля 2021 г.), Международная научно-практическая конференция «Изучение водных и наземных экосистем: история и современность» (Севастополь, 5–9 сентября 2022 г.), II Всероссийский орнитологический конгресс (Санкт-Петербург, Россия, 30 января–4 февраля 2023 г.).

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 научному руководителю Г. Л. Атаеву за помощь на всех этапах выполнения диссертационного исследования. Автор выражает отдельную благодарность А. А. Добровольскому за поддержку и ценные советы. Автор благодарен А. С. Токмаковой, Е. Е. Прохоровой, А. А. Виноградовой, А. Е. Жохову, Р. Р. Усманову, Н. А. Усмановой, и Р. Р. Усманову, а также всему коллективу кафедры зоологии и генетики РГПУ им.

А. И. Герцена за помощь в организации исследований. 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).

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

В главе приводятся данные об истории исследований трематод р. *Leucochloridium*, их жизненном цикле. Особое внимание уделено описанию морфологии стадий жизненного цикла, в частности, приводятся сведения о строении спороцист, окраске их отростков. В главе содержится информация о современных молекулярно-генетических исследованиях трематод р. *Leucochloridium*, об их промежуточных хозяевах: разнообразии и особенностях биологии.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Объекты исследования. В работе были исследованы промежуточные хозяева трематод *L. paradoxum* – моллюски *S. putris*, собранные в Ленинградской, Кировской, Московской, Калининградской областях России, Витебской и Гомельской области Белоруссии. Заражённые трематодами *L. paradoxum* особи были обнаружены на территории Ленинградской, Ярославской, Калининградской областей России, Витебской области Белоруссии. Всего было исследовано 1386 янтарок. 626 моллюсков были заражены спороцистами *L. paradoxum* или спороцистами р. *Leucochloridium* без окрашенных отростков.

Методы исследования. Для исследования фенотипической изменчивости промежуточного хозяина проводили морфометрический анализ раковины с последующей статистической обработкой. Также проводили анализ строения половой системы при анатомировании. Раковину, радулу и челюсть моллюсков исследовали с помощью сканирующего электронного микроскопа Carl Zeiss EVO-40 после предварительного обезвоживания и напыления золотом.

Для исследования развития спороцист воспроизводили жизненный цикл в лабораторных условиях с использованием в качестве окончательных хозяев *Gallus gallus domesticus*. Цыплят заражали 40–50 метацеркариями из зрелых окрашенных отростков спороцист *L. paradoxum*. Яйца марит, извлечённых из кишечника птиц через 21–23 дня после заражения (п. з.), использовали для получения мирацидиев и заражения улиток *S. putris*. Моллюсков фиксировали в смеси Буэна через 7 (n=1), 14 (n=2), 22 (n=3), 55 (n=1), 72 (n=1), 95 (n=1) дней п. з. Для изучения развития и размножения экспериментально и природнозаражённых спороцист использовали парафиновые срезы толщиной 4–5 мкм, окрашенные спиртовым эозином и гематоксилином Эрлиха. Анализ препаратов проводили на микроскопах Leica DM5000 и Nikon Eclipse E200. Иммунофлуоресцентный анализ спороцист проводили с помощью конфокальной микроскопии (Zeiss LSM880) с использованием специфических флуоресцентных красителей (родамин-фаллоидин, Hoechst 33342). Анализ микрофотографий выполняли в программном обеспечении ImageScope и ImageJ.

Образцы тканей моллюсков и трематод хранили при температуре -80°C для молекулярно-генетических исследований. Для исследования генетического полиморфизма из тканей моллюсков и трематод выделяли ДНК коммерческим набором «ДНК-сорб-С-М» согласно инструкции производителя. Затем проводили амплификацию со специфическими

праймерами. В качестве генетических маркеров для исследования янтарок использовали фрагменты митохондриальных генов I субъединицы цитохром с-оксидазы (*cox1*) и цитохрома b (*cytb*). Для исследования трематод – *cox1*. Праймеры для амплификации фрагмента *cytb* *S. putris*, а также один из праймеров для амплификации *cox1* *L. paradoxum* были сконструированы при помощи программы Primer3. Секвенирование проводили в коммерческих фирмах «Евроген», «Биобигль». Для анализа данных и визуализации результатов использовали программы BioEdit v. 7.2.5, MEGA v. 10.2.4, PopArt v. 4.8.4, BEAST v. 2.5, TreeAnnotator v. 1.7.5.

Оценку экстенсивности инвазии проводили по формуле: экстенсивность инвазии= $3M/n \times 100$ %, где 3M – количество заражённых моллюсков, n – общее число исследованных моллюсков. Статистическую обработку данных ($p \leq 0,05$) проводили в программах Past v. 3.26 и Microsoft Excel v. 1811.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

III. 1. Видовая идентификация промежуточного хозяина

Раковина исследованных моллюсков *S. putris* турбоспиральная, правозакрученная, остро яйцевидной формы, её составляют 2–3,5 оборота. Устье овальное, заострено в области колюмеллы. По индексам раковины и устья моллюски из Витебской области достоверно отличаются от остальных. Для улиток характерен полиморфизм по окраске, обусловленный пигментацией покровов.

Отличий между изученными моллюсками по морфологии половой системы не выявлено. Гермафродитная железа, её проток и семенной пузырьёк имеют типичное для пульмонат строение. Гермафродитный проток впадает в карреофур, с которым соединены два семяприёмника и проток белковой железы. Продолжается половой тракт семяйцеводом, который в области простаты разделяется на яйцевод и семяпровод. Яйцевод переходит во влагалище после впадения протока от сперматеки. Пенис покрыт мышечным чехлом и подразделяется на передний, интеркалярный и задний отделы. Ретрактор пениса охватывает семяпровод в дистальной части.

Челюсть и радула исследованных моллюсков устроены сходным образом. Радулярная формула имеет вид 22:12:1:12:22.

В результате исследования получено и аннотировано в базу данных GenBank 18 и 19 последовательностей фрагментов *cox1* и *cytb* соответственно. Оригинальные данные и данные из GenBank использовали для филогенетического анализа. По результатам анализа *cox1* (выравнивание 95 последовательностей длиной 565 п. н.) выявлено 18 гаплотипов (рис. 1). Наибольшее генетическое разнообразие характерно для моллюсков из ленинградской и московской популяций, наименьшее – для популяции из Витебской области. Средняя генетическая дистанция между гаплотипами составила $0,015 \pm 0,001$. Гаплотип Har_18 янтарки из Франции отдалён от остальных на большую генетическую дистанцию (в среднем $0,053 \pm 0,001$).

При анализе фрагмента *cytb* (выравнивание 19 нуклеотидных последовательностей длиной 452 п. н.) выделено 11 гаплотипов. Последовательность фрагмента гена *cytb* моллюска из Франции представляет уникальный гаплотип Har_11, отдалённый от остальных на 27

нуклеотидных замен. Генетические дистанции между гаплотипами составили в среднем $0,018 \pm 0,003$.

Обсуждение. Несмотря на выявленный полиморфизм, все изученные моллюски относятся к виду *S. putris*, о чём свидетельствует анализ половой системы. Высокая степень внутривидовой изменчивости характерна и для других представителей сем. Succineidae (Branson, 1962; Patterson, 1971 и др.).

Результаты исследования гена *cox1* показывают, что гаплотипическое разнообразие *S. putris* из Европы выше, чем улиток из Канады. Это может быть связано с процессами расселения вида (см. Бондарева и др., 2016). Показатели внутривидовой генотипической изменчивости сравнимы с показателями других видов семейства – *S. caduca*, *Oxyloma salleanum* (Holland, Cowie, 2007; Perez et al., 2021). Генетические дистанции между исследованными образцами свидетельствуют о высокой степени генетической однородности моллюсков из разных популяций. Ранее был проанализирован фрагмент рДНК (ITS1-5,8S-ITS2) тех же моллюсков *S. putris*. Была выявлена идентичность всех особей по данному участку генома (Prokhorova et al., 2020). Таким образом, данные анализа рДНК также свидетельствуют о том, что все исследованные моллюски относятся к виду *S. putris*.

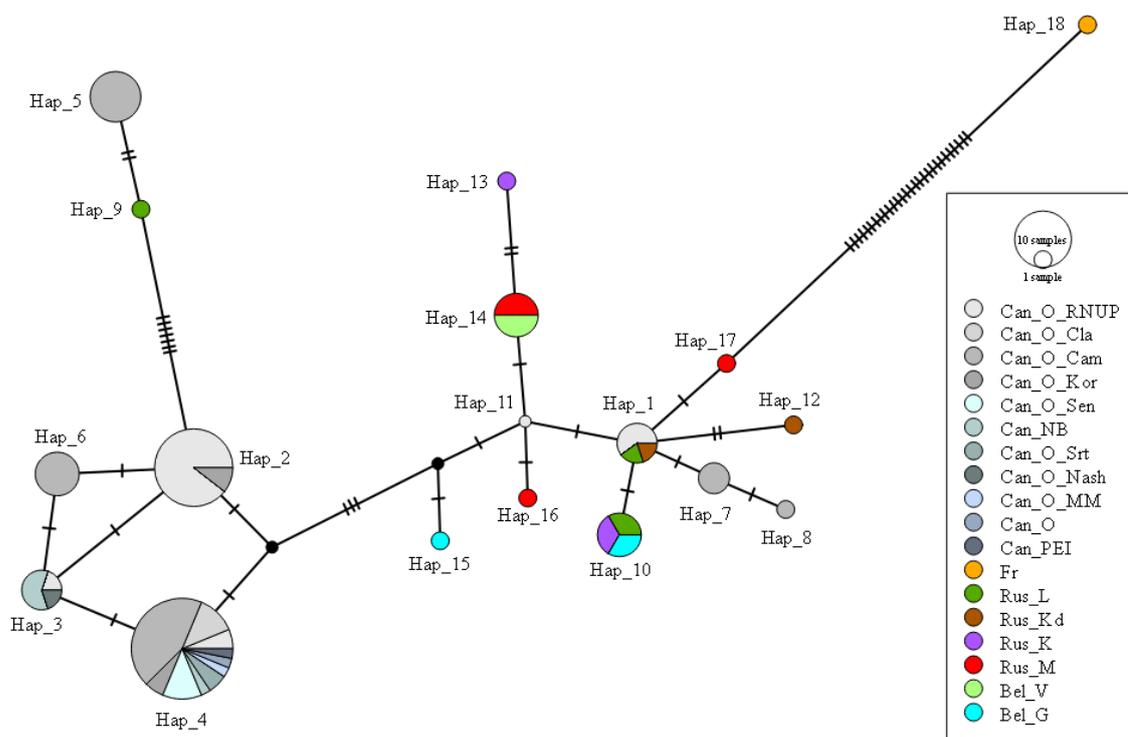


Рисунок 1. Разнообразие гаплотипов моллюсков *S. putris* по фрагменту *cox1*. Размеры окружностей в сети пропорциональны частоте встречаемости гаплотипов. Каждая мутация обозначена одним штрихом. Чёрные круги без обозначений – гипотетические гаплотипы. Точки сбора моллюсков: Can – Канада, Fr – Франция, Rus_L – Ленинградская область, Rus_Kd – Калининградская область, Rus_K – Кировская область, Rus_M – Московская область, Bel_V – Витебская область, Bel_G – Гомельская область.

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

Окраска отростков спорцист *L. paradoxum* представляет собой чередование полос чёрного, зелёного и белого цветов. Однако оттенок, расположение и количество полос варьирует, что связано с онтогенезом и индивидуальными особенностями спорцист. Анализ изображений зрелых отростков спорцист *L. paradoxum* (n=591) позволил выявить следующие

признаки в окраске: в дистальной части заметны тёмно-коричневые бугорки, затем расположены широкие сплошные полосы зелёного цвета. За ними отросток имеет окраску из прерывистых линий зелёного и жёлтого цветов. На основании анализа окраски отростков выделено четыре основных её типа (Usmanova et al., 2023).

В результате молекулярно-генетического исследования получено и аннотировано в базу данных GenBank 45 последовательностей фрагмента *cox1* спороцист *L. paradoxum* длиной 769–833 п. н. При анализе полученных данных и последовательностей из GenBank (выравнивание 51 последовательности длиной 757 п. н.) выявлено 27 гаплотипов. Наиболее часто встречается гаплотип Нар_3, характерный для всех исследованных точек сбора, за исключением Японии. Наиболее генетически разнообразны спороцисты из улиток вырицкой популяции (11 гаплотипов). На гаплогосети выделяются две группы: одна из них представлена гаплотипами трематод с территории Европы, вторую группу составляют гаплотипы японских спороцист. Средняя генетическая дистанция между гаплотипами – $0,013 \pm 0,001$. Средняя генетическая дистанция между гаплотипами спороцист из Европы – $0,005$, между гаплотипами всех европейских и японских спороцист – $0,032 \pm 0,001$. На филогенетической реконструкции по последовательностям *cox1* трематоды с территории Европы формируют единую кладу с высокой степенью поддержки. Обособлена японская группа гаплотипов *L. paradoxum*.

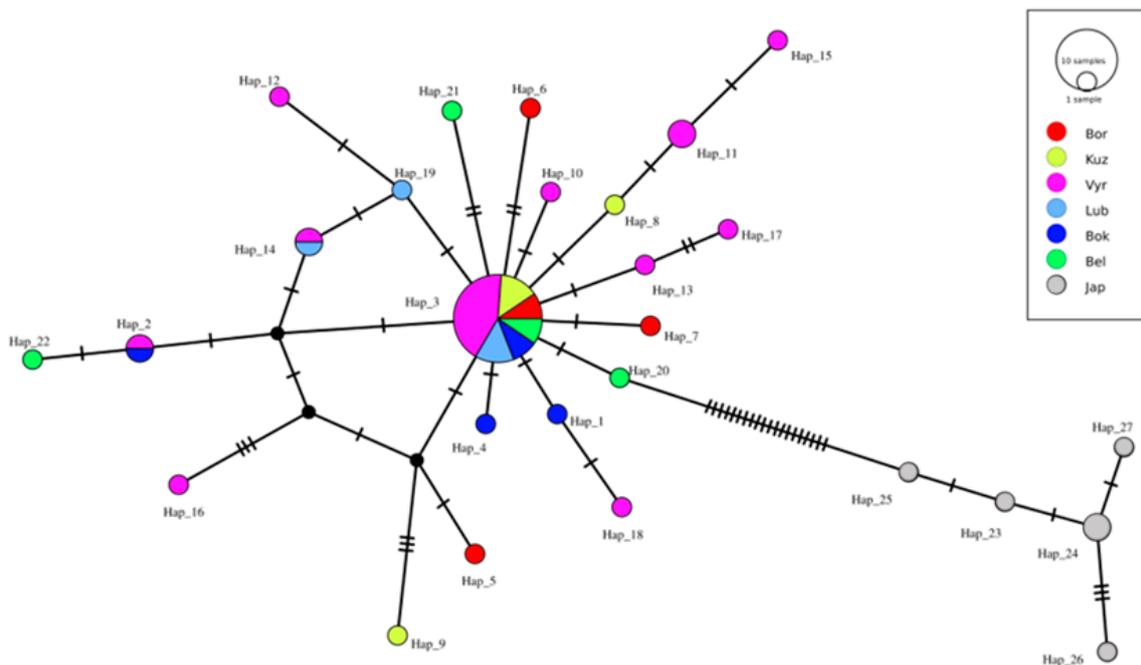


Рисунок 2. Разнообразие гаплотипов спороцист трематод *L. paradoxum* по фрагменту *cox1*. Размер кругов пропорционален частоте встречаемости гаплотипа. Штрихами обозначены нуклеотидные замены. Чёрные круги без обозначений – гипотетические гаплотипы. Точки сбора спороцист: Бор – Ярославская область, Куз, Вур, Луб – Ленинградская область, Бел – Витебская область, Яп – Япония.

Обсуждение. Выделенные четыре типа окраски спороцист *L. paradoxum* характеризуют внутривидовую вариабельность пигментации их отростков, однако для всех типов имеются общие признаки. Окраска отростков спороцист *L. paradoxum* из Японии (Nakao et al., 2019) отличается от описанных. Кроме того, эти спороцисты паразитируют в *Succinea lauta* (Nakao et al., 2019), что ставит под сомнение правильность определения трематод из Японии.

Трематоды *L. paradoxum* характеризуются значительной консервативностью как по митохондриальным, так и по ядерным маркерам. По фрагменту гена *cox1* выявлено более 20

гаплотипов, но они незначительно отличаются друг от друга. Значения генетических дистанций между гаплотипами *L. paradoxum* сопоставимы с внутривидовыми дистанциями других трематод семейства Leucochloridiidae (Heneberg et al., 2016; Nakao et al., 2019). Ранее было установлено, что все спороцисты *L. paradoxum* с территории России идентичны по протяжённым последовательностям рДНК, включая переменные участки (Zhukova et al., 2014). Незначительны различия по участку рДНК и между видами в пределах рода (Ataev et al., 2016). Для других родов сем. Leucochloridiidae показаны намного большие межвидовые различия (Prokhorova et al., 2020).

На филогенетической реконструкции с использованием участка ITS1-5.8S-ITS2 и фрагмента гена 28S рРНК выделяются две основные клады *L. paradoxum* – японская и европейская. Топология дерева схожа с топологией реконструкции на основе *cox1*. Различия между группами японских и европейских спороцист намного больше, чем средние внутривидовые генетические дистанции в сем. Leucochloridiidae, составляющие 0,005–0,010 (Heneberg et al., 2016). Проведённый морфологический и генетический анализ позволяет предположить, что японские спороцисты не относятся к виду *L. paradoxum*.

Генетическое разнообразие *L. paradoxum*, развивающихся в улитках *S. putris*, относящихся к разным популяциям, возможно, обеспечивается за счёт мобильности окончательных хозяев – птиц, в период миграций и расселения в районе гнездований. Существует мнение о том, что на генетическую структуру популяций паразитов также влияет степень специфичности к хозяину: популяции паразита с широким кругом хозяев могут демонстрировать относительно высокую генетическую изменчивость и низкую дифференциацию (см. Vázquez-Prieto et al., 2015). Это применимо и к виду *L. paradoxum*, который является паразитом птиц разных отрядов.

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

III. 3. 1. Развитие и размножение в экспериментально заражённых моллюсках.

Зрелые яйца *L. paradoxum* занимают дистальные участки матки. Они имеют размеры $26,0 \pm 0,7 \times 16,7 \pm 0,6$ мкм ($n=15$) и характеризуются овальной, несколько асимметричной формой. На верхнем полюсе яйца расположен оперкулум.

Триггером вылупления мирацидиев является попадание яйца в пищеварительный тракт моллюска. Мирацидий каплевидной формы, размером $23,2 \pm 2,0 \times 10,7 \pm 0,5$ мкм ($n=10$), в нём заметны около 10 клеток. Реснички расположены двумя продольными рядами с одной стороны тела личинки. Их средняя длина 4–5 мкм, в каудальной части личинки реснички образуют цирры длиной 8–10 мкм. В апикальной части мирацидия находится светопреломляющая структура копьевидной формы длиной $3,3 \pm 0,2$ мкм. В передней части тела личинки расположено 4 крупных клетки со светлыми ядрами размером $3,3 \pm 0,2$ мкм. Эти клетки выглядят как секреторные клетки мирацидиев других видов (Ataev, Tokmakova, 2018).

Через **7 дней** п. з. между ацинусами гепатопанкреаса видны округлые скопления клеток диаметром около 15 мкм. Они представляют собой эмбрионы на стадии 10–12 бластомеров, в основном макромеров (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; $n=6$). Такие зародыши, лишённые защитных структур, называются «голый эмбрион» (Cheng, 1961).

Через **14 дней** п. з. эмбрионы становятся овальными и подрастают до $34,1 \pm 2,1 \times 23,5 \pm 2,5$ мкм ($n=8$) (рис. 3 А). Они состоят из 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 эмбриона хорошо заметна зародышевая мембрана, что свидетельствует о достижении эмбрионами стадии «зародышевый шар» (Cheng, 1961).

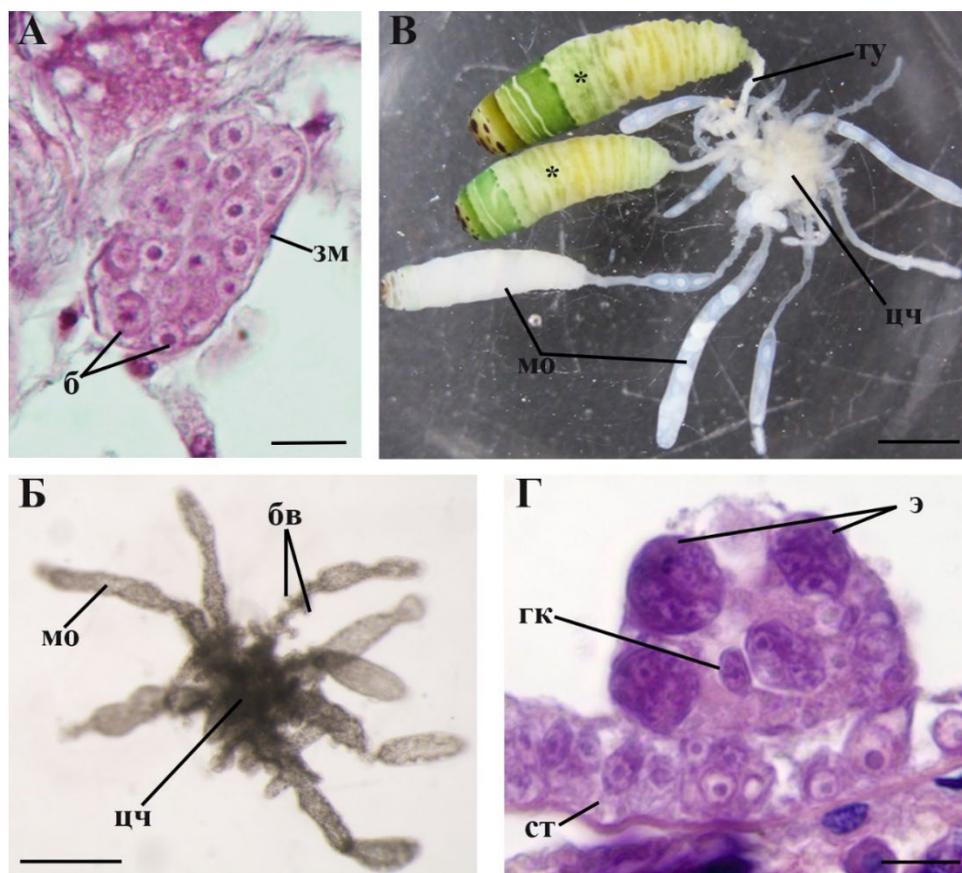


Рисунок 3. Строение спороцист *L. paradoxum*. А – спороциста через 14 дней п. з. Б – спороциста на ювенильной стадии развития. В – спороциста на стадии зрелости. Г – герминальная масса спороцисты. Масштаб: А, Г – 10 мкм, Б – 2 мм, В – 1 мм. Условные обозначения: б – бластомер, бв – боковой вырост отростка, гк – генеративная клетка, зм – зародышевая мембрана, мо – молодой отросток, ст – стенка тела спороцисты, ту – трубчатый участок, цч – центральная часть столона, э – эмбрион метацеркарии. Звёздочка – зрелый окрашенный отросток.

Через **22 дня** п. з. размеры спороцисты 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.

Через **55 дней** п. з. тело спороцисты представляет собой стolon, размеры центральной части которого составляют около 380×130 мкм. Внутри столона формируется общая полость, но отростки (не более пяти) лишены просвета. Длина наиболее крупных из них достигает 260 мкм. Герминальный материал спороцист представлен ГК и эмбрионами метацеркарий, которые развиваются как в субтегументарной паренхиме, так и в составе специализированных органов размножения партенит – в ГМ. Генеративные элементы, закладка и развитие которых происходит вне ГМ, мы называем свободными ГК и эмбрионами. Они расположены в пристеночной паренхиме центральной части столона и в паренхиматозном матриксе отростков.

ГМ расположены в субтегументарном слое. На ранних этапах своего развития они представляют собой скопления из 15–20 клеток диаметром не более 18 мкм. Крупные ГМ спороцист в возрасте 55 дней достигают размеров 30×40 мкм. По мере роста в них закладываются эмбрионы, и ГМ приобретают радиальную структуру: в центре расположены ГК и маленькие эмбрионы (менее 15 клеток), а по периферии – крупные эмбрионы (более 25 клеток). В составе ГМ эмбрионы развиваются до стадии зародышевого шара, после чего выходят в схизоцель. Наиболее крупные эмбрионы, состоящие из 70–80 бластомеров, достигают 25 мкм в диаметре.

Развитие схизоцеля сопровождается разрушением пристеночного слоя паренхимы. В результате в паренхиматозном матриксе образуются микрополости, в которых и развиваются генеративные элементы. Разрушение паренхимы может приводить к откреплению одной или нескольких ГМ от стенки спороцисты и переходу к флотированию в схизоцеле.

Через **72 дня** п. з. размеры центральной части столона спороцисты достигают 270×145 мкм. Спороцисты имеют более пяти отростков, длина наиболее крупных составляет 350 мкм. Внутри отростков имеется просвет, соединённый со схизоцелем центральной части столона. Полость схизоцеля отграничена от пристеночной паренхимы выстилкой, образованной цитоплазматическими отростками звёздчатых клеток. В зародышевой полости находятся многочисленные эмбрионы. Размер наиболее крупных из них составляет 25 мкм. Размер ГМ увеличивается до 50×30 мкм (рис. 3 Г). В них развивается около 10 эмбрионов.

Через **95 дней** п. з. размер центральной части столона увеличивается до 554×1120 мкм. Количество отростков не возрастает, но длина самых крупных из них достигает 675 мкм. В проксимальной части таких отростков видны боковые выросты.

В результате дегенерации паренхимы стенка тела спороцисты истончается, основные процессы размножения теперь приурочены к зародышевой полости, где видны ГМ и разновозрастные эмбрионы метацеркарий. Большинство зародышей находятся на ранних стадиях развития, но в некоторых начинаются морфогенетические преобразования. Диаметр таких эмбрионов достигает 70–80 мкм, они состоят примерно из 600 бластомеров. В спороцисте заметно снижается количество свободных ГК. ГМ имеют овальную форму, их размер составляет 90×50 мкм. В них развивается 20–40 эмбрионов, наиболее крупные из которых расположены ближе к периферии и достигают 35 мкм в диаметре.

Обсуждение. Мирацидии трематод *L. paradoxum* характеризуются пассивной стратегией заражения промежуточного хозяина. Для таких личинок характерны небольшие размеры (Семёнов, 1991), упрощение аппарата проникновения, а также редукция числа эпителиальных пластинок (Галактионов, Добровольский, 1998). В результате реснички у таких мирацидиев расположены не по всей поверхности тела. При этом они отличаются по длине, что характерно и для других исследованных на светооптическом мирацидиев надсемейства Brachylaimoidea (Kagan, 1952).

Самый ранний срок, на котором удалось обнаружить спороцисту – 7 дней п. з. В этом возрасте она представляет собой эмбрион, что 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 ДС, вероятно, осуществляется за счёт ГК, которые начинают дробиться, формируя эмбрион.

В результате постановки жизненного цикла *L. paradoxum* в лабораторных условиях, были получены спороцисты на разных сроках развития. Подобные исследования для этого вида проводились в конце XIX в. Гекертом (Heckert, 1889). Полученные нами результаты схожи с данными этого исследователя, однако спороцисты развивались примерно в полтора раза медленнее. 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. Разницу в темпах развития можно объяснить температурой окружающей среды при проведении экспериментов (см. Pfluger, 1980; Атаев, 1991) и интенсивностью инвазии (см. Атаев, Добровольский, 1990).

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 ДС *L. paradoxum* ГМ закладываются в субтегументарном матриксе, а затем переходят к флотированию в схизоцеле, приобретая радиальную структуру. Свободные ГК, расположенные на внутренней стенке тела спороцисты, были отмечены у спороцист *Haplometra cylindracea* (Plagiorchiidae). Подобные центры мультипликации ГК были ранее описаны как «диффузные» ГМ (Dobrovolskij, Ataev, 2003).

III. 3. 2. Развитие и размножение в природнозаражённых моллюсках. На протяжении тёплого сезона (с мая до сентября) в природе встречаются моллюски, заражённые разновозрастными спороцистами *L. paradoxum*. Мы выделяем в развитии спороцист несколько основных стадий.

(1) Стадия ювенильной спороцисты включает развитие от появления первых отростков до формирования зрелых отростков (рис. 3 Б). Минимальные размеры партенит из природнозаражённых янтарок составили 1240×972 мкм. У таких спороцист 10–15 отростков без боковых ответвлений, длиной 450–1920 мкм. Стенка тела спороцист на стадии ювенили сохраняет мощный субтегументарный слой (толщина 120±23 мкм). В схизоцеле центральной части столона располагаются эмбрионы метацеркарий, а также ГМ. В их составе находятся ГК, а также эмбрионы на ранних стадиях развития.

(2) Стадия зрелой спороцисты отличается появлением 1–5 окрашенных отростков (рис. 3 В). Центральная часть столона представляет собой переплетение тонких выростов размерами 11,9×11,9 мкм. Наиболее крупные из отростков достигают длины 17,8 мм. Они заполнены инвазионными метацеркариями (максимально 373 особи). Такие отростки ярко окрашены, соединены с центральной частью столона сократимыми трубчатыми участками и способны к пульсации. Одиночные и развивающиеся в составе ГМ эмбрионы встречаются как в пристеночной паренхиме, так и в схизоцеле центральной части столона. Но уже на этой стадии становятся заметны признаки дегенерации, проявляющиеся в снижении репродуктивной активности спороцист. Постепенно истончается и дегенерирует паренхиматозный матрикс. В паренхиме уменьшается число генеративных элементов.

(3) Стадия дегенерирующих спороцист. Признаки дегенерации, отмеченные у партенит на предыдущей стадии развития, приводят к завершению их размножения. Центральная часть столона становится компактной (1582×1230 мкм). Слой пристеночной паренхимы сильно истончается, её клетки, включая цитоны тегумента, разрушаются. Среди них не обнаруживаются генеративные элементы. Среди отростков выделяются крупные, интенсивно окрашенные, заполненные инвазионными метацеркариями. В схизоцеле заметны эмбрионы, однако они явно не закончат развития.

Для оценки экстенсивности инвазии были проведены вскрытия янтарок бокситогорской популяции с мая по август 2018–2022 гг. (n=635). Было выявлено, что экстенсивность инвазии не меняется в течение года и составляет максимум 10,1% в июле, минимум 6,8% – в сентябре. Наибольшее число спороцист на ювенильной стадии развития приходится на июнь (5,7%).

В результате анализа заражённых моллюсков, собранных в 2017-2022 гг. на территории Ленинградской области (n=178), было выявлено, что наибольшее число спороцист на стадии зрелости приходится на июль (95,1%), на стадии дегенерации – на июнь (18,7%).

Анализ заражённых моллюсков, собранных в Ленинградской области и Белоруссии в 2018-2022 гг. (n=224) показал, что в 90,6% случаев янтарки заражены одной спороцистой. В 7,6% случаев моллюски были заражены двумя спороцистами, в 1,8% – тремя. В случае множественной инвазии спороцисты могли находиться на разных стадиях развития, что свидетельствует о разнице в их возрасте.

Обсуждение. На основании анализа полученных в эксперименте данных, а также данных о спороцистах из природнозаражённых моллюсков предположено, что развитие спороцисты до стадии зрелости занимает около 90 суток в условиях летнего времени года. По литературным данным, развитие спороцисты от мирацидия до спороцисты с первым окрашенным отростком занимает около трёх месяцев (Heckert, 1889). Схожий срок развития характерен для спороцист *Neoleucochloridium problematicum* (Kagan, 1952). Однако это не абсолютная величина, которая, скорее всего, зависит от биотических и абиотических факторов (Combes, 2001), среди которых наибольшее влияние оказывает температура (Атаев, 1991).

Приведённая в работе периодизация онтогенеза спороцист отражает их функциональное состояние. В работах других исследователей (Лутта, 1939; Гинецинская, 1954) не приводятся описания обнаруженных партенит, что не позволяет сопоставить данные об их репродуктивной активности.

Было выявлено, что экстенсивность инвазии не меняется в течении сезона. Схожие данные получил Вудхед (Woodhead, 1935). 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).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Видовая идентификация трематод *L. paradoxum* и их промежуточных хозяев – моллюсков *S. putris*. В настоящее время определение беспозвоночных животных требует как анализа морфологии, так и молекулярно-генетического анализа. Это связано, в том числе, с внутривидовым полиморфизмом объектов исследований, наличием криптических видов.

Для лёгочных моллюсков характерна внутривидовая изменчивость, обусловленная экологической пластичностью раковин, что привело к тому, что в прошлом веке малакологами в рамках отдельных видов выделялись самостоятельные таксономические группы видового статуса. Подобная ситуация возникла с представителями сем. *Lymnaeidae*, *Radix auricularia* и *Lymnaea stagnalis* (Kruglov, Starobogatov, 1985; Schneibs et al., 2022), которых считали сборными видами. Применение молекулярно-генетических методов позволило во многом уточнить их статус (Vinarski et al., 2012; Schneibs et al., 2022).

Широкой внутривидовой изменчивостью характеризуются и моллюски *S. putris*, что дало 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*. В рамках исследования было выявлено, что все исследованные особи относятся к виду *S. putris*. Это подтвердили результаты морфологического анализа (по признакам раковины, радулы, челюсти, половой системы) и молекулярно-генетического анализа фрагментов генов *cox1* и *cytb*.

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). Ярким примером является таксономия р. *Echinostoma* (см. Chai et al., 2020), сем. *Notocotylidae* (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 связано с наличием у спороцист отростков с видоспецифичной окраской.

Вместе с тем, для спороцист р. *Leucochloridium* характерна и внутривидовая изменчивость окраски отростков. Только комплексный подход с использованием как морфологического, так и молекулярно-генетического анализа, а также анализа специфичности к промежуточному хозяину позволяет идентифицировать виды. Проведённый морфологический анализ позволил выделить четыре типа окраски отростков спороцист *L. paradoxum*, состоящей из элементов зелёного, белого и чёрного цветов, и выявить черты, общие для всех типов окраски. При этом на основании молекулярно-генетического анализа было показано, что спороцисты р. *Leucochloridium* со схожей пигментацией (см. Nakao et al., 2019; Усманова, Прохорова, 2022), однако принципиальными отличиями в рисунке окраски относятся к отдельным от *L. paradoxum* видам.

Таким образом, для моллюсков *S. putris* и спороцист трематод *L. paradoxum* выявлена морфологическая и генотипическая изменчивость. Однако, выполненный анализ позволил убедиться в том, что в ходе выполнения исследования были использованы модельные организмы этих двух видов. Это позволило с уверенностью экстраполировать данные, полученные в ходе постановки жизненного цикла в условиях эксперимента, на анализ природных заражений.

Развитие спороцист *L. paradoxum*. Среди трематод можно выделить несколько групп, которые отличаются характером размножения МС (Dobrovolskij, Ataev, 2003; Ataev, 2017). Разделение основано на различии состава генеративных элементов, представленных в личинках МС – мирацидиях. Такими элементами являются недифференцированные клетки

(НК), ГК и эмбрионы. Однако, всё разнообразие вариантов организации герминального материала мирацидиев может быть сведено к двум основным типам.

Если в личинке есть НК половой природы, то её размножение приурочено к паразитической фазе развития МС в моллюске, на которой пролиферация этих клеток обеспечивает мультипликацию ГК. К этому типу относится большинство трематод.

В мирацидиях второго типа отсутствуют НК. Герминальный материал представлен только ГК и (или) эмбрионами, которые завершат развитие в МС, следовательно, не происходит размножения на паразитической фазе развития МС. В этом случае спороциста функционально выполняет роль выводковой камеры (см. Dobrovolskij, Ataev, 2003). Такие мирацидии характерны для семейств *Phylophthalmidae* (Nollen, 1990; Tikhomirov, 2000), *Cyclocoelidae* (Szidat, 1932), *Microphalidae* (см. Galaktionov, Dobrovolskij, 2003), *Plagiorchidae* (Schell, 1965), *Brachylamidae* (Bargues, Mas-Coma, 1991). Первой генерацией партенит в жизненных циклах трематод этой группы являются материнские редии или ДС. Для редиидных видов установить отсутствие паразитической фазы МС возможно по морфологии партенит первой генерации – они представлены материнскими редиями. Однако для спороцистоидных видов по морфологии партенит достоверно определить их генерацию невозможно. В этом случае необходимо экспериментальное изучение начальных стадий развития партенит после проникновения мирацидия в моллюска-хозяина.

Среди исследователей отсутствует общее мнение о происхождении разветвлённых спороцист р. *Leucochloridium*: их относят либо к материнскому поколению (Woodhead, 1935; Гинецинская, 1968), либо к дочернему (Галактионов, Добровольский, 1998), но зачастую этот вопрос не рассматривается (Kagan, 1952; Pojmanska, 2003 и др.).

В рамках исследования было выявлено, что вылупление мирацидиев происходит в желудке или в дистальной части средней кишки моллюска-хозяина. В результате пенетрации личинки 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 ДС. Таким образом, разветвлённые спороцисты с окрашенными отростками относятся к дочернему поколению партенит – единственному в жизненном цикле трематод р. *Leucochloridium*.

На основании собственных и литературных данных (Heckert, 1889; Wesenberg-Lund, 1931; Woodhead, 1935) о развитии ДС *L. paradoxum* в экспериментально и природнозаражённых моллюсках в онтогенезе партенит были выделены 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 партениты 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 зависит 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. Соответственно, указанные выше сроки достижения определённой стадии онтогенеза являются усредненными и характерны для летнего времени года.

Реализация жизненного цикла *L. paradoxum* в природе. Изучение развития партенит 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.

Мы допускаем, что инвазия окончательных хозяев происходит двумя путями. Птицы могут заражаться при заглатывании заражённых моллюсков целиком или же при склёвывании отдельного отростка, который может самостоятельно выходить из моллюска. Вероятно, в основном, инвазия птиц идёт за счёт вышедших из тела улиток отростков, что подтверждается данными о способности отростков сохранять жизнеспособность, а также пульсировать во внешней среде от одного (Атаев et al., 2016) до пяти часов (Woodhead, 1935).

В роли окончательных хозяев трематод р. *Leucochloridium* выступает множество птиц, имеющих различную пищевую специализацию. Мариты *L. paradoxum* были обнаружены в птицах из отрядов Воробьинообразные, Ржанкообразные, Журавлеобразные и др. (Белопольская, 1966; Быховская-Павловская, 1974; Гвоздев, 1962 и др.). Возможно заражение как всеядных, насекомоядных, так и растительноядных птиц, что подтверждается успешным заражением в условиях эксперимента *Gallus gallus domesticus* (отряд Курообразные) и литературными данными (Бондаренко, 1964). Благоприятные условия для инвазии возникают вблизи водоёмов или переувлажненных участков, где образуются большие скопления *S. putris* (Шилейко, Лихарев, 1986).

В условиях Северо-Запада в популяциях моллюсков *S. putris* наблюдается наличие двух основных групп: весной из зимовки выходят молодые моллюски (1), вылупившиеся из яиц в конце предыдущего летнего сезона и половозрелые моллюски (2). 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 природнозаражённым моллюскам, а также экспериментальных данных по развитию партенит, биологии их промежуточных хозяев позволяет представить сезонную динамику инвазии моллюсков, а также механизм реализации жизненного цикла трематод *Leucochloridium paradoxum* в природе следующим образом (рис. 4).

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 марины массово откладывают яйца, которыми заражаются моллюски.

Таким образом, в жизненном цикле трематод *L. paradoxum* в условиях Северо-Запада России именно промежуточные хозяева – моллюски *Succinea 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).

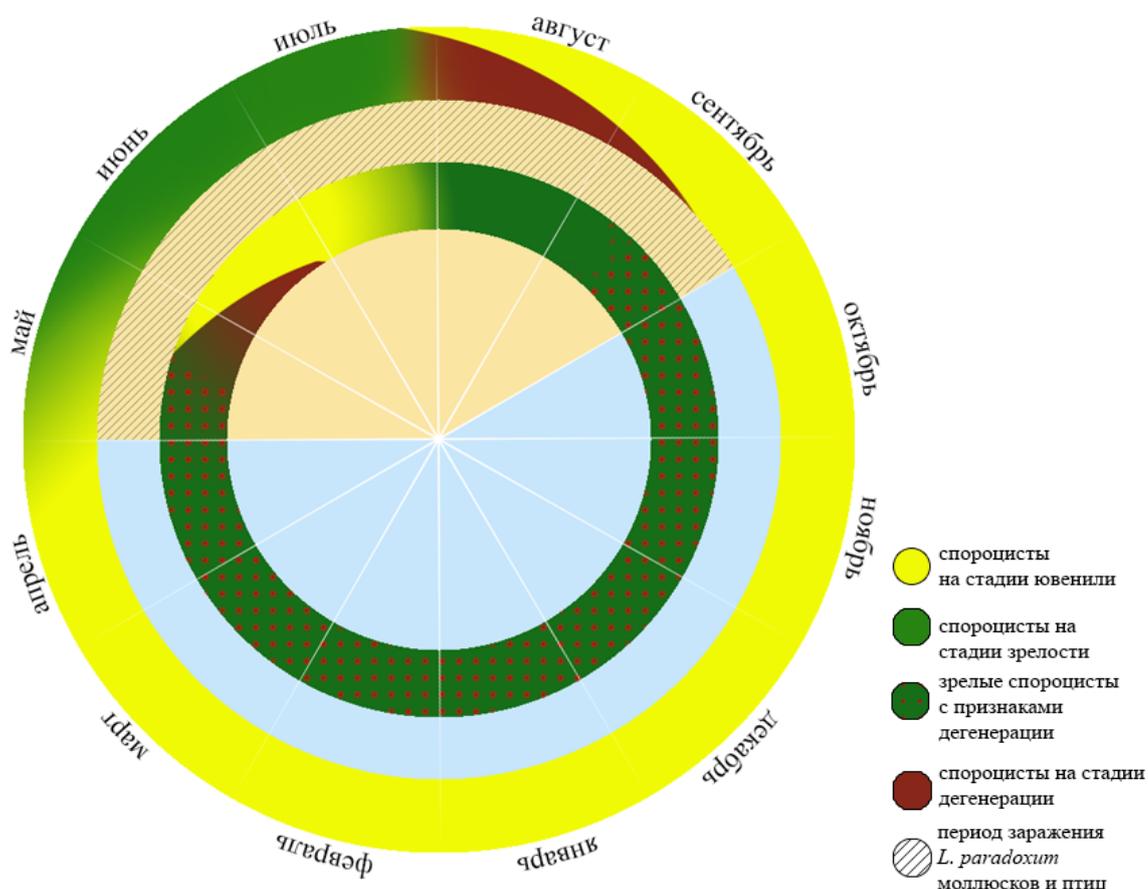


Рисунок 4. Динамика реализации жизненного цикла трематод *Leucochloridium paradoxum* в условиях умеренных широт. Внешнее кольцо – первая когорта спороцист, внутреннее кольцо – вторая когорта спороцист.

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 счёт 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 РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в рецензируемых журналах из списка ВАК:

1. 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*. – 2020. – Vol.17, N. 1. – P. 1–17.
2. Прохорова, Е. Е. Генетический полиморфизм трематод *Leucochloridium paradoxum* на территории Ленинградской области по фрагменту митохондриального гена *cox1* / Е. Е. Прохорова, А. С. Токмакова, О. Д. Лопатина, **Р. Р. Усманова** // *Паразитология*. – 2021. – Т. 55, № 5. – С. 355–361.
3. **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.
4. **Usmanova, R. R.** Genotypic and morphological diversity of trematodes *Leucochloridium paradoxum* / R. R. Usmanova, G. L. Ataev, A. S. Tokmakova, N. V. Tsybalyenko, E. E. Prokhorova // *Parasitology Research*. – 2023. – Vol. 122, N. 4. – P. 997–1007.

Основные работы, опубликованные в материалах конференций:

1. Прохорова, Е. Е. Распространение трематод *Leucochloridium paradoxum* на территории Европейской части России / Е. Е. Прохорова, А. А. Виноградова, А. С. Токмакова, **Р. Р. Усманова**, Г. Л. Атаев // *Материалы VI Съезда паразитологического общества: международная конференция*. – 2018. – С. 196.
2. **Усманова, Р. Р.** Анализ внутривидового популяционного полиморфизма моллюсков *Succinea putris* (Gastropoda: Pulmonata) / Р. Р. Усманова, Е. Е. Прохорова // *Тезисы докладов VII Всероссийской конференции с международным участием «Школа по теоретической и морской паразитологии»*. – Севастополь, 2019. – С. 72.
3. Прохорова, Е. Е. Внутривидовой генотипический полиморфизм моллюсков *Succinea putris* / Е. Е. Прохорова, **Р. Р. Усманова**, Г. Л. Атаев // *Тезисы докладов Всероссийской научной конференции с международным участием «Моллюски: биология, экология, эволюция и формирование малакофаун»*. – Ярославль, 2019. – С. 69.
4. **Усманова, Р. Р.** Анализ внутривидового полиморфизма моллюсков *Succinea putris* (Gastropoda: Pulmonata) / Р. Р. Усманова // *Материалы Международного молодежного научного форума «Ломоносов-2020»*. Москва, 2020. [Электронный ресурс].
5. Прохорова, Е. Е. Генетический полиморфизм моллюсков *Succinea putris* (Gastropoda, Pulmonata) / Е. Е. Прохорова, **Р. Р. Усманова** // *Сборник статей V Международной конференции «Концептуальные и прикладные аспекты научных исследований и образования в области зоологии беспозвоночных»*. – Томск, 2020. – С. 133–136.
6. **Усманова, Р. Р.** Анализ генотипического полиморфизма трематод *Leucochloridium paradoxum* / Р. Р. Усманова, Е. Е. Прохорова, О. Д. Лопатина, Т. А. Богачёва, А. С. Токмакова, А. Е. Жохов, Г. Л. Атаев // *Тезисы докладов Международной научной конференции «Изучение водных и наземных экосистем: история и современность»*. – Севастополь, 2021. – С. 189.
7. **Усманова, Р. Р.** Полиморфизм спороцист трематод *Leucochloridium paradoxum* / Р. Р. Усманова // *Материалы Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов-2021»*. Москва, 2021. [Электронный ресурс].
8. **Усманова, Р. Р.** Изучение генотипического полиморфизма трематод *Leucochloridium paradoxum* / Р. Р. Усманова, Е. Е. Прохорова // *Тезисы докладов II Международной научно-практической конференции «Изучение водных и наземных экосистем: история и современность»*. – Севастополь, 2022. – С. 69–70.
9. Атаев, Г. Л. Реализация жизненного цикла трематод *Leucochloridium paradoxum* на территории Ленинградской области // Г. Л. Атаев, **Р. Р. Усманова**, Е. Е. Прохорова, А. С. Токмакова / *Тезисы докладов II Всероссийского орнитологического конгресса*. – Санкт-Петербург, 2023 г. – С. 10–11.