



УДК 576.895.122:575(262.5)

**ПЕРВЫЕ ДАННЫЕ ГЕНОТИПИРОВАНИЯ  
ЧЕРНОМОРСКИХ ТРЕМАТОД РОДОВ *CAINOCREADIUM* И *HELICOMETRA*  
(TREMATODA: OPECOELIDAE)**

© 2018 г. А. В. Катохин<sup>1</sup>, Ю. М. Корнийчук<sup>2</sup>

<sup>1</sup>ФИЦ Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, Россия

<sup>2</sup>Институт морских биологических исследований имени А. О. Ковалевского РАН, Севастополь, Россия  
E-mail: [katokhin@bionet.nsc.ru](mailto:katokhin@bionet.nsc.ru)

Поступила в редакцию 25.10.2018; после доработки 18.12.2018;  
принята к публикации 18.12.2018; опубликована онлайн 28.12.2018.

Впервые изучены нуклеотидные последовательности ITS1 кластера генов рРНК марит черноморских трематод *Cainocreadium flesi* Korniyuchuk & Gaevskaya, 2000 от камбалы глоссы *Platichthys flesus* (депонированы в GenBank с номерами MG980645, MG980646), *Cainocreadium* sp. от морского налима *Gaidropsarus mediterraneus* (MG980643, MG980644, MK248037, MK248038) и *Helicometra fasciata* (Rud., 1819) от собачки-павлина *Salaria pavo* (MG980647, MG980648). ITS1-последовательности черноморских трематод *C. flesi* и *Cainocreadium* sp. оказались идентичными, однако, ввиду морфологических отличий между этими гостальными морфами, видовой статус трематод от морского налима пока не определён. По четырём позициям ITS1-последовательности черноморских *Cainocreadium* отличались от аналогичных последовательностей, описанных у церкарий близкородственного средиземноморского вида, *C. labracis*. Пять инсерций-делеций и 38 нуклеотидных замен отличают ITS1-последовательности черноморских *Cainocreadium* от аналогичных последовательностей представителей ещё одного средиземноморского вида этого рода, *C. dentecis*. ITS1-последовательности черноморских и средиземноморских образцов *H. fasciata* также различаются: выявлено пять нуклеотидных замен и 11 инсерций-делеций.

**Ключевые слова:** ITS rDNA, Opecoelidae, *Cainocreadium*, *Helicometra*, Чёрное море

Черноморские паразитические организмы составляют не менее 15 % региональной фауны. Многие из них имеют средиземноморское происхождение: более трети зарегистрированных в Чёрном море видов паразитов обнаружены также и в Средиземноморском бассейне. Тем не менее нередко характер их гостальной специфичности в этих двух морских бассейнах весьма отличается. Известно, что обитание в хозяевах разного систематического положения существенно сказывается на генетической структуре популяций паразитических организмов. При успешной адаптации паразита к новым хозяевам могут сформироваться гостальные экоморфы или, в конечном итоге, новые виды, что определяет интерес не только к морфологической, но и к генетической составляющей внутривидовой изменчивости паразитов.

Ведущим по числу видов семейством трематод Чёрного моря является Opecoelidae [1]. Морфологическое разнообразие и экологические особенности черноморских опецелид нуждаются в адекватной таксономической интерпретации. Эту работу мы начинаем с опецелидных трематод родов *Cainocreadium* и *Helicometra*, имеющих гостальные морфы [1, 2]. *Cainocreadium* в Чёрном море представлены видом *Cainocreadium flesi* Korniyuchuk & Gaevskaya, 2000, на стадии мариты паразитирующим у камбалы глоссы, и номенклатурно не оформленной гостальной морфой *Cainocreadium* sp.

из морского налима, причём кайнокреидумы от этих двух хозяев значительно отличаются друг от друга морфологически [2]. Черноморская гемипопуляция марит *Helicometra fasciata* (Rud., 1819) распределена среди рыб 32 видов из 14 семейств [1].

Данные о генетической структуре популяций черноморских трематод полностью отсутствуют, что определяет актуальность выполняемого нами исследования. Цель настоящей работы — получить первые сведения такого рода.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Мариты трематод из родов *Cainocreadium* и *Helicometra* получены от черноморских рыб, выловленных в районе г. Севастополя и в акватории Карадагского природного заповедника (табл. 1).

Нуклеотидные последовательности ITS1 из кластера генов рРНК получены в результате ПЦР-амплификации с помощью праймеров ITS1-Fw (5'-GTCGTAACAAGGTTCCGTA-3') и ITS1alRv (5'-ACACGAGCCGAGTGATCC-3') [9] при температуре отжига 55 °С и при стандартных условиях реакции. Последовательность ампликонов расшифровывали по методу Сэнгера, анализ продуктов сиквенсных реакций проводили в центре коллективного пользования «Геномика» СО РАН на капиллярном секвенаторе ABI 3730XL Genetic Analyzer, Applied Biosystems. Полученные последовательности депонированы в GenBank (см. табл. 1).

Выравнивание ITS1-последовательностей (установленных в настоящей работе, полученных из GenBank, а также описанных [7]) проводили в программе ClustalW Omega [4] с последующим ручным редактированием. Поскольку 5'-гипервариабельный район ITS1-локуса у опецелид вносит слишком большое разнообразие по длине за счёт множественных инсерций, делеций и, у некоторых видов, tandemных повторов, при формировании выравнивания этот район был удалён (файл выравнивания приведён в дополнительных данных к статье: <https://doi.org/10.21072/mbj.2018.03.4.04>).

Филогенетический анализ выровненных ITS1-последовательностей проводили в программе MEGA (v. 6) с помощью алгоритма «максимальное правдоподобие» (ML) по модели нуклеотидных замен К2Р (данная модель рекомендована программой как наиболее пригодная) и с помощью опции частичного делетирования пропуск-содержащих позиций выравнивания.

Для сравнения использованы ITS1-последовательности из GenBank для образцов трематод из родов *Cainocreadium* и *Helicometra* (см. табл. 1), а также не депонированные в GenBank, но представленные в [7] последовательности для восьми образцов трематод *Cainocreadium* (мариты *C. labracis* из *Dicentrarchus labrax* DIC1, DIC2, DIC3 и церкарии из моллюсков *Calliostoma striatum* CAL1; мариты *C. dentecis* из *Dentex dentex* DEN1, DEN2, DEN3 и церкарии из *Haliotis tuberculata* HAL1) из акваторий Средиземного моря у побережья Франции.

Немногочисленные опубликованные ITS1-последовательности опецелид демонстрируют большие различия за счёт не нуклеотидных замен, а инсерций-делений, поэтому укоренение филогенетического дерева не применяли. Пригодные для генерации выравнивания достаточной длины ITS1-последовательности средиземноморских трематод из других родов семейства Opascoelidae (AJ241803 *Macvicaria crassigula*, AJ241802 *M. mormyri*, AJ241801 *M. alacris*, AJ241799 *Pachycreadium carnosum*, AJ241797 *Pycnadenoides senegalensis*, AJ241796 *Peracreadium characis*) использовали для оценки масштаба структурных различий по данному локусу внутри семейства.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Нами впервые изучены нуклеотидные последовательности ITS1 кластера генов рРНК черноморских представителей рода *Cainocreadium*. Для анализа выбран именно этот участок генома трематод, поскольку имелись доступные для сравнения аналогичные данные о маритах трематод рода *Cainocreadium* из Средиземного моря [6, 7, 8].

**Таблица 1.** Проанализированные образцы опецелидных трематод  
**Table 1.** Samples of Trematoda (Opencelidae) analyzed within the frame of the study

№ в GenBank	Идентификатор	Вид трематод, стадия развития	Вид хозяина	Регион, акватория	Ссылка	Название вида в GenBank
MG980645	PSKr05-21 (C-03-21)	<i>Cainocreadium flesi</i> , maritae	<i>Platichthys flesus</i>	Чёрное море, Севастополь	***	<i>Cainocreadium flesi</i>
MG980646	PSKr05-22 (C-03-22)	<i>Cainocreadium flesi</i> , maritae	<i>Platichthys flesus</i>	Чёрное море, Севастополь	***	<i>Cainocreadium flesi</i>
MG980643	GSKr05-21 (Cg01-21)	<i>Cainocreadium</i> sp., maritae	<i>Gaidropsarus mediterraneus</i>	Чёрное море, Севастополь	***	<i>Cainocreadium</i> sp.
MG980644	GSKr05-22 (Cg01-22)	<i>Cainocreadium</i> sp., maritae	<i>Gaidropsarus mediterraneus</i>	Чёрное море, Севастополь	***	<i>Cainocreadium</i> sp.
MK248037	GKKr18-21	<i>Cainocreadium</i> sp., maritae	<i>Gaidropsarus mediterraneus</i>	Чёрное море, Карадаг	***	<i>Cainocreadium</i> sp.
MK248038	GKKr18-26	<i>Cainocreadium</i> sp., maritae	<i>Gaidropsarus mediterraneus</i>	Чёрное море, Карадаг	***	<i>Cainocreadium</i> sp.
AJ241806*	isolate C2	Opencelidae gen. sp., cercariae	<i>Haliotis tuberculata</i>	Средиземное море	[8]	<b>Opencelidae gen. sp.</b>
		<i>Cainocreadium labracis</i> *, cercariae			[7]	
AJ241807	isolate C3	<i>Cainocreadium labracis</i> *, cercariae	<i>Steromphala adansonii</i>	Средиземное море	[8]	<b>Opencelidae gen. sp.</b>
JQ694148		<i>Cainocreadium labracis</i> , cercariae	( <i>Gibbula adansonii</i> )	Средиземное море	[6]	<i>C. labracis</i>
AJ241808**	isolate C4	Opencelidae gen. sp., cercariae	<i>Jujubinus striatus</i>	Средиземное море	[8]	<b>Opencelidae gen. sp.</b>
		<i>Cainocreadium dentecis</i> ** , cercariae	( <i>Calliostoma striatum</i> )		[7]	
AJ241795		<i>Cainocreadium labracis</i>	<i>Dentex dentex</i>	Средиземное море	[8]	<b><i>C. labracis</i></b>
		<i>Cainocreadium dentecis</i>			[7]	
MG980647	SSKr05-22 (Hf02-22)	<i>Helicometra fasciata</i> , maritae	<i>Salaria pavo</i>	Чёрное море	***	<i>Helicometra fasciata</i>
MG980648	SSKr05-23 (Hf02-23)	<i>Helicometra fasciata</i> , maritae	<i>Salaria pavo</i>	Чёрное море	***	<i>Helicometra fasciata</i>

**Примечания:**

\* — [6] указывают, что эти церкарии были определены [7] как *C. dentecis*;

\*\* — [6] указывают, что эти церкарии были определены [7] как *C. labracis*;

\*\*\* — настоящее исследование;

**жирным шрифтом** выделены видовые названия в GenBank, которые, очевидно, требуют замены

**Notes:**

\* – [6] mark these cercariae were identified by [7] as *C. dentecis*;

\*\* – [6] mark these cercariae were identified by [7] as *C. labracis*;

\*\*\* – present study;

**in bold** there are, obviously, incorrect species names in GenBank

При составлении филограммы нам пришлось учесть ряд обстоятельств.

Во-первых, по итогам таксономической ревизии средиземноморских представителей рода *Cainocreadium* Жюссон и Бартоли [7] отнесли ранее не определённые до уровня вида собственные находки церкарий этих трематод в средиземноморских брюхоногих моллюсках

*Haliotis tuberculata* (AJ241806) к виду *C. labracis*, а церкарий из *Calliostoma striatum* (современное название — *Jujubinus striatus*) (AJ241808) — к виду *C. dentecis*: «...corresponding cercariae were isolated from two species of gastropods belonging to different families of the order Archaeogastropoda: *Haliotis tuberculata* (Haliotidae) and *Calliostoma striatum* (Trochidae) [8]. These cercariae were found to correspond to *C. labracis* and *C. dentecis*, respectively». Тем не менее и по [6], и по нашим данным, церкарии из *H. tuberculata* располагаются на дендрограммах в группе *C. dentecis*, тогда как церкарии из *C. striatum* — в группе *C. labracis*, что усложняет оценку действительной гостальной специфичности средиземноморских представителей рода *Cainocreadium* к первым промежуточным хозяевам.

Церкарии, найденные [8] в *Gibbula adansonii* (современное название — *Steromphala adansonii*) (AJ241807), были позднее отнесены [6] к виду *C. labracis*. Авторы последней работы депонировали в GenBank и нуклеотидные последовательности своей находки — церкарий *C. labracis* от *G. adansonii* (JQ694148).

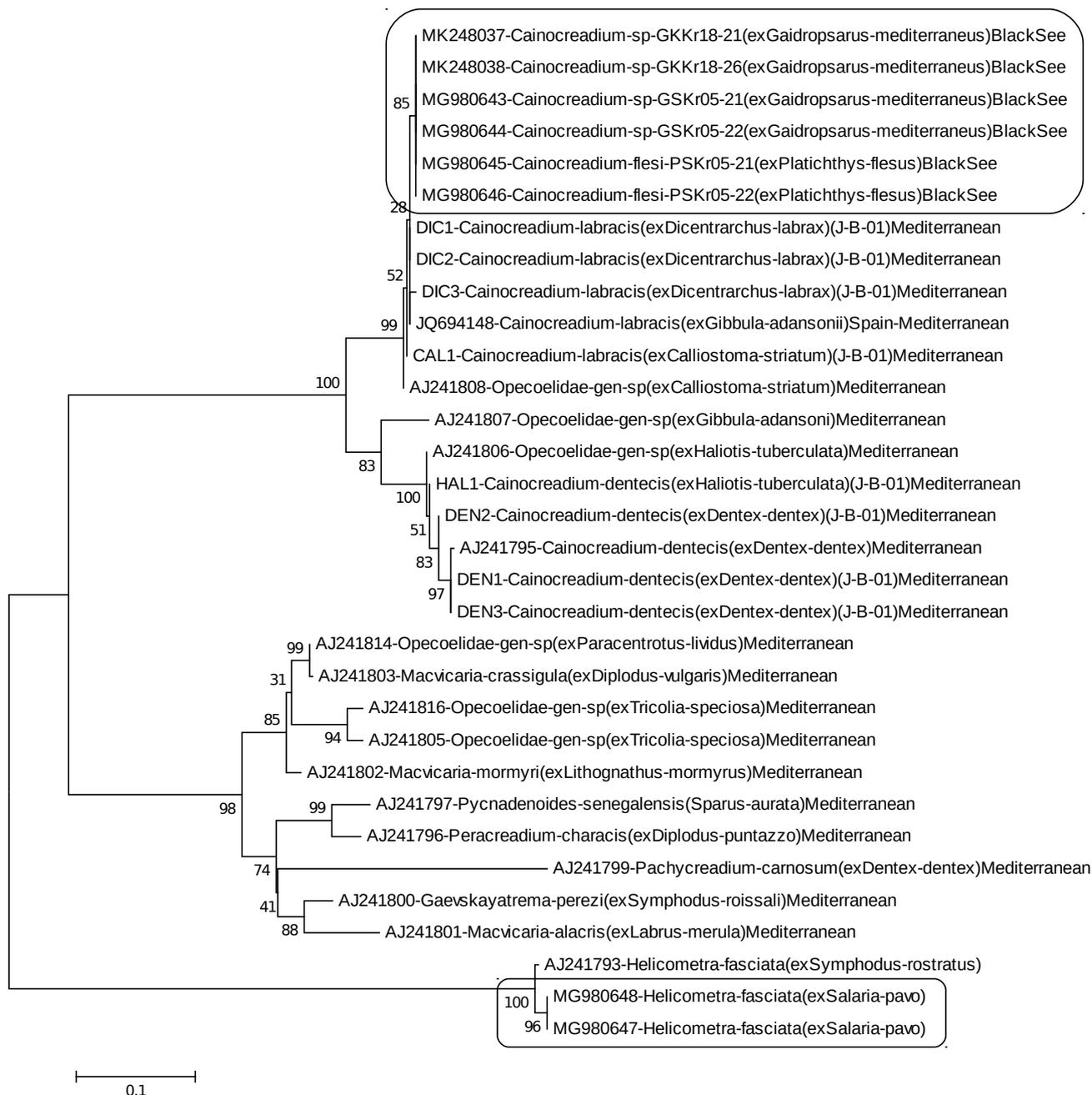
Во-вторых, нуклеотидные последовательности марит кайнокреидумов от средиземноморских зубариков *Dentex dentex* (AJ241795) первоначально были депонированы в GenBank под названием *C. labracis* [8]. В 2001 г. [7] однозначно указали на узкую гостальную приуроченность двух видов средиземноморских кайнокреидумов, описанных ими в результате таксономической ревизии: «...*Cainocreadium labracis* occurs in *D. labrax*, whereas *C. dentecis* n. sp. occurs in *D. dentex*», однако запись в GenBank не была скорректирована. Таким образом, несмотря на отсутствие на сегодняшний момент изменений в записи GenBank под номером AJ241795, депонированные в нём последовательности относятся к трематодам вида *C. dentecis*. Последовательностей для марит *C. labracis* из Средиземного моря в GenBank нет.

ITS1-последовательности черноморских трематод от двух обследованных рыб-хозяев, камбалы глоссы и морского налима, оказались идентичными (рис. 1). Отметим, что они отличались от последовательностей, расшифрованных для церкарий близкородственного средиземноморского вида *C. labracis* из брюхоногого моллюска *Steromphala adansonii* со средиземноморского побережья Испании (JQ694148) [6], по четырём позициям. Их отличие от образцов марит второго средиземноморского вида того же рода, *C. dentecis* (AJ241795) из средиземноморского зубарика *Dentex dentex* [8], оказалось гораздо более выраженным: 38 нуклеотидных замен и 5 инсерций-делеций (или 39 нуклеотидных замен и 3 инсерции-делеции для образцов DEN1, DEN2, DEN3 [7]).

Примечательно, однако, что по комплексу таксономически значимых для трематод этого рода морфологических признаков (линейные размеры тела, наличие мышечного валика, окружающего брюшную присоску, форма сумки цирруса, количество долей яичника) черноморские представители рода *Cainocreadium* гораздо ближе не к *C. labracis*, а к *C. dentecis*. Эти же признаки значимо отличают и две черноморские гостальные формы [2]. Поэтому до выполнения полного морфологического и генетического описания кайнокреидумов от черноморского морского налима мы не уточняем их таксономический статус, и в настоящей работе мы рассматриваем их как *Cainocreadium* sp.

Средиземноморские трематоды рода *Cainocreadium* проявляют узкую специфичность по отношению к окончательным хозяевам [7]. Поскольку в Чёрном море представители этого рода используют те виды окончательных хозяев-рыб (и, предположительно, моллюсков — первых промежуточных хозяев), у которых они не отмечены в Средиземном море, логично было бы ожидать у трематод не только морфологической (например, [3]), но и генетической изменчивости. Полагаем, что для решения вопроса о видовой самостоятельности гостальной морфы от черноморского морского налима понадобится исследовать другие участки генома трематод, например мтДНК.

Сходство нуклеотидных последовательностей ITS1 кластера генов рРНК *Helicometra fasciata* из черноморской собачки-павлина со средиземноморскими особями из носатого губана, относимыми к тому же виду трематод (см. рис. 1), составило 4%. Различия состояли в 5 нуклеотидных заменах и 11 инсерциях-делециях. Учитывая крайне широкую гостальную специфичность трематод



**Рис. 1.** Филограмма ITS1-последовательностей трематод семейства Opacoelidae, построенная по алгоритму ML (последовательности, полученные в настоящем исследовании, — в рамках). Образцы, помеченные (J-B-01), описаны в [7]

**Fig. 1.** Filogramm of internal transcribed spacer 1 complete sequence of Opacoelidae trematodes constructed with using ML-algorithm (sequences obtained in the present study are framed). Samples marked by (J-B-01) are described in [7]

этого вида к окончательным хозяевам по всему ареалу [5] и их значительную морфологическую вариабельность в Чёрном море [1], необходимо дальнейшее исследование гостальных группировок черноморских представителей *H. fasciata* с применением различных молекулярных маркеров.

#### Выводы:

1. Впервые изучены нуклеотидные последовательности ITS1 кластера генов рРНК мариит черноморских трематод *Cainocreadium flesi* Korniychuk & Gaevskaya, 2000 от камбалы глоссы *Platichthys flesus* (депонированы в GenBank под номерами MG980645, MG980646),

*Cainocreadium* sp. от морского налима *Gaidropsarus mediterraneus* (MG980643, MG980644, MK248037, MK248038) и *Helicometra fasciata* (Rud., 1819) от собачки-павлина *Salaria pavo* (MG980647, MG980648).

2. ITS1-последовательности черноморских трематод *C. flesi* и *Cainocreadium* sp. оказались идентичными, однако, ввиду ранее отмеченных морфологических отличий между ними, видовой статус трематод от морского налима пока не определён.
3. По четырём позициям ITS1-последовательности черноморских кайнокреидиумов отличались от аналогичных последовательностей у средиземноморских *C. labracis*. Степень отличий ITS1-последовательностей черноморских кайнокреидиумов от таковых у представителей ещё одного средиземноморского вида этого рода, *C. dentecis*, гораздо выше (38 нуклеотидных замен и 5 инсерций-делеций).
4. Полученные нами результаты демонстрируют актуальность исследования других, помимо ITS1, участков генома трематод рода *Cainocreadium* для оценки степени их видовой самостоятельности и генетического своеобразия черноморских кайнокреидиумов в сравнении с трематодами данного рода из Средиземного моря.
5. ITS1-последовательности черноморских и средиземноморских образцов марит *H. fasciata* различаются: выявлено 5 нуклеотидных замен и 11 инсерций-делеций. Перспективно дальнейшее разнонаправленное молекулярное исследование гостальных группировок черноморских представителей *H. fasciata*, отличающегося исключительно широкой гостальной специфичностью на стадии мариты — как в Чёрном море, так и за его пределами.

*Исследования выполнены по гранту РФФИ №18-44-920027 р\_а «Гостальная изменчивость черноморских трематод: о чём говорит генетический базис под морфологическими различиями?» (№ гос. регистрации АААА-А18-118072490024-0) и, частично, в рамках государственного задания ФГБУН ИМБИ по теме «Закономерности формирования и антропогенная трансформация биоразнообразия и биоресурсов Азово-Черноморского бассейна и других районов Мирового океана» (№ гос. регистрации АААА-А18-118020890074-2).*

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Гаевская А. В., Корнийчук Ю. М. Паразитические организмы как составляющая экосистем черноморского побережья Крыма // *Современное состояние биоразнообразия прибрежных вод Крыма (черноморский сектор)* / под ред. В. Н. Еремеева, А. В. Гаевской ; НАН Украины, Институт биологии южных морей. Севастополь : ЭКОСИ-Гидрофизика, 2003. С. 425–490. [Gaevskaya A. V., Kornuychuk Yu. M. Paraziticheskie organizmy kak sostavlyayushchaya ekosistem chernomorskogo poberezh'ya Kryma. *Sovremennoe sostoyanie bioraznoobraziya pribrezhnykh vod Kryma* / V. N. Eremeev, A. V. Gaevskaya (Eds); NAN Ukrainy, Institut biologii yuzhnykh morei. Sevastopol: EKOSI-Gidrofizika, 2003, pp. 425–490. (in Russ.)].
2. Корнийчук Ю. М. Трематоды рода *Cainocreadium* (Opcoelidae) в Черном и Средиземном морях // *Паразитология в XXI веке – проблемы, методы, решения* : материалы IV Всерос. съезда Паразитологического общества при Российской академии наук, Санкт-Петербург, 20–25 окт. 2008 г. Санкт-Петербург : Лема, 2008. Т. 2. С. 77–80. [Kornuychuk Yu. M. Trematody roda *Cainocreadium* (Opcoelidae) v Chernom i Sredizemnom moryakh. *Parazitologiya v XXI veke – problemy, metody, resheniya: materialy IV Vseros. s'ezda Parazitologicheskogo obshchestva pri Rossiiskoi akademii nauk*, Saint Petersburg, 20–25 Oct., 2008. Saint Petersburg: Lema, 2008, vol. 2, pp. 77–80. (in Russ.)].
3. Корнийчук Ю. М., Гаевская А. В. *Cainocreadium flesi* sp. n. (Trematoda, Opcoelidae) – новый вид трематод черноморских рыб // *Вестник зоологии*. 2000. Т. 34, вып. 6. С. 89–91. [Korniiuchuk Yu. M., Gaevskaya A. V. *Cainocreadium flesi* sp. nov. (Trematoda: Opcoelidae) – a new trematode species from the Black Sea fishes. *Vestnik zoologii*, 2000, vol. 34, iss. 6, pp. 89–91. (in Russ.)].
4. *Bioinformatics Tools: Multiple Sequence Alignment:*

- Clustal Omega* [Program]. URL: <https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/> (accessed 20.10.2018).
5. Blend C. K., Dronen N. O. A review of the genus *Helicometra* Odhner, 1902 (Digenea: Opcoelidae: Plagioporinae) with a key to species including *Helicometra overstreeti* n. sp. from the cusk-eel *Luciobrotula corethromycter* Cohen, 1964 (Ophidiiformes: Ophidiidae) from the Gulf of Mexico. *Marine Biodiversity*, 2015, vol. 45, iss. 2, pp. 183–270. <https://doi.org/10.1007/s12526-014-0250-3>.
  6. Born-Torrijos A., Kostadinova A., Raga J. A., Holzer A. S. Molecular and morphological identification of larval opcoelids (Digenea: Opcoelidae) parasitising prosobranch snails in a Western Mediterranean lagoon. *Parasitology International*, 2012, vol. 61, iss. 3, pp. 450–460. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2012.03.002>.
  7. Jousson O., Bartoli P. Molecules, morphology and morphometrics of *Cainocreadium labracis* and *Cainocreadium dentecis* n. sp. (Digenea: Opcoelidae) parasitic in marine fishes. *International Journal for Parasitology*, 2001, vol. 31, iss. 7, pp. 706–714. [https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(01\)00180-1](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(01)00180-1).
  8. Jousson O., Bartoli P., Pawlowski J. Molecular identification of developmental stages in Opcoelidae (Digenea). *International Journal for Parasitology*, 1999, vol. 29, iss. 1, pp. 1853–1858. [https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(99\)00124-1](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(99)00124-1).
  9. Kiyani V. S., Bulashev A. K., Katokhin A. V. *Opisthorchis felinus* and *Metorchis bilis* metacercariae in cyprinid fish *Leuciscus idus* in Nura-Sarysu River, Kazakhstan. *Korean Journal of Parasitology*, 2018, vol. 56, iss. 3, pp. 267–274. <https://doi.org/10.3347/kjp.2018.56.3.267>.

**FIRST DATA OF ITS1-GENOTYPING  
OF THE BLACK SEA TREMATODES *CAINOCREADIUM* AND *HELICOMETRA*  
(TREMATODA: OPECOELIDAE)**

**A. V. Katokhin<sup>1</sup>, Yu. M. Kornychuk<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Institute of Cytology and Genetics SB of RAS, Novosibirsk, Russian Federation

<sup>2</sup>Kovalevsky Institute of Marine Biological Research RAS, Sevastopol, Russian Federation

E-mail: [katokhin@bionet.nsc.ru](mailto:katokhin@bionet.nsc.ru)

Data of genetic analysis of the Black Sea trematodes of *Cainocreadium* genus and *Helicometra fasciata* were obtained for the first time. The nucleotide sequences of ITS1 rRNA gene cluster of *Cainocreadium flesi* from *Platichthys flesus* (GenBank entries MG980645, MG980646) and *Cainocreadium* sp. from *Gaidropsarus mediterraneus* (MG980643, MG980644, MK248037, MK248038) off Crimean Black Sea coast were found to be identical. Nevertheless, they have not been synonymized because of morphological differences known between these hostal morphs. Sequences of *Cainocreadium* from the Black Sea fish turned out to differ, by 4 positions, from similar sequences of a closely related Mediterranean congener, *C. labracis* (cercaria). Five insertions-deletions and 38 nucleotide sequences distinguish the ITS1 sequences of the Black Sea trematodes, *C. flesi* and *Cainocreadium* sp., from ITS1 sequences of another Mediterranean congener, *C. dentecis*. The ITS1 sequences of the Black Sea and Mediterranean *Helicometra fasciata* samples also differ: 5 nucleotide changes and 11 insertions-deletions were identified. Supplementary data associated with this article can be found in online version at <https://doi.org/10.21072/mbj.2018.03.4.04>.

**Keywords:** ITS rDNA, Opcoelidae, *Cainocreadium*, *Helicometra*, Black Sea