

АНОТАЦІЯ

Шрестха М. Ю. Бранхіобделіди Західної Палеарктики (Annelida: Branchiobdellida): систематика, географічне поширення та еволюція. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора філософії 091 Біологія –Харківський національний університет імені В. Н. Каразіна, Міністерство освіти і науки України, Харків, 2025.

Дисертація присвячена дослідженню систематики, географічного поширення та еволюції бранхіобделід (Annelida: Branchiobdellida) Західної Палеарктики. Бранхіобделіди є obligatними симбіонтами прісноводних ракоподібних і відіграють важливу роль у функціонуванні прісноводних екосистем. Незважаючи на їхнє значення, ця група організмів залишається недостатньо вивченою, особливо в контексті їхніх симбіотичних взаємин, географічного поширення та еволюційної історії. Метою дослідження є вивчення бранхіобделід Західної Палеарктики, зокрема їхньої систематики, географічного поширення та еволюційних зв'язків, а також дослідження можливості зараження інтродукованих видів раків аборигенними бранхіобделідами.

Для здійснення цієї мети нами було проведено комплексне дослідження, яке включало морфологічний аналіз (стереомікроскопія, вивчення щелеп та сперматеки), філогенетичний аналіз (метод Максимальної правдоподібності та Баєсове висновування), а також геоінформаційні методи (QGIS) для визначення ареалів поширення. В рамках молекулярно-генетичного аналізу ми вперше отримали послідовності чотирьох мітохондріальних (CO1, 16S) та ядерних (28S, ITS) генетичних локусів для восьми досліджуваних видів бранхіобделід Західної Палеарктики. Це значно розширило можливості дослідження, оскільки раніше в GenBank були доступні лише послідовності CO1. Крім того, ми провели значну роботу з модифікації протоколів ампліфікації, що дозволило отримати якісні послідовності генетичних послідовностей для виду п'явки *Hemiclepsis marginata*.

Цей вид використовувався як зовнішня група для побудови мультилокусного філогенетичного дерева, що забезпечило більш високу підтримку отриманих результатів. Матеріали для дослідження були зібрані протягом 2009 - 2022 рр. під час польових експедицій у Західних Балканах, Україні і прилеглих до неї територій та в інших регіонах Західної Палеарктики. Також була проаналізована значна кількість зразків річкових раків з музейної колекції Люблянського університету (м. Любляна, Словенія).

В результаті дослідження розширено уявлення про межі розповсюдження видів бранхіобделід Західної Палеарктики. Молекулярний філогенетичний аналіз за ядерними генами 28S та ITS та мітохондріальними генами 16S і CO1 виявив, що рід *Branchiobdella* у Західній Палеарктиці формує вісім основних еволюційних ліній, які відповідають видам *B. kozarovi*, *B. balcanica*, *B. pentadonta*, *B. italica*, *B. astaci*, *B. hexadonta*, *B. parasita* та новому виду *B. sp.n.*. Вперше отримано послідовності ДНК для *B. kozarovi*, що дозволило уточнити її філогенетичне положення.

Морфологічні та генетичні відмінності підтверджують видовий статус нової популяції бранхіобделід *Branchiobdella* sp.n. зі Словенії. Комбінований аналіз морфології, філогенії та делімітації показав, що клада *B. parasita* поділяється щонайменше на три субклади, які можуть мати статус окремих видів або підвидів.

Філогенетична структура бранхіобделід, підтримана високими значеннями бутстрепа, корелює з філогенією їхніх хазяїв — річкових раків. Зокрема, підтверджено тісний зв'язок між *B. kozarovi* та *B. balcanica*, що відображає спорідненість їхніх хазяїв — довгопалого (*Astacus leptodactylus*) та широкопалого (*Astacus astacus*) раків. Географічний розподіл гаплотипів *B. kozarovi* в Україні вказує на два основні шляхи історичної міграції довгопалого рака: західний (через Західне Причорномор'я до басейнів р. Дунай та р. Південний Буг) та східний (через Східне Причорномор'я до р. Дон, р. Сіверський Донець та р. Дніпро).

Експериментально доведено, що *B. kozarovi* здатна виживати без хазяїна протягом 60 днів, що має значення для адаптації виду в умовах тимчасової відсутності раків. Цей вид також успішно колонізує інтродукованих раків, займаючи аналогічні ділянки тіла, як і у природних хазяїв. Дослідження коконів бранхіобделід та їхньої локалізації на тілі раків дозволяє ідентифікувати види навіть за відсутності дорослих особин, а також вивчати особливості їхнього симбіозу, включаючи розподіл ніш та інтенсивність інвазії.

Branchiobdella balcanica, ектосимбіонт широкопалого рака, характеризується низьким генетичним різноманіттям, що робить його залежним від стану популяцій хазяїна. Підвид *B. balcanica sketi* Karaman, 1967 визнано невалідним, оскільки варіації копулятивної бурси, які раніше використовувалися для його виділення, виявилися пов'язаними з віковою зміною морфології, а не з генетичною диференціацією.

Branchiobdella astaci був чисельним у старих музейних зразках, але його не знайшли в сучасних зборах, що може свідчити про суттєве скорочення його популяцій.

Отримані результати підкреслюють важливість інтеграції молекулярних, морфологічних та екологічних даних для розуміння еволюції та поширення бранхіобделід і відносини з їхніми хазяями-раками. Результати роботи мають важливе практичне значення для розуміння екологічних наслідків інтродукції екзотичних видів раків у водні екосистеми і можуть бути використані для розробки заходів біобезпеки та карантинного контролю при ввезенні живих раків, а також для розробки стратегій збереження аборигенних видів раків.

Основні результати дослідження опубліковані в трьох наукових статтях, зокрема в закордонному виданні, яке індексується в базах даних Web of Science або Scopus (Q2), та у фахових виданнях України (категорії А та Б). Результати також представлено на міжнародних конференціях, зокрема на *4th Central European Symposium of Aquatic Invertebrates* (Словаччина, 2024).

Дослідження виконано в рамках наукових програм, спрямованих на вивчення біорізноманіття прісноводних екосистем Західної Палеарктики, за підтримки грантів Міністерства освіти і науки України, Міністерства освіти і науки Словенії (2009–2012) та Science and Technology Center in Ukraine (STCU) (з 2023 року).

Ключові слова: бранхіобделіди, Branchiobdellida, річкові раки, симбіоз, систематика, філогенетика, молекулярна генетика, географічне поширення, еволюція, видоутворення, інвазивні види, аквакультура.

ABSTRACT

Shrestkha M. Yu. Branchiobdellidans of the Western Palearctic (Annelida: Branchiobdellida): systematics, geographic distribution, and evolution. – Qualifying scientific work on the rights of the manuscript.

Thesis submitted for obtaining the Doctor of Philosophy degree, 091 Biology – V. N. Karazin Kharkiv National University, Ministry of education and science of Ukraine, Kharkiv, 2025.

This dissertation is dedicated to the study of the taxonomy, geographical distribution, and evolution of branchiobdellidans (Annelida: Branchiobdellida) in the Western Palearctic. Branchiobdellidans are obligate symbionts of freshwater crustaceans and play a crucial role in freshwater ecosystem functioning. Despite their ecological significance, this group remains understudied, particularly in terms of their symbiotic relationships, biogeography, and evolutionary history. The study aims to investigate the taxonomy, distribution, and evolutionary relationships of Western Palearctic branchiobdellidans, as well as assess the potential for native branchiobdellidans to colonize introduced crayfish species.

To achieve this goal, a comprehensive approach was employed, integrating morphological analysis (stereomicroscopy, jaw and spermatheca examination), phylogenetic reconstruction (Maximum Likelihood and Bayesian Inference), and geospatial methods (QGIS) for range mapping. Molecular genetic analysis was conducted for the first time on four mitochondrial (CO1, 16S) and nuclear (28S, ITS) loci across eight studied branchiobdellidan species, significantly expanding research possibilities, as only CO1 sequences were previously available in GenBank. Additionally, optimized amplification protocols were developed to obtain high-quality genetic sequences for the leech *Hemiclepsis marginata*, which served as an outgroup in multilocus phylogenetic tree construction, enhancing result reliability.

Field collections were conducted between 2009 and 2022 across the Western Balkans, Ukraine, adjacent regions, and other Western Palearctic areas. Museum specimens from the University of Ljubljana (Slovenia) were also analyzed.

As a result of the study, the understanding of the distribution ranges of branchiobdellidan species in the Western Palearctic has been expanded. Molecular phylogenetic analysis of the nuclear genes 28S and ITS and the mitochondrial genes 16S and CO1 revealed that the genus *Branchiobdella* in the Western Palearctic forms eight major evolutionary lineages corresponding to the species *B. kozarovi*, *B. balcanica*, *B. pentadonta*, *B. italica*, *B. astaci*, *B. hexadonta*, *B. parasita*, and a new species, *B. sp. n.*. For the first time, DNA sequences were obtained for *B. kozarovi*, which clarified its phylogenetic position.

Morphological and genetic differences confirm the species status of a newly discovered population of branchiobdellidans, *Branchiobdella* sp.n., from Slovenia. A combined analysis of morphology, phylogeny, and species delimitation showed that the *B. parasita* clade splits into at least three subclades, which may represent distinct species or subspecies.

The phylogenetic structure of branchiobdellidans, supported by high bootstrap values, correlates with the phylogeny of their hosts—freshwater crayfish. In particular, a close relationship between *B. kozarovi* and *B. balcanica* was confirmed, reflecting the relatedness of their hosts—the narrow-clawed crayfish (*Astacus leptodactylus*) and the broad-clawed crayfish (*Astacus astacus*). The geographical distribution of *B. kozarovi* haplotypes in Ukraine indicates two main historical migration routes of the narrow-clawed crayfish: a western route (via the western Black Sea coast to the Danube and Southern Bug river basins) and an eastern route (via the eastern Black Sea coast to the river Don, river Siversky Donets, and Dnipro river).

Experimental studies demonstrated that *B. kozarovi* can survive without a host for up to 60 days, which is significant for the species' adaptation in conditions of temporary

host absence. This species also successfully colonizes introduced crayfish, occupying the same body regions as in their native hosts.

The study of branchiobdellidan cocoons and their localization on crayfish bodies allows for species identification even in the absence of adult specimens, as well as for investigating the specifics of their symbiotic relationships, including niche distribution and infestation intensity. *Branchiobdella balcanica*, an ectosymbiont of the broad-clawed crayfish, exhibits low genetic diversity, making it dependent on the status of its host populations. The subspecies *B. balcanica sketi* Karaman, 1967, was deemed invalid, as variations in the copulatory bursa, previously used for its classification, were found to be related to age-dependent morphological changes rather than genetic differentiation. *Branchiobdella astaci* was abundant in old museum specimens but was not found in recent collections, which may indicate a significant decline in its populations.

The results underscore the importance of integrating molecular, morphological, and ecological data to understand branchiobdellidan evolution and host interactions. The obtained results have important practical significance for understanding the ecological consequences of the introduction of exotic crayfish species into aquatic ecosystems. They can be used to develop biosecurity measures and quarantine control for the import of live crayfish, as well as to develop strategies for the conservation of native crayfish species.

Key results were published in three peer-reviewed articles, including a Q2-indexed international journal (Web of Science/Scopus) and Ukrainian Category A/B journals, and presented at the *4th Central European Symposium of Aquatic Invertebrates* (Slovakia, 2024).

The research was conducted within the framework of scientific programs aimed at studying the biodiversity of freshwater ecosystems in the Western Palearctic. Supported by grants from the Ministry of Education and Science of Ukraine, the

Ministry of Education and Science of Slovenia (2009–2012), and the Science and Technology Center in Ukraine (STCU) (2023-2025).

Keywords: branchiobdellidans, *Branchiobdellida*, crayfish, symbiosis, systematics, phylogenetics, molecular genetics, geographic distribution, evolution, speciation, invasive species, aquaculture.