

АНОТАЦІЯ

Хоменко А. М. Таксономічна ревізія п'явок родини Eprobdehlidae (Annelida, Clitellata, Hirudinida) Палеарктики: морфологія, філогенія і географічне поширення. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора філософії за спеціальністю 091 – «Біологія». Харківський національний університет імені В.Н. Каразіна, Харків; Інститут зоології імені І.І. Шмальгаузена НАН України, Київ, 2021.

Дисертаційна робота присвячена встановленню класифікації п'явок родини Eprobdehlidae, насамперед палеарктичних її представників, та виявленню закономірностей морфологічної еволюції та географічного поширення. За останні двадцять років внаслідок накопичення нових даних було виявлено багато невідповідностей між філогенетичним положенням, морфологічними особливостями окремих таксонів та діагнозами родів, що в свою чергу зумовлює необхідність проведення таксономічної ревізії з максимальним охопленням таксонів, використанням сучасних філогенетичних методів і дотриманням принципів стабільності номенклатури, що і стало нашою метою. Для здійснення цієї мети нами було досліджено філогенетичну структуру родини Eprobdehlidae, досліджено морфологічні особливості представників різних еволюційних ліній глоткових п'явок та описано закономірності їхнього географічного поширення.

Дослідження проводилося на матеріалах колекції кафедри зоології та екології тварин Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна та зразках, зібраних автором особисто. Всього автором було проаналізовано близько двохсот тридцяти зразків п'явок, що належать до чотирьох родів і тридцяти видів, зібраних з вісімдесят семи локалітетів. Була досліджена зовнішня та внутрішня морфологія зразків, для візуалізації поширення деяких досліджених таксонів було застосовано ГІС-програми. Для філогенетичного

аналізу з частини зразків було виділено геномне ДНК та отримано послідовності генів *cox1*, 12S та 28S, які були проаналізовані разом із послідовностями глоткових п'явок взятих з GenBank. Також було проаналізовано послідовності гену 18S, наявні у GenBank. До послідовностей гену *cox1* також були застосовані методи делімітації видів.

Проведений нами філогенетичний аналіз виявив дуже чітку філогенетичну структуру родини Erpobdellidae, яка значною мірою підтверджує морфологічні дані і біогеографію на рівні родів. Виявлені нами сім еволюційних ліній глоткових п'явок відповідають сімом родам, а саме *Erpobdella*, *Dina*, *Trocheta*, *Blanchardia*, *Fadejewobdella*, *Nephelopsis* та *Mooreobdella*. Більшість досліджених нами видів роду *Trocheta* утворили окрему від типового виду *T. subviridis* еволюційну лінію. До цієї еволюційної лінії належить, зокрема, і *T. cylindrica*, типовий вид для синонімізованого раніше роду *Blanchardia*. Неарктичні види роду *Erpobdella*, як виявилось, належать до цієї самої еволюційної лінії, що й види родів *Mooreobdella* та *Motobdella*. Так само неарктичні види роду *Dina* належать до цієї самої еволюційної лінії, що і монотипний рід *Nephelopsis*. Послідовності видів *T. subviridis* і *F. quinqueannulata*, типові види родів *Trocheta* та *Fadejewobdella* утворили дві окремі від інших досліджених п'явок еволюційні лінії. Також наші результати частково вказують на реальність підродин Erpobdellinae і Trochetinae та заперечують існування підродини Mooreobdellinae в її початковому складі.

Завдяки дослідженню морфологічних ознак ми дійшли висновку, що кількість кілець у соміті не є ознакою, яка дозволяє надійно виявити приналежність виду до якогось з родів, проте значення кільчастості для розрізнення видів залишається надзвичайно важливим. Наприклад, такі ознаки, як положення гонопорів відносно кілець соміту або ступінь розділеності деяких кілець є важливою діагностичною характеристикою для розрізнення багатьох схожих видів. Водночас представники різних еволюційних ліній глоткових п'явок добре розрізняються за особливостями будови статевої системи,

переважно формою атріуму та його рогів. Форма атріуму та форма яйцевих мішків мають велике значення для розрізнення видів глоткових п'явок.

Аналізуючи виявлену філогенетичну структуру глоткових п'явок та поширення окремих представників різних еволюційних ліній, ми з'ясували, що ареали п'явок роду *Erpobdella* обмежені Палеарктикою, натомість ареали родів *Dina* і *Trocheta* обмежені Західною Палеарктикою. Монотипного рід *Fadejewobdella* живе лише в північно-східній частині Азово-Чорноморського басейну. Загалом фауна Західної Палеарктики виявилася значно різноманітнішою, ніж фауна Східної Палеарктики. Неарктичні та неотропічні п'явки, яких відносили/відносять до родів *Erpobdella* та *Dina*, насправді належать до інших еволюційних ліній. Було показано, що Південний Кавказ, насамперед його західна частина, є санктuarioм для багатьох видів глоткових п'явок та одним із центрів різноманіття цієї групи разом із Балканами. Фауна глоткових п'явок бореальної зони та зони Євразійського степу є збідненою, проте вони включають окремі ендемічні види та збагачуються завдяки одна одній і окремих елементів карпатської і балканської фаун. Фауна п'явок Криму, зі свого боку, була сформована під значним впливом фауни Кавказу і Балкан.

Наукова новизна цієї роботи полягає в тому, що нами було визначено філогенетичну структуру родини Erpobdellidae. Було показано, що палеарктичні представники родів *Erpobdella* та *Dina* насправді не належать до тих саме еволюційних ліній, що і неарктичні представники цих родів, а склад родів *Erpobdella*, *Dina*, *Mooreobdella* та *Nephelopsis* потребує перегляду. Варто зазначити, що представники різних еволюційних ліній обмежені в своєму поширенні Палеарктикою або Неарктикою, що суперечить попереднім уявленням. Також результати філогенетичного аналізу вказують на те, що види роду *Trocheta* належать до двох еволюційних ліній, одна з яких відповідає роду *Trocheta*, а інша – *Blanchardia*, який було синонімізовано більш ніж вісімдесят років тому. За допомогою методів делімітації видів було продемонстровано значне видове різноманіття глоткових п'явок Західної Палеарктики, насамперед

серед кавказьких представників родів *Trocheta* і *Dina*. Встановлено, що різні типи кільчастості виникали в різних еволюційних лініях глоткових п'явок незалежно.

Теоретичне значення роботи визначається в тому, що на основі молекулярно-філогенетичних, а також морфологічних і біогеографічних даних було переглянуто систематику родини *Erpobdellidae* на рівні родів. На основі цих даних було запропоновано переглянути склад родів *Erpobdella*, *Dina*, *Trocheta*, *Mooreobdella* та *Nephelopsis*. У роботі було виявлено закономірності поширення глоткових п'явок і продемонстровано криптичне різноманіття глоткових п'явок Кавказу. Було досліджено систематичну значущість ознак зовнішньої та внутрішньої морфології. Крім того, було доопрацьовано стандарт опису глоткових п'явок і вдосконалено методику розтину. Під час цього дослідження було підібрано генетичні маркери, які найкраще відображають еволюційну історію глоткових п'явок у різних масштабах.

Практичну цінність роботи підтверджує те, що результати дослідження лягли в основі пропозицій щодо зміни переліку видів глоткових п'явок, внесених до Червоної книги України. Для деяких видів було запропоновано змінити природоохоронний статус. Матеріали дослідження можуть бути використані під час викладання курсів «Зоологія безхребетних». «Навчальна практика з зоології безхребетних», «Зоотомія», «Молекулярна еволюція та філогенетика» тощо.

Ключові слова: кільчасті черви, систематика, синонімія, молекулярна філогенетика, делімітація, фауна, ендемізм, знахідки, Кавказ, Україна, криптичні види, нові види, кільчастість, статева система, мінливість.

Summary

Khomenko A. M. Taxonomic revision of leeches of the family Erpobdellidae (Annelida, Clitellata, Hirudinida) of the Palaearctic: morphology, phylogeny and geographical distribution. - Qualifying scientific work printed as a manuscript.

The dissertation for a scientific degree of the doctor of philosophy on a specialty 091 "Biology", V. N. Karazin Kharkiv National University, Kharkiv; I. I. Schmalhausen Institute of Zoology, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, 2021.

The dissertation is devoted to the establishment of the classification of leeches of the family Erpobdellidae, primarily its Palearctic members, and to the determination of patterns of morphological evolution and geographical distribution. Over the past twenty years, the accumulation of new data has led to revealing many inconsistencies between phylogenetic positions and morphological features of individual taxa and diagnoses of genera, which in turn necessitates a taxonomic revision with maximum coverage of taxa, using modern phylogenetic methods and taking into account the principle of stability, which became our goal. To achieve this goal, we studied the phylogenetic structure of the family Erpobdellidae, the morphological features of representatives of different evolutionary lineages of erpobdellid leeches and described the patterns of their geographical distribution.

The study was conducted using the materials of the collection of the Department of Zoology and Animal Ecology of V. N. Karazin Kharkiv National University and samples collected by the author personally. In total, the author analysed about two hundred and thirty specimens of leeches belonging to four genera and thirty species collected from eighty-seven localities. The external and internal morphology of the samples was studied and GIS programs were used to visualize the distribution of some of the studied taxa. For phylogenetic analysis, genomic DNA was isolated from some samples and the *cox1*, 12S and 28S gene sequences were obtained and analysed together with the sequences of erpobdellids taken from

GenBank. The sequences of the 18S gene available in GenBank were also analysed. Species delimitation methods were applied to *cox1* gene sequences.

Our phylogenetic analysis revealed the very clear phylogenetic structure of the family Erpobdellidae, which largely confirms to the morphological data and biogeography at the level of genera. Seven evolutionary lineages of erpobdellids we found correspond to seven genera, namely *Erpobdella*, *Dina*, *Trocheta*, *Blanchardia*, *Fadejewobdella*, *Nephelopsis*, and *Mooreobdella*. Most of the species of the genus *Trocheta* studied by us formed an evolutionary lineage separated from the type species of the genus, *T. subviridis*. *Trocheta cylindrica*, a type species of the synonymized genus *Blanchardia*, also belongs to this evolutionary lineage. The Nearctic species of the genus *Erpobdella* turned out to belong to the same evolutionary line as the species of the genera *Mooreobdella* and *Motobdella*. Nearctic species of the genus *Dina* belong to the same evolutionary line as the monotypic genus *Nephelopsis*. Sequences of *T. subviridis* and *F. quinqueannulata*, type species of the genera *Trocheta* and *Fadejewobdella*, formed two evolutionary lineages separately from other leeches studied. Also, our results partially confirm the reality of the subfamilies Erpobdellinae and Trochetinae and deny the existence of the subfamily Mooreobdellinae in its initial composition.

Through the study of morphological features, we came to the conclusion that the number of annuli in the segment is not a feature that makes it possible to reliably identify the species belonging to any of the genera, but the value of annulation to distinguish species remains extremely important. For example, features such as the position of the gonopores relative to annuli of the segment or the degree of separation of some annuli are important diagnostic features for distinguishing between similar species. At the same time, representatives of different evolutionary lineages of erpobdellids differ well in the structure of the reproductive system, mainly the shape of the atrium and its cornua. The shape of the atrium and the shape of the ovisacs are important for distinguishing between the species of erpobdellid leeches.

Analyzing the phylogenetic structure of pharyngeal leeches and the distribution of individual representatives of different evolutionary lines, we found that the habitats of leeches of the genus *Erpobdella* are limited to the Palearctic, while the habitats of the genera *Dina* and *Trocheta* are limited to the Western Palearctic. The monotypic genus *Fadejewobdella* lives only in the northeastern part of the Azov-Black Sea basin. In general, the fauna of the Western Palearctic turned out to be much more diverse than the fauna of the Eastern Palearctic. Non-Arctic and neotropical leeches, which belonged to the genera *Erpobdella* and *Dina*, actually belong to other evolutionary lines. It has been found that the South Caucasus, especially its western part, is a sanctuary for many species of pharyngeal leeches and one of the centers of diversity of this group, along with the Balkans. The pharyngeal leech fauna of the boreal zone and the Eurasian steppe zone is impoverished, but they include some endemic species and are enriched by each other and individual elements of the Carpathian and Balkan fauna. The Crimean leech fauna, on the other hand, was formed under the significant influence of the fauna of the Caucasus and the Balkans.

Analyzing the phylogenetic structure of erpobdellids and the geographical distribution of individual representatives of different evolutionary lineages, we found that the ranges of leeches of the genus *Erpobdella* are limited to the Palaearctic, while the ranges of the genera *Dina* and *Trocheta* are restricted by the Western Palearctic. The monotypic genus *Fadejewobdella* occurs only in the northeastern part of the Azov-Black Sea basin. In general, the fauna of the Western Palearctic turned out to be much more diverse than the fauna of the Eastern Palearctic. Nearctic and Neotropical leeches, which had been assigned to the genera *Erpobdella* and *Dina*, actually belong to other evolutionary lineages. It was found that the South Caucasus, especially its western part, is a sanctuary for many species of erpobdellids and one of the centers of diversity of this group, along with the Balkans. The erpobdellid fauna of the Boreal zone and the Eurasian steppe zone is impoverished, but they include some endemic species and are enriched by each other and individual elements of the Carpathian and Balkan faunae. The Crimean leech fauna, on the other hand, was formed under the significant influence of the fauna of the Caucasus and the Balkans.

The scientific novelty of this work is that we determined the phylogenetic structure of the family Erpobdellidae. It was shown that the Palearctic members of the genera *Erpobdella* and *Dina* do not actually belong to the same evolutionary lines as the Nearctic members of these genera, and the composition of the genera *Erpobdella*, *Dina*, *Mooreobdella* and *Nephelopsis* needs to be revised. It should be noted that the representatives of different evolutionary lineages are limited in their distribution by the Palearctic or the Nearctic, which contradicts previous views. Also, the results of phylogenetic analysis indicate that the species of the genus *Trocheta* belong to two evolutionary lineages, one of which corresponds to the genus *Trocheta*, and the other, *Blanchardia*, was synonymized more than eighty years ago. Species delimitation demonstrated significant species diversity of erpobdellids in the Western Palearctic, especially among Caucasian members of the genera *Trocheta* and *Dina*. Different types of annulation was found to occur in different evolutionary lineages of erpobdellids independently.

The theoretical significance of the work is determined by the fact that on the basis of molecular-phylogenetic, as well as morphological and biogeographical data, the taxonomy of the family Erpobdellidae at the level of genera was revised. Based on these data, it was proposed to review the composition of the genera *Erpobdella*, *Dina*, *Trocheta*, *Mooreobdella* and *Nephelopsis*. The paper revealed the patterns of distribution of erpobdellids and demonstrated the cryptic diversity of erpobdellid leeches in the Caucasus. The systematic significance of features of external and internal morphology was investigated. In addition, the standard for describing erpobdellid leeches was revised and the dissection technique was improved. During this research, genetic markers were selected that best reflect the evolutionary history of erpobdellid leeches at different scales.

The practical value of this work is confirmed by the fact that the results of the study formed the basis for proposals to change the list of species of erpobdellid leeches listed in the Red Book of Ukraine. For some species, it was proposed to change the conservation status. These research materials can be used for the teaching

of courses "Zoology of Invertebrates", "Educational Practice in Invertebrate Zoology", "Zootomy", "Molecular Evolution and Phylogenetics" etc.

Key words: annelids, systematics, synonymy, molecular phylogenetics, delimitation, fauna, endemism, new records, Caucasus, Ukraine, cryptic species, new species, annulation, reproductive system, variability.

Список публікацій здобувача, в яких опубліковані основні наукові результати дисертації

У виданнях, які включені до міжнародних наукометричних баз даних:

1. **Khomenko, A., Utevsky, S., Utevsky, A., Trontelj, P.** (2020). Unrecognized diversity of *Trocheta* species (Hirudinea: Erpobdellidae): resolving a century-old taxonomic problem in Crimean leeches. *Systematics and Biodiversity*. 18(2), p. 129–141. (**Web of Science Core Collection та Scopus**) (*особистий внесок: камеральна обробка, філогенетичний аналіз, аналіз літературних джерел, інтерпретація результатів, морфологічний опис, написання статті*).

2. **Khomenko, A., Utevsky, S., Palatov, D., Huseynov, M., Farzali, Sh., Dadashova, L., Darabi-Darestani, K., Utevsky, A.** (2018). On the distribution of *Dinastichegolewi* (Hirudinida: Erpobdellidae) in the South Caucasus. *Zoology in the Middle East*. 64(1). p. 88–90. (**Web of Science Core Collection та Scopus**) (*особистий внесок: камеральна обробка, аналіз літературних джерел, інтерпретація результатів, написання статті*).

Публікації у наукових фахових виданнях України

3. **Хоменко, А. М., Утевський, С. Ю., Сон, М. О., Шрестха, М. Ю., Дядичко, В. Г.** (2019). Рідкісні види глоткових п'явок (Hirudinea: Erpobdellidae) Причорноморської низовини: Ідентифікація і поширення. *Вісник ОНУ. Біологія*. 24(2). С. 97–109. (**Фахове видання**) (*особистий внесок: участь у зборі матеріалу, камеральна обробка, аналіз літературних джерел, інтерпретація результатів, написання статті*).

Публікації, які засвідчують апробацію результатів дисертації

4. Utevsky, S., **Khomenko, A.**, Utevsky, A., Trontelj, P. (2019, September). *Trocheta* leeches (Hirudinea: Erpobdellidae) of the Black Sea region: Taxonomy, biogeography and phylogeny. In: 2nd International Symposium on Limnology and Freshwater Fisheries (p. 3). Elazığ, Eğirdir Fisheries Research Institute. (особистий внесок: камеральна обробка, філогенетичний аналіз, аналіз літературних джерел, інтерпретація результатів).

5. **Khomenko, A.**, Utevsky, S., Son, M., Shrestha, M., Palatov, D., Dyadichko, V. (2019, June). Rare erpobdellids species (Erpobdellidae) of Black Sea Lowland: Biogeography and evolutionary history. In: Achievements in studies of marginal effect in water ecosystems and their practical significance (p. 33). Odesa, Institute of marine biology NAS of Ukraine. (особистий внесок: камеральна обробка, філогенетичний аналіз, аналіз літературних джерел, інтерпретація результатів, морфологічний опис, написання тез).

6. **Хоменко, А.**, Утєвський, С., Палатов, Д. (2018, листопад). Про меланізм *Erpobdella monostriata* (Hirudinida: Erpobdellidae) в північній частині її ареалу. В: Тези доповідей Конференції молодих дослідників-зоологів – 2018 (с. 24). Київ, Інститут зоології імені І. І. Шмальгаузена НАН України. (особистий внесок: камеральна обробка, філогенетичний аналіз, аналіз літературних джерел, інтерпретація результатів, написання тез).

7. **Khomenko, A.**, Utevsky, S., Palatov, D., Huseynov, M., Farzali, Sh., Shrestha, M., Son, M., Utevsky, A. (2018, July). Geographical distribution and taxonomic status of *Dina stschegolewi* (Lukin & Epshtein, 1960) (Hirudinida: Erpobdellidae). In: 3rd Central European Symposium for Aquatic Macroinvertebrate Research (p. 122). Łódź, University of Łódź. (особистий внесок: камеральна обробка, філогенетичний аналіз, аналіз літературних джерел, інтерпретація результатів, написання тез).

8. Utevsky, S., Vladymyrska, M., **Khomenko, A.** (2018, July). Geographical ranges and species concepts in leeches (Annelida: Hirudinida) In: 3rd Central European Symposium for Aquatic Macroinvertebrate Research (p. 76). Łódź,

University of Łódź. (*особистий внесок: філогенетичний аналіз, аналіз літературних джерел, інтерпретація результатів*).

9. **Хоменко, А.**, Утевський, С., Сон, М., Дядичко, В., Шрестха, М. (2018, Квітень). Поширення найбільшої європейської п'явки *Trocheta danastrica* (Hirudinida: Eprobdeidae) в Україні. В: Молодь і поступ біології (с. 203). Львів, Львівський національний університет імені Івана Франка. (*особистий внесок: збір матеріалу, камеральна обробка, аналіз літературних джерел, інтерпретація результатів, написання тез*).

Публікації, які додатково відображають наукові результати дисертації

10. **Хоменко, А. М.**, Утевський, С. Ю. (2019). Рідкісні види п'явок (Hirudinida) України. В: Інститут зоології імені І. І. Шмальгаузена НАН України (Ред.). Матеріали до 4-го видання Червоної книги України: Тваринний світ: Том 2 (с. 437–440). Чернівці, Друк Арт. (*особистий внесок: камеральна обробка, аналіз літературних джерел, обговорення, написання тексту статті*).