

ANNOTATION

Valeriia Telizhenko. Genetic and morphological proxies for evolutionary changes in the ontogeny of cetacean skeleton. – Qualifying scientific work printed as a manuscript.

The dissertation for a scientific degree of the Doctor of Philosophy on a specialty 091 – «Biology». I. I. Schmalhausen Institute of Zoology, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, 2025.

The dissertation is dedicated to investigating morphological and molecular markers accompanying the evolutionary changes in the cetacean skeleton. In the process of transitioning to a fully aquatic lifestyle, cetaceans underwent numerous modifications of anatomy and physiology, with the changes in skeletal structure being the most prominent and including skull, vertebrae, and limb transformations. These morphological changes are characterized by temporal changes in postnatal ontogeny that were previously demonstrated in different examples of heterochronies, such as paedomorphosis and peramorphosis. Due to the complex and interconnected nature of the processes of evolutionary development of cetaceans, the mechanisms of their skeletal changes remain poorly understood and require additional studies. Thus, this work aims to fill gaps in our knowledge by addressing several morphological and genetic aspects of evolution of cetacean skeleton, that include postnatal suture ossification of the cetacean cranium, genetic markers of transformations of forelimb skeletal elements, and gene expression patterns in flippers, fins, and flukes.

The morphological part of the research was conducted on cranium and limb skeleton specimens of cetaceans and other mammals from world museum collections. Photographs and three-dimensional surface scans were taken for further assessment. Some specimens were personally examined and all the images were personally assessed by the author. A total of 434 skull and 145 limb specimens were analyzed, along with an additional 56 limb skeleton records from literature sources. Cranial suture ossification was assessed across 25 sutures using a binary scoring system (0 = open, 1 = fully ossified). The presence of accessory bones and clefts was recorded

based on visual inspection, with additional juvenile and fetal specimens included to evaluate early developmental stages. Ancestral state reconstruction of ossification rates and accessory bones was performed using maximum likelihood and stochastic character mapping, with model selection based on AIC. Phylogenetic signal was evaluated using Blomberg's K , Pagel's λ , and Fritz and Purvis' D -statistics. Statistical comparisons between groups were made using t-tests or Mann–Whitney U tests, following normality checks. Evolutionary rate models were fitted using *geiger*, while variation in rate dynamics was assessed with *evorates* and *BAMM*. Gene and protein sequences for selection analysis were collected from the GenBank public database or extracted from genome data deposited in NCBI and DNA Zoo. Methods used for gene selection study included MAFFT 7 and PAL2NAL for sequence alignment, MrBayes 3.7a for tree reconstruction, PAML 4 and HyPhy 2.5.33 software package for inferring selection pressure. Tissue specimens for the gene expression study were collected from stranded animals by the author and colleagues. Gene expression was examined in cetacean flippers, tail flukes, and dorsal fins using tissue samples collected from stranded animals. Laboratory work included RNA extraction, cDNA synthesis, and quantitative PCR, with expression levels quantified via the ΔC_t method.

The study of cranial development across 47 cetacean and 15 terrestrial artiodactyl species revealed an unusually low rate of postnatal suture ossification in cetaceans, with strong phylogenetic signal and evolutionary conservatism across lineages. Mysticetes exhibited the least ossified skulls (2-4 sutures), while ziphiids among odontocetes showed relatively higher degrees of ossification (up to 17). Six types of accessory cranial bones were identified, some of which may represent evolutionary reversals or developmental innovations, diverging from the trend of skull simplification typical for mammals (Williston's law). Statistical analyses confirmed a significant correlation between reduced ossification rates and the presence of accessory elements or cranial clefts. Ancestral state reconstructions indicated that accessory bones likely originated at the base of the crown cetacean clade, although losses occurred in specific lineages such as Kogiidae and Ziphiidae. Evolutionary rate

modeling (evorates, BAMM) demonstrated an overall slowing trend in the ossification rate, with the absence of shifts. However, few delphinid taxa (e.g., *Orcaella*, *Lissodelphis*) showed marginally significant acceleration of rates. These results suggest that delayed cranial development, likely influenced by paedomorphic processes, accompanied the re-emergence or retention of multiple ossification centers. Prolonged ontogeny, large brain, and functional adaptations for underwater feeding and echolocation were discussed as the possible correlates and/or drivers of changes in cetacean cranium development.

During the study of forelimb morphology, the evolution of skeletal elements of the manus was traced using ancestral state reconstructions based on a dataset comprising 88 mammal species, including 55 cetaceans. The sample included all the diversity of variants of forelimb bone number in whales, with extreme cases of both hyperphalangy and hypophalangy, as well as variation in the number of distal carpal bones. These ancestral reconstructions were then used to choose target lineages with either increased or decreased states for gene selection scans. The analysis of 25 limb-related genes showed relaxation of purifying selection in distal HoxD genes, *EVX1/EVX2*, and *GDF5* as the main trend underlying flipper evolution in cetaceans, while no signs of positive selection were detected. The genes under relaxed selection were also associated with observed cases of bone number variation, including changes in phalanges, metacarpals, and carpals.

Additionally, specific non-synonymous substitutions were identified in mammals with unusual limb morphology, including one in *BMP2* that was shared by all cetaceans and the northern elephant seal (*Mirounga angustirostris*). Analysis of the polyalanine tract length in *HOXD13* across our dataset demonstrated that variation in alanine number relative to the ancestral state (both increase and decrease in alanine residues) was associated with deviant limb structures. However, contrary to previous studies, this pattern was not universal, as some cetaceans retained the ancestral number of alanines.

Selection analyses of 11 genes involved in humerus morphogenesis across 45 cetacean species identified relaxed purifying selection in several regulatory genes, including *PTCH1*, *GLI3*, and *PBX3*. Two positively selected sites were detected in *GLI3* in *Kogia breviceps*. Additionally, *PBX3*, a gene associated with proximal humerus development, showed mysticete-specific acceleration. A premature stop codon in *PANX3*, a gene involved in osteoblast function, was identified in *Delphinapterus leucas*, although no apparent morphological anomalies were observed. These results show that evolutionary shifts in the genetic regulation of humerus development – through a combination of relaxed and positive site selection – likely contributed to the morphological diversification of this element in living whales and dolphins.

Gene expression analysis of posterior HoxD genes, *HOXA13*, and the lncRNA *HOTTIP* was performed on flipper, fluke, and dorsal fin tissues from three odontocete species representing juvenile, adult, and senescent stages. Expression levels varied substantially between tissues and species. In a juvenile *Hyperoodon ampullatus*, *HOTTIP*, *HOXD10*, *HOXD11*, and *HOXD13* showed the highest expression in the fluke and dorsal fin, while *HOXD12* and *HOXA13* were minimally expressed or absent. An adult *Phocoena phocoena* had a similar distribution but with generally higher expression levels, particularly *HOXD11* and *HOXD13* in the dorsal fin. In contrast, an old *Tursiops truncatus* showed unusually high expression of *HOXD11* and *HOTTIP* in the flippers, with low or undetectable levels in the fluke and dorsal fin. *HOXD12* was consistently undetectable across all adult samples, supporting earlier findings that its activity is limited to early developmental stages. These results demonstrate that posterior Hox gene activity persists into postnatal life and highlight the need for further studies to clarify its role in limb and fin development in cetaceans.

The scientific novelty of the study consists in integrative analysis of both morphological and genetic markers of skeletal evolution in cetaceans during the postnatal development. It provides the first comprehensive quantitative assessment of cranial suture ossification and accessory bone formation in modern whales, and

explores evolutionary patterns, such as phylogenetic signal and evolutionary rates of skull ossification. The work also offers novel insights into the evolution of the forelimb skeleton, including the analysis of correlations in evolution of anatomical traits and regulatory genes in cetaceans compared to other mammals, detailed ancestral state reconstructions and the identification of relaxed selection in key regulatory genes. Selection patterns in genes were also first analysed in the context of evolution of specific bony elements, such as phalanges, carpals and humerus. Finally, this is the first study to report persistent postnatal expression of posterior Hox genes in cetacean flippers, dorsal fin and tail flukes.

The practical value of the work lies in providing new directions for future research – methodological, descriptive, and conceptual – within the field of comparative skeletal development. Published datasets of morphological characters can be used to identify evolutionary patterns, test functional hypotheses, link anatomical variation with genetic data, and train automated methods in comparative anatomy. The approach of using ancestral reconstructions to identify target lineages for selection analysis could be adopted to investigate gene-phenotype correlations on a broader scale. The identification of unusual expression patterns points to the importance of further studies on gene expression in non-model animals, which could potentially shed light on processes relevant to human health and medicine. The materials of the dissertation can be used during the teaching of such educational courses as “Evolutionary Morphology” and “Fundamentals of Animal Phylogeny”.

Key words: Cetacea, mammals, whales, dolphins, skeleton, Hox genes, evolution, phylogeny, gene expression, heterochrony, skull, limbs

АНОТАЦІЯ

Теліженко В. С. Генетичні і морфологічні індикатори еволюційних змін онтогенезу скелета китоподібних. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора філософії за спеціальністю 091 – «Біологія». Інститут зоології імені І. І. Шмальгаузена НАН України, Київ, 2025.

Дисертаційна робота присвячена вивченню морфологічних ознак і молекулярно-генетичних маркерів, що характеризують еволюційні зміни у скелеті китоподібних. У процесі переходу до повністю водного способу життя китоподібні зазнали численних анатомічних і фізіологічних змін, найвиразнішими з яких стали трансформації скелета – черепа, хребта та кінцівок. Ці морфологічні зміни супроводжуються часовими зсувами процесів постнатального онтогенезу, що раніше було показано на прикладах гетерохроній, таких як педоморфоз і пераморфоз. Через складність і взаємопов'язаність процесів еволюційного розвитку китоподібних механізми, що лежать в основі змін будови їх скелета, залишаються недостатньо вивченими та потребують подальших досліджень. Таким чином, метою цієї роботи є заповнення прогалин у розумінні формування скелета китоподібних шляхом аналізу окремих морфологічних і генетичних аспектів еволюції скелета, зокрема скостеніння швів черепа, генетичних маркерів трансформацій передніх кінцівок у зв'язку з перетвореннями будови їх скелетних елементів, закономірностей експресії регуляторних генів у передніх кінцівках і плавцях.

Матеріалом для морфологічної частини дослідження були черепа і кінцівки китоподібних та інших ссавців з колекцій музеїв Європи та Америки. Кількісні аналізи морфології проведено на матеріалах з тривимірних сканів поверхні та фотографій. Частину екземплярів особисто виміряно автором. Загалом проаналізовано 434 черепа, 145 екземплярів кінцівок, а також 56 літературних описів скелетів кінцівок. Скостеніння швів черепа оцінювали за 25

швами за бінарною шкалою (0 = відкритий, 1 = повністю закритий). Оцінено наявність додаткових кісткових елементів та розщеплень; для порівняння з ранніми етапами онтогенезу включено додаткові екземпляри ювенільних особин. Реконструкції предкових станів скостеніння і наявності додаткових кісток виконано за допомогою методів максимальної правдоподібності та стохастичного картування, вибір моделей проведено за критерієм Акаїке (AIC). Філогенетичний сигнал оцінено за допомогою коефіцієнтів Blomberg's K , Pagel's λ , і D-статистики. Для статистичного порівняння між групами застосовували t-тести або критерій Манна–Уїтні після перевірки на нормальність. Моделі еволюційних темпів побудовано в середовищі R у пакеті *geiger*, а зміни темпів еволюції аналізували за допомогою пакетів *evrates* і *BAMM*.

Геномні й білкові послідовності для аналізу добору отримано з бази даних GenBank або з геномів, доступних у NCBI і DNA Zoo. При дослідженні природного добору застосовували MAFFT 7 і PAL2NAL для вирівнювання послідовностей, MrBayes 3.7a для побудови дерев, а також PAML 4 і HyPhy 2.5.33 для оцінки тиску добору. Зразки тканин для аналізу експресії генів відібрано з мертвих китоподібних під час розтинів автором і колегами. Експресію генів визначали у грудних кінцівках, хвостових лопатях і спинних плавцях. Лабораторна робота включала екстракцію РНК, синтез кДНК і кількісну ПЛР з оцінкою рівня експресії за методом ΔC_t .

Дослідження розвитку черепа у 47 видів китоподібних та 15 видів наземних парнокопитних виявило надзвичайно низькі темпи скостеніння швів у китоподібних у постнатальному онтогенезі, а також виражений філогенетичний сигнал і еволюційну консервативність цих процесів. У вусатих китів черепа мали найменшу кількість зрощених швів (2–4), тоді як у дзьоборилих китів (Ziphiidae) — до 17. Також у китоподібних виявлено шість додаткових черепних кісток, що є винятком з загальної тенденції до спрощення складу черепа у ссавців (закону Віллістона). Статистичні аналізи підтвердили значущу

кореляцію між низьким рівнем скостеніння та наявністю додаткових елементів або розщеплень у черепі. Реконструкції предкового стану показали, що додаткові кістки могли з'явитися вже на початку еволюції вусатих і зубатих китів, хоча у деяких груп, зокрема в родинях Kogiidae і Ziphiidae, вони були втрачені. Моделювання темпів еволюції (evrates, BAMM) вказало на загальне уповільнення скостеніння без виразних зсувів, хоча у кількох дельфінових (наприклад, *Orcaella*, *Lissodelphis*) спостерігалось деяке прискорення. Отримані результати свідчать, що уповільнення розвитку черепа сприяло повторному виникненню або збереженню численних центрів скостеніння. Ці процеси можуть бути пов'язані з тривалим онтогенезом і функціональними адаптаціями до захоплення здобичі під водою й ехолокації.

У дослідженні морфології передніх кінцівок простежено еволюцію елементів кисті на основі реконструкції предкового стану для 88 видів ссавців, зокрема 55 китоподібних. Дослідженням охоплено різноманіття варіантів кількості кісток у передній кінцівці у китів, зокрема крайні форми як гіпер-, так і гіпофалангії, а також різноманіття варіантів дистальних зап'ясткових кісток. Реконструкції предкових станів дозволили визначити філогенетичні гілки з варіаціями у кількості кісткових елементів (збільшення чи зменшення у порівнянні з предковим станом), які було обрано для подальшого аналізу добору. Аналіз 25 генів, пов'язаних із розвитком кінцівок, виявив релаксацію стабілізуючого добору у 5'-кінцевих генах *HoxD*, *EVX1/EVX2* і *GDF5* як основну тенденцію, пов'язану з еволюцією передніх кінцівок у китоподібних, без ознак рушійного добору. Такі стани генів також були пов'язані з окремими виявами варіації кількості кісток – фаланг, п'ястків і зап'ястків.

Крім того, були ідентифіковані специфічні несинонімічні заміни у ссавців з незвичною морфологією кінцівок, зокрема одна мутація у гені *BMP2*, спільна для всіх китоподібних і північного морського слона (*Mirounga angustirostris*). Аналіз довжини поліаланінового фрагмента в *HOXD13* показав, що варіації кількості аланінів у порівнянні з предковим станом корелюють з нетиповою

структурою кінцівок, хоча, на відміну від даних попередніх досліджень, ця кореляція не є універсальною – у деяких китоподібних поліаланіновий фрагмент залишався незмінним за довжиною порівняно з предковим.

Аналіз добору для 11 генів, пов'язаних з морфогенезом плечової кістки, серед 45 видів китоподібних виявив релаксацію стабілізуючого добору у *PTCH1*, *GLI3* і *PBX3*. У *Kogia breviceps* знайдено два сайти під дією рушійного добору у *GLI3*. Крім того, зміни *PBX3* є значно прискореними у вусатих китів. У *Delphinapterus leucas* виявлено передчасний стоп-кодон у гені *PANX3*, що відповідає за функцію остеобластів, хоча явних морфологічних змін у них не зафіксовано. Це свідчить, що еволюційні зсуви у генетичній регуляції розвитку плечової кістки – через поєднання релаксованого стабілізуючого та рушійного добору – сприяли морфологічній диверсифікації форми цієї кістки у сучасних китів і дельфінів.

Аналіз експресії 5'-кінцевих НохD-генів, *HOXA13* і некодуючої РНК *HOTTIP* проводився на зразках грудних кінцівок, хвостових лопатей і спинного плавця трьох видів зубатих китів у ювенільному, дорослому і сенільному віці. Рівні експресії значно варіювали в залежності від тканини і виду. У *Hyperoodon ampullatus* найвищу експресію у хвості й спинному плавці мали *HOTTIP*, *HOXD10*, *HOXD11* і *HOXD13*, тоді як *HOXD12* і *HOXA13* практично не експресувалися. Зразки *Phocoena phocoena* демонстрували схожі закономірності, але з вищими рівнями експресії, особливо *HOXD11* і *HOXD13* у спинному плавці. Натомість експресія *HOXD11* і *HOTTIP* була дуже високою у грудних кінцівках *Tursiops truncatus* і майже відсутня в інших структурах. *HOXD12* не експресувався у жодному дорослому зразку, що підтверджує його активність лише на ранніх стадіях розвитку. Ці результати демонструють, що активність 5'-кінцевих Нох-генів зберігається протягом усього життя, та вказують на потребу подальших досліджень їхньої ролі у розвитку кінцівок і плавців китоподібних.

Наукова новизна роботи полягає в інтегрованому аналізі змін у морфологічних структурах і послідовностях генів регуляції морфогенезу, що

супроводжують еволюцію скелета китоподібних у постнатальному онтогенезі. Вперше проведено комплексну кількісну оцінку скостеніння швів черепа та формування додаткових кісток, досліджено філогенетичний сигнал і темпи еволюційних змін цих процесів. Проведено аналіз кореляцій в еволюції анатомічних ознак скелета передніх кінцівок і відповідних регуляторних генів у китоподібних у порівнянні з іншими ссавцями, аналіз реконструкцій предкових станів і виявлення релаксованого добору у найважливіших регуляторних генах. Вперше закономірності добору генів було проаналізовано у зв'язку з еволюцією окремих елементів скелета кінцівок: фалангами, зап'ястками і плечовою кісткою. Також вперше виявлено експресію 5'-кінцевих Нох-генів в постнатальному онтогенезі (протягом усього життя) у грудних кінцівках, а також спинних плавцях і лопатях хвоста китоподібних.

Практичне значення роботи полягає у відкритті нових напрямів для подальших досліджень у галузі порівняльної морфології скелета. Опубліковані набори морфологічних даних можуть використовуватись для виявлення еволюційних закономірностей, перевірки функціональних гіпотез, зіставлення анатомічних варіантів з генетичними даними та для розвитку автоматизованих методів у порівняльній анатомії. Підхід із використанням реконструкцій предкових станів для вибору цільових філогенетичних гілок може бути застосований для вивчення зв'язку між генами та фенотипами в ширшому масштабі. Виявлення нетипових виявів експресії вказує на важливість подальших досліджень експресії генів у немодельних організмів для отримання даних, що можуть бути застосовані у медицині. Матеріали дисертації можуть бути використані у викладанні таких дисциплін, як «Еволюційна морфологія», «Основи філогенії тварин» тощо.

Ключові слова: китоподібні, ссавці, кити, дельфіни, скелет, Нох-гени, еволюція, філогенія, експресія генів, гетерохронії, череп, кінцівки

The list of publications in which the main scientific results of the acquirer have been published, including those which are listed in international databases

1. **Telizhenko, V.** & Gol'din, P. (2025). Evolution of accessory bones in cetacean skull coupled with decreasing rate of ossification of cranial sutures. *Scientific Reports*, 15, 10268. <https://doi.org/10.1038/s41598-025-95566-x>
2. Ghazali, M., Davydenko, S., **Telizhenko, V.**, Otriazhyi, P., Vishnyakova, K., Bukhsianidze, M., Solis-Añorve, A., Dzeverin, I. & Gol'din, P. (2025). Humerus shape evolved in cetaceans under relaxed selection and random drift. *Communications Biology*, 8, 518. <https://doi.org/10.1038/s42003-025-07952-w>
3. **Telizhenko, V.**, Kosiol, C., McGowen, M.R. & Gol'din, P. (2024) Relaxed selection in evolution of genes regulating limb development gives clues to variation in forelimb morphology of cetaceans and other mammals. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 291: 20241106. <https://doi.org/10.1098/rspb.2024.1106>

Presentation of dissertation materials

4. **Telizhenko, V.**, Gulak, K., Boldyriev, O., & Gol'din, P. (2024, November). *Analysis of expression of limb-related regulatory genes in harbor porpoise (Phocoena phocoena) during postnatal ontogeny* (Abstract, p. 53). In *Book of Abstracts of the 25th Biennial Conference on the Biology of Marine Mammals*, Perth, Australia.
5. **Telizhenko, V.**, & Gol'din, P. (2024, April). *Suture ossification in cetacean skulls is delayed and shows strong phylogenetic signal* (Abstract, p. 375). In *Book of abstracts of the 35th Annual Conference of the European Cetacean Society*, Catania, Italy.
6. **Telizhenko, V.**, Kosiol, C., McGowen, M. R., & Gol'din, P. (2024, January). *Exploring the connection between gene evolution and limb morphology in*

- cetaceans and other mammals* (Abstract, p. 174). Abstract presented at the Population Genetics Group 57, St Andrews, United Kingdom.
7. Otriazhyi, P., Davydenko, S., **Telizhenko, V.**, Ghazali, M., Bukhsianidze, M., Solis-Añorve, A., Dzeverin, I., & Gol'din, P. (2023). *Morphological evolution of cetacean humerus shows functional and phylogenetic signals* (Abstract, p. 52). In *Abstract book of the 34th Annual Conference of the European Cetacean Society*, O Grove, Galicia.
 8. **Telizhenko, V.**, McGowen, M., & Gol'din, P. (2022, August). *Evolution of HOXD13 gene in cetaceans shows lifting selective constraints for limb patterning* (Abstract, pp. 221–222). In *Book of Abstracts of the 24th Biennial Conference on the Biology of Marine Mammals*, Palm Beach, FL, United States.
 9. **Telizhenko, V.** (2021, June 1–3). *Relaxation of purifying selection in Hoxd13 gene in cetaceans* (Abstract, p. 43). *Zoology in the Modern World: Challenges of the 21st Century*, Institute of Zoology, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, Ukraine.