

ХАРКІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ В. Н. КАРАЗІНА

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ

Кваліфікаційна наукова

праця на правах рукопису

ШРЕСТХА МАРІЯ ЮРІЇВНА

УДК: 591.5:597.5:574.5:575.86

ДИСЕРТАЦІЯ

**БРАНХІОБДЕЛІДИ ЗАХІДНОЇ ПАЛЕАРКТИКИ
(ANNELIDA:BRANCHIOBELLIDA): СИСТЕМАТИКА, ГЕОГРАФІЧНЕ
ПОШИРЕННЯ ТА ЕВОЛЮЦІЯ**

Спеціальність 091 – Біологія

Галузь знань 09 – Біологія

Подається на здобуття наукового ступеня доктора філософії

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело

_____ М. Ю. Шрестха

Науковий керівник: **Утєвський Сергій Юрійович**, доктор біологічних наук, професор

Харків – 2025

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 бутстрепу, 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.

Список публікацій здобувача за темою дисертації.

Наукові праці, в яких опубліковано основні наукові результати дисертації:

1. **Shrestkha, M., & Utevsky, S. (2024).** The distribution of branchiobdellidan worms (Annelida: Clitellata) on the noble crayfish, *Astacus astacus*, in the Transcarpathian region, Ukraine. *The Journal of V.N.Karazin Kharkiv National University. Series «Biology»*, 43, 85-95. <https://doi.org/10.26565/2075-5457-2024-43-7>
2. Sydorovsky, S., **Shrestkha, M. (2024).** Fauna of Crustaceans of the Kharkiv Region, Ukraine. *Biosystems Diversity*, 32 (3), 314–323. <https://doi.org/10.15421/012434>
3. Solijonov, K., Utevsky, S., Izzatullaev, Z., Umarov, F. U., Fazliddinov, F., **Shrestkha, M., & Utevsky, A. (2024).** First record of *Hemiclepsis marginata* (O.F.Müller, 1773) (Hirudinida: Glossiphoniidae) from the Ferghana Valley, Uzbekistan. *Ecologica Montenegrina*, 75, 74–84. <https://doi.org/10.37828/em.2024.75.6>

Наукові праці, які засвідчують апробацію матеріалів дисертації:

1. **Shrestkha M., Utevsky, S. (2024).** Phylogenetic position and genetic diversity of *Branchiobdella kozarovi*, an ectosymbiont of the narrow-clawed crayfish. *Abstract book of 4th Central European Symposium of aquatic invertebrates, Stara Lesna, Slovakia, 7-12 July.*
2. Mariia Kolesnykova (**Shrestkha**) (2011). Host associations and biogeography of *Branchiobdella* spp. in the Western Balkans. *4th International Conference HIRUDINEA: biology, taxonomy, faunistics. 18-21 May, Wierzba, Poland.*
3. Kolesnykova (**Shrestkha**) M. Yu. (2009). A report on the distribution of *Branchiobdella astaci* (Annelida, Clitellata) in a lake from northern Kazakhstan. *IV All-Russian Congress of the Parasitological Society of the Russian Academy of sciences “Parasitology in the XXI Century – problems, methods, decisions”, St. Petersburg, 2, 49-51.*

4. Kolesnykova (**Shrestkha**) M. Yu. (2009). Localization of *Branchibdella kozarovi* on the *Astacus leptodactylus* host. Young Zoologist Scientists Conference. Zoology Shmalgauzen Institution, Ukrainian National Academy of Sciences, 8-9 April, Kyiv.

Наукові праці, які додатково відображають наукові результати дисертації:

1. **Kolesnykova (Shrestkha) M.**, Utevsky S. (2013). New Ukrainian records of *Branchiobdella parasita* (Annelida: Clitellata: Branchiobdellida) from the Danube basin. *Scientific annals of the Danube Delta Institute, Tulcea, Romania*, 19, 35-38. <http://doi.org/10.7427/DDI.19.05>
2. **Mariia Kolesnykova (Shrestkha)**, D.M. Soes and Serge Utevsky (2012). First record of *Branchiobdella kozarovi* (Clitellata: Branchiobdellida) for the Netherlands, with overview of the Dutch Branchiobdellida. *Lauterbornia*, 74, 101-103.
3. **Mariia Kolesnykova (Shrestkha)**, Andrei Utevsky and Serge Utevsky (2008). First record of *Branchiobdella kozarovi* (Clitellata: Branchiobdellida) from eastern Ukraine. *Lauterbornia*, 65, 77-81.

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.

ЗМІСТ

АНОТАЦІЯ	1
ABSTRACT	7
ВСТУП	12
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	18
1.1. Загальна характеристика бранхіобделід та їх симбіотичні відносини з річковими раками... 18	
1.1.1. Характер симбіотичних відносин.....	18
1.1.2. Еволюція ектосимбіотичних відносин бранхіобделід та річкових раків.....	19
1.2. Регіон дослідження.....	22
1.3. Рід <i>Branchiobdella</i> на території Західної Палеарктики.....	23
1.4. Проблематика досліджуваної групи бранхіобделід.....	24
1.5. Річкові раки - хазяї бранхіобделід.....	25
1.6. Еволюційне походження бранхіобделід та філогенія.....	33
1.6.1. Бранхіобделіди - проміжна форма між олігохетами та п'явками? Філогенетичне положення бранхіобделід.....	36
1.6.2. Мозаїчність морфологічних характеристик.....	38
1.6.3. Час переходу від олігохет до п'явок та бранхіобделід.....	40
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ	40
2.1. Походження матеріалу.....	40
2.2. Збір і збереження матеріалу.....	51
2.3. Методи вивчення ознак зовнішньої морфології.....	54
2.4. Методи вивчення анатомічних ознак.....	56
2.5. Дослідження локалізації бранхіобделід на річкових раках.....	57
2.6. Молекулярні методи аналізу.....	58
3. РЕЗУЛЬТАТИ. РІЗНОМАНІТТЯ	74
3.1. Таксономічна диференціація видів роду <i>Branchiobdella</i> за морфологічними та анатомічними ознаками.....	74
3.2. Фауна бранхіобделід Західної Палеарктики.....	83
3.3. Філогенетична структура бранхіобделід Західної Палеарктики.....	120
3.4. Делімітація видів роду <i>Branchiobdella</i>	128
3.5. Обговорення розділу. Таксономічна ревізія роду <i>Branchiobdella</i>	147
3.5.1. Еволюційні зв'язки, морфологічна мінливість та сучасний стан популяцій.....	147
3.5.2. Генетичне різноманіття та еволюція.....	156
4. РЕЗУЛЬТАТИ. СИМБІОТИЧНІ ВІДНОСИНИ	162
4.1. Життєвий цикл бранхіобделід.....	162
4.2. Локалізація на річкових раках.....	164
4.3. Взаємовідносини з інтродукованими видами річкових раків.....	173
4.4. Обговорення розділу. Специфічність до хазяїв, вплив бранхіобделід на стан популяцій річкових раків.....	179
ВИСНОВКИ	183
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ЛІТЕРАТУРНИХ ДЖЕРЕЛ	185
ДОДАТКИ	203

ВСТУП

Сучасний етап розвитку біологічної науки характеризується зростанням інтересу до дослідження симбіотичних взаємозв'язків, зокрема між прісноводними раками та бранхіобделідами. Ці організми, які є облігатними симбіонтами ракоподібних, відіграють важливу роль у функціонуванні прісноводних екосистем, а їхня систематика, географічне поширення та еволюція залишаються недостатньо вивченими. Тема дисертаційного дослідження **«Бранхіобделіди Західної Палеарктики (Annelida: Branchiobdellida): систематика, географічне поширення та еволюція»** є актуальною, оскільки спрямована на заповнення існуючих пробілів у знаннях про цю групу організмів, зокрема в регіоні Західної Палеарктики.

Обґрунтування вибору теми дослідження. Вибір теми дослідження обумовлений необхідністю комплексного вивчення бранхіобделід, які є важливим компонентом прісноводних екосистем. Незважаючи на те, що річкові раки є одним із ключових видів безхребетних тварин наших водойм, їхні ектосимбіонти залишаються недостатньо вивченими. Наша робота спрямована на дослідження групи ектосимбіонтів річкових раків – бранхіобделід (Clitellata: Branchiobdellida) Західної Палеарктики. Досі мало відомо про особливості їхнього способу життя, поширення, симбіотичних відносин, філогенетичні зв'язки. Тому метою наших досліджень є вивчення симбіотичних відносин між бранхіобделідами та річковими раками.

Зростання аквакультури у всьому світі призводить до поширення захворювань, які транспортуються разом з об'єктами аквакультури. Тому дослідження відносин бранхіобделід з їх хазяями річковими раками є ключовим для розуміння екологічних наслідків інтродукції екзотичних організмів у водні екосистеми та розробки карантинних заходів при ввезенні живих раків. Попередні дослідження (Füreder et al. 2009, Siddall et al. 2001, Lee et al. 2009, DeWitt et al. 2013, Brown and Creed 2004) виявили цікаві закономірності у взаємозв'язках між бранхіобделідами та річковими раками.

видами раків. Однак питання щодо можливості переселення аборигенних видів бранхіобделід на інтродуковані види раків залишаються недостатньо вивченими.

Об'єкт дослідження. Бранхіобделіди (Clitellata: Branchiobdellida) Західної Палеарктики, які є симбіонтами прісноводних річкових раків.

Предмет дослідження. Систематика, географічне поширення та еволюційні зв'язки бранхіобделід Західної Палеарктики, зокрема морфологічні особливості, таксономічний статус видів, їхня філогенетична позиція та симбіотичні взаємини з аборигенними та інтродукованими видами раків.

Мета і завдання. Метою дослідження є комплексне вивчення бранхіобделід Західної Палеарктики, зокрема їхньої систематики, географічного поширення та еволюційних зв'язків, а також дослідження можливості зараження інтродукованих видів раків аборигенними бранхіобделідами. Для досягнення цієї мети поставлено наступні завдання:

1. Вивчити морфологічні особливості бранхіобделід, зокрема структуру щелеп та сперматеки, для уточнення таксономічного статусу видів.
2. Дослідити географічне поширення бранхіобделід у Західній Палеарктиці, зокрема в регіонах Західних Балкан, України та прилеглих до неї територій.
3. Провести філогенетичний аналіз для визначення еволюційних зв'язків між видами бранхіобделід Західної Палеарктики, виявити їх філогенетичну структуру.
4. З'ясувати статус підвиду *Branchiobdella balcanica sketi*, дослідивши його в типовій локації в Західних Балканах.
5. Дослідити особливості локалізації досліджуваних видів бранхіобделід та їх коконів на річкових раках.
6. Дослідити особливості життєвого циклу *Branchiobdella kozarovi* на річковому раку *Astacus leptodactylus*.
7. З'ясувати можливість зараження інтродукованих видів раків видом *Branchiobdella kozarovi*.

Методи дослідження. У дослідженні використано комплекс методів, включаючи 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 результаті молекулярно-генетичного аналізу нами вперше отримано послідовності чотирьох генетичних маркерів бранхіобделід (CO1, 16S, 28S та ITS) для всіх досліджуваних видів, тоді як у GenBank наявні лише послідовності CO1. Проведено значну роботу з модифікації протоколів ампліфікації, що дозволило отримати послідовності і для виду п'явки *Hemiclepsis marginata*, яка використовувалася як зовнішня група при побудові мультилокусного філогенетичного дерева з вищою підтримкою. Крім того, вперше отримано та розміщено в GenBank послідовності для виду *Branchiobdella kozarovi*.

Наукова новизна отриманих результатів:

1. Описано новий для науки вид *Branchiobdella* sp.n.
2. Розширено уявлення про межі ареалів виду *Branchiobdella hexadonta* та *Branchiobdella parasita*.
3. Уточнено таксономічний статус підвиду *Branchiobdella balcanica sketi*, що дозволило поставити під сумнів його валідність.
4. Виявлено декілька гаплогруп *Branchiobdella kozarovi*, що відображає еволюційну історію річкового рака - хазяїна *Astacus leptodactylus*.
5. Отримано нові дані щодо морфологічних особливостей та генетичної варіації виду *Branchiobdella parasita*, а також його географічного поширення в Україні.
6. Вперше отримано послідовності чотирьох генів для всіх досліджуваних видів бранхіобделід, що значно розширило можливості філогенетичного аналізу. Вперше отримано та розміщено в GenBank послідовності для *Branchiobdella kozarovi*.
7. Проведено модифікацію протоколів ампліфікації для отримання послідовностей зовнішньої групи (*Hemiclepsis marginata*), що дозволило побудувати мультилокусне філогенетичне дерево з високою підтримкою.

8. Продемонстровано філогенетичні зв'язки між видами бранхіобделід Західної Палеарктики.
9. Досліджено особливості локалізації видів бранхіобделід на річкових раках.
10. Досліджено особливості локалізації *Branchiobdella kozarovi* на річковому раку *Astacus leptodactylus* та інтродукованих видах раків, що дозволило з'ясувати можливість їхнього зараження.

Особистий внесок здобувача. Дисертаційна робота є результатом самостійного наукового дослідження автора. Здобувачем проведено комплексний аналіз наукової літератури з теми дослідження, організовано та виконано польові дослідження, здійснено збір і аналіз зразків бранхіобделід. Автор особисто провів морфологічний та молекулярно-генетичний аналіз отриманих даних, а також їх інтерпретацію. Самостійно виконано філогенетичний аналіз, розроблено та вдосконалено протоколи ампліфікації генетичних маркерів. На основі отриманих результатів підготовлено наукові публікації, які відображають ключові аспекти дослідження.

Публікації. Основні результати дослідження опубліковані в трьох наукових статтях. Одна з них опублікована в закордонному виданні, яке індексується в базах даних Web of Science або Scopus та належить до другого квартилю (Q2). Дві інші статті опубліковані у наукових виданнях, включених до переліку фахових видань України (категорії А та Б). Крім того, до теми дисертації належать три додаткові статті, які були підготовлені здобувачем до вступу в аспірантуру. Ці роботи присвячені вивченню бранхіобделід України та є важливим науковим доробком автора.

Апробація матеріалів дисертації. Результати дослідження представлено на міжнародних конференціях та симпозіумах, зокрема на *4th International Conference HIRUDINEA: biology, taxonomy, faunistics (18-21 May, 2011, Wierzba, Poland)*, *Young Zoologist Scientists Conference, Zoology Shmalgauzen Institution, Ukrainian National Academy of Sciences (8-9 April, Kyiv, 2009)* та на *4th Central European Symposium of*

Aquatic Invertebrates (Stara Lesna, Slovakia, 7-12 July 2024), де вони отримали схвальні відгуки.

Структура та обсяг дисертації. Дисертаційна робота складається з вступу, чотирьох основних розділів, висновків, списку використаних джерел та 9 додатків. Загальний обсяг роботи становить 242 сторінки, включаючи 19 таблиць, 57 рисунків та 170 джерел літератури.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами, грантами. Дисертаційне дослідження виконано в рамках наукових програм, спрямованих на вивчення біорізноманіття прісноводних екосистем Західної Палеарктики. Робота підтримувалася декількома грантами в період з 2009 - 2012 “Taxonomic status and ecology of key invertebrate species in continental waters of Europe/Ministry of Education and Science of Ukraine, Ministry of Education and Science of Slovenia”, а з 2023 року грантом “Establishment of a molecular laboratory for the study of biodiversity/Science and Technology Center in Ukraine (STCU) and Academic Sanctuaries Fund”. Це дозволило провести масштабні польові дослідження, молекулярно-генетичний аналіз та опублікувати результати у провідних наукових виданнях.

Практичне значення отриманих результатів. Дисертаційна робота спрямована на вирішення актуальних питань систематики, географічного поширення та еволюції бранхіобделід Західної Палеарктики, що робить її значущою для подальшого розвитку науки. Отримані результати мають важливе практичне значення для розуміння екологічних наслідків інтродукції екзотичних видів раків у водні екосистеми. Вони можуть бути використані для розробки заходів біобезпеки та карантинного контролю при ввезенні живих раків, що є особливо актуальним у контексті розвитку аквакультури. Крім того, результати дослідження можуть бути застосовані для розробки стратегій збереження аборигенних видів раків, які знаходяться під загрозою через інтродукцію чужорідних видів.

Подяки. Автор висловлює щирі подяки своєму науковому керівнику Сергію Утевському за вибір теми дослідження, цінні поради та незмінну підтримку на всіх

етапах роботи. Особлива подяка Андрію Утевському за великий внесок у розвиток моїх навичок роботи гістологічними та мікроскопічними методами, допомогу у зборі матеріалу річкових раків та цінні ідеї під час обговорення результатів дослідження. Щиро дякую колегам з Люблянського Університету (Словенія) за допомогу у проведенні молекулярних досліджень та набутті навичок роботи з різними програмами: Майї Загмайстер, Ані Кос, Тео Деклічу, Айді Мокріц та Валерії Закшек. Окрема подяка Петеру Тронтелю, який супроводжував моє дослідження всіма необхідними порадами та матеріалами під час мого перебування в Словенії. Висловлюю вдячність проф. Стюарту Гелдеру та Мітко Субчеву за цінні поради на початковому етапі моїх досліджень. Також дякую Олені Бошко за переданий досвід у розтинанні бранхіобделід. Щира подяка всім моїм колегам з кафедри зоології за підтримку та сприятливу атмосферу для наукової роботи. Особлива вдячність Аллі Громаковій, Тетяні Атемасовій, Ніні Полчаниновій за їх підтримку. Я вдячна всім колегам та друзям, які допомагали у вилові річкових раків: Андрію Колишкіну, Марині Кравченко, Геннадію Шандикову, Данілу Острасю, Анатолію Колеснику, Сергію Сидорівському та багатьом іншим. Моя щира подяка моїм друзям: Марині Володимирській, Андрію Хоменко, Леону Кебе, Михайлу Горпинченко та Михайлу Сону за їхню готовність їхати в чергову експедицію та за всебічну підтримку протягом усього часу дослідження. Нарешті, моя найщиріша подяка моїй родині – моїй мамі, чоловіку та дітям, які з розумінням поставилися до моєї роботи та створювали умови для її успішного здійснення. Без їхньої підтримки ця робота була б неможливою.

РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Загальна характеристика бранхіобделід та їх симбіотичні відносини з річковими раками

1.1.1. Характер симбіотичних відносин

Поняття "симбіоз" (від грецьких слів σύν "разом" і βίωσις "життя") у біологічному значенні вперше запровадив Генріх Антон де Барі у своїй праці "Erscheinung der Symbiose". Він описав симбіоз як "явище спільного існування різних організмів", не обмежуючи його впливом лише на одного з учасників взаємодії (де Барі, 1879). Хоча пізніше з'явилися більш вузькі трактування цього терміна (див. Saffo, 1992), визначення де Барі залишається найбільш універсальним, оскільки охоплює всі можливі типи взаємин — від нейтральних до шкідливих.

Взаємовідносини між бранхіобделідами та річковими раками є прикладом ектосимбіозу, який може варіюватися від ектокоменсалізму до ектопаразитизму залежно від різних екологічних факторів. Ці відносини у переважній більшості видів характеризуються як мутуалістичні, де бранхіобделіди отримують вигоду від раків як середовища проживання та джерела поживних речовин, тоді як раки отримують переваги, такі як очищення поверхні тіла та зменшення забруднення їхніх зябер (Creed et al., 2023; Brown et al., 2002; Farrell et al., 2013). Деякі види бранхіобделід харчуються у зябрах раків, очищають їх і таким чином позитивно впливають на життєдіяльність рака. (Farrell et al., 2013; Niwa et al., 2014; Thomas et al., 2016; Olden et al., 2009). Облігатний симбіоз між річковим раком і бранхіобделідами, ймовірно, пов'язаний із розмноженням, оскільки для успішного ембріонального розвитку кокони або яйця мають бути відкладені на живому хазяїні (Young 1966, 1971). Ця залежність пов'язує еволюційну історію як симбіонтів, так і їх хазяїв.

Дослідження вказують на те, що чисельність бранхіобделід на раках може відображати стан здоров'я та екологічний статус популяцій раків. Наприклад, раки, які мають більшу кількість бранхіобделід, часто демонструють покращений ріст та нижчу смертність порівняно з тими, у кого менше або взагалі немає симбіонтів

(Farrell et al., 2013; Creed et al., 2020). Це свідчить про те, що помірні кількості бранхіобделід є корисною, потенційно вказуючи на здорове середовище для хазяїна. Однак, якщо щільність бранхіобделід стає надто високою, це може призвести до негативних наслідків для раків, таких як збільшення конкуренції між симбіонтами або пошкодження тканин хазяїна (Landler et al., 2019; Skelton et al., 2016; Johnson et al., 2014). Таким чином, відносини можуть зміщуватися від мутуалізму до паразитизму за умов високої щільності симбіонтів або стресу у хазяїна.

Екологічний контекст також відіграє вирішальну роль у визначенні характеру взаємин між річковими раками та бранхіобделідами. Такі фактори, як якість води, наявність забруднювачів та загальний стан здоров'я водного екосистеми, можуть впливати як на чисельність бранхіобделід, так і на стан їхніх хазяїв — річкових раків (Lee et al., 2009; Skelton et al., 2013). Наприклад, у середовищах з високим рівнем забруднення очищувальна функція бранхіобделід стає більш важливою, потенційно посилюючи мутуалістичні аспекти взаємин (Lee et al., 2009). Навпаки, у менш забруднених середовищах відносини можуть наближатися до коменсалізму, де бранхіобделіди отримують вигоду від раків, не впливаючи суттєво на їхнє здоров'я (Young, 1966).

1.1.2. Еволюція ектосимбіотичних відносин бранхіобделід та річкових раків

Палеоекологічні дані дозволяють припустити, що предкові форми бранхіобделід пройшли шлях від харчування детритом до утворення симбіотичних зв'язків. Як демонструють молекулярно-генетичні дослідження (Chen et al., 2007), ця трансформація була обумовлена не лише отриманням харчових переваг, а й здатністю уникати хижацтва шляхом формування асоціацій з ракоподібними.

Сучасні представники Branchiobdellida, подібно до інших клітеллят, мають походження від вільноживучих організмів, що населяли донні відкладення. Поступово, у процесі освоєння нових екологічних ніш, вони розвинули здатність до коменсалізму з прісноводними раками, використовуючи останніх як субстрат для існування. Така зміна екологічної стратегії, ймовірно, забезпечила їм, по-перше, покращений захист від ворожих видів, по-друге, стабільний доступ до харчових

ресурсів, а також оптимізацію репродуктивних процесів (Chen et al., 2007; Chatterjee & Yadav, 2019)

Проте останні філогенетичні дослідження (Phillips et al., 2019) вказують на більш складний характер еволюції цієї групи (Рис. 1.1). Виявлення перехідних форм ставить під сумнів традиційні уявлення про чітку дихотомію між вільноживучими та симбіотичними стратегіями у анелід. Це відображає загальну тенденцію в сучасній еволюційній біології, де застосування геномних методів часто призводить до перегляду усталених парадигм.

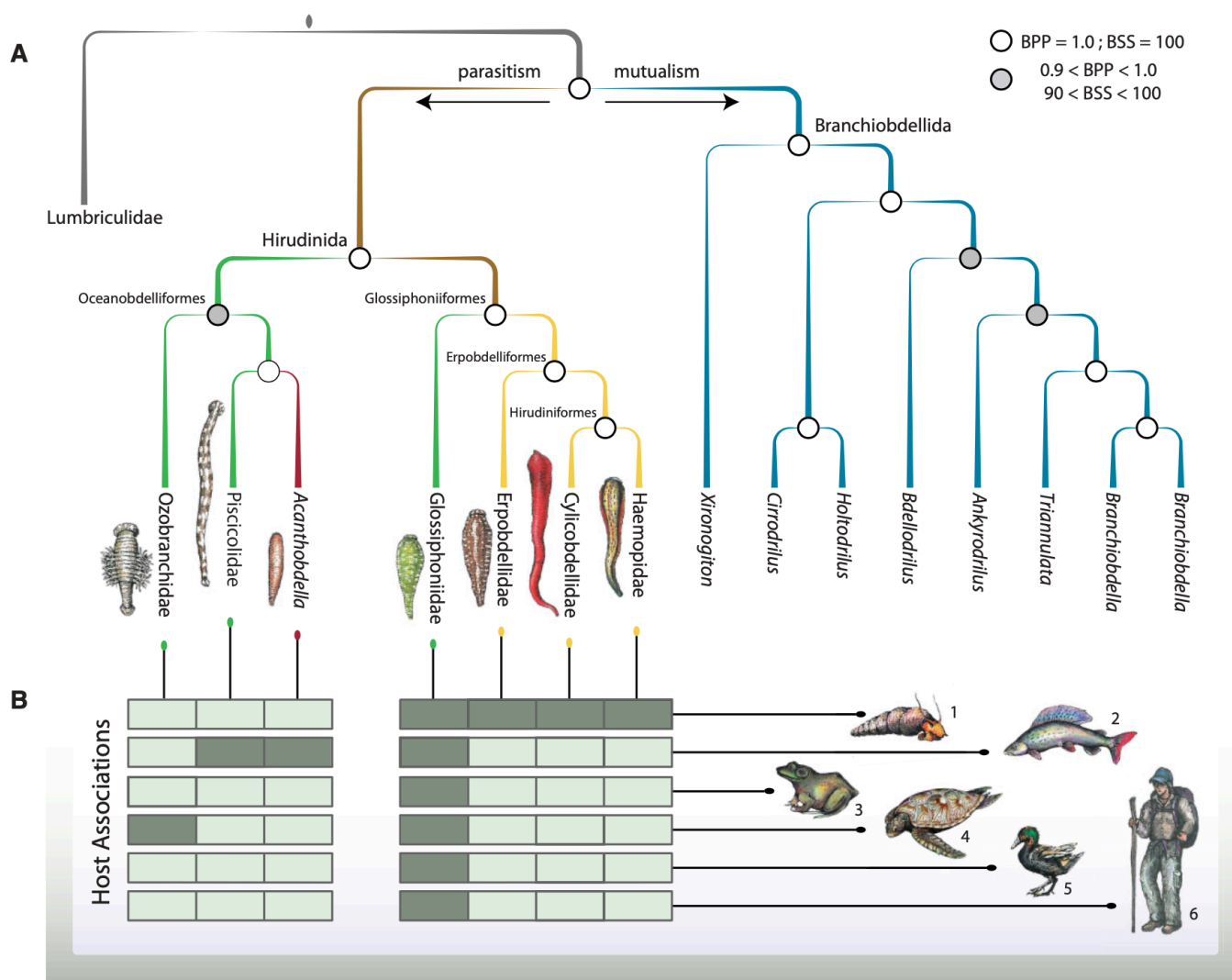


Рисунок 1.1. Філогенетичні зв'язки основних ліній п'явок та бранхіобделід і їх асоціації з господарями (Anna J Phillips et al., 2019): (A) Еволюційні зв'язки,

побудовані на основі Баєсового висновування та методів Максимальної правдоподібності аналізу послідовностей ДНК. Значення підтримки клад вказані кружками у вузлах (Баєсова апостеріорна ймовірність = BPP; підтримка бутстрепом = BSS). Гілки позначені кольорами, що відповідають історично прийнятим вищим таксонам: коричневий = Hirudinida, зелений = Rhynchobdellida (нині Oceanobdelliformes та Glossiphoniiformes), жовтий = Arhynchobdellida (у цьому дослідженні представлені членами, які нині належать до Eprobodelliformes та Hirudiniformes), червоний = Acanthobdellida, синій = Branchiobdellida. (Б) Матриця вказує на асоціації п'явок (стовпці відповідають філогенії) із узагальненими господарями (рядки) для кожної представницької родини, зображеної графічно як: 1) безхребетні, 2) риби (морські, солонуваті та прісноводні), 3) амфібії та рептилії, за винятком черепах, 4) черепахи (морські та прісноводні), 5) птахи, 6) ссавці. Темні зафарбовані клітини в матриці вказують на зв'язок п'явки з господарем. Лінії, що йдуть вгору від матриці, пов'язують матрицю в (А) з точками, позначеними кольорами відповідно до гілок, а горизонтальні лінії відповідають узагальненим господарям.

Еволюційні адаптації Branchiobdellida до симбіотичного способу життя дозволили їм ефективно використовувати річкових раків як господарів. Зміни в харчовій поведінці дозволяють їм житися органічними залишками або епібіонтами на господарі (Chen et al., 2007; Chatterjee & Yadav, 2019). На відміну від них, Acanthobdellida та Hirudinida демонструють більш виражені адаптації до паразитизму та репродуктивні стратегії, що забезпечують їхню ефективність як ектопаразитів (Cichocka et al., 2021; Santourlidis, 2024). Це розрізнення підкреслює адаптивну радіацію, що відбулася в межах Clitellata, і демонструє, як різні екологічні умови могли сприяти формуванню різних стратегій виживання (Marotta et al., 2008; Cichocka et al., 2021).

1.2. Регіон дослідження

Палеарктика охоплює величезну територію, що включає Європу, Азію до Тихого океану, а також частини Північної Африки. Розмежування на Західну та

Східну Палеарктику зазвичай базується на таких критеріях, як видове різноманіття, екологічні умови та вплив людини. По-перше, Західна Палеарктика характеризується більшою різноманітністю видів, зокрема річкових раків, які є важливими компонентами екосистем. По-друге, екологічні умови також відіграють важливу роль у розмежуванні цих регіонів. Західна Палеарктика має більш м'який клімат і різноманітні водні середовища, що сприяє розвитку багатих біотопів для річкових раків (Kouba et al., 2014; Meira et al., 2019). Східна Палеарктика, навпаки, має суворіші кліматичні умови, що обмежує видове різноманіття, але водночас сприяє адаптації деяких видів до екстремальних умов (Machida & Akiyama, 2013; Veselý et al., 2015). Крім того, антропогенний вплив на екосистеми також відрізняється між цими регіонами. У Західній Палеарктиці спостерігається активна експлуатація водних ресурсів, що призводить до зменшення чисельності корінних видів через забруднення та конкуренцію з інвазивними видами, такими як *Procambarus clarkii* (Putra et al., 2018; Jussila et al., 2021). У Східній Палеарктиці, хоча й існують подібні проблеми, вони часто пов'язані з меншою інтенсивністю антропогенного впливу, що дозволяє деяким аборигенним видам зберігати свої популяції (Machida & Akiyama, 2013; Veselý et al., 2015).

1.3. Рід *Branchiobdella* на території Західної Палеарктики

Всього у світі існує понад 150 описаних видів бранхіобделід. Вони належать до 16 Неарктичних родів (Північно-Американських), 6 Палеарктичних (5 Азійських родів та 1 європейський рід). Більше різноманіття можна спостерігати у Північній Америці та Азії. Усі північноамериканські види бранхіобделід є ендеміками територій (Crandall and Buhay 2008).

У Палеарктиці бранхіобделіди мають розірваний ареал (Рис. 1.2). Так, рід *Branchiobdella* поширений у Західній Палеарктиці від південної Скандинавії, Англії та Франції на заході до північних районів Східної Азії (Fard and Gelder 2011, Subchev 2014). А також в Ірані, Казахстані, Росії. Інші п'ять палеарктичних родів обмежені Східною Азією (Gelder and Ohtaka 2002, Ohtaka 2007, Ohtaka & Chen 2010, Timm 1991). Наприклад, роди *Cirrodrilus* та *Sinodrillus* зустрічаються разом із

Branchiobdella у північно-східному Китаї, південно-західній Росії та на Корейському півострові. Деякі види *Cirrodrilus* зустрічаються лише в Японії, а *Hidetodrilus* обмежений Корейським півостровом.

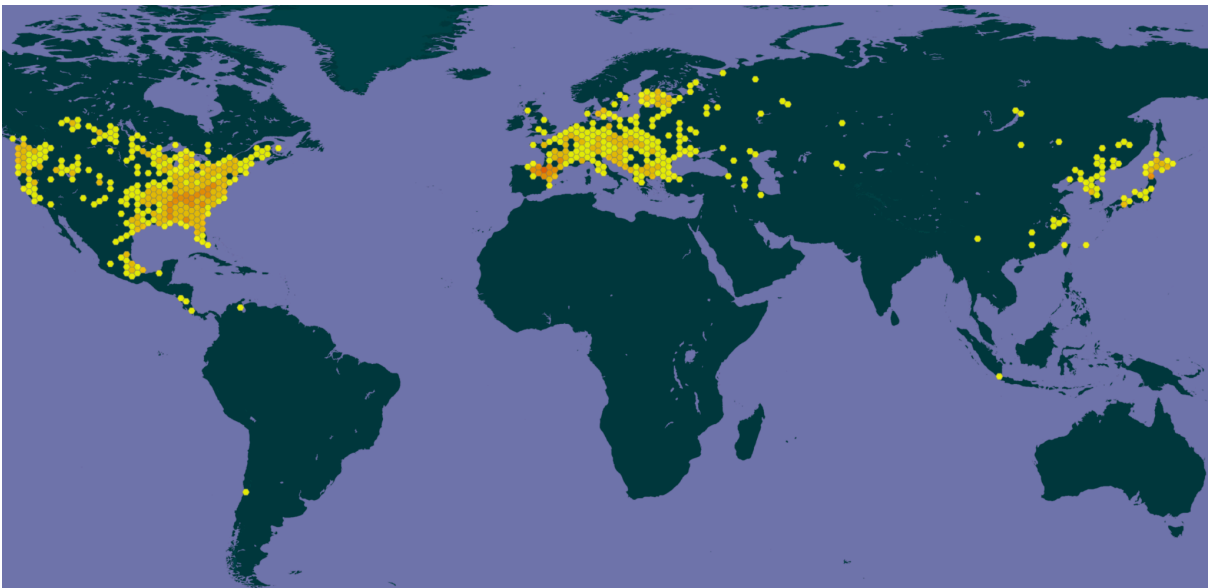


Рисунок 1.2. Розповсюдження бранхіобделід. <https://www.gbif.org/species/471>

1.4. Проблематика досліджуваної групи бранхіобделід

Дослідження бранхіобделід часто мають фрагментарний характер і базуються на аналізі музейних колекцій (Subchev, 2009, 2012) або обмежуються локальними зборами (наприклад, Brown and Creed, 2004; Scalici et al., 2010; Rosewarne et al., 2012). Лише невелика кількість робіт охоплює ширші географічні масштаби (Karaman, 1967; Gelder et al., 2001; Füreder et al., 2009; Williams et al., 2009). Як наслідок, розподіл видів, межі їх ареалів, а також симбіонтні взаємини залишаються значною мірою невивченими для багатьох представників бранхіобделід.

У нашій роботі ми організували відбір матеріалу таким чином, щоб виявити симбіонтні взаємини серед європейських бранхіобделід, а також заповнити

прогалини у знаннях щодо їх різноманіття та поширення. Бранхіобделіди використовують річкового рака як хазяїна, який є популярним промисловим об'єктом і часто використовується для інтродукції в нові водойми. Це створює ризик випадкового транспортування бранхіобделід разом із раками, що може призводити до нових взаємодій між аборигенною (місцевою) та інтродукованою (інвазивною) фауною. Тому важливо враховувати вплив торгівлі та переміщення річкових раків на поширення цих симбіонтів та їх потенційні екологічні наслідки.

Розповсюдження бранхіобделід у Західній Палеарктиці. Види бранхіобделід поширені переважно в Європі, але є значні прогалини у знаннях щодо їх присутності в деяких країнах Палеарктики. Наприклад, у Румунії бранхіобделіди, асоційовані з місцевими раками, залишаються недостатньо вивченими.

Таксономічна історія родини Branchiobdellidae. Історично бранхіобделіди класифікувалися як п'явки, але згодом їх виокремили в окрему групу. Проте їх таксономічний статус залишається дискусійним через недостатню кількість досліджень.

Таксономічна історія європейських видів роду Branchiobdella. Види цього роду мають складну історію опису та класифікації, що призводить до плутанини в їх визначенні. Наприклад, види *B. italica* та *B. pentodonta* часто плутають через схожість морфологічних ознак, а вид *B. parasita* містить комплекс видів. Вид *Branchiobdella kosarovi* був описаний пізніше, і його морфологічні відмінності від *pentodonta* залишаються недостатньо чіткими, що потребує додаткових досліджень. Підвид *Branchiobdella balcanica sketi* має невизначений таксономічний статус, оскільки його морфологічні ознаки недостатньо досліджені для чіткого відокремлення від інших видів. Деякі види бранхіобделід утворюють комплекси, де морфологічні відмінності між видами мінімальні, що ускладнює їх ідентифікацію та вивчення. Бранхіобделіди, асоційовані з нещодавно описаним річковим раком *Au. bihariensis*, залишаються недослідженими, що обмежує розуміння їх ролі в екосистемах та взаємодій із хазяїнами.

1.5. Річкові раки - хазяї бранхіобделід

В результаті таксономічних переглядів за останні 60 років (підсумовано у Crandall and De Grave, 2017) та недавніх молекулярних аналізів (Blaha et al., 2023), сім видів прісноводних раків були ідентифіковані як аборигенні для європейського континенту (Табл. 1.1): *Astacus astacus* (Linnaeus, 1758), *Astacus colchicus* Kessler, 1876, *Pontastacus pachypus* (Rathke, 1837), *Astacus (Pontastacus) leptodactylus* (Eschscholtz, 1823), *Austropotamobius fulcisanus* (Ninni, 1886), *Austropotamobius torrentium* (Schrank, 1803), *Austropotamobius pallipes* (Lereboullet, 1858), а також додатковий ендемічний вид *Austropotamobius bihariensis* Pârvulescu, 2019, який має вузький ареал поширення в Румунії (Pârvulescu, 2019).

Таблиця 1.1. Аборигенні та інвазивні види раків на території Західної Палеарктики

аборигенні	інвазивні
<i>Astacus astacus</i> (Linnaeus, 1758)	<i>Cherax destructor</i> (Clark, 1936)
<i>Astacus leptodactylus</i> (Eschscholtz, 1823)	<i>Orconectes limosus</i> (Rafinesque, 1817)
<i>Astacus pachypus</i> (Rathke, 1837)	<i>Orconectes immunis</i> (Hagen, 1870)
<i>Austropotamobius pallipes</i> (Lereboullet, 1858)	<i>Pacifastacus leniusculus</i> (Dana, 1852)
<i>Austropotamobius torrentium</i> (Schrank, 1803)	<i>Procambarus clarkii</i> (Girard, 1852)
<i>Austropotamobius italicus</i> (Faxon, 1914)	

Рід *Astacus*

Рід *Astacus* широко поширений по всій Європі. Класифікація європейських раків зазнавала кількох переглядів. Наприклад, Starabogatov (1995) виділив загалом п'ять родів і 19 видів для азійських та східноєвропейських регіонів. У відповідності до досліджень Tejlor (2002), рід *Astacus* включає три види: благородний рак *Astacus astacus*, вузькопалий рак *Astacus leptodactylus* та товстопалий рак *Astacus pachypus*. Зокрема, у випадку понто-каспійських видів досі не досягнуто загальноприйнятої таксономії (Vlaha et al., 2023).

Благородний рак, Astacus astacus. Поширення.

Astacus astacus широко поширений по всій Європі (Рис. 1.3,Г). Його ареал простягається від Росії та України на сході до Скандинавії на півночі, Греції на півдні та Великобританії та Франції на заході (Edsman et al. 2010, Kouba et al. 2014). На основі морфологічних критеріїв у літературі можна знайти різні, частково суперечливі класифікації підвидів благородного рака (див. огляд у Smietana et al. 2006). Karaman (1963) описав три підвиди з чітким географічним розподілом: (1) *A. a. colchicus* є ендеміком ізольованого регіону в понто-каспійській області верхнього Ріону (Кавказ). (2) *A. a. balcanicus* мешкає на Західних Балканах у басейні річки Вардар у Македонії та Греції, а також у озері Охрид. (3) *A. a. astacus* населяє річку Дунай та її притоки, а також річки, що впадають у Північне та Балтійське моря.

Фрагментованість прісноводних середовищ, де мешкає *A. astacus*, а саме річки, озера з чистою водою та сховищами (див. огляд у Füreder et al. 2006), разом із низькою міграційною здатністю, ускладнюють відновлення вимерлих локальних популяцій (Strayer & Dudgeon 2010). До екологічних загроз (забруднення води, каналізація річок) додається ооміцет *Aphanomyces astaci*, який значно скоротив популяції *A. astacus* (Holdich et al. 2014). Цей патоген був завезений до Європи через американських раків (наприклад, *Orconectes limosus*) у середині XIX століття

(Alderman et al. 1990) і спричинив масове вимирання місцевих популяцій раків (Alderman 1996).

Благородний рак, Astacus astacus. Еволюційна історія.

Благородний рак, *Astacus astacus*, має складну еволюційну історію, яка характеризується значною різноманітністю гаплотипів та широким географічним поширенням по всій Європі. Ця різноманітність значною мірою є результатом історичних кліматичних подій, зокрема під час плейстоцену, які сформували генетичну структуру та розподіл виду (Gross et al., 2021; Schrimpf et al., 2013). Під час останнього льодовикового максимуму *A. astacus*, ймовірно, вижив у кількох рефугіумах, включаючи Балканський півострів, який став ключовою територією для післяльодовикового повторного заселення та розширення на північ і захід уздовж системи річки Дунай (Schrimpf et al., 2013; Gross et al., 2021). Наприклад, дослідження показують, що популяції на Балканах мають чіткі генетичні лінії, які можна простежити до тривалої ізоляції цих популяцій під час холодних періодів, коли більша частина Центральної та Північної Європи була непридатною для життя річкових раків (Laggis et al., 2017; Lovrenčić et al., 2022). Генетична різноманітність, яка спостерігається в популяціях *A. astacus*, наприклад, частота гаплотипів 0,6857 для 16S та 0,985 для COI, підкреслює широкий ареал виду та еволюційний тиск, який він зазнав (Laggis et al., 2017).

Антропогенний вплив на популяції *A. astacus* також є значним. Діяльність людини, включаючи зміну середовища проживання та інтродукцію інвазивних видів, суттєво вплинула на генетичну структуру та розподіл *A. astacus* (Lovrenčić et al., 2022; Schulz et al., 2005). Наприклад, транслокації та реінтродукції призвели до збільшення обміну гаплотипами між географічно віддаленими популяціями, що послабило філогеографічну структуру, яка інакше була б очевидною (Lovrenčić et al., 2022). Крім того, інтродукція таких видів, як *Pacifastacus leniusculus*, загострила конкуренцію та сприяла скороченню місцевих популяцій (Westman et al., 2002; Makkonen et al., 2015).

Вузькопалий рак *Astacus leptodactylus*.

Поширення. Вузькопалий рак (*Astacus leptodactylus*) представляє собою класичний приклад понто-каспійського виду з характерним природним ареалом, що охоплює басейни Каспійського моря (зокрема річки Волга) та західного Сибіру (річка Об), як вперше описав Karaman у 1963 році. Протягом минулого століття цей вид зазнав значної антропогенної експансії, будучи масово інтродукованим у водойми Європи з метою компенсації втрат популяцій місцевих видів раків, зокрема благородного рака (Machino and Holdich 2005).

Сучасний статус *A. leptodactylus* відображає його подвійну роль у європейських екосистемах. З одного боку, він став важливим об'єктом ракового господарства, особливо в Туреччині та Ірані, де складає основу експортних поставок (Bláha, 2023). З іншого боку, його інтродуковані популяції в Західній Європі викликають певні екологічні побоювання, незважаючи на те, що в східній частині свого ареалу вид залишається автохтонним і екологічно стабільним (Gherardi and Souty-Grosset 2010).

Еволюційна історія. Філогенетичні дослідження останніх років (Kokko et al., 2012; Bláha et al., 2023) виявили надзвичайну генетичну різноманітність у популяціях *A. leptodactylus*, що вказує на його складну еволюційну динаміку. Особливий інтерес становлять популяції басейну Чорного моря, де спостерігається максимальне генетичне різноманіття, що, ймовірно, пов'язано з історичною присутністю численних рефугіумів під час кліматичних коливань плейстоцену (Maguire et al., 2018). Результати останніх молекулярно-генетичних досліджень (Bláha et al., 2023) підтверджують гіпотезу про те, що *A. leptodactylus* може представляти собою не єдиний вид, а комплекс криптичних видів або підвидів, кожен з яких пройшов унікальний шлях адаптації до місцевих умов. Це особливо помітно при порівнянні популяцій з різних частин ареалу, де спостерігаються значні відмінності у морфологічних ознаках та екологічних перевагах.

Найсерйознішою сучасною загрозою для *A. leptodactylus* є інвазія сигнального рака (*Pacifastacus leniusculus*), який не лише витісняє місцеві популяції, як це

сталось у річці Корана в Хорватії (Maguire et al., 2018), але й є переносником небезпечних захворювань, зокрема рачої чуми.

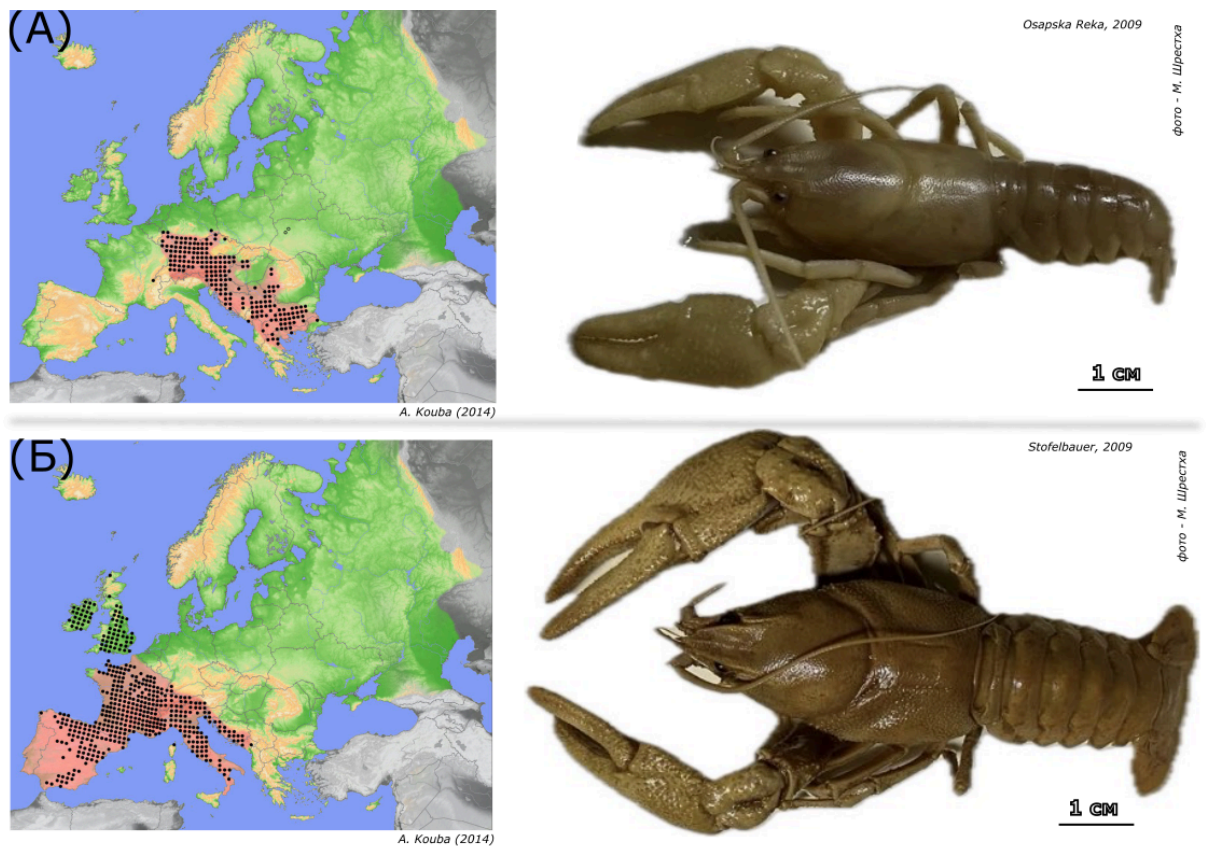


Рисунок 1.3. Розповсюдження (А) кам'яного раку *Austropotamobius torrentium*, (Б) білопалого раку *Austropotamobius pallipes sensu latum*. Природній ареал виділено червоним (карти - по А. Kouba, 2014; фото раків - М. Шрестха)

Таксономічні питання

Таксономія довгопалого раку неодноразово переглядалася, але наразі залишається невирішеною. У випадку *A. leptodactylus* виділяють один вид із кількома підвидами (Karaman 1963, Albrecht 1983, Taylor 2002) або навіть до дев'яти видів (Starobogatov 1995). Висока морфологічна пластичність та широкий ареал *A. leptodactylus* ускладнюють таксономію цього виду (Smietana et al. 2006) і вимагають проведення додаткових генетичних аналізів.

Austropotamobius torrentium.

Поширення. Кам'яний рак (*Austropotamobius torrentium*) є широко поширеним видом у центральній та південно-східній Європі, з ареалом, що простягається від Болгарії на сході до Люксембургу та Франції на заході, і від Німеччини та Чеської Республіки на півночі до Греції та Туреччини на півдні (Holdich, 2002; Kouba et al., 2014; Ion et al., 2024). Цей вид переважно мешкає в чистих, добре насичених киснем гірських струмках і річках з кам'янистим субстратом, де знаходить оптимальні умови для існування (Chucholl & Schrimpf, 2015; Lovrenčić et al., 2020). Проте в останні десятиліття популяції *A. torrentium* стикаються з серйозними загрозами, включаючи деградацію середовища існування, забруднення водою та конкуренцію з інтродукованими видами, особливо з сигнальним раком (*Pacifastacus leniusculus*), що призводить до значного скорочення чисельності популяцій (Chucholl & Schrimpf, 2015; Lovrenčić et al., 2020).

Еволюційна історія. Еволюційна історія *A. torrentium* тісно пов'язана з кліматичними змінами плейстоцену. Вид, ймовірно, пережив льодовикові періоди в кількох рефугіумах, розташованих переважно в південних регіонах Європи, включаючи Балкани та частини Паннонського басейну (Pârvulescu et al., 2011, 2019). Після відступу Паратетису та формування сучасних річкових систем, зокрема Дунаю приблизно 4,36 мільйонів років тому (de Leeuw et al., 2018), популяції з південних рефугіумів почали заселяти басейн Дунаю, що призвело до виникнення характерної гаплогрупи в Центральній та Південно-Східній Європі (Pârvulescu et al., 2019). Одночасно інша гаплогрупа залишилася ізольованою в карстових районах, що свідчить про ранні спроби колонізації з боку балканських популяцій. Тектонічні процеси, такі як підняття гірських масивів та ерозія, які відбувалися протягом цього періоду, створили різноманітні середовища, включаючи численні струмки та річки, що стали ідеальними місцями проживання для *A. torrentium* (Lindhorst et al., 2014).

Сучасний генетичний розподіл *A. torrentium* відображає цю складну історичну динаміку, демонструючи чітку географічну структуру популяцій. Вид продовжує грати важливу роль як індикатор стану гірських прісноводних екосистем, а його збереження вимагає комплексних заходів, спрямованих на захист природних середовищ існування, контроль інвазивних видів та моніторинг генетичного

різноманіття популяцій. Особливу увагу слід приділяти карстовим водоймам, які є унікальними рефугіумами для цього виду.

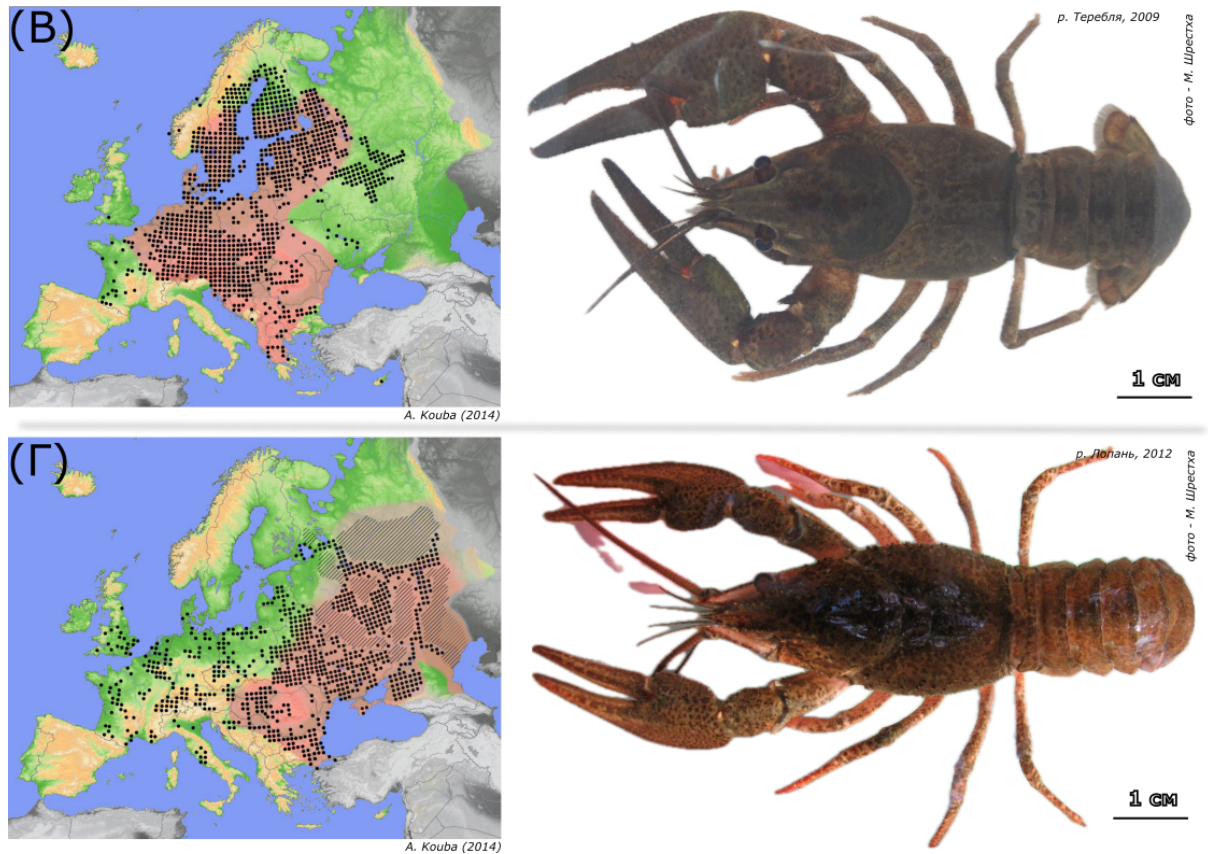


Рисунок 1.4. Розповсюдження (B) *Astacus leptodactylus sensu lato* (вужькопалого рака) та (Г) *Astacus astacus* (благородного рака) (карти - за A. Kouba, 2014; фото - М. Шрестха)

***Austropotamobius pallipes*. Поширення**

Поширення *A. pallipes* обмежене озерами та річками, що належать до басейну Адріатичного моря (від північного заходу до південного сходу Хорватії). Сьогодні *A. pallipes* зустрічається переважно в чистих, добре насичених киснем струмках і річках Європи (Holdich et al. 2009, Füreder et al. 2010). Його розповсюдження часто обмежується середовищами на більших висотах з кам'янистим субстратом, які є необхідними для його виживання (Maguire & Gottstein-Matočec, 2004; Schrimpf et al., 2013). Популяції *A. pallipes* у Хорватії є ізольованими в басейні Адріатичного моря,

тому природне поширення цього виду є майже неможливим (Рис. 1.3, Б). Нещодавно була виявлена ймовірно інтродукована популяція на Сардинії (Amouret et al. 2015). Раніше вважалося, що західною межею ареалу виду є Португалія (хоча зараз він, ймовірно, вимер там), але тепер відомо, що він зустрічається на північному заході Іспанії. Східною межею є Чорногорія, тоді як Іспанія та Шотландія є південною та північною межами відповідно. Його розповсюдження обмежене в Австрії, Корсиці, Німеччині, Ліхтенштейні та Чорногорії (Souty-Grosset et al. 2006). Англія, Уельс, Ірландія, Франція та Італія колись мали найбільшу чисельність цього виду, проте за останні 10–20 років у цих країнах спостерігається значне скорочення популяцій. Найбільша субпопуляція зараз знаходиться в Ірландії, яка досі вільна від сигнального рака.

***Austropotamobius pallipes*. Еволюційна історія.**

Austropotamobius pallipes, білопалый рак, наразі вважається таксономістами комплексом видів, що складається з двох окремих видів: *A. pallipes* та *A. italicus*. Це підтверджується результатами різних молекулярних аналізів (наприклад, Santucci et al. 1997, Grandjean et al. 2002, Pedraza-Lara et al. 2010). Через міркування щодо ефективності природоохоронних організацій та відсутність остаточного вирішення цього питання, види в межах комплексу зазвичай розглядаються як *A. pallipes*.

Генетичні дослідження виявили кілька гаплогруп у *A. pallipes*, які пов'язані з різними географічними регіонами Європи. Ці гаплогрупи відображають історичну біогеографію виду, причому окремі лінії виникли з різних рефугіумів під час плейстоцену. Наприклад, популяції в басейні Середземного моря та водозборі Адріатичного моря демонструють унікальні генетичні характеристики, які відрізняють їх від популяцій у північних регіонах Європи (Schrimpf et al., 2013; Maguire et al., 2018).

1.6. Еволюційне походження бранхіобделід та філогенія

На основі молекулярних філогеній встановлено, що п'явки (Hirudinida) походять від парафілетичної групи "олігохет" (Erséus & Källersjö, 2004; Rousset et al., 2008; Siddall et al., 2001) (Рис.1.4, 1.5).

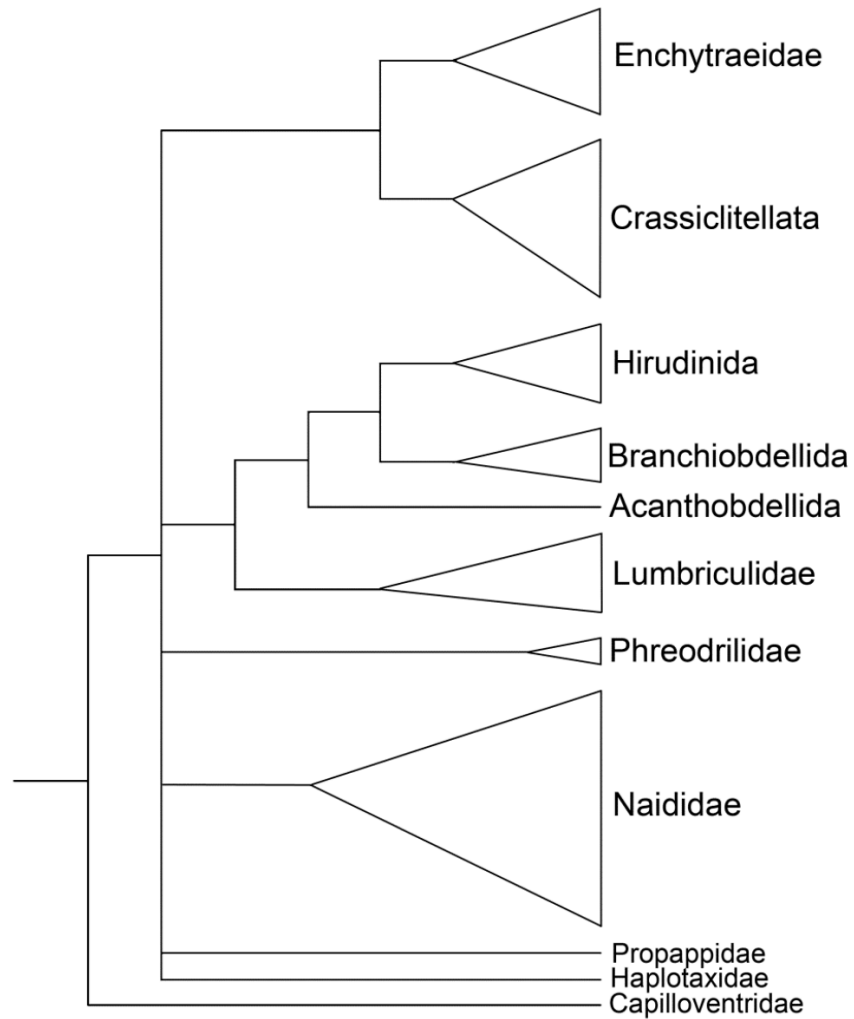


Рисунок 1.4. Філогенія Clitellata, модифікована Svante Martinsson (2016) на основі роботи Erséus and Källersjö (2004).

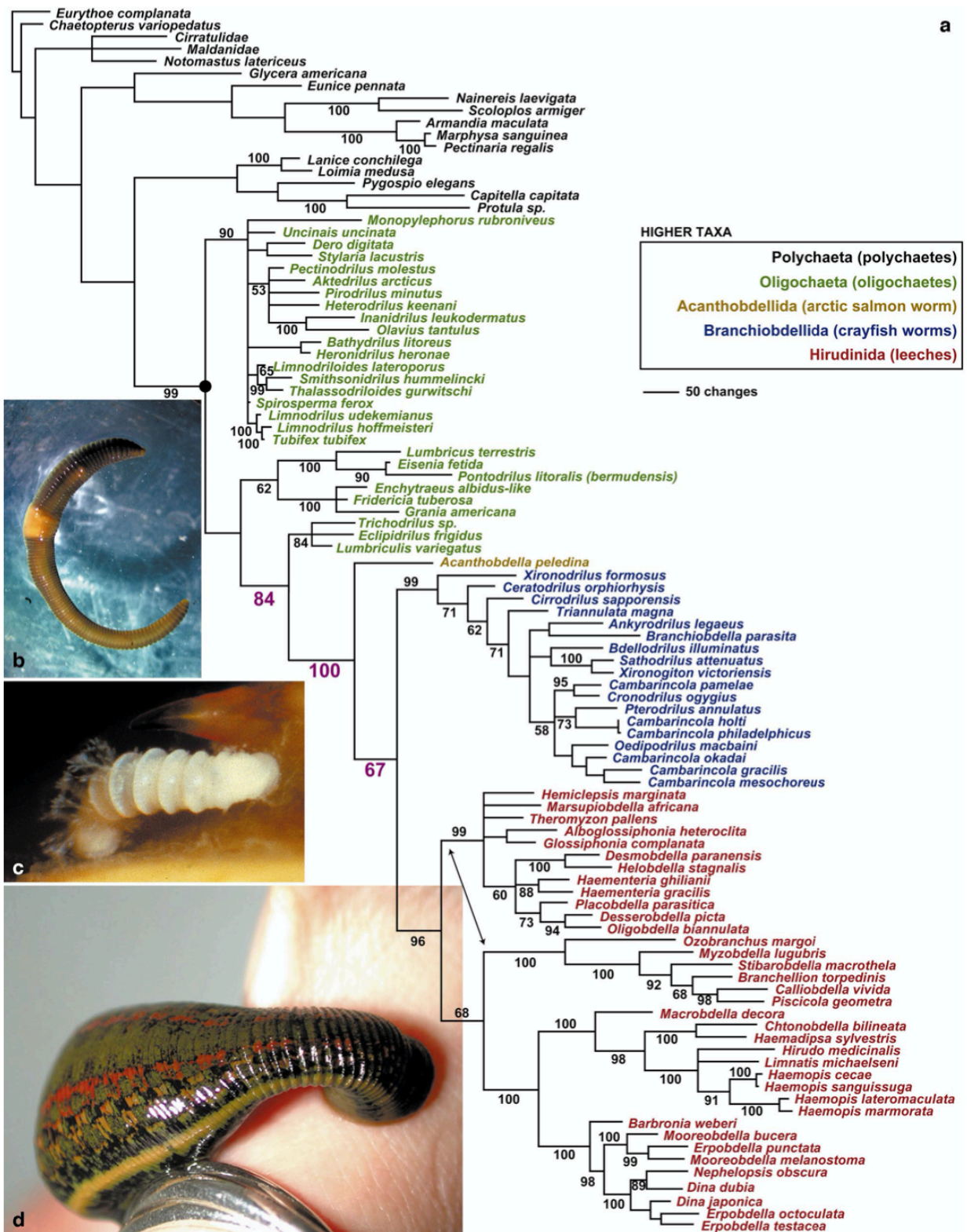


Рисунок 1.5. Siddall et al., 2001. Комбінований молекулярний аналіз за 18S DNA та COI

Клада Clitellata, яка включає олігохет та п'явок, розташована всередині парафілетичних поліхет (Kojima, 1998; McHugh, 1997; Struck et al., 2011). Цей

філогенетичний паттерн свідчить про те, що лінія, яка привела до виникнення п'явок, пройшла через два етапи трансформації будови тіла. Перший етап, перехід від поліхет до клітеллят, відбувся, коли предок сучасних клітеллят перейшов із морських середовищ до прісноводних, що призвело до формування олігохетного плану будови тіла (Dian-Han Kuo, 2018; Omodeo, 1998). Другий етап, перехід від олігохет до п'явок та бранхіобделід, пов'язаний із еволюцією нових харчових поведінок, які призвели до виникнення п'явок та бранхіобделід. Еволюція Clitellata включала адаптації до прісноводних і наземних місць існування. Наприклад, дуплікації генів Na⁺/K⁺-ATPase були пов'язані з вторгненням клітеллят у прісноводні середовища (Horn et al., 2019). Еволюція прямого розвитку у деяких клітеллят, таких як п'явки, також була пов'язана зі змінами в регуляції генів розвитку (Kuo & Hsiao, 2018).

1.6.1. Бранхіобделіди - проміжна форма між олігохетами та п'явками? ***Філогенетичне положення бранхіобделід***

Спочатку бранхіобделіди були описані як п'явки і отримали назву «п'явки річкових раків». Схожість між бранхіобделідами та п'явками очевидна, як і між *Acanthobdella peledina* та їхніми сестринськими групами, такими як люмбрикуліди. Ця схожість була підтверджена на основі морфологічних спостережень (Odier, 1823; Livanow, 1906, 1931; Sawyer, 1986; Siddall & Burreson, 1996; Martin et al., 2000). Зокрема, Livanow (1931) та Стефенсон (Stephenson, 1930) стверджують, що бранхіобделіди є сестринською групою до п'явок, і разом вони утворюють сестринську групу відносно *Acanthobdella*. Крім того, філогенетичний аналіз, який використовував лише морфологічні ознаки, підтримував ці погляди (Purschke et al., 1993; Brinkhurst, 1994; Siddall & Burreson, 1996). Однак і Purschke et al. (1993), і Brinkhurst (1994) відкинули результати власного філогенетичного аналізу. Тобто всі морфологічні синапоморфії, що об'єднують *Acanthobdella*, Branchiobdellida та Hirudinea в цьому аналізі, були відкинуті цими авторами як випадкові та засновані виключно на схожості, що виникла в результаті паралелізму через схожий спосіб життя цих трьох таксонів.

Комбіновані молекулярні дані 18S ядерної рибосомальної ДНК та COI підтвердили гіпотезу, що Hirudinida та Branchiobdellida дійсно є сестринськими групами, і що вони разом з *A. peledina* та рядом Lumbriculida утворюють окрему групу в межах олігохет (Martin, 2001; Siddall et al., 2001). Молекулярні дані також підтверджують, що Acanthobdellida є сестринською групою до Hirudinida + Branchiobdellida, про що раніше згадував Ліванов (Livanow, 1931). Таким чином, Clitellata став синонімічним для Oligochaeta, і можна використовувати одне або інше для групи в цілому. Martin (2001) зазначає, що Clitellata (від clitellum – поясок) є більш прийнятною назвою, оскільки вона була дана спочатку, а також є ширшою, ніж Oligochaeta. Siddall et al. (2001) пропонують розглядати п'явок, бранхіобделід та акантобделлід як ряди Hirudinida, Branchiobdellida та Acanthobdellida відповідно в межах Clitellata. Їхніми предками, можливо, були олігохетоподібні пояскові, за організацією найближчі до родини Lumbriculidae.

Більш недавні філогенетичні дослідження (Phillips et al., 2019) підкреслюють тісний зв'язок між Branchiobdellida, Acanthobdellida та Hirudinida, які формують монофілетичну групу в межах класу Clitellata (Рис. 1.6). Це свідчить про те, що ці групи мають спільного предка, який не є спільним з іншими анелідами (Erséus & Källersjö, 2004; Cichocka et al., 2021). Молекулярні дані, такі як послідовності 18S рДНК та мітохондріальної ДНК, підтверджують сестринські відносини між Hirudinida (справжніми п'явками) та Acanthobdellida, тоді як Branchiobdellida є тісно пов'язаними з обома групами. Наявність унікальних особливостей сперматозоїдів у *Acanthobdella* та Hirudinida ще більше підкреслює їхню еволюційну близькість (Marotta et al., 2008).

Tessler (2018) також розглядає бранхіобделід як ранню гілку на шляху до п'явок, тоді як акантобделліди є сестринською групою справжніх п'явок (Tessler et al., 2018). Це може свідчити про те, що бранхіобделіди представляють собою один з етапів еволюційного переходу від олігохет до п'явок. Таким чином, їхнє положення в філогенетичному дереві підтверджує їхню роль як проміжної ланки між цими двома групами.

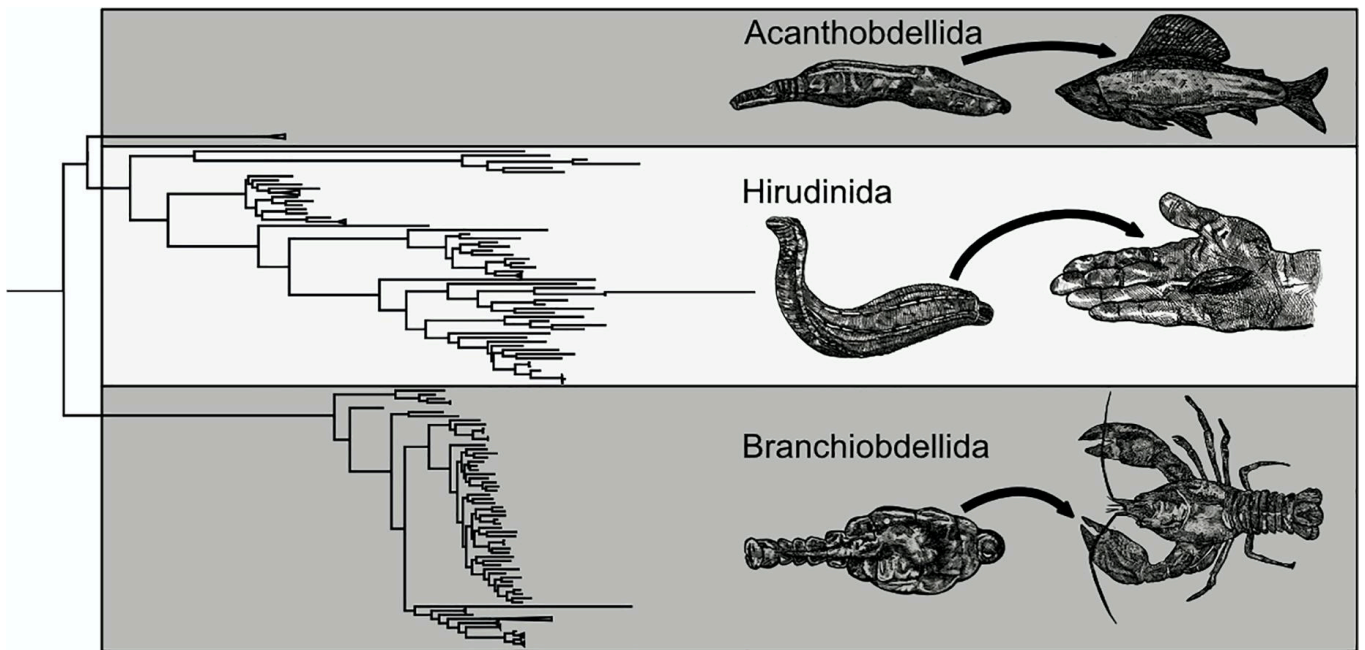


Рисунок 1.6. Філогенетичні зв'язки, виявлені між Hirudinida, Branchiobdellida та Acanthobdellida, за допомогою методу Максимальної правдоподібності. Для кожного ряду наведено узагальнене зображення черва цього ряду та його господаря (*Tessler et al., 2018*).

1.6.2. Мозаїчність морфологічних характеристик

Еволюційний перехід від вільноживучих олігохет до спеціалізованих п'явок (Hirudinida) є одним із ключових етапів у розвитку класу Clitellata. Цей процес супроводжувався значними змінами в морфології, фізіології та екології організмів. Серед кільчастих червів бранхіобделіди (Branchiobdellida) займають особливе місце як проміжна форма, що демонструє риси як олігохет, так і п'явок.

Уявлення, що відкидає монофілетичне походження п'явок, бранхіобделід та *Acanthobdella*, було обґрунтоване спочатку Michaelsen (1919), потім Holt (1965), і, зрештою, більш активно підтримане Holt (1989) та Brinkhurst & Gelder (1989). Передбачувані синапоморфії для п'явок, бранхіобделід та *Acanthobdella* включають

постійну кількість сегментів, зменшення або відсутність щетинок, зменшення ціломічної порожнини та, найбільш вражаюче, наявність заднього присоска для прикріплення. Розглянемо це детальніше.

У бранхіобделід **редукція целому** схожа на таку у деяких олігохет. Зокрема, аналогічна редукція целому спостерігається у *Chaetogaster*, *Agriodrillus* та інших. Вона обмежена передніми сегментами тіла і пов'язана з посиленням мускулатури глотки або стравоходу. У п'явок і *Acanthobdella* редукція целому поширюється на все тіло, але у п'явок він зберігає перегородки. **Задній присосок** у п'явок морфологічно відрізняється від такої у бранхіобделід. Доведено, що ця структура у бранхіобделід не є справжнім м'язовим органом, як у Euhirudinea (Brinkhurst & Gelder, 1989; Purschke et al., 1993; Brinkhurst, 1994, 1999), а є помітно відмінним диском для прикріплення або так званим адгезійним органом (Weigl, 1980; Gelder & Rowe, 1988). У п'явок присосок утворюється в результаті злиття 7 (у *Acanthobdella* – 4) сегментів тіла, тоді як у бранхіобделід це модифікація останнього сегмента. **Кількість сегментів.** У п'явок їх 34, у *Acanthobdella* – 27, а у бранхіобделід – лише 15 (Holt, 1989; Brinkhurst & Gelder, 1989). У бранхіобделід **щетинки** відсутні, але вони все ще присутні у *Acanthobdella*. Будова **статевого апарату** бранхіобделід відрізняється від такої у п'явок, за винятком непарних статевих отворів, але злиття дистальних частин гонодуктів відбувається незалежно у олігохет. **Нефридії** бранхіобделід мають війки, чого немає у Euhirudinea та *Acanthobdella*. **Щелепи** бранхіобделід мають будову, схожу на будову щелеп Euhirudinea, однак у останніх щелепи працюють у латеральному напрямку. Виняток становить один ряд п'явок, у яких щелепи, як і у бранхіобделід, працюють у дорзо-вентральному напрямку.

Ці аргументи стали причиною виключення бранхіобделід з класу п'явок і зближення їх з олігохетами. Після знаходження Frenzen (1963) клітин гірудиноїдного типу, Holt (1965) виключив бранхіобделід з олігохет і розглядав їх у класі Clitellata як окремий ряд поряд із рядами олігохет і п'явок. Kaspgak (1984) дійшов висновку про доцільність обґрунтування для родини Branchiobdellidae окремого класу та включив її разом із класами олігохет і п'явок до підтипу Clitellata. Gelder та Brinkhurst (1990)

також підтримують цю точку зору, оскільки деталі будови чоловічої статеві системи бранхіобделід і люмбрикулід схожі. Це дає підстави вважати бранхіобделід сестринською групою до родини люмбрикулід. Stephenson (1930) стверджує, що такі анатомічні структури бранхіобделід, як постійна кількість сегментів, відсутність щетинок, розвиток переднього та заднього адгезійного диска, щелеп та інші риси будови, не є гомологічними п'явкам, але лише добре відображають здатність до ектосимбіотичного способу життя.

1.6.3. Час переходу від олігохет до п'явок та бранхіобделід

Спроби визначити час переходу від олігохет до п'явок залишаються складними через обмеженість палеонтологічних даних. Виявлені рештки, які можна інтерпретувати як сучасні п'явки та їхні кокони, знайдені в мезозойських та кайнозойських відкладеннях (Sawyer, 1986). Найдавніший зразок, який можна однозначно ідентифікувати як п'явку, датується верхнім юрським періодом (145–163 млн років тому; MYA). Однак, оскільки всі ці виявлені рештки вже мають характерні риси п'явок, перехід мав відбутися раніше, ймовірно, у палеозойську еру. Молекулярні дослідження вказують на те, що останній спільний предок п'явки *Helobdella* та олігохети *Tubifex* жив близько 360 млн років тому, на межі девону та кам'яновугільного періоду, хоча точність цієї оцінки залишається низькою (Dos Reis et al., 2015). Таким чином, перехід міг відбутися в проміжку між верхнім кам'яновугільним (510 MYA) та нижнім юрським періодами (210 MYA).

РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

2.1. Походження матеріалу

Дослідження за темою дисертації проводилися протягом 2007–2024 років. У рамках роботи було обстежено близько 700 екземплярів річкових раків, які належать до 4 аборигенних та 3 інвазивних видів. З цих зразків було зібрано понад 4000 екземплярів бранхіобделід, що представляють 8 видів.

Вибір зразків здійснювався з метою охопити найширший спектр філогенетичної та екологічної різноманітності бранхіобделід в межах Західної Палеарктики. Матеріал походить з декількох джерел. Основну частину матеріалу склали збори, ініційовані під час дисертаційного дослідження на території України, Білорусі, Росії, Словенії, Польщі, Румунії та Казахстану (80 зборів річкових раків). Меншу частину дослідженого матеріалу (66 зборів річкових раків) становили зразки зі Словенії, Чорногорії, Північної Македонії, Хорватії, Сербії та Австрії, які було досліджено на наявність бранхіобделід з колекції біотехнічного факультету Люблянського університету (м. Любляна, Словенія) (Рис. 2.1). Також для порівняння ми використовували інформацію з вже опублікованих даних з GenBank, GBIF та з літературних джерел.

Усі матеріали бранхіобделід, включаючи власні збори, наразі зберігаються в колекції біотехнічного факультету Люблянського університету. Детальну інформацію щодо місця та часу збору матеріалу, географічних координат, імен колекторів та кількості досліджених екземплярів річкових раків наведено в Таблиці 2.1.



Рисунок 2.1. Точки збору річкових раків та браніобделлід в межах нашого дослідження.

Ми обрали чотири молекулярні маркери по декілька представників одного виду бранхіобделлід з різних річкових басейнів і різних видів річкових раків - хазяїв у Західній Палеарктиці (Рис. 2.2). А саме: два мітохондріальні гени (COI та 16S рДНК) та два ядерні гени (28S рДНК та ITS). Всього нами було отримано 179 послідовностей.

З них 125 послідовностей гена **COI** було взято з бази даних GenBank, а 39 послідовностей отримано в молекулярно-генетичній лабораторії біотехнічного факультету Люблянського університету (Словенія). Матриця з послідовностями гену **cox1** містила 8 видів бранхіобделлід та один вид для зовнішньої групи – *Hemiclepsis marginata*, послідовність якого також була отримана в лабораторії. Загалом матриця мала довжину у 164 позицій таксонів.

Матриця з послідовностями гена **16S** мала довжину у **53** позиції та включала **8** видів бранхіобделлід. Нами було отримано **52** послідовності, включно з

послідовністю для зовнішньої групи *Hemiclepsis marginata*. Лише 1 послідовність була запозичена із генетичного банку GenBank.

Матриця з послідовностями гена **28S** мала довжину у **49** позицій та містила **8** видів. **Всі** послідовності було отримано нами, включно з послідовністю для зовнішньої групи *Hemiclepsis marginata*.

Матриця з послідовностями гена **ITS** мала довжину у **40** позиції та включала **8** видів, один з яких належав до зовнішньої групи *Hirudo orientalis*. Нами було отримано **39** послідовності. Одну послідовність було запозичено із генетичного банку GenBank.

Усі послідовності чотирьох генів було завантажено до бази даних **GenBank**. Детальний перелік послідовностей наведено в Додатках.

Нижче ми приводимо послідовності олігонуклеотидних праймерів, використаних для ПЛР-ампліфікації та секвенування з посиланням на джерело інформації.

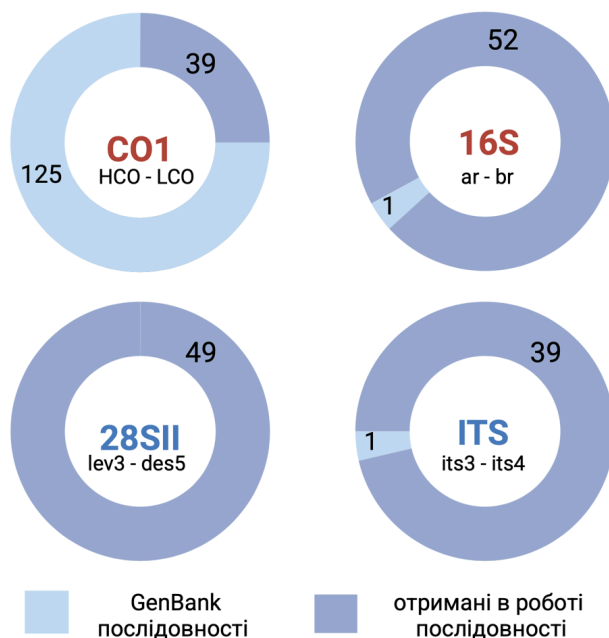


Рисунок 2.2. Послідовності чотирьох генетичних локусів, використаних у філогенетичному аналізі.

COI (ген субодиниці I цитохром с-оксидази)

LCO 1490: GGTCAACAAATCATAAAGATATTG

HCO 2198: TAAACTTCAGGGTGACSSAAAAAAT

Folmer et. al., 1994.

16S рибосомальна РНК (частина великої субодиниці мітохондріальної рибосоми)

16Sar: CGCCTGTTTA5CAAAAACAT (5* INOSINE)

16Sbr: CCGGTCTGAACTCAGATCA

Simon, et. al, 1991

28S II ядерна рибосомальна РНК для великої субодиниці

28Slev3: GCCCTTAAAATGGATGGCGCT

28Sdes5: CCGCCGTTTACCCGCGCTT

Fišer, C. et al., 2013

ITS 2 (internal transcribed spacer 2) рибосомальної ДНК

its3GCATCGATGAAGAACGCAGC

its4TCCTCCGCTTATTGATATGC

White et al, 1990.

Таблиця 2.1. Збори річкових раків, використані в роботі. Аббревіатури країн за міжнародним стандартом ISO: BLR - Білорусь, KZ - Казахстан, UA - Україна, RU - Російська Федерація, PL - Польща, RO - Румунія, NL - Нідерланди, MNE - Чорногорія, SVN - Словенія, HRV - Хорватія, MAC - Північна Македонія, BIH - Боснія і Герцеговина, BGR - Болгарія, SRB - Сербія.

#	Країна	Локація	Дата	Колектор	N	E	Кількість зборів
1	UA	озеро Світязь, Шацьк	06.2009	М. Shrestkha	51.4844	23.8461	1
2	UA	озеро Люцимер, Шацьк	06.2009	М. Shrestkha	51.4840	23.9394	1

3	UA	р. Сіверський Донець, с. Гінсєвка	28.06.2009	A. Utevsky	49.6607	36.5485	1
4	UA	р. Сіверський Донець, с. Чугуїв	29.06.2009	M. Shrestkha	49.8308	36.7201	1
5	UA	р. Сіверський Донець, с. Червоний Донець	28.01.2007	A. Kolesnyk	49.5131	36.5618	1
6	UA	р. Сіверський Донець, м. Святогорськ	29.06.2011	A. Utevsky	49.0367	37.5796	1
7	UA	р. Сіверський Донець, с. Нижній Бішкін	28.01.2007	A. Kolesnyk	49.5422	36.4101	1
8	UA	р. Сіверський Донець, с. Гайдари	06.2008	A. Utevsky	49.6227	36.3274	2
9	UA	р. Лопань, м. Харків	17.06.2009	M. Shrestkha	50.0095	36.2089	2
10	UA	р. Орель, с. Баловка, Дніпропетровська обл.	2009	A. Atemasov	48.6087	34.7629	1
11	UA	р. Південний Буг, с. Бузьке	2009	M. Son	47.6082	31.1805	1
12	UA	р. Південний Буг, с. Мигія	24.06.2011	M. Shrestkha	48.0296	30.9421	1
13	UA	кар'єр Камплія, с. Занки	25.04.2006 - 2010	A. Kolyshkin	49.6718	36.4053	5
14	UA	Одеса, музейна колекція університету	не відомо	не відомо	46.4830	30.7228	1
15	UA	оз. Жовтневе, с. Золочево	19.12.2006	M. Shrestkha	50.2620	36.0807	1
16	UA	Печенезьке вдсхв., с. Печенеги	13. 04. 2007	M. Kravchenko	49.9911	36.8722	8
17	UA	Дніпровсько-Бузький лиман, с. Стара Збруївка	28.01.2007	D. Chernyakova	46.4944	32.2884	5
18	UA	канал Дніпр - Донбас	28.06.2007	A. Kolesnyk	48.9912	35.5475	1
19	UA	Безлюдівське вдсхв., Харківська обл.	2007-2009	M. Shrestkha	49.8794	36.2586	4
20	UA	Печенізьке вдсхв., с. Мартова	2007 - 2011	G. Shandikov, M. Shrestkha	49.9465	36.9545	3
21	UA	о. Брітай, с. Смирновка, Лозовський р-н	2009	A. Atemasov	48.9878	36.4193	1
22	UA	Рогозянське вдсхв., Золочевський р-н	24.03.2008	M. Shrestkha	50.1464	35.9306	1

23	UA	пруд, с. Сокиренці, Чернігівська обл.	2006	M. Shrestkha	50.7063	32.7893	1
24	UA	р. Джгун, с. Бірки, Харківська обл.	2009	M. Shrestkha	49.7226	36.0615	1
25	UA	Печенезьке вдсхв., с. Хотомля	21.09.2006	Yu. Kazarinova	50.0127	36.8692	1
26	UA	Трав'янське вдсхв., Харківська обл.	22.10.2011	A. Shrestha	50.2545	36.3931	2
27	UA	озеро Лісне, с. Лісне, Харківська обл.	23.5.2013, 03.4.2007	A. Shabanova	49.7904	36.0526	2
28	UA	р. Сіверський Донець, м. Чугуєв	08.06.09	M. Shrestkha	49.8360	36.7067	1
29	UA	р. Сугокля, м. Кировоград	14.08.2008	D. Kryvohyza	48.4841	32.2355	1
30	UA	р. Десна, вище впадіння р. Смолянка, Чернігівська обл, с. Блислове	07.11.2008	M. Shrestkha	51.2284	31.0500	1
31	UA	озеро Тихая Десна Черниговская область, С Блислово	08.11.2008	M. Shrestkha	51.3641	31.9529	1
32	UA	оз. Синевір, Межигірний р-н, Закарпатська обл.	2009-2022	M. Shrestkha	48.6170	23.6840	2
33	UA	р. Теремля, с. Колочава, Закарпатська обл.	2009-2022	M. Shrestkha, S. Utevsky	48.4223	23.6931	4
34	UA	озеро Катлабух, с. Кислиця, Одеська обл.	08.06.2009	M. Shrestkha, S. Utevsky	45.4131	29.0302	1
35	UA	р. Дунай, с. Кислиця, Одеська обл.	09.06.2009	N. Krutienko, O. Yakovenko	45.3853	29.0755	1
36	UA	р. Дунай, канал, с. Вілково	10.06.2009	M. Shrestkha, S. Utevsky	45.3426	29.6460	1
37	UA	р. Турунчук, с. Беяївка, Одеська обл.	11.06.2009	M. Shrestkha, S. Utevsky	46.4472	30.2061	1
38	BLR	оз. Муховець, м. Брест	2008	M. Shrestkha	52.0933	23.9052	1
39	BLR	Заславське вдсхв., м. Мінськ	2008	M. Shrestkha	53.9643	27.3392	1
40	KZ	оз. Тасколь	2.8.2007	O. Zinenko	43.0021	79.9914	1
41	KZ	оз. Якши (Жаксы Жалгызтау)	3.8.2007	A. Utevsky	52.6275	68.1569	1
42	RU	р. Ока, Калузька обл., с. Василеєво	7.11.2013	D. Palatov	54.9490	38.7657	1

43	RU	оз. Манич, Ставропольський край	23.08.2007	M. Shrestkha, S. Utevsky	46.0208	43.4490	1
44	RU	м. Єсентукі, річка біля хут. Садовий	24.08.2007	M. Shrestkha, S. Utevsky	44.0388	42.9700	1
45	RU	м. Ростов на Дону, Лиман	28.08.2007	M. Shrestkha, S. Utevsky	47.1988	39.2723	1
46	RU	пруд, Краснодарський край, Ривенська станиця	29.08.2007	M. Shrestkha, S. Utevsky	45.6434	38.1676	1
47	RU	Таганрозький залив, м. Таганрог	2008	M. Shrestkha, S. Utevsky	47.2805	39.2057	1
48	Russia	Курське вдсхв., м. Курськ	12.06.2013	M. Shrestkha	51.6761	35.7374	1
49	PL	струмок Лукавка	31.08.2024	Macej Bojnik	50.7520	20.9352	1
50	RO	ASA	2024	Pavrulesku	47.1342	23.8062	1
51	RO	АРТ	2024	Pavrulesku	46.4557	25.4275	1
52	NL	вдсхв. Краненвейер (Cranen-weyer), м. Керкаде	2013	M.Soes	50.8825	6.0514	1
53	MNE	River Rijeka Crnojevića at Rijeka Crnojevića, W part of Lake Skadar	30.7.2002	P. Trontelj	42,3197	19,1481	1
54	SVN	Lake Vučja jama, near Lipovci, Beltinci	20.9.1993	unspecified	46,6317	16,2231	1
55	SVN	Stream Bača, Baška grapa, Podbrdo	1.5.2001	B. Sket	46,2306	15,0911	1
56	BGR	River Timok, Bregovo	22.8.1965	unspecified	44,1519	23,6264	1
57	HRV	Lake Vrana, Cres Island	23.9.1997	unspecified	44,8656	14,3883	1
58	HRV	Stream near Butoniga, Pazin, Istra	25.5.1996	Mrakovcic	45,3108	13,9297	1
59	BIH	Stream near Uvir Cave, Kladanj	22.7.2004	P. Trontelj	44,2236	18,6747	1
60	SVN	River Pazinčica, Pazin, Istra	1.9.1960	B. Sket	48,24	13,9294	1
61	HRV	Lake Modro Oko, river source near Rogotin, Ploče	1.10.2000	C. Fiser	43,0456	17,4742	1
62	HRV	Mirna River near Škuljari, Buzet, Istra	28.4.2001	B. Sket	45,4183	13,9214	1
63	HRV	Ljuta River, Konavoski Dvori, Dubrovnik	20.9.2000	C. Fiser	42,6419	18,1097	1

64	SVN	River Drava near Šturmovci, Ptuj	1.7.1975	unspecified	46,4817	15,7544	1
65	SVN	Stream Kožbanjšček, Neblo, Nova Gorica	30.7.1967	unspecified	46,0053	13,5019	1
66	SVN	Rižana River, Koper	6.6.1975	unspecified	45,5428	13,8489	1
68	SVN	Belica Creek, Osilnica, Kočevje	9.6.2001	C. Fiser	45,5675	14,7142	1
69	SVN	Creek near Bohinjska Bela, Bled	14.10.2000	C. Fiser	46,3364	14,06	1
70	SVN	Creek at Mlake, Vipava	15.6.2001	G. Bracko	45,8156	13,9611	1
71	SVN	Stream at Karlovica, Velike Lašče	11.8.1971	unspecified	45,8086	14,5956	1
72	SVN	Sušacki Potok at Novokrajška jama, Ilirska Bistrica	unspecified	B. Sket, F. Velkovrh	45,4914	14,3014	1
73	SVN	Trnava Creek, Silova, Velenje	29.6.1989	unspecified	46,255	15,0658	1
74	SVN	Osapska reka, Osp, Koper	16.6.2003	studenti	45,5731	13,8492	1
75	SVN	Stream in Ribče, Litija	20.4.1980	unspecified	46,1011	14,7744	1
76	SVN	Martinščica River, Lake Cerknica	1.4.1968	unspecified	45,7703	14,3631	1
77	SVN	Stream on Planinsko polje, Planina	1.6.1966	B. Sket	45,8419	14,2831	1
78	SVN	Pendirjevka Creek, Cerov Log, Šentjernej	14.5.2005	M. Bedjanic	45,8056	15,3175	1
79	SVN	Zala Creek, Vrh Zala, Godovič, Idrija	17.9.2000	B. Sket	45,9572	14,0908	1
80	SVN	Stream at Rakitna Lake, Rakitna	16.9.2000	B. Sket	45,8875	14,4325	1
81	MKD	Osojnica stream, 2.5 km NW of Laki village, Berovo	25.7.2008	M. Bedjanic	41,8078	22,6461	1
82	SVN	Grivački potok, Grivac, Kočevje	25.10.2004	P. Trontelj, F. Kijum	45,4675	14,8431	1
83	SVN	Tršovka Stream, Poljane, Cerkno	24.9.2000	B. Sket	46,1406	14,0125	1
84	SVN	Iška River, Iški Vintgar, Ljubljana	23.9.2000	B. Sket	45,9303	14,5172	1

85	SVN	Nežica Stream, Fara, Kočevje	25.10.2004	P. Trontelj, F. Kijum	45,8161	13,9675	1
86	MKD	Stream near Izbište, Resen	16.7.2008	M. Bedjanic	41,1272	21,0025	1
87	SVN	Stream near Kaja&Grom ranch, Zaplana, Logatec	24.10.2000	C. Fiser	45,9703	14,2386	1
88	SVN	Hotenjka Creek, Hotedršica, Logatec	17.9.2000	B. Sket	45,9347	14,1414	1
89	BIH	Živašnica, Begića Česma, Konjic	1.10.1968	unspecified	46,0419	14,4683	1
90	SVN	River Cerknjščica, Jamski zaliv, Cerknica	20.10.1969	unspecified	45,7847	14,3386	1
91	BIH	Source of Sanica River, Sanica	1.10.1969	unspecified	44,6161	16,6603	1
92	SVN	Stream Bela, Vrhnika	1.8.1990	unspecified	45,9592	14,315	1
93	SVN	Zala River, Cerknica	unspecified	unspecified	45,8672	14,4606	1
94	SVN	waterfall Nežica, near r.Kupa, v. Fara	25.10.2004	P. Trontelj, F. Kijum	45,4747	14,8833	1
95	SVN	Zala Creek, Godovič, Idrija	28.09.2009	M. Shrestkha	46,1831	14,1047	1
96	SVN	Kolpa River near Dolenja Žaga, Kočevje	22.07.2002	C. Fiser	45,5167	14,9128	1
97	MAC	Stream near Izbište, Resen	16.07.2008	M. Bedjanic	41,1364	21,0058	1
98	SVN	Unspecified pond in Logatec	1993	unspecified	45,9142	14,2047	1
99	SVN	Nevljica River near Buč, Kamnik	1955	unspecified	46,2211	14,7236	1
100	BIH	Veliki ponor, Livno	unspecified	unspecified	43,8258	17,0025	1
101	BIH	Tušnica river, Tomislavgrad (Duvno)	1.9.1987	unspecified	43,7175	17,1842	1
102	SVN	Glinjščica, Ljubljana	unspecified	B. Sket	46,1167	14,4522	1
103	SVN	Glinjščica Creek, concrete canal, Ljubljana	10.4.2000	C. Fiser	46,0558	14,4569	1
104	SVN	Glinjščica, under bridge, Ljubljana	10.4.2000	C. Fiser	46,0558	14,4569	1
105	SVN	Bloščica River, Volčje, Cerknica	2.0.2009; 21.5.2018	P. Trontelj, M. Shrestkha	45,7903	14,7903	2
106	SVN	Ljubljana, Tiha pri Zabarju	1.9.1982	B. Sket	46,0419	14,4683	1
107	SVN	Šmartinsko Jezero, Celje	1.5.1979	unspecified	46.2801	15.2664	1

108	SVN	Mura River, Gornja Radgona	28.9.2003	U. Arnus	46,5019	16,4822	1
109	SVN	Drava River, Maribor	8.10.2009	M. Shrestkha	46,5389	15,7158	1
110	SVN	Rateški potok, Petelinjek, Novo mesto	17.3.2002	I.R. Verovnik, C. Fiser	45.8183	15.2334	1
111	SVN	Spring near Osp, Koper	12.9.2011	stud OB	45.5711	13.8534	1
112	SVN	Cave Velika Karlovica, r. Cerkniscica, Cerknica	21.5.1969	unspecified	45.7752	14.3250	1
113	SVN	Ribnik Lokva, Logatec	1993	unspecified	45.9145	14.2121	1
114	SVN	Postojna Cave, Pivka, Postojna	1.2.1973	unspecified	45.7756	14.2025	1
115	SVN	Dragonja River, Sečovelje	1.5.1979	unspecified	45.4741	13.6188	1
117	SRB	Riorska Reka, Valjevo	2009	unspecified	44.1338	20.1029	1
118	IT	Sicilia	unspecified	unspecified	37.9136	13.6235	1

Матеріали для вивчення симбіотичних відносин. Для вивчення симбіотичних відносин було обрано вид *B. kozarovi* з наступних локацій та чисельності:

місце збору	річковий рак - хазяїн (екз.)	кількість зборів	кількість екз. бранхіобделід
Печенізьке вдсхв.	<i>Astacus leptodactylus</i> (174)	8	1539
Кампличанський кар'єр	<i>Astacus leptodactylus</i> (40)	7	2332
Безлюдівський кар'єр	<i>Astacus leptodactylus</i> (18)	5	1040
Жовтневе вдсхв.	<i>Astacus leptodactylus</i> (10)	1	70
Трав'янське вдсхв.	<i>Astacus leptodactylus</i> (20)	1	40
р. Сіверський Донець:			
Червоний Донець	<i>Astacus leptodactylus</i> (3)	1	500
Нижній Бишкін	<i>Astacus leptodactylus</i> (5)	1	352

Чугуїв	<i>Astacus leptodactylus</i>	1	75
	(5)		
Борки	<i>Astacus leptodactylus</i>	1	50
	(8)		

Матеріали для вивчення можливості переселення аборигенних видів бронхіобделід на інвазивні види річкових раків. Матеріалом для цього дослідження стали річкові раки та креветки таких видів:

- 30 екземплярів *Astacus leptodactylus* (Eschscholtz, 1823) – довгопалий річковий рак;
- 2 екземпляри *Procambarus sp.* (M. Pockl) – мармуровий рак;
- 2 екземпляри *Cherax quadricarinatus* (von Martens, 1868) – тропічний синій рак;
- 2 екземпляри *Procambarus clarkii* (Giard, 1852) – червоний рак;
- 2 екземпляри *Procambarus sp.* (M. Pockl) – мармуровий рак (біла форма);
- 2 екземпляри *Macrobrachium asperulum* (von Martens, 1868);
- 6 екземплярів *Neocaridina heteropoda* (Liang, 2002).

Загалом було залучено до цього дослідження 38 екземплярів річкових раків та 8 екземплярів креветок. Як аборигенний вид-симбіонт був взят *Branchiobdella kozarovi* з довгопалого річкового раку, усього було залучено 494 екземпляри.

Довгопали річкові раки (*Astacus leptodactylus*) були відловлені вручну у Трав'янському водосховищі Харківської області у вересні 2013 року. Інтродуковані види раків, такі як мармуровий рак, тропічний синій рак, червоний рак та інші, були придбані на пташиному ринку, оскільки вони є поширеними в акваріумістиці у Західній Палеарктиці.

2.2. Збір і збереження матеріалу

Збір річкових раків проводився під час експедицій з використанням різних методів, які враховували особливості поведінки раків та умови їх середовища. Нічний час був найбільш ефективним для збору, оскільки раки активізуються вночі, виходячи на полювання. Для їх пошуку використовувався ліхтарик, який дозволяв

легко виявляти раків на мілководді або серед каміння. Раки збиралися вручну, з використанням невеликого сачка або просто руками, з обережністю, щоб уникнути пошкодження їхніх клешень. У денний час, коли раки менш активні, застосовувалися більш інтенсивні методи збору. Зокрема, раків шукали в їхніх норах на берегах водойм, де доводилося залазити руками у нору, обережно витягуючи їх. У водоймах з більшими глибинами (озерах та водосховищах) використовувався метод scuba-diving або free-diving, що дозволяло шукати раків на імлістому дні, серед каміння або водоростей. У гірських річках раки часто ховалися під камінням, тому ми їх знаходили шляхом перегортання каменів. У великих водосховищах застосовувалися спеціальні ловушки — сітки з приманкою всередині, куди раки запливали, приваблені їжею, після чого їх виймали для подальшого дослідження. Цей метод дозволяв збирати велику кількість раків з мінімальними зусиллями. Окрім прямого збору, раки також купувалися на ринках поблизу водосховищ, де місцеві рибалки продавали свій улов. Це дозволяло отримати додаткові зразки, особливо в тих випадках, коли прямий збір був утруднений.

Методи обробки матеріалу

Для дослідження раків використовувався метод обробки матеріалу, який включав наступні етапи. Спочатку досліджувані раки поміщалися в розчин соди з водою у співвідношенні 1:1 на 5 хвилин. Цей метод дозволяв досягти релаксації бронхіобделід, що значно полегшувало їх збір з поверхні тіла рака. Черви збиралися за допомогою пензлика, виконуючи обережні зіскоблюючі рухи, щоб уникнути пошкодження їхніх тканин. Після збору річкові раки та зібрані з них бронхіобделіди переносилися у проточну воду для того, щоб ретельно змити залишки содового розчину з їхніх тіл. Черви досліджувалися у живому стані під мікроскопом з метою визначення морфологічних та анатомічних особливостей, після чого проводилася їх фіксація.

З метою проведення молекулярно-генетичного аналізу, бронхіобделід фіксували у 96% спирті без попередньої релаксації у водно-содовому розчині одразу. Хоча 96% спирт робить матеріал крихким, він надійно забезпечує збереження

структури ДНК. Особливо цінні та малочисельні екземпляри бронхіобделід фіксувалися саме спиртом.

Важливим аспектом було дотримання співвідношення об'єму фіксуючої рідини до об'єму матеріалу, яке становило 1:100. Така пропорція забезпечувала ефективну фіксацію та подальше зберігання матеріалу. Для тривалого зберігання і подальшого розтину, використовувався 70%-й спирт. Альтернативним фіксуючим агентом був 4%-й розчин формальдегіду або комбінація спирту з формаліном (70%-й спирт — 100 см³, 40%-й формалін — 2–3 см³). Формалін використовувався для зберігання матеріалу, призначеного для анатомічних досліджень, оскільки він робить тканини м'якшими та легшими для розтину.

Однією з головних проблем під час фіксації бронхіобделід було те, що їхні м'язи скорочувалися, що призводило до деформації зразків. Щоб уникнути цього, використовувався метод релаксації: спочатку черв'яків занурювали у 10%-й спирт, а потім поступово підвищували концентрацію спирту до необхідного рівня (70% або 96%). Це допомагало уникнути різкого скорочення м'язів. Також ефективним методом було фіксування черв'яків під покривним склом, де за допомогою пензлика їх утримували у потрібному положенні, що запобігало деформації.

Кожен зразок фіксованого матеріалу зберігався в окремій пластиковій пробірці. Всередину пробірки ми клали етикетку з інформацією: дата збору, географічне місце, назва водойми та прізвище збирача. Ці дані паралельно заносилися в електронну таблицю, де кожен зразок отримував унікальний номер. Такий підхід забезпечував точну ідентифікацію та систематизацію матеріалу.

Для точного визначення виду бронхіобделід найкраще було досліджувати їх у живому стані. Це дозволяло оцінити ключові ознаки, такі як розміри, форма, характер рухів та поведінка, які є важливими для систематики. Деталі будови органів, чутливих клітин, війчастих апаратів та інших структур найкраще вивчалися саме на живих об'єктах. Спочатку черв'яків розглядали у відкритій краплі води під біокуляром або при невеликому збільшенні мікроскопа. Потім їх досліджували під покривним склом, додаючи краплю гліцеролу. Гліцерол робив покривні тканини

прозорими, що значно покращувало видимість внутрішніх органів у прохідному світлі.

Методи візуалізації географічного розповсюдження. Для візуалізації та аналізу географічного розповсюдження зібраного матеріалу було використано програму QGIS (v.3.28), яка дозволила точно нанести координати місць збору річкових раків та бронхіобделід на карту. Спочатку підготовлювалися таблиці з даними, де вказувалися координати місць збору у форматі широти та довготи, а також додаткова інформація, така як вид організму, дата збору та інші параметри. Ці дані зберігалися у форматі CSV, що дозволяло легко імпортувати їх у QGIS. Використовуючи інструмент "додати шар текстових даних", таблиця з координатами завантажувалася в програму, де вказувався роздільник стовпців та вибиралися відповідні поля для широти та довготи. Після імпорту дані автоматично відображались як точковий шар на карті, які можна було редагувати в параметрах відображення точок, включаючи колір, розмір та форму, щоб відрізнити різні види або локації. Результати експортувалися у вигляді зображень (наприклад, PNG або SVG) для подальшого редагування і обробки у графічних програмах. Для цього ми використовували InkScape (v.1.2). Для уточнення існуючого розповсюдження видів бронхіобделід та їх хазяїв в Західній Палеарктиці була використана інформація з міжнародної бази даних gbif.org (Global Biodiversity Information Facility).

2.3. Методи вивчення ознак зовнішньої морфології.

Дослідження фіксованих бронхіобделід починалося з їхнього зовнішнього огляду під мікроскопом при невеликому збільшенні у відбитому світлі. На цьому етапі оцінювали форму та розміри тіла, форму головної лопаті та розташування статевих отворів. Основним методом вивчення систематичних ознак було виготовлення тотальних препаратів. Для цього фіксований матеріал поміщали у гліцерин, який робив тканини прозорими. Просвітлених черв'яків розміщували на предметне скло в краплі гліцерину та накривали покривним склом. Тотальні препарати бронхіобделід не потребували додаткового забарвлення. Канадський бальзам використовувався рідко, оскільки гліцерин дозволяв легко знімати покривне

скло та змінювати положення черв'яка. Недоліком гліцерину є його швидке висихання, але цього можна уникнути, обмазуючи краї покривного скла лаком. Такі препарати досліджували під світловим мікроскопом у темному полі, що дозволяло чітко розрізнити окремі сегменти.

Для детального вивчення зовнішньої морфології бранхіобделід також використовувався метод скануючої електронної мікроскопії (SEM). Цей метод дозволяє отримати високоякісні зображення поверхні тіла з великим збільшенням та високою роздільною здатністю, що є важливим для аналізу дрібних структур, таких як щетинки, папіли, статеві отвори та інші морфологічні особливості. Підготовка зразків до SEM починалася з фіксації. Зразки бранхіобделід фіксували у 2,5%-му розчині глутаральдегіду на 24 години при температурі 4°C. Після фіксації матеріал промивали у фосфатному буфері (рН 7,4) для видалення залишків фіксатора. Далі зразки проходили серію дегідратації в етанолі зі ступінчатим підвищенням концентрації (30%, 50%, 70%, 90%, 100%), причому кожен етап тривав 15–20 хвилин. Щоб уникнути пошкодження тонких структур під час сушіння, зразки піддавали критичному сушінню за допомогою спеціального приладу, використовуючи рідкий вуглекислий газ. Після сушіння зразки покривали тонким шаром золота або паладію за допомогою спрею-металезатора, що забезпечувало провідність поверхні та покращувало якість зображень під час сканування. Підготовлені зразки розміщували на спеціальних столиках-тримачах та встановлювали у камеру скануючого електронного мікроскопа. Зразки досліджували при різних збільшеннях (від 50x до 5000x) для детального аналізу поверхневих структур. На етапі сканування реєстрували такі ознаки, як форма тіла, особливості будови поверхневих сенсорних клітин, будова головного відділу, статевих отворів та інших морфологічних особливостей. Перевагами методу SEM є висока роздільна здатність, що дозволяє вивчати нанорозмірні структури, можливість отримання тривимірних зображень поверхні, а також зручність для детального аналізу зовнішньої морфології. Однак метод має обмеження для вивчення внутрішніх структур, що робить його застосування актуальним лише для зовнішнього опису.

Методика вивчення щелеп. Для вивчення щелеп не обов'язково виділяти їх із глотки. У великих екземплярів щелепи витягували шляхом сагітального розрізу головного відділу та досліджували під мікроскопом. Маленькі екземпляри поміщали у гліцерин, злегка роздавлювали під покривним склом та вивчали під мікроскопом при збільшенні 40х. Щелепи були добре помітними як темно забарвлені структури. Особливу увагу приділяли формі, розмірам основи щелеп, а також формі, розташуванню та кількості зубців.

2.4. Методи вивчення анатомічних ознак.

Статева система, яка є ключовою для визначення бранхіобделід, на тотальному препараті може бути детально розглянута лише за допомогою методу фазового контрасту. Для більш детального вивчення використовувалися інші методи. Ми застосовували метод розтину під бінокуляром при достатньому освітленні знизу. Цей метод є ефективним для вивчення анатомічних особливостей цих тварин. Розтин проводився для аналізу будови травної та статевої систем. Для цього використовувалися такі інструменти:

- гострі прямі та зігнуті препарувальні голки;
- шматок гостро заточеного леза, закріпленого в тримачі (це запобігало розриву покривів бранхіобделід під час розтину);
- маленькі пінцети з гострими кінцями для утримання органів під час розтину;
- маленькі чашки Петрі.

Розтин проводився у тому ж фіксаторі, в якому зберігалися бранхіобделіди. Найкращим фіксатором для розтину був формалін, оскільки він зберігає м'якість покривів, що полегшує розрізання. Для вивчення елементів статевої системи розріз робився на рівні ІХ–ХІІ сегментів зі спинного боку. Це дозволяло виокремити та детально розглянути будову сперматеки, атріуму та насінних воронок. Після розтину проводили опис та замальовування і фотографування статевої системи за допомогою мікроскопічної камери LeicaX. Під час вивчення травної та статевої систем визначали розташування їхніх частин відносно сегментів тіла. Якщо розтин був

неможливий через малу кількість зразків або їхні малі розміри, ці ознаки вивчалися на тимчасових препаратах під світловим мікроскопом Granum Lux 6 за допомогою методу фазового контрасту та темного поля.

2.5. Дослідження локалізації бранхіобделід на річкових раках

Для вивчення місць прикріплення бранхіобделід досліджувані раки (*Astacus leptodactylus*) поміщалися в ємність з проточною водою. Тіло рака умовно поділили на кілька ділянок – «екологічних ніш». За допомогою пензлика або пінцета з цих ділянок збирали ектосимбіонтів. Зібрані бранхіобделіди переносилися в невелику ємність з проточною водою. Кількість знайдених екземплярів бранхіобделід на кожній ділянці тіла рака фіксувалася в таблиці.

Для дослідження взаємодії бранхіобделід з різними видами раків використовувався спеціальний підхід. Бранхіобделіди поміщалися в окремі ємності, які по черзі розміщувалися в акваріумах з ізольованими різними видами раків. Кожен експеримент тривав від 1 до 3 днів, після чого ємність з бранхіобделідами та досліджуваний рак виймалися для аналізу. На першому етапі перевіряли саму ємність на наявність бранхіобделід, які могли залишитися неприкріпленими до рака. Для цього уважно оглядали стінки ємності та воду за допомогою пінцета або пензлика. Потім проводився ретельний пошук бранхіобделід на тілі рака. Для цього рака уважно оглядали під бінокляром або лупою, звертаючи увагу на типові місця прикріплення симбіонтів, такі як зябра, кінцівки або нижня частина тіла.

Отримані результати фіксувалися в таблиці, де вказувалися такі параметри:

- вид рака;
- кількість бранхіобделід, знайдених у ємності;
- кількість бранхіобделід, знайдених на тілі рака;
- тривалість експерименту (1, 2 або 3 дні);
- додаткові спостереження (наприклад, поведінка рака або стан бранхіобделід).

Ця методика дозволила систематизувати дані про прикріплення бранхіобделід до різних видів раків та виявити закономірності їхньої взаємодії. Запис результатів у

таблицю забезпечив зручність подальшого аналізу та порівняння між різними видами раків.

2.6. Молекулярні методи аналізу

Виділення ДНК. Оскільки розміри бронхіобделід досить маленькі (декілька мм), ми брали цілий екземпляр для виділення ДНК. Перед виділенням, цей екземпляр ідентифікувався до виду з виділенням щелеп і репродуктивної системи, фотографувався. Для запобігання контамінації, ми видаляли кишківник, оскільки в ньому часто містяться хірономіди, водорості та інфузорії. Геномна ДНК виділялася за допомогою набору GeneElute Mammalian Genomic DNA miniprep від Sigma-Aldrich (Стайнгайм, Німеччина) принципом зв'язувальних колонок за протоколом “tissue kit preparation”. До пробірки вносили 180 мкл Lysis Solution T та 20 мкл протеїнази K, вортексували та інкубували при 55°C протягом 3–6 годин до повного розчинення зразків. Потім додавали 20 мкл RNase A Solution та інкубували 2 хвилини при кімнатній температурі. Колонки підготовляли шляхом внесення 500 мкл Column Preparation Solution, центрифугування при 12000 g (1 хвилина) та видалення фільтрату. До пробірки додавали 200 мкл Lysis Solution C та 200 мкл холодного етанолу, ретельно перемішували. Суміш переносили до колонки, центрифугували при 6500 g (1 хвилина), фільтрат видаляли. Колонку двічі промивали 500 мкл Wash Solution (центрифугування при 6500 g, 1 хвилина, та при 12000-16000 g, 3 хвилини). ДНК відділяли (“elution”) додаванням 40 мкл Elution Solution, інкубацією 5 хвилин та центрифугуванням при 6500 g (1 хвилина), повторювали з 40 мкл розчину. Отриману ДНК (80 мкл) зберігали при температурі -20°C.

Перевірка концентрації ДНК. Концентрація ДНК вимірювалася за допомогою спектрофотометра NanoDrop. Цей прилад дозволяє визначити концентрацію нуклеїнових кислот на основі їхнього поглинання при довжині хвилі 260 нм. Крім того, за допомогою співвідношення показників поглинання при 260 нм та 280 нм (A260/A280) була оцінена чистота зразків ДНК (Рис. 2.3). Оптимальне

співвідношення A260/A280 для чистої ДНК становить приблизно 1.8–2.0, що свідчить про відсутність значних домішок білків або органічних сполук.

Report		Test Type		Nucleic Acid		Date/time	
Nano Drop		DNA					
Sample ID	User ID	Date	Time	ng/ul	A260	A280	260/280
M1	Default	9.6.2023	11:24	10,44 ✓	0,209	0,095	2,20
M2	Default	9.6.2023	11:26	3,36 ✓	0,067	0,035	1,94
M3	Default	9.6.2023	11:28	3,31 ✓	0,066	0,040	1,64
M4	Default	9.6.2023	11:29	2,69 ✓	0,054	0,021	2,57
M5	Default	9.6.2023	11:30	1,81 ✓	0,036	0,011	3,45
M6	Default	9.6.2023	11:31	26,70	0,534	0,272	1,96
M7	Default	9.6.2023	11:32	24,18	0,484	0,261	1,85
M8	Default	9.6.2023	11:33	24,57	0,491	0,267	1,84

Рисунок 2.3. Результат спектрофотометра NanoDrop. П'ятий стовпчик відображає концентрацію ДНК у ng/ul. Останній стовпчик демонструє співвідношення показників поглинання A260/A280, що відображає наявність домішок органічних сполук або білків.

Модифікації умов ПЛР та протоколів ампліфікації

Модифікація часу плавлення, кількості циклів і температури підпалу.

Ми використовували стандартну програму ампліфікації для фрагменту 16S.

16s (ar-br)

Initial denaturation 94°C 4 min

Number of cycles : 35

Denaturation : 94°C 30 sec

Annealing: 47°C 30 sec

Elongation : 72°C 45 sec

Final Elongation **72°C** **5 min** Програми ампліфікації для фрагментів CO1, 28S та ITS були модифіковані нами в рамках цієї роботи.

Для фрагменту 28S, який є досить довгим (близько 800 пар основ), ми подовжили час елонгації з 80 секунд до 120 секунд. Для підвищення виходу продукту при низькій концентрації матриці ми також збільшили кількість циклів з 30 до 40. Крім того, ми знизили температуру підпалу з 50°C до 47°C. При температурі 50°C праймери не могли стабільно зв'язуватися з матрицею, тоді як при температурі нижче 47°C спостерігалось неспецифічне зв'язування, що призводило до ампліфікації небажаних ділянок.

28s			28s		
(lev3-des5)	our modification		(lev3-des5)	standart	
Initial			Initial		
denaturation	94°C	3 min	denaturation	94°C	3 min
Number of cycles :			Number of cycles :		
	40			30	
Denaturation :	94°C	45 sec	Denaturation :	94°C	45 sec
Annealing:	47°C	60 sec	Annealing:	50°C	60 sec
Elongation :	72°C	120 sec	Elongation :	72°C	80 sec
Final			Final		
Elongation	72°C	3 min	Elongation	72°C	3 min

Для фрагменту COI ми модифікували лише температуру підпалу, підвищивши її з 46°C до 48°C. За таких умов ми спостерігали підвищення специфічності зв'язування праймерів.

COI			COI		
(HCO-LCO)	our modification		(HCO-LCO)	standart	
Initial			Initial		
denaturation	94°C	3 min	denaturation	94°C	3 min

Number of cycles :	35	
Denaturation :	94°C	45 sec
Annealing:	48°C	45 sec
Elongation :	72°C	60 sec
Final		
Elongation	72°C	3 min

Number of cycles :	35	
Denaturation :	94°C	45 sec
Annealing:	46°C	90 sec
Elongation :	72°C	60 sec
Final		
Elongation	72°C	2 min

Для фрагменту ITS ми підвищили температуру підпалу з 45°C до 50°C, щоб забезпечити більш специфічне зв'язування праймерів. Крім того, ми змінили час елонгації з 90 секунд до 120 секунд, оскільки цей фрагмент ДНК у різних видів бронхіобделід варіює від 650 до 900 пар основ, і для його синтезу було недостатньо 90 секунд.

ITS (its3-its4)	our modification		ITS (its3-its4)	standart
Initial			Initial	
denaturation	94°C	3 min	denaturation	94°C 7 min
Number of cycles :	30		Number of cycles :	30
Denaturation :	94°C	45 sec	Denaturation :	94°C 45 sec
Annealing:	50°C	45 sec	Annealing:	45°C 60 sec
Elongation :	72°C	120 sec	Elongation :	72°C 90 sec
Final			Final	
Elongation	72°C	3 min	Elongation	72°C 7 min

Зміна програм ампліфікації: зміна температури плавління (“touch up PCR”, “re-amplification”).

При роботі зі старими музейними зразками, ми зіткнулися із складнощами при ампліфікації фрагменту CO1, що, ймовірно, пов'язано з частковим пошкодженням ДНК. Тому для цього фрагменту CO1 було застосовано метод **“touch up PCR”**.

COI (HCO-LCO)	“touch up PCR”
----------------------	-----------------------

Initial		
denaturation	94°C	3 min
Number of cycles :	35	
Denaturation :	94°C	45 sec
	42°C - - -	
Annealing:	48°C	90 sec
Elongation :	72°C	60 sec
Final		
Elongation	72°C	3 min

Ми запрограмували ампліфікатор таким чином, щоб температура підпалу поступово підвищувалась під час циклів полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР), що дозволило оптимізувати зв'язування праймерів з матрицею ДНК та мінімізувати утворення неспецифічних продуктів. Реакцію

ініціювали при нижчій температурі у 42°C, що забезпечувало початкове зв'язування праймерів навіть за умови їхньої неідеальної специфічності. Після кожного циклу температуру відпалювання підвищували на 0,5–1 °C, що сприяло зменшенню неспецифічного зв'язування праймерів. На кінцевих циклах ПЛР температуру доводили до оптимального значення у 48°C, що забезпечувало високу специфічність ампліфікації. Час підпалу збільшили від 45 сек до 90 сек.

COI (HCO-LCO)	PRE-AMP "re-amplification"	COI (HCO-LCO)	POST-AMP "re-amplification"
Initial			
denaturation	94°C	3 min	
Number of cycles :	15		
Denaturation :	94°C	45 sec	
Annealing:	48°C	30 sec	
Elongation :	72°C	1.45 min	
Final			
Elongation			72°C
			3 min

Також для фрагменту CO1 та фрагменту 16S ми застосовували метод **"re-amplification"** або метод повторної ампліфікації. Ми його використовували для тих зразків, де кількість ампліфікованого продукту після первинної ПЛР була недостатньою для секвенування. Також ми його використовували у деяких зразках, де були наявні неспецифічні продукти. Цей метод дозволив отримати достатню кількість високоспецифічного продукту для подальшого секвенування, що є особливо важливим при роботі з низькоконцентрованими або деградованими зразками ДНК.

Спочатку ми отримали продукт первинної ПЛР. Після чого цей продукт використали як матрицю для повторної ампліфікації з використанням тих самих праймерів. Умови реакції (температура відпалювання, концентрація праймерів, нуклеотидів та ДНК-полімерази) були адаптовані для досягнення максимальної ефективності та специфічності ампліфікації:

16s (ar-br)	PRE-AMP		16s (ar-br)	POST-AMP	
Initial denaturation	94°C	3 min	Initial denaturation	94°C	3 min
Number of cycles :	15		Number of cycles :	34	
Denaturation :	94°C	45 sec	Denaturation :	94°C	45 sec
Annealing:	47°C	30 sec	Annealing:	55°C	45 sec
Elongation :	72°C	1.45 min	Elongation :	72°C	90 sec
Final Elongation	72°C	3 min	Final Elongation	72°C	3 min

Модифікація концентрації компонентів реакції. Для приготування суміші для ПЛР ми використовували наступні реагенти KAPA 2G ROBUST Polymerase (Biolabs):

DNA	1,0 µl
Volume PCR	15,0 µl
<hr/>	
KAPA 2G buffer A (5x)	3,00 µl
dNTP	1,50 µl
Cresol RED	1,50 µl
MgCl ₂ (25x)	0,50 µl
primLCO(20uM)F	0,20 µM
PrimHCO(20uM)R	0,20 µM
KAPA 2G robust poly.	0,10 µM
UHQ water	8,00 µl

Модифікація концентрації праймерів. При низькій концентрації вихідної ДНК (менше ніж 10 ng) ми збільшували концентрацію праймера з 0,6 µM до 1 µM, щоб підвищити ймовірність їх зв'язування з цільовою ділянкою.

Модифікація концентрації MgCl₂. При наявності неспецифічних фрагментів ми збільшували концентрацію Mg²⁺ з 0,5 µl до 1 µl. Іони Mg²⁺ сприяють стабільному

зв'язуванню праймерів з цільовими ділянками. Це допомагає уникнути неспецифічної ампліфікації.

Праймери для дослідження. У Таблиці 2.2 наведено інформацію про праймери для кожного генетичного локусу, які були використані нами у філогенетичних дослідженнях.

Таблиця 2.2. Праймери, використані в дисертаційному дослідженні.

Ген, локус	Праймер	Послідовність праймера 5' - 3'	Посилання на авторів
<i>Мітохондріальні:</i> CO1	LCO1490	GGTCAACAAATCATAAAGATATTG	Folmer et al., 1994
	HCO2198	TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAAT	
16S rDNA	Ar	CGCCTGTTTA5CAAAAACAT (5* INOSINE)	Simon et al., 1991
	Br	CCGGTCTGAACTCAGATCA	
<i>Ядерні:</i> 28S rDNA	lev3	GCCCTTAAAATGGATGGCGCT	Zakšek et al., 2007
	des5	CCGCCGTTTACCCGCGCTT	
ITS	its3	GCATCGATGAAGAACGCAGC	White et al., 1990
	its4	TCCTCCGCTTATTGATATGC	

Визначення якості і розмірів продуктів ПЛР. Для перевірки розмірів отриманих продуктів ПЛР був використаний метод електрофорезу в агарозному гелі. Агарозний гель ми готували 1 відсотковий (1 гр агарози на 100 мл ТАЕ-буферу). Для

візуалізації продуктів ПЛР після електрофорезу в агарозному гелі використовувався барвник Mildori Green або бромід етидію . Гель інкубувався з барвником протягом 20–30 хвилин, після чого фрагменти ДНК візуалізували під УФ-світлом. Mildori Green був обраний через його низьку токсичність та простоту утилізації. Зразки ДНК разом із ДНК-маркером (Gene Ruller 100 bp plus) відомої довжини були внесені у лунки гелю та піддані електрофорезу. Під дією електричного поля фрагменти ДНК розділилися за розміром: менші фрагменти рухалися швидше, ніж більші. Розміри продуктів ПЛР були визначені шляхом порівняння їхнього положення в гелі з відповідними фрагментами ДНК-маркера (Рис. 2.4).

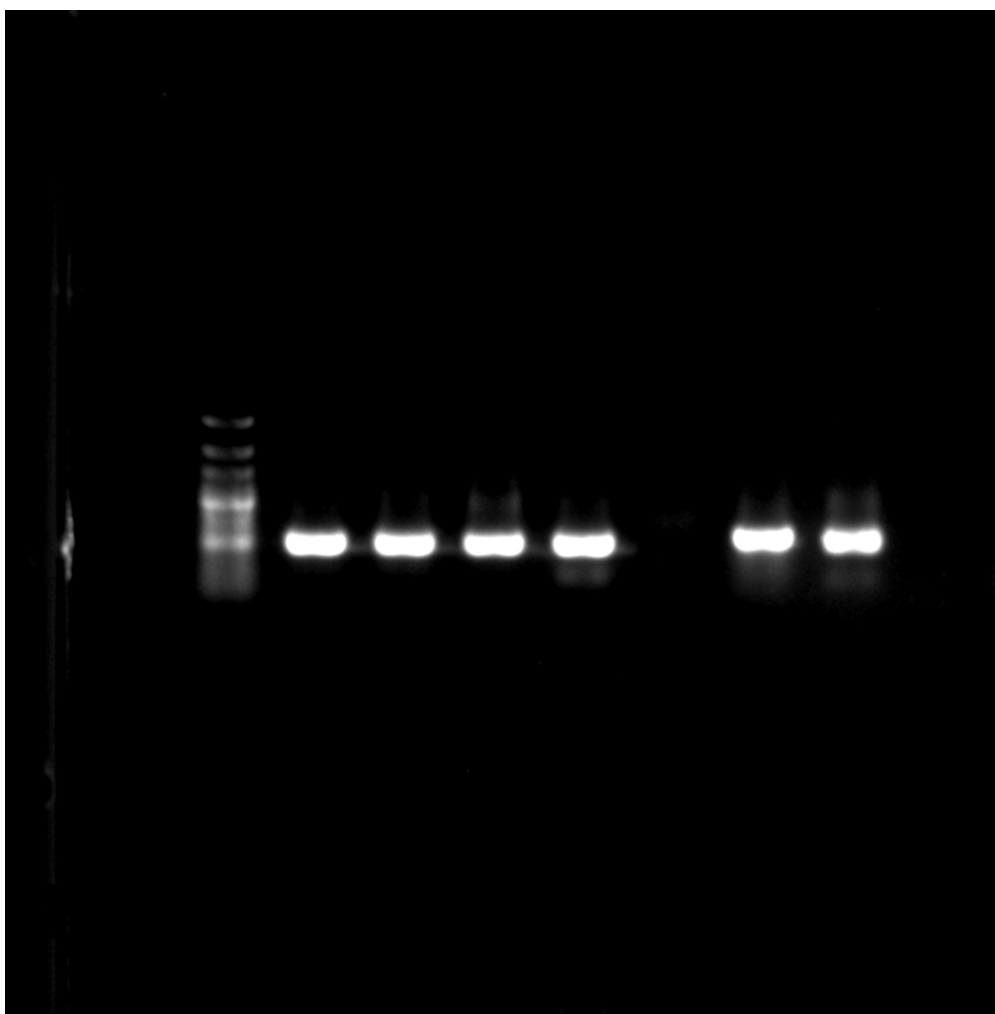


Рисунок 2.4. Результат електрофорезу в агарозному гелі. Представлений фрагмент 16S довжиною у 500 пар основ. Перший стовпчик (лінійка) смужок - маркер розміру фрагментів - Gene Ruller 100 bp plus. Усі зразки відповідають необхідному фрагменту, довжиною у 500 пар основ. П'ятий зразок зліва не ампліфікувався.

Останній зразок - негативний контроль (відсутність смужки), передостанній - позитивний контроль.

Очищення продуктів ПЛР. Для очищення продуктів ПЛР були використані ферменти **EXO** (екзонуклеаза) та **FastAP** (швидка лужна фосфатаза) у розрахунку 1 мкл FastAP та 0.2 мкл EXO на один зразок об'ємом у 10 мкл. EXO фермент видаляє одностричкові ДНК, включаючи залишки праймерів, тоді як FastAP здійснює дефосфорилування 5'-кінців ДНК, що запобігає самолігації фрагментів. Після інкубації з ферментами суміш нагрівалася у ампліфікаторі до 73°C протягом 45 хвилин для інактивації ферментів. Очищені продукти ПЛР були підготовлені для подальшого етапу секвенування і надіслані у MacroGen Europe B.V. (Амстердам, Нідерланди) (Рис. 2.5).



Рисунок 2.5. Надсилання зразків на секвенування у MacroGen Europe B.V. (Амстердам, Нідерланди).

Редагування і вирівнювання послідовностей у програмі Geneious Prime 2022.2.1

Об'єднання (Assembly) секвенованих послідовностей. Процес об'єднання сирих послідовностей, відомий також як "консенсусне збирання", передбачало імпорт

окремих фрагментів ДНК (“reads”), отриманих в результаті секвенування у форматах *FASTQ* або *FASTA*. Для об’єднання послідовностей застосовували модуль De Novo Assembly, що дозволяє скласти повнішу картину послідовностей шляхом знаходження перекриттів між фрагментами (Рис. 2.6). Після цього у зібраних послідовностях оцінювалася довжина, якість та перевірялася належність до бранхіобделід за допомогою вбудованою у платформу Geneious Prime функцією BLAST. На цьому етапі контаміновані послідовності видалялися.

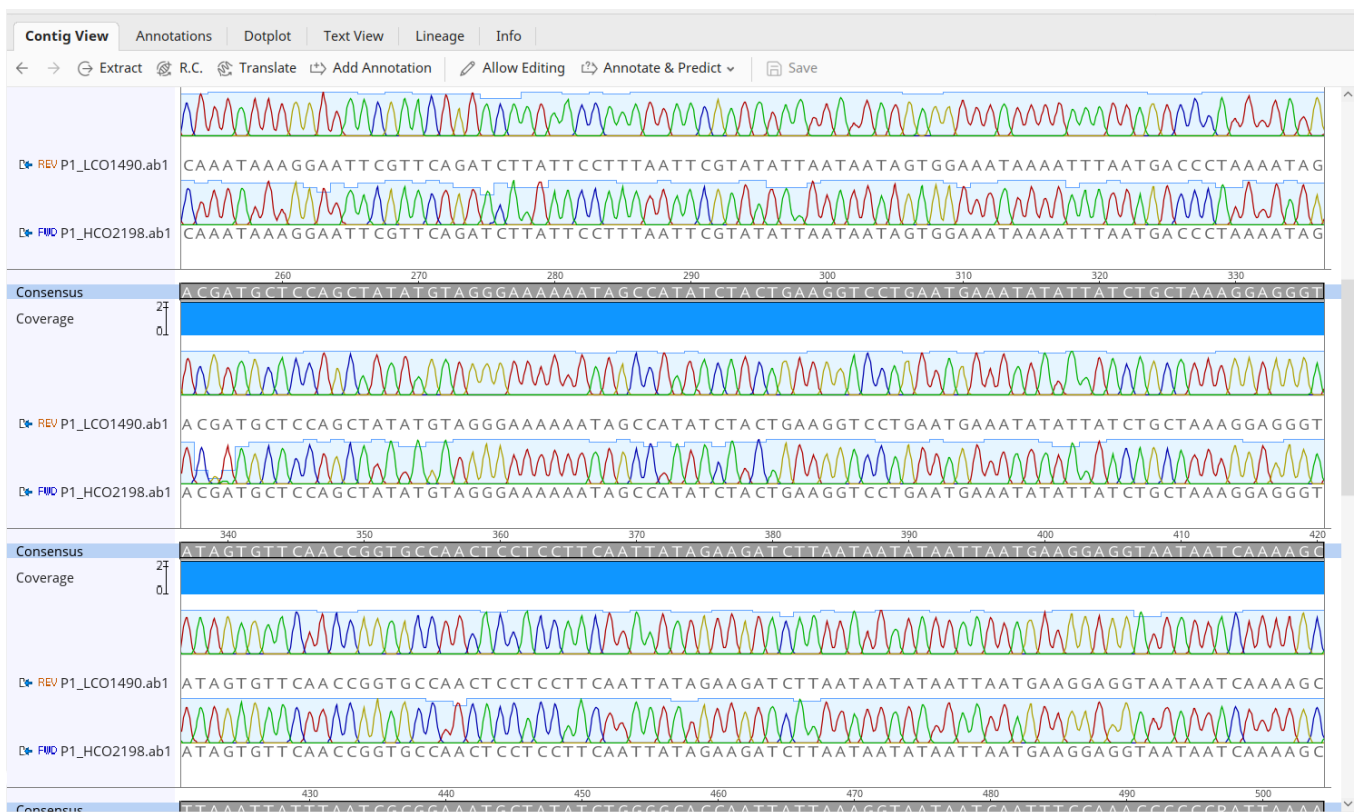


Рисунок 2.6. Хроматограми об’єднаних послідовностей, отриманих в результаті секвенування з використанням прямого та зворотного праймерів (скріншот програми Geneious Prime).

Вирівнювання послідовностей. Після об’єднання послідовностей наступним кроком є їх вирівнювання. У Geneious Prime вирівнювання здійснювалося за допомогою алгоритмів, таких як MAFFT або MUSCLE (Рис. 2.7). Для фрагмента CO1 вирівнювання здійснювалося з MAFFT v7.38860, використовуючи алгоритм

E-INS-і з матрицею оцінки 1PAM/k = 2. Крім того, Geneious Prime надає можливість візуалізації результатів вирівнювання, що дозволяє легко ідентифікувати варіації в послідовностях, швидко повертатися до хроматограми, знаходити невідповідності і виправляти їх вручну (Рис. 2.8). Після вирівнювання фрагменти, що відповідають праймерам, були знайдені і видалені вручну. Фрагмент CO1 був перевірений на стоп-кодони на рівні амінокислот у програмі MEGA 11 (Kumar et al., 2018).

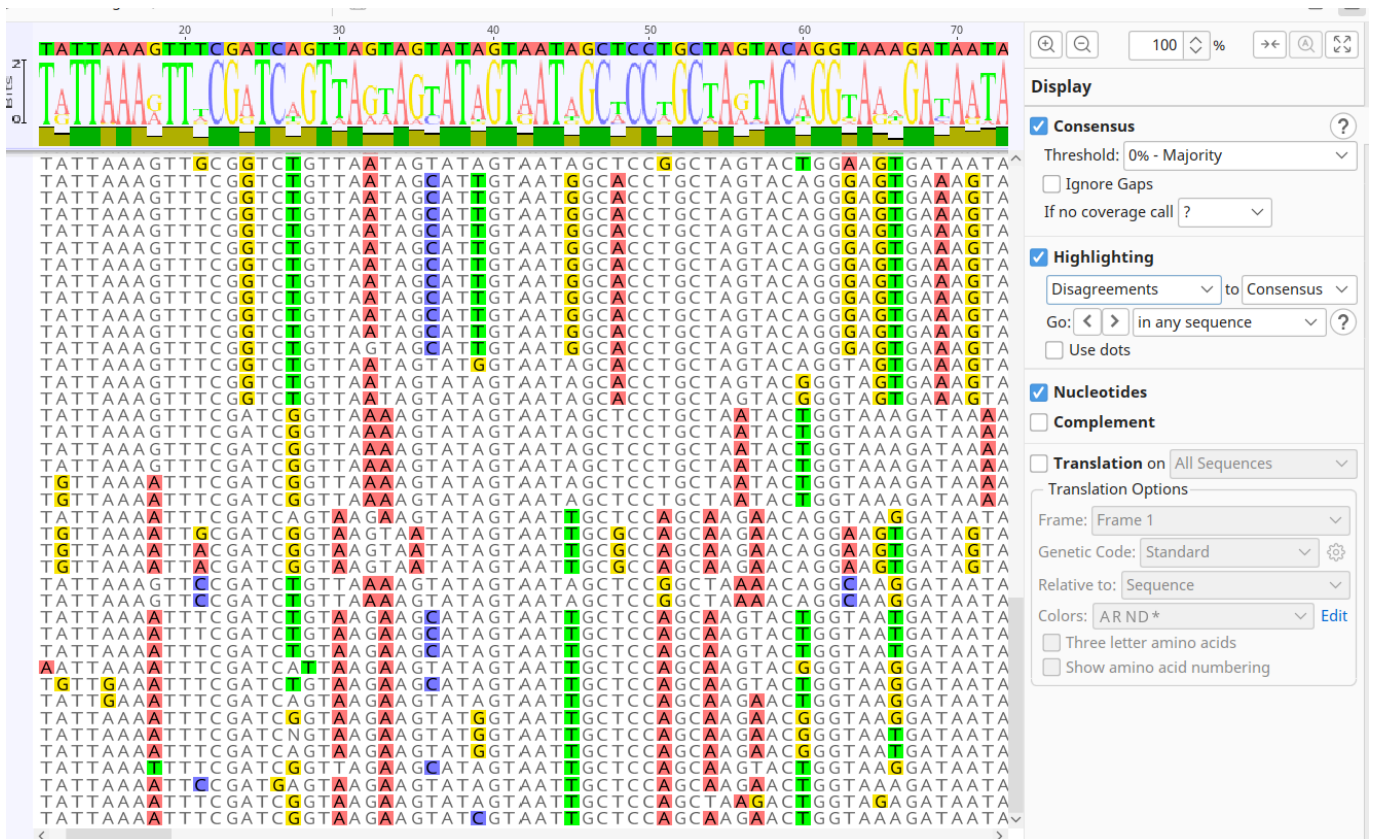


Рисунок 2.7. Вирівнювання послідовності CO1 у програмі Geneious Prime, отримане за алгоритмом MAFFT.

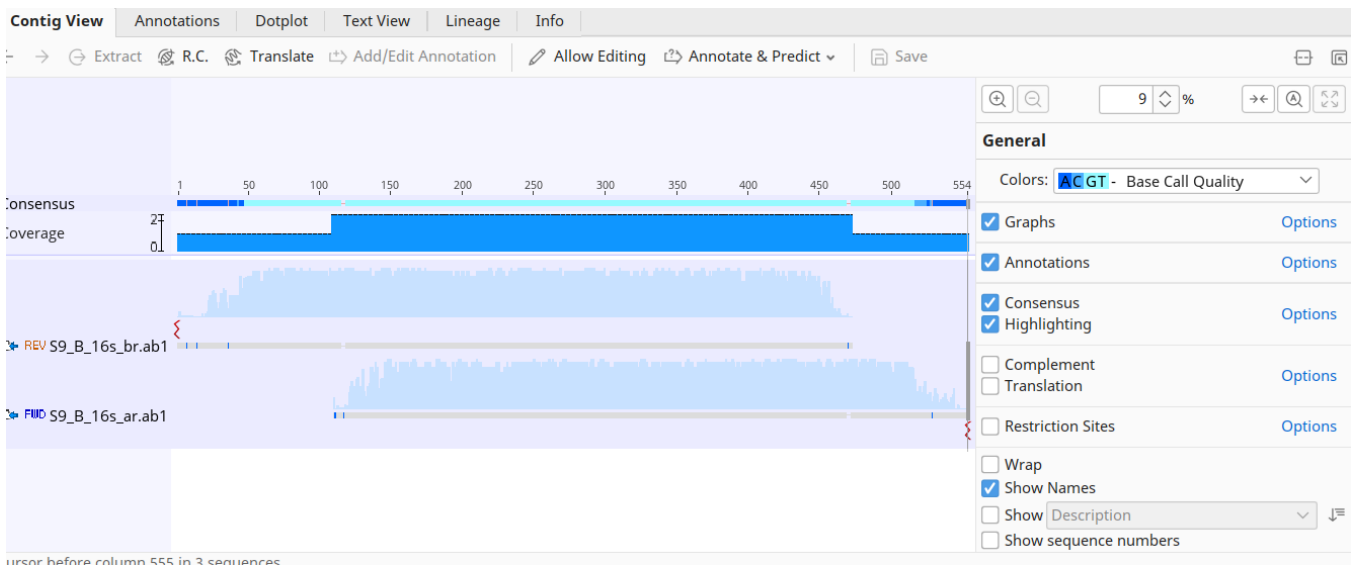


Рисунок 2.8. Перевірка якості консенсусної послідовності гену 16S у програмі Geneious Prime.

Методи філогенетичного аналізу. Філогенетичний аналіз проводили, використовуючи критерії Максимальної правдоподібності, Баєсового висновування. Ці дві методології використовують еволюційні моделі.

Критерій Максимальної правдоподібності. Для побудови філогенетичного дерева за кожним маркером окремо або за всіма маркерами разом використовували онлайн-версію програми IQ-TREE <http://iqtree.cibiv.univie.ac.at/> (Trifinopoulos et al., 2016). Попередньо підготовлені та вирівняні послідовності у форматі FASTA завантажували на сервер.

Вибір моделі субституції (моделі еволюції) для побудови філогенетичного дерева виконувався за допомогою вбудованого інструменту ModelFinder (Kalyaanamoorthy et al., 2017). Цей інструмент автоматично підбирає оптимальну модель субституції на основі критеріїв BIC (Bayesian Information Criterion), AIC (Akaike Information Criterion) та AICc (скоректований AIC). Для цього у розділі "Substitution Model" було обрано опцію "Auto", що дозволило програмі проаналізувати набір даних та визначити найкращу модель. Після завершення аналізу IQ-TREE надавав звіт із назвою обраної моделі, її параметрами (частоти нуклеотидів, швидкості переходів/трансверсій, параметри гамма-розподілу) та

значеннями критеріїв (BIC, AIC, AICc), що дозволяло оцінити якість підбору моделі. Для реконструкції дерева застосовували метод Максимальної правдоподібності (Maximum Likelihood). Надійність гілок оцінювали за допомогою ультрашвидкого методу бутстрепа (Ultrafast Bootstrap) (Minh et al., 2013) з 1000 реплік. Після завершення аналізу отримане філогенетичне дерево у форматі “.newick” завантажували для подальшої візуалізації та аналізу.

Баєсове висновування. Побудова філогенетичного дерева за допомогою програми MrBayes, ver. 3.0b4. Попередньо підготовлені та вирівняні послідовності у форматі NEXUS завантажували до програми. Вибір моделі еволюції здійснювали за допомогою програми Kakusan, що дозволило визначити найбільш підходящу модель для кожного фрагменту ДНК. Вхідний файл для MrBayes містив інформацію про розподіл даних на частини (partitions), якщо такі були, та вибрану модель еволюції для кожної частини.

Аналіз проводили за допомогою двох незалежних запусків (runs) з чотирьох ланцюгів Маркова (Markov chains) кожен, один з яких був "гарячим" (heated), для забезпечення ефективного дослідження простору дерев. Кількість генерацій (generations) встановлювали на рівні 1–2 мільйони, з відбором кожного 1000-го дерева. Збіжність аналізу контролювали за допомогою параметру стандартного відхилення розподілу ймовірностей (average standard deviation of split frequencies), який мав бути меншим за 0,01.

Після завершення аналізу перші 25% дерев відкидали як "випалювання" (burn-in), а на основі решти дерев будували консенсусне дерево. Підтримку гілок оцінювали за допомогою апостеріорних ймовірностей (posterior probabilities), значення яких вказували на надійність кожної гілки.

Візуалізація отриманих результатів філогенетичного аналізу.

Візуалізацію отриманих дерев проводили за допомогою програм FigTree V. 1.4.4 (Rambaut, 2018) та iTOL (Letunic & Bork, 2021), що дозволило детально дослідити топологію дерева та інтерпретувати результати з урахуванням значень

підтримки гілок. Подальше редагування дерев відбувалося у графічному редакторі Inkscape (v.1.2) та частково у Biorender (<https://app.biorender.com>). Результати делімітації та нетворки, отримані в PopArt (Leigh, JW, Bryant D, 2015), також редагувалися в цій програмі.

Методи делімітації видів

Для делімітації видів ми використовували послідовності одного мітохондріального гена CO1 та декількох (CO1, 28S та 16S) для багатолокусної делімітації видів. Спочатку ми створили набір даних послідовностей CO1 всіх відомих видів *Branchiobdella* для Західної Палеарктики. Використовуючи вирівнювання, ми визначали MOTU (молекулярні оперативні таксономічні одиниці) за допомогою методів однолокусної делімітації, заснованих на генетичних відстанях: Automatic Barcode Gap Discovery (ABGD) (Puillandre et al., 2012), Assemble Species by Automatic Partitioning (ASAP) (Puillandre et al., 2021) та на оцінці нуклеотидних заміщень на філогенетичних деревах: Poisson Tree Processes (PTP) (Zhang et al., 2013). Переваги та недоліки використаних методів делімітації можна подивитися у Додатках.

Алгоритм ABGD. Ми імпортували вирівнювання у форматі FASTA на веб-сервер ABGD (<https://bioinfo.mnhn.fr/abi/public/abgd/abgdweb.html>). Ми використовували параметри внутрішньовидової дивергенції між 0.001 і 0.1. Генетичну відстань розраховували за K80 (модель Кімури з двома параметрами (K2P)). Якщо обрано K80, за замовчуванням використовується каппа 2.0, що означає, що ймовірність транзицій удвічі вища за ймовірність трансверсій. JC69 (поправлена відстань p-distance за Juke-Cantor) . В параметрі «Nb bins» ми вказували кількість груп, на які розподіляються генетичні відстані. За замовчуванням вказується 20, але в нашому випадку нам вистачило 10. Параметр «Steps» визначав кількість ітерацій для оптимізації локальних генетичних порогів (в межах первинних MOTU) та делімітації MOTU. Ми не змінювали цей параметр і залишили значення за замовчуванням (10). Як результат ми отримали гістограму відстаней, ранжовані відстані та кількість MOTU.

Алгоритм ASAP. Метод Assemble Species by Automatic Partitioning (ASAP) (Puillandre et al., 2021) базується на попарних генетичних відстанях, так само як і ABGD, але надає оцінку для кожного визначеного MOTU та долає проблему попереднього визначення максимальної внутрішньовидової дивергенції P . Ми запустили ASAP з моделлю заміщень Кімури з двома параметрами на веб-сервері ASAP (<https://bioinfo.mnhn.fr/abi/public/asap/asapweb.html>).

Алгоритм РТР. Цей метод делімітації базується на аналізі філогенетичних дерев. Він аналізує швидкості нуклеотидних заміщень (мутацій) і визначає, де відбувається перехід від внутрішньовидових до міжвидових відмінностей. Цей метод дозволяє виявити, які гілки дерева відповідають окремим видам (Zhang et al., 2013). Ми використовували онлайн-сервер (<http://species.h-its.org/>) для проведення аналізу РТР (Poisson Tree Processes). Для цього аналізу ми видалили дубльовані послідовності, використовуючи тільки унікальні гаплотипи. Спочатку ми визначили філогенетичні зв'язки за допомогою методу Максимальної правдоподібності в IQ-TREE 1.6.7 (Minh et al., 2020; Trifinopoulos et al., 2016), використовуючи автоматичний пошук найкращої моделі заміщень за допомогою ModelFinder (Kalyaanamoorthy et al., 2017). Далі отримане дерево ми завантажували у форматі NEWICK. Після цього, для забезпечення високої точності аналізу, обирали максимальну кількість ітерацій (кроків) МСМС — 500 000, із вибіркою кожні 100 поколінь та відкиданням перших 20% зразків як burn-in.

Аналіз внутрішньовидової різноманітності

Для аналізу популяційних даних ми використовували метод побудови філогенетичних мереж у PopART (Population Analysis with Reticulate Trees). Програма PopART працює з даними у форматі FASTA або NEXUS та будує мережу, поєднуючи гаплотипи на основі їх генетичних відстаней. Кожен вузол мережі представляє гаплотип, а ребра — мутації між гаплотипами. Ми використовували алгоритм TSC (Tree Sequence Collection), який дозволяє аналізувати складні еволюційні процеси, такі як рекомбінація та гібридизація. Він особливо корисний для дослідження популяційної генетики та реконструкції еволюційної історії.

Мережу TSC ми зберігали у вигляді зображення PNG або SVG для подальшого редагування в InkScape за потреби.

Додатково, діапазони внутрішньовидових некорегованих попарних відстаней (p-відстань або генетична відстань) були розраховані для кожного обраного виду за допомогою програми MEGA 11 (Tamura et al., 2021). Цей метод визначає відстань між парами послідовностей шляхом підрахунку кількості відмінностей у нуклеотидних позиціях, поділеної на загальну кількість порівнюваних позицій.

3. РЕЗУЛЬТАТИ. РІЗНОМАНІТТЯ

3.1. Таксономічна диференціація видів роду *Branchiobdella* за морфологічними та анатомічними ознаками.

Форма тіла. Довжина тіла дорослих черв'яків варіюється від 0,8 до 12 мм. Тіло у більшості видів циліндричне, але також може бути сплюснене в спинно-брюшному напрямку, рівномірно потовщене або мати різке потовщення з набуванням пляшкоподібної форми. Тіло безбарвне, розділене на 3 відділи (Рис. 3.1):

- головний відділ з перистоміумом,
- тулубний відділ,
- задній адгезійний диск.

Кількість сегментів постійна, їх 15, і вони відповідають кількості парних гангліїв. Їх прийнято позначати римськими цифрами (I–XV) (див. Brinkhurst & Gelder, 2001).

Головний відділ. Кільцева борозна на передньому кінці головного відділу, яка оточує рот, називається перистоміумом. Головний відділ тіла, як показують дослідження нервової та кровоносної систем, формується з перистоміуму та 3 злитих сегментів.

Тулубний відділ. Складається з 11 сегментів із вторинною сегментацією. Сегменти тулуба позначаються арабськими цифрами (1–11). Вторинна кільчастість тулубного відділу (сегменти V–XIII) дуже схожа на таку у люмбрикулід. Передні 8 сегментів тулубного відділу великі, задні 3 — дрібніші, менш виражені. Кожен тулубний сегмент поділяється на велике переднє кільце та менше заднє. Також існують види, у яких більше кільце поділяється ще на дві частини. До таких відноситься американський рід *Triannulata* (Goodnight, 1940) та китайський рід *Holtodrilus* (Gelder & Brinkhurst, 1990), які мають 3–5 кілець у сегменті.

Адгезивні органи. Задній адгезійний диск утворений XV сегментом. Рух бранхіобделід подібний до руху п'явок і забезпечується переднім та заднім адгезійними органами. Передня адгезійна область розташована на нижній поверхні черевної губи і може бути явно виділена (як у *B. parasita*), або ні. Рот зазвичай

оточений глотковими папілами, які можуть бути добре видні (як у *B. kozarovi*), а можуть бути скорочені при фіксації і не видно поза губами. Перистоміум може бути чітко розділений на спинну та черевну губи за допомогою борозди, губи можуть мати декілька лопастей та мати різні розміри. (Рис. 3.2)

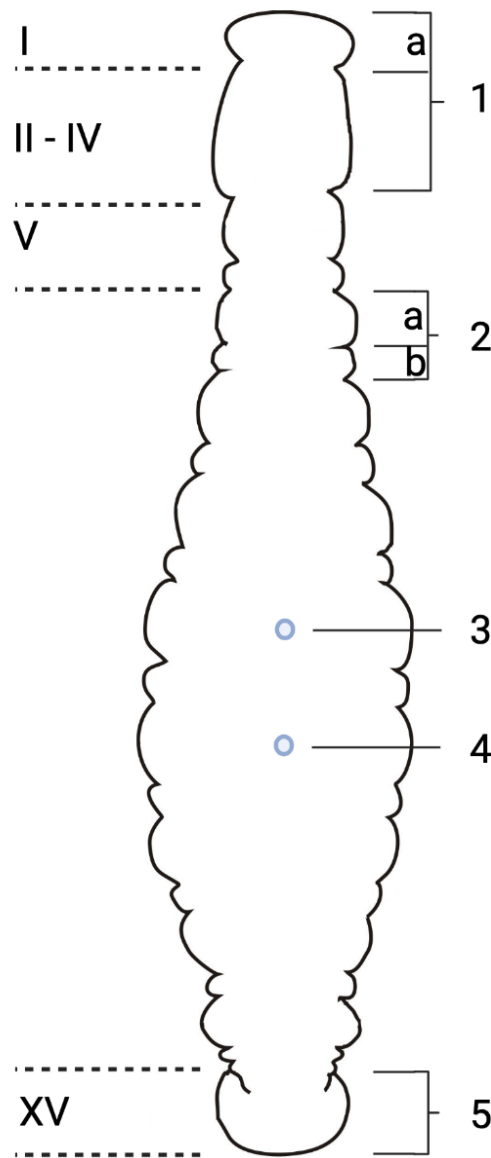


Рисунок 3.1. Схема зовнішньої будови бранхіобделіди. 1 - головний відділ: а - перистоміум; 2 - тулубний сегмент: а – велике кільце, b – мале кільце; 3 - отвір сперматеки; 4 - отвір атріуму; 5 - задній адгезивний диск.

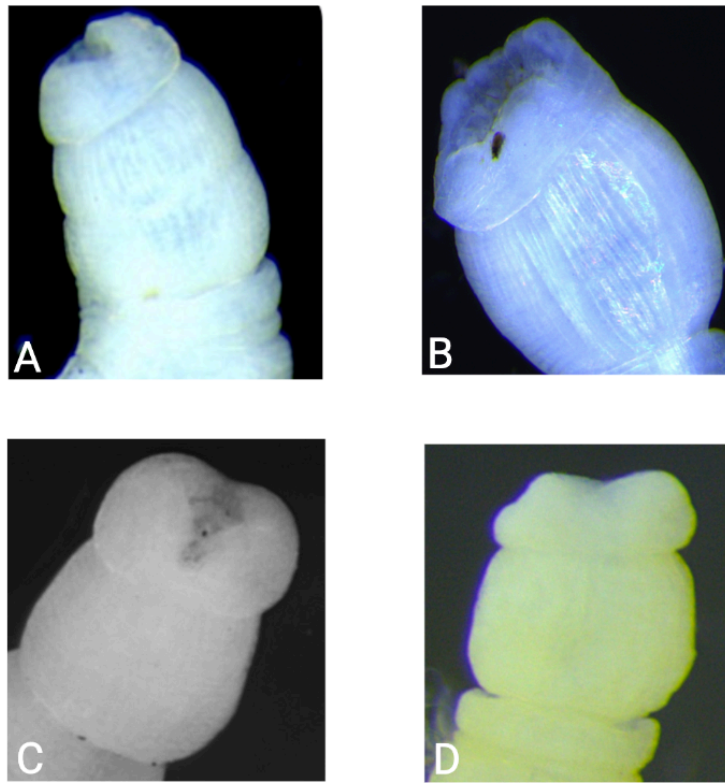


Рисунок 3.2. Варіанти будови перистоміуму: А - *B. hexadonta*; В - *B. parasita*, С - *B. kozarovi*, D - *B. balcanica*.

Задній присосок (адгезійний диск) являє собою м'язисте розростання останнього (XV) сегмента тіла. Подібна до присоска структура змушувала багатьох авторів зближувати бранхіобделід із п'явками. Подальші дослідження виявили відмінності в типах залозистих клітин, які забезпечують прикріплення та переміщення по тілу хазяїна. У бранхіобделід було виявлено два типи залозистих клітин: клейкі адгезійні клітини та клітини, що відокремлюють (Gelder & Rowe, 1998). У розслабленому стані бранхіобделіди прикріплені до субстрату. Клітини, що відокремлюють, виділяють речовину, яка розчиняє контакт із субстратом і дозволяє тварині переміщуватися. При наступному контакті з субстратом знову працюють адгезійні клітини. Така структура відрізняється від структури присоска у Hirudinea.

Травна система. Травна система бранхіобделід складається з глотки, стравоходу, шлунка, кишки та анального отвору. Рот переходить у глотку, яка має ряд папіл, які у

певних видів переходять у щупальця або пальпи. У глотці є пара щелеп (спинна та черевна). Глотка являє собою коротку трубку, вкриту війками, за якою йде прямий і сегментно-опуклий зоб. Середня кишка сегментована і відокремлена від зобу перегородкою між IV та V сомитами. Клітини сегментів середньої кишки значно відрізняються за структурою та функцією. Анальний отвір відкривається на спинній стороні тіла біля основи заднього присоска, у 10 сегменті.

Видільна система. Видільна система бранхіобделід представлена нефридіями, які мають війки. Нефридіїв – 2 пари; їх розташування варіює у різних форм; загалом вони розташовані асиметрично. Передня пара нефридіїв відкривається у VII сегменті, а задня пара розташована у XII сегменті, але відкривається у XIII.

Статева система роду *Branchiobdella*. Статева система бранхіобделід є гермафродитною, тобто кожна особина має як чоловічі, так і жіночі репродуктивні органи. Вона розташована у сегментах тіла IX–XI (Рис. 3.4). У IX та X сегментах знаходиться чоловіча статевая система, а у XI – жіноча. Чоловіча статевая система представлена сім'яниками з сім'япроводами, атріумом та пенісом. Наявна 1 або 2 пари сім'яників, розташованих у сегментах IX та X (або лише в одному з цих сегментів, залежно від виду). Сім'яники виробляють сперматозоїди. Сперма транспортується через сім'япроводи, які з'єднуються в один непарний сім'япровід. Він впадає у атрій – трубчастий орган, який поділяється на залозисту частину з залозистими клітинами та дистальну. Дистальний кінець атріуму переходить у пеніс, який зазвичай здатний вивертатися назовні. Пеніс розташований у пеніальній сумці та використовується для передачі сперми під час копуляції. Чоловічий статевий отвір розташований на черевній лінії X сегмента (Рис. 3.3).

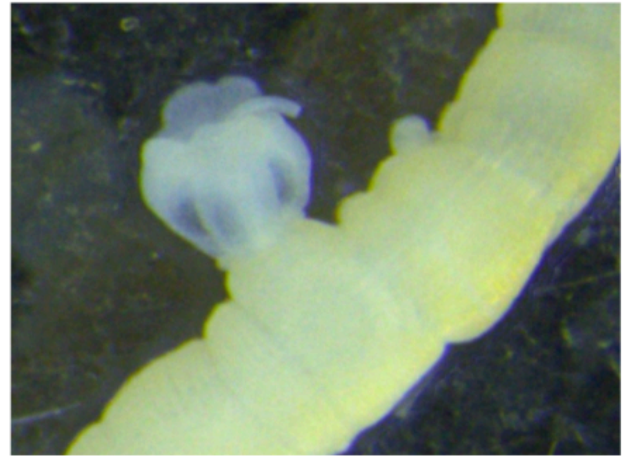
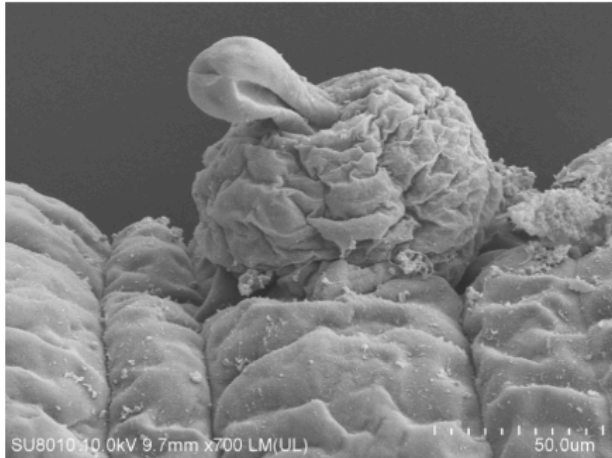


Рисунок 3.3. Копулятивна bursa *B. balcanica* у вивернутому стані.

Жіноча статевая система складається з однієї пари яєчників у XI сегменті, які виробляють яйцеклітини. Вони прикріплені до передньої поверхні перегородки між X та XI сегментами. Яйцеклітини транспортуються через короткі яйцепроводи, які відкриваються назовні на черевній стороні тіла у задній частині XII сегмента.

У IX сегменті розташована сперматека – орган для зберігання сперми після копуляції. Цей орган захищає сперматозоїди від зовнішніх чинників та зберігає сперму до моменту, коли яйцеклітина буде готова до запліднення. Сперматека складається з кількох частин: бульби та зовнішнього каналу (Рис. 3.4). Бульба сперматеки sb (bulb of spermatheca) може бути різної різної форми: від трубчастої у *B. hexadonta* до сферичної у *B. parasita* (Рис. 3.5). Зовнішній канал сперматеки sd (ectal duct of spermatheca) у різних видів може варіювати від зовсім короткого (як у *B. parasita*) та довгого (як у *B. hexadonta*). Бульба сперматеки має малопомітний або добре помітний внутрішній відросток se (ental process), який оточений великою кількістю залозистих клітин.

Функціонування статевої системи. Під час копуляції дві особини обмінюються спермою. сперма передається через пеніс і потрапляє у сперматеку партнера через статеву пору. У сперматеці сперма зберігається до моменту, коли яйцеклітини будуть готові до запліднення. Коли яйцеклітина дозріває, вона виходить з яєчника через яйцепровід у простір між тілом і слизовою оболонкою, яку виділяє клітелум. Сперма вивільняється зі сперматеки через спеціальний отвір і

активізується для запліднення яйцеклітини. Після запліднення зигота (запліднена яйцеклітина) рухається вперед разом із слизовою оболонкою і коли досягає перистоміуму, скорочується, утворюючи кокон, який прикріплюється до поверхні карапаксу або зябер річкового раку - хазяїна.

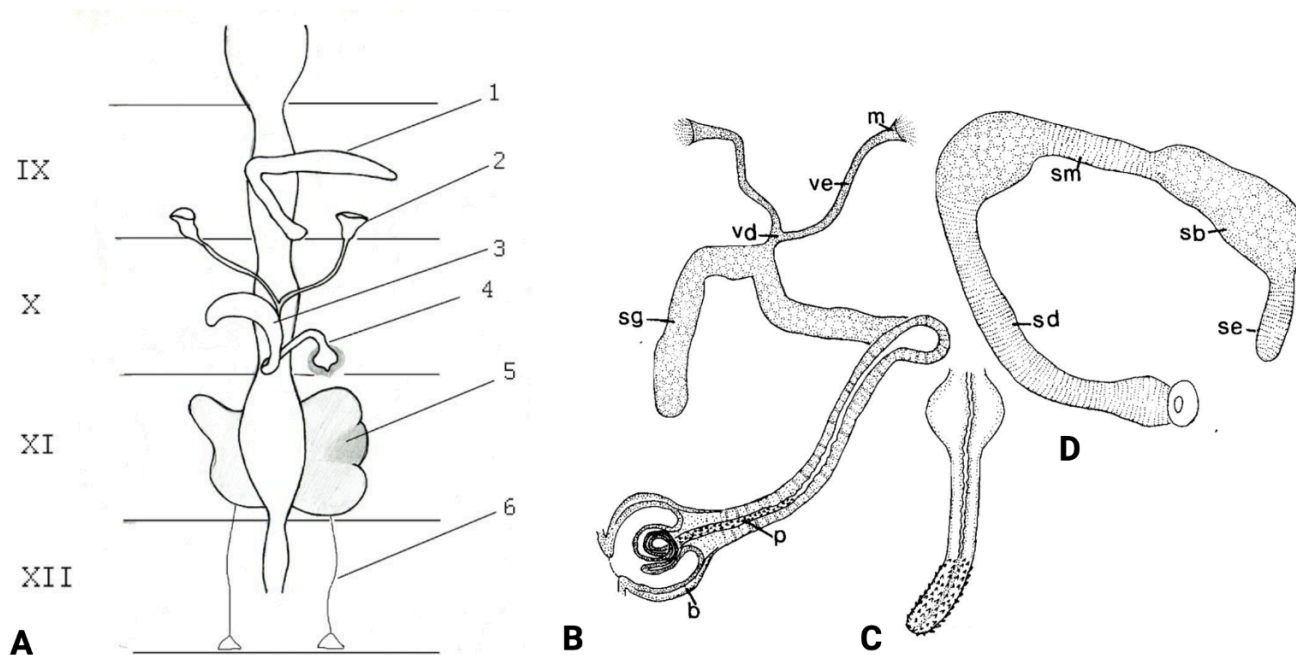


Рисунок 3.4. Розташування елементів статеві системи бранхіобделід: **A:** IX–XII сегменти, 1 – сперматека, 2 – сім'яні воронки, 3 – атріум, 4 – копуляційна сумка, 5 – яєчник, 6 – яйцепроводи. **B:** деталі будови атріуму на прикладі виду *B. astaci*: b, бурса; p, пеніс; sg (spermiducal gland), залозиста частина атріуму; vd (vas deferens) – сім'япровід; ve (vas efferens) – сім'яприймач; m (mail funnels) – сім'яні воронки. **C:** пеніс, вивернутий з копулятивної бурси. **D:** деталі будови сперматеки на прикладі виду *B. astaci*: esd (ectal duct of spermatheca) – зовнішній канал сперматеки; sm – середній канал сперматеки; sb (bulb of spermatheca) – бульба сперматеки; se (ental process)- внутрішній відросток сперматеки (модифіковано за Pop, 1965 та Dorner, 1864).

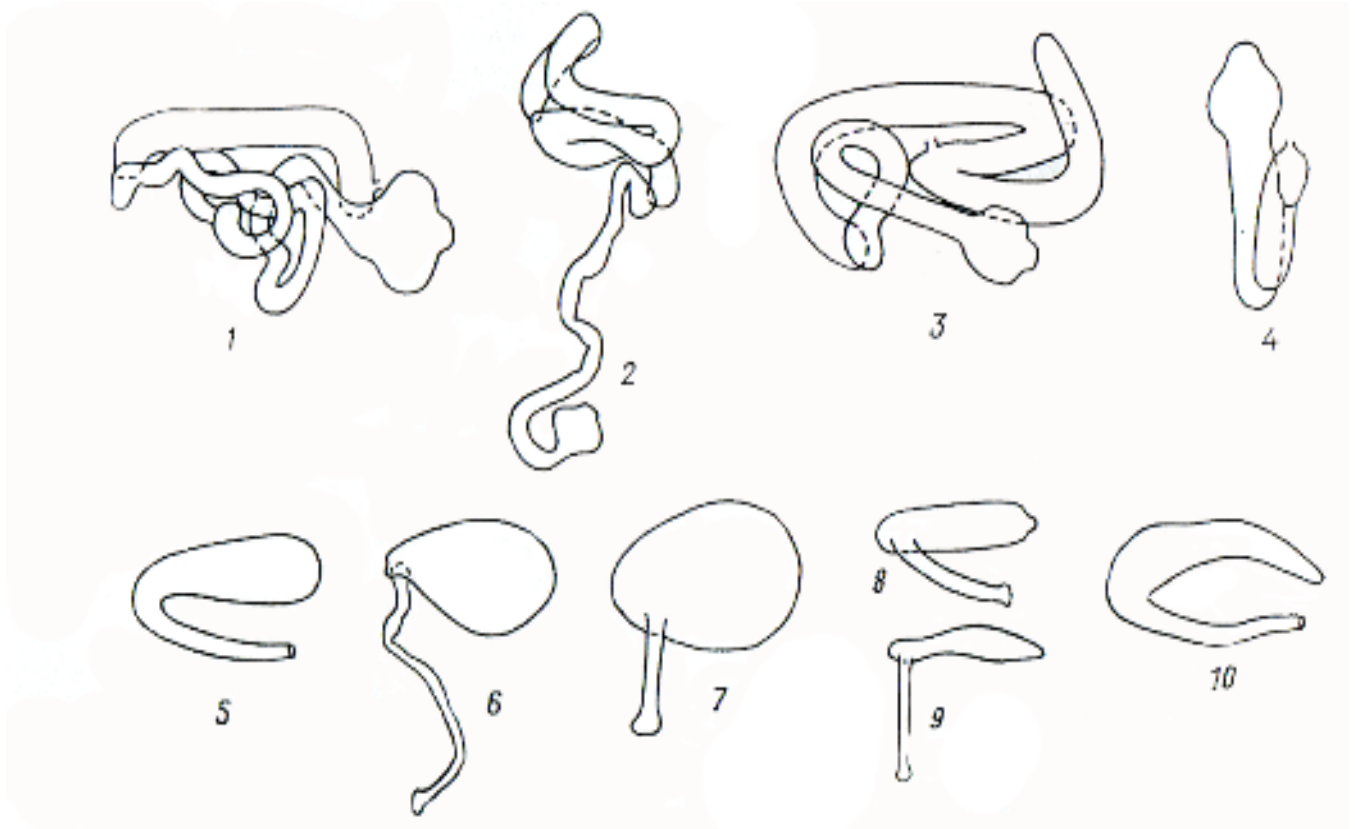


Рисунок 3.5. Схематичні малюнки варіантів будови атріуму та сперматеки (за Karaman, 1970; Kozarov, 1970): 1,5 – *Branchiobdella balcanica*; 2,6 – *Branchiobdella italica*; 3,7 – *Branchiobdella pentodonta*; 4,8-10 – *Branchiobdella kozarovi*.

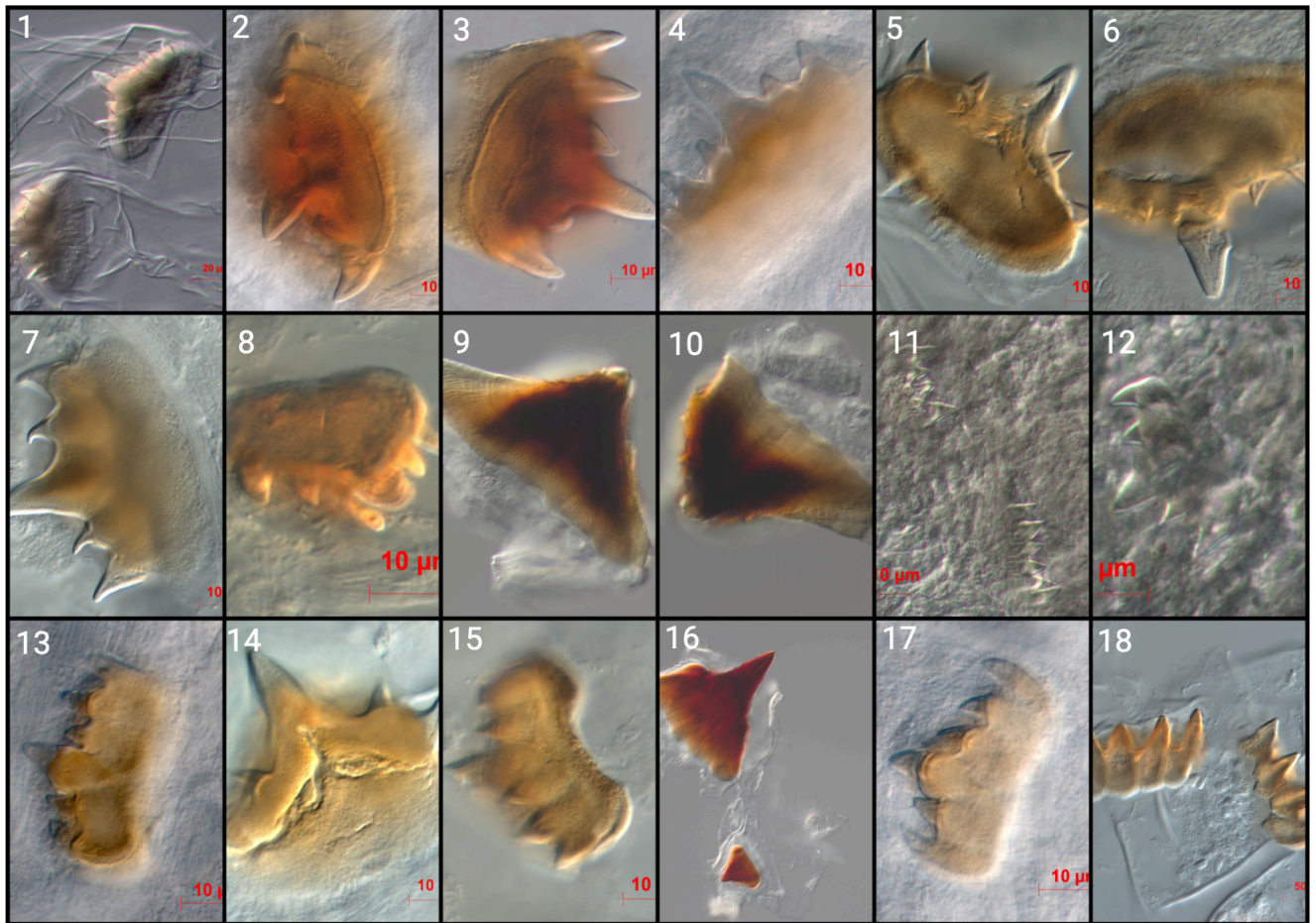


Рисунок 3.6. Варіанти будови щелеп розглянутих в нашій роботі видів бранхіобделід: 1, 5, 6 - *B. balcanica*; 4, 12 - *B. italica*; 2, 3, 7, 14 - *B. pentadonta*; 9, 10 - *B. parasita*; 11 - *B. hexadonta*; 8, 13, 15, 17 - *B. kozarovi*; 16 - *B. astaci*; 18 - *X. victoriensis*.

Будова щелеп. У ротовій порожнині присутній хітиноїдний щелепний апарат, який складається зі спинної та черевної щелеп різного розміру, з зубцями або без них (Рис. 3.6). Ми зосередилися на детальному спостереженні зовнішньої морфології балканських бранхіобделід та пошуку відмінностей між видами на основі морфології їх щелеп, а саме: співвідношення довжини до ширини, кривизни лінії основи щелепи та розташування зубців. Розмір щелеп та кількість зубців вважаються діагностичними ознаками (див. Neseemann, 1999), особливо для *Branchiobdella parasita*, *Branchiobdella astaci* та *Branchiobdella hexadonta*. Однак *Branchiobdella balcanica*, *Branchiobdella pentadonta* та *Branchiobdella italica* важко ідентифікувати,

використовуючи лише морфологію щелеп, оскільки кількість зубців може варіюватися в межах одного виду (Karaman, 1967).

Також ми вимірювали, такі відносні параметри зовнішньої морфології, як співвідношення ширини першого сегмента тулуба (Т1) до ширини четвертого (Т4) та шостого (Т6) сегментів тіла (Рис. 3.7) і виявили їх корисними для розрізнення видів. Подібні пропорційанальні заміри були зроблені Epshtein в його дисертаційній роботі. Приводимо їх далі в описах видів.

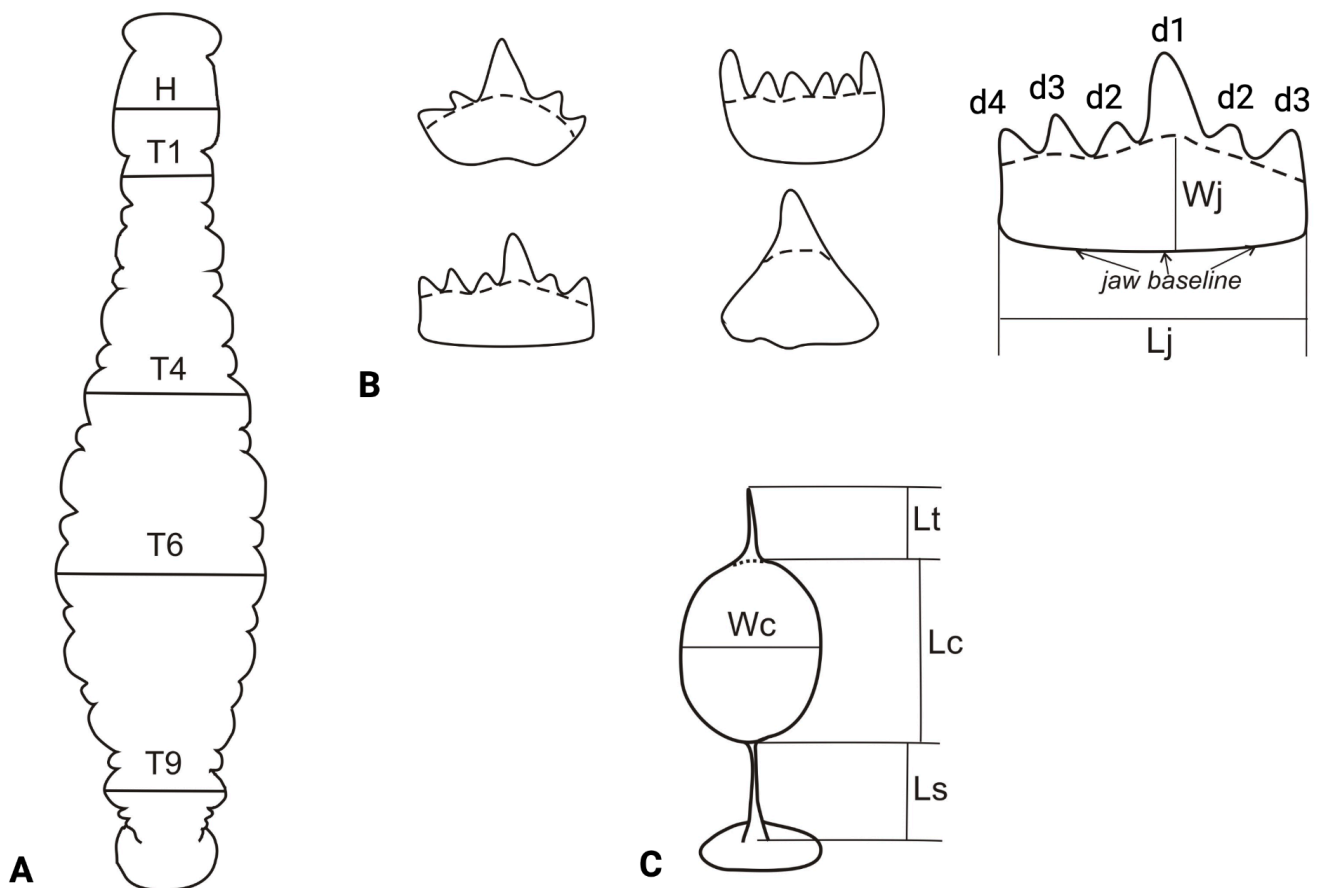


Рисунок 3.7. Морфологічні структури бранхіобделід, важливі для таксономії: А - параметри зовнішньої морфології: Н - ширина голови, Т1 - ширина першого тулубного сегмента, Т4 - ширина ширина 4го тулубного сегменту, Т6 - ширина бго тулубного сегменту, Т9 - ширина 9го тулубного сегменту; В - параметри форми щелепи: Lj - ширина щелепи, Wj - висота щелепи, d1 – середній зуб, d2, d3, d4 –

бічні зуби; С - параметри будови кокону: Wc - ширина кокону, Lc - довжина капсули кокону, Lt - кришечка кокону, Ls - ніжка кокону.

3.2. Фауна бранхіобделід Західної Палеарктики

Дорослі бранхіобделіди були знайдені на ракоподібних із 146 локацій. З них на ракоподібних із 9 локацій були виявлені лише кокони бранхіобделід або вони взагалі не були інфіковані. Досліджені ракоподібні належали до п'яти видів: чотири автохтонні (аборигенні) види Західної Палеарктики – *Astacus astacus* (Linnaeus, 1758), *Austropotamobius torrentium* (Schrank, 1803), *Austropotamobius pallipes* (Lereboullet, 1858) та *Astacus leptodactylus*, а також інтродуковані види – *Orconectes limosus* (Rafinesque, 1817) та *Pacifastacus leniusculus* (Dana, 1852) з Північної Америки. Присутність *Pacifastacus leniusculus* була зафіксована у двох локаціях на північному сході Словенії, тоді як полосатий рак *Orconectes limosus* був знайдений в одній словенській локації, «Тіха при Забарю» (1982 р), на території Білорусі (м. Брест) у 2009 р. та на о. Сицилія (колекція F. Maronne).

Шість європейських видів бранхіобделід – *Branchiobdella balcanica* Moszynski 1937, *Branchiobdella pentadonta* Whitman 1882, *Branchiobdella italica* Canegallo 1929, *Branchiobdella parasita* (Braun 1805), *Branchiobdella hexadonta* Gruber 1882, *Branchiobdella astaci* Odier 1823, *Branchiobdella kozarovi* Subchev 1978 – та північноамериканський вид *Xironogiton victoriensis* Gelder & Hall, 1990 були знайдені або ідентифіковані в колекціях.

Деталі географічного поширення ракоподібних та асоційованих з ними бранхіобделід наведено в Таблиці 2.1 та 3.1.

Таблиця 3.1. Поширення видів бранхіобделід на досліджених видах річкових раків (окрім *Astacus leptodactylus*). Коди країн ISO: ALB – Албанія, BGR – Болгарія, BIH – Боснія і Герцеговина, HRV – Хорватія, HUN – Угорщина, ITA – Італія, MKD – Північна Македонія, MNE – Чорногорія, ROU – Румунія, SRB – Сербія, SVN – Словенія. Назви видів бранхіобделід та річкових раків скорочені. Символами

позначено: Y - присутні бранхіобделіди, N - відсутні бранхіобделіди, * – знайдено лише кокони.

№ Локації	Країна	Вид річкового раку	<i>B. paras.</i>	<i>B.pentad.</i>	<i>B. hexad.</i>	<i>B. ital.</i>	<i>B. ast.</i>	<i>B. balc.</i>	<i>X. victor.</i>
1	BGR	<i>Au. pallipes</i>	Y*	N	N	N	N	N	N
2	BIH	<i>Au. pallipes</i>	N	Y	Y	N	N	N	N
3	BIH	<i>Au. torrent.</i>	N	Y*	N	N	Y	N	N
4	BIH	<i>Au. torrent.</i>	N	Y	Y	N	N	N	N
5	BIH	<i>As. astacus</i>	N	N	Y*	N	N	N	N
6	BIH	<i>As. astacus</i>	N	Y	N	N	N	N	N
7	BIH	unspecif.	N	N	Y	N	N	N	N
8	HRV	<i>Au. pallipes</i>	N	N	N	N	N	N	N
9	HRV	<i>Au. pallipes</i>	N	N	N	N	N	N	N
10	HRV	<i>Au. pallipes</i>	N	N	N	Y	N	N	N
11	HRV	<i>Au. pallipes</i>	N	N	N	Y	N	N	N
12	HRV	<i>Au. pallipes</i>	N	N	N	Y	N	N	N
13	MAC	<i>Au. torrent.</i>	Y	N	N	N	Y	N	N
14	MKD	<i>Au. torrent.</i>	Y	Y	N	N	N	N	N
15	MKD	<i>Au. torrent.</i>	Y*	N	N	N	N	N	N
16	MNE	<i>Au. pallipes</i>	N	N	N	Y	N	N	N
17	SRB	unspecif.	Y	Y	N	N	N	N	N
18	SVN	<i>Au. pallipes</i>	Y	N	N	N	N	N	N
19	SVN	<i>Au. pallipes</i>	N	N	N	N	N	N	N
20	SVN	<i>Au. pallipes</i>	N	N	N	N	Y	N	N
21	SVN	<i>Au. pallipes</i>	Y	N	Y	Y	Y	N	N
22	SVN	<i>Au. pallipes</i>	Y	N	N	N	Y	N	N
23	SVN	<i>Au. pallipes</i>	N	N	N	N	Y	N	N
24	SVN	<i>Au. pallipes</i>	Y	N	Y	N	N	N	N
25	SVN	<i>Au. torrent.</i>	N	Y	N	N	N	N	N
26	SVN	<i>Au. torrent.</i>	N	Y	Y	N	N	N	N
27	SVN	<i>Au. torrent.</i>	N	N	Y	Y	N	N	N
28	SVN	<i>Au. torrent.</i>	N	N	N	N	Y	N	N
29	SVN	<i>Au. torrent.</i>	N	N	N	N	N	N	N
30	SVN	<i>Au. torrent.</i>	Y	Y	N	N	N	N	N
31	SVN	<i>Au. torrent.</i>	N	N	N	Y	N	N	N
32	SVN	<i>Au. torrent.</i>	Y*	N	N	N	N	N	N
33	SVN	<i>Au. torrent.</i>	Y	N	N	N	N	N	N
34	SVN	<i>Au. torrent.</i>	Y	Y	N	N	N	N	N
35	SVN	<i>Au. torrent.</i>	N	N	N	N	N	N	N
36	SVN	<i>Au. torrent.</i>	N	N	N	N	N	N	N
37	SVN	<i>Au. torrent.</i>	N	N	N	N	N	N	N

38	SVN	<i>Au. torrent.</i>	N	Y	N	N	N	N	N
39	SVN	<i>Au. torrent.</i>	Y	N	N	N	N	N	N
40	SVN	<i>Au. torrent.</i>	N	N	N	N	N	N	N
41	SVN	<i>Au. torrent.</i>	N	Y	Y	N	N	N	N
42	SVN	<i>Au. torrent.</i>	Y	N	Y	Y	N	Y	N
43	SVN	<i>Au. torrent.</i>	N	N	Y	Y	N	N	N
44	SVN	<i>Au. torrent.</i>	N	N	N	N	Y	N	N
45	SVN	<i>Au. torrent.</i>	Y	N	N	N	N	N	N
46	SVN	<i>Au. torrent.</i>	Y	N	N	N	N	N	N
47	SVN	<i>Au. torrent.</i>	N	Y	N	N	N	N	N
48	SVN	<i>Au. torrent.</i>	Y	Y	N	N	N	N	N
49	SVN	<i>Au. torrent.</i>	N	N	Y	N	N	N	N
50	SVN	<i>As. astacus</i>	Y	Y	N	N	N	N	N
51	SVN	<i>As. astacus</i>	N	Y	N	N	N	N	N
52	SVN	<i>As. astacus</i>	N	Y	N	N	N	N	N
53	SVN	<i>As. astacus</i>	Y	N	N	N	N	N	N
54	SVN	<i>As. astacus</i>	Y	N	N	N	N	N	N
55	SVN	<i>As. astacus</i>	Y	N	N	N	N	Y	N
56	SVN	<i>As. astacus</i>	N	Y	N	N	N	Y	N
57	SVN	<i>As. astacus</i>	N	N	Y	N	N	Y	N
58	SVN	<i>As. astacus</i>	Y	N	N	N	N	N	N
59	SVN	<i>Pa. leniuscul.</i>	N	N	N	N	N	N	Y
60	SVN	<i>Pa. leniuscul.</i>	N	N	N	N	N	N	Y
61	SVN	unspecif.	N	N	Y	N	N	N	N
62	SVN	unspecif.	N	Y	N	N	N	N	N
63	SVN	unspecif.	Y	N	N	N	N	N	N
64	SVN	unspecif.	Y	N	N	N	N	N	N
65	SVN	unspecif.	Y	N	N	N	N	N	N
66	SVN	unspecif.	N	Y	N	N	N	N	N

Таксономічний опис

Попередні таксономічні описи зосереджувалися на комбінації таких ознак, як щелепи, кількість зубців, зовнішня морфологія та особливо репродуктивні органи, як відмінні риси для дискусійних видів (Секановська, 1962; Karaman, 1970; Kozarov, 1970; Boshko, 1983; Gelder, 1994; Nesemann, 1999). Однак для дослідників і практиків, які не є експертами з таксономії бранхіобделід, репродуктивна система недоступна для ідентифікації. Тому ми зосредилися на детальному спостереженні зовнішньої морфології бранхіобделід та пошуку відмінностей між видами на основі морфології їхніх щелеп, а саме: співвідношення довжини до ширини, кривизни базової лінії щелеп та розташування зубців. Раніше розмір щелеп та кількість зубців

вважалися діагностичними ознаками (див. Neesemann, 1999), особливо для *Branchiobdella parasita*, *Branchiobdella astaci* та *Branchiobdella hexadonta*. Однак *Branchiobdella balcanica*, *Branchiobdella pentadonta* та *Branchiobdella italica* важко ідентифікувати, використовуючи лише морфологію щелеп, а кількість зубців може варіюватися в межах одного виду (Karaman, 1967). Окрім того, нижче ми демонструємо варіації в будові сперматеки в різних популяціях *B. parasita* та приводимо опис нового для науки виду *B. sp.n.*

Також ми виявили, що такі відносні параметри зовнішньої морфології, як співвідношення ширини першого сегмента тулуба до ширини четвертого та шостого сегментів тіла, є корисними для розрізнення видів. Наші результати підкреслюють важливість детального вивчення морфологічних та репродуктивних ознак для точного визначення видів бранхіобделід, особливо у випадках, коли генетична неоднорідність ускладнює їх ідентифікацію.

***Branchiobdella astaci* Odier, 1823**

Опубліковано в: *Odier, Auguste. (1823). Mémoire sur le branchiobdelle, nouveau genre d'annelides de la famille des hirudiinées. Memoires de la Societe d'Histoire Naturelle de Paris. (series 2) 1: 69-78, plate 4.*

Типовий екземпляр: не відомо

Типова локація: Франція, без точної локації

Синоніми: *Astacobdelle branchiale* (Vallot, 1840) *Moquin-Tandon, 1846; Astacobdella Roesoli* (Diesing, 1850) *Gelder, 1996; Branchiobdella astaci fluviatilis* (Ostroumoff, 1883) *Gelder, 1996; Branchiobdella astaci leptodactyli* (Ostroumoff, 1883) *Gelder, 1996; Branchiobdella varians var. astaci* (Voigt, 1885) *Pierantoni, 1912.*

Етимологія: та, що живе на річковому раку роду *Astacus*

Опис. Довжина тіла фіксованих червів коливається від 6 до 10 мм. Тіло циліндричне, бочкоподібне. Колір тіла жовтуватий, іноді просвічується коричневий кишківник. Голова овальна; її ширина вдвічі менша за довжину. Голова чітко відокремлена борозною від перистомію. Спинна та черевна губи слабо виступають.

Сегменти тулуба однакової ширини; їх ширина майже вдвічі перевищує ширину голови (Рис. 3.8). Щелепи трикутні, з дуже широкою основою; спинна щелепа помітно більша за черевну; довжина спинної щелепи становить 230–250 мкм, черевної — 80–90 мкм. Ширина спинної щелепи від основи до вершини середнього зубця — 240–260 мкм, ширина черевної щелепи — 58–65 мкм. Зубна формула 1/1; один великий середній зубчик, бічні зубчики відсутні. Сперматека трубчаста.

Опис коконів та їх локалізація на тілі річкового рака. Кокон овальний або веретеноподібний; довжина капсули — 0,43–0,5 мм, ширина — 0,25–0,3 мм. Стебло кокону тонке, довше половини довжини капсули; верхівка кокону формує шип (Рис. 3.8). Кокони розташовані симетрично з обох сторін зябер хазяїна, покриваючи середні частини центральних і задніх зябрових ниток.

Поширення. Перша згадка про *B. astaci*, його анатомічний опис та локалізація на хазяїні *Astacus fluviatilis* (також відомому як *Astacus astacus* Linnaeus, 1758) належить Roesl (1755). Це стало першим описом бранхіобделід як ектосимбіонтів ракоподібних загалом. Пізніше цей вид був описаний як *Hirudo astaci* Müller, 1806, зібраний з очей *Astacus fluviatilis*. У 1823 році Odier під час детального дослідження визначив вид як *B. astaci* Odier, 1823. Під час опису «рачих червів» *B. astaci* Odier, 1823 був прийнятий за типовий вид, а Франція вказана як типове місце. Згідно з Pop (1965), це рідкісний вид. Згідно з аналізу розповсюдження по Neesemann, *B. astaci* поширений у північно-західній, центральній та східній Європі, але відсутній у Скандинавії та середземноморському регіоні (Neesemann, 2000). Його виявляли в Естонії, Німеччині, Франції, Латвії, Литві, Югославії (Georgevitch, 1955; Pop, 1965; Karaman, 1970; Мажилис, 1973) (Рис. 3.9).

Під час ревізії колекції річкових раків Університету Любляни нами було виявлено 4 локації в Словенії на *Austropotamobius pallipes* та дві локації на *A. torrentium*. Усі ці зразки датуються 1960-1970 роками. Також було знайдено одну локацію в Боснії та Герцеговині (1968 рік) та одну в Македонії (2008 рік). У Західних Балканах цей вид відомий з Сербії (річка Іба біля Косовської Мітровиці) та Чорногорії (річка Цетіна, Далмація) (Moszynski, 1937). У 1929 році зразки цього виду були передані до Французького національного музею без вказання походження

(Subchev, 2008). Аналогічно, зразок у музеї Гумбольдта в Північній Македонії не має детального опису (Subchev, 2007). У Хорватії (Klobučar, 2006) вид був зареєстрований в Істрії на *As. astacus* (потік Боруцькі, Даусі, Пазин) та *Au. pallipes* (озеро Врансько, острови Крес і Рачиці, Бузет) (Klobučar et al., 2006; Šarič et al., 2018). Ми повідомили про нові місця знаходження цього виду в Хорватії (озеро Модро Око та потік у регіоні Далмація) та Північній Македонії (південно-західна частина озера Ресен). Усі зразки зі Словенії є історичними, з датами збору: 1955 (річка Невляниця, Буч), 1960 (річка Фойба), 1967 (потік Кожбаньшчек, Небло), 1969 (озеро Церкніца, Раковський мостик), 1971 (Карловиця) та 1975 (річка Драва; річка Ріжана). Одна локація (Гліншчиця, Любляна) не мала дати на етикетці (див. Табл. 2.1).

Під час експедиції 2007 року на озері Якши ми виявили наявність *B. astaci* на річковому раку *Astacus leptodactylus*. Це перше вказання цього виду для фауни Казахстану та є на даний момент найсхіднішою точкою його ареалу. Згідно з Чекановською (1962), на прилеглих до Казахстану територіях вид виявляли у Пермській та Саратовській областях РФ, а також у річці Пекша (басейн Волги) поблизу міста Кольчугіно Владимирської області (1989). На території України цей вид також згадується з давніми датуваннями у Галичині, Одесі та Коломиї (Subchev, 2008). Однак наші спроби знайти його у вказаних локаціях не увінчалися успіхом.

Таким чином, більшість знахідок *B. astaci*, зафіксованих у літературі або музейних колекціях, мають майже 70-річну давність. Спроби повторно знайти цей вид не були успішними, що дозволяє вважати його рідкісним і, можливо, таким, що знаходиться на межі зникнення. Сучасні знахідки цього виду обмежуються знахідками (Klobučar et al., 2006; Rosewarne et al., 2013) і є рідкісними.

Спектр хазяїв виду *B. astaci* є досить широким і включає види *As. astacus* (Kozarov et al. 1972, Subchev, Stanimirova 1998, Klobučar et al. 2006, Subchev, Gelder 2010), *As. leptodactylus* (Kolesnykova, 2008; Boshko 2010, Subchev, Gelder 2010) з можливим співіснуванням з іншим видом *B. parasita* та рідше види *Au. torrentium* (Subchev, Stanimirova 1986) та *Au. pallipes* (Klobučar et al. 2006, Gelder et al. 1994).

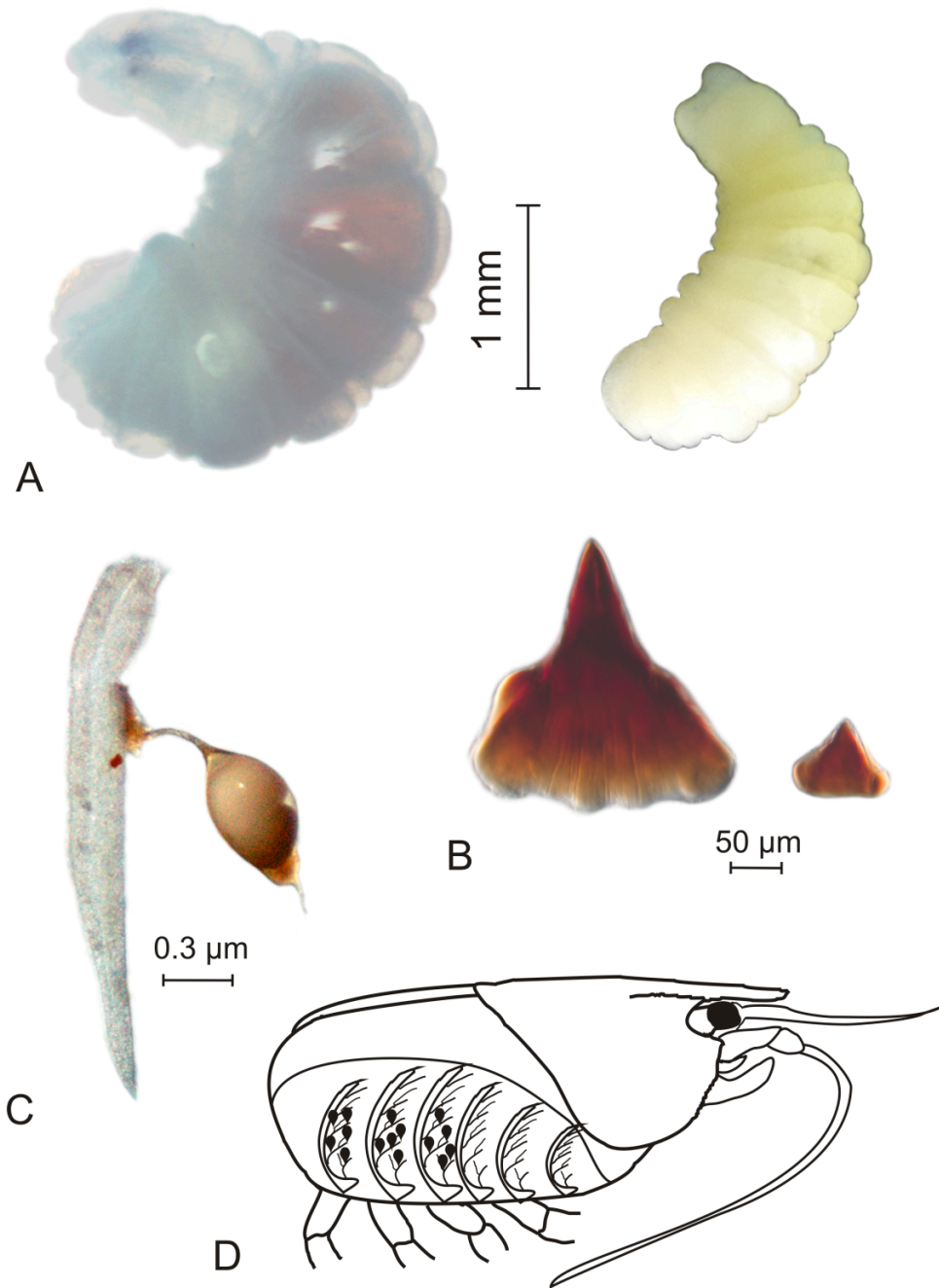


Рисунок 3.8. *Branchiobdella astaci* Odier, 1823: А – загальний вигляд; В – щелепи з вентральної та дорзальної сторін; С – кокон на зябровому філаменті; D – локалізація коконів на задніх зябрових філаментах рака.

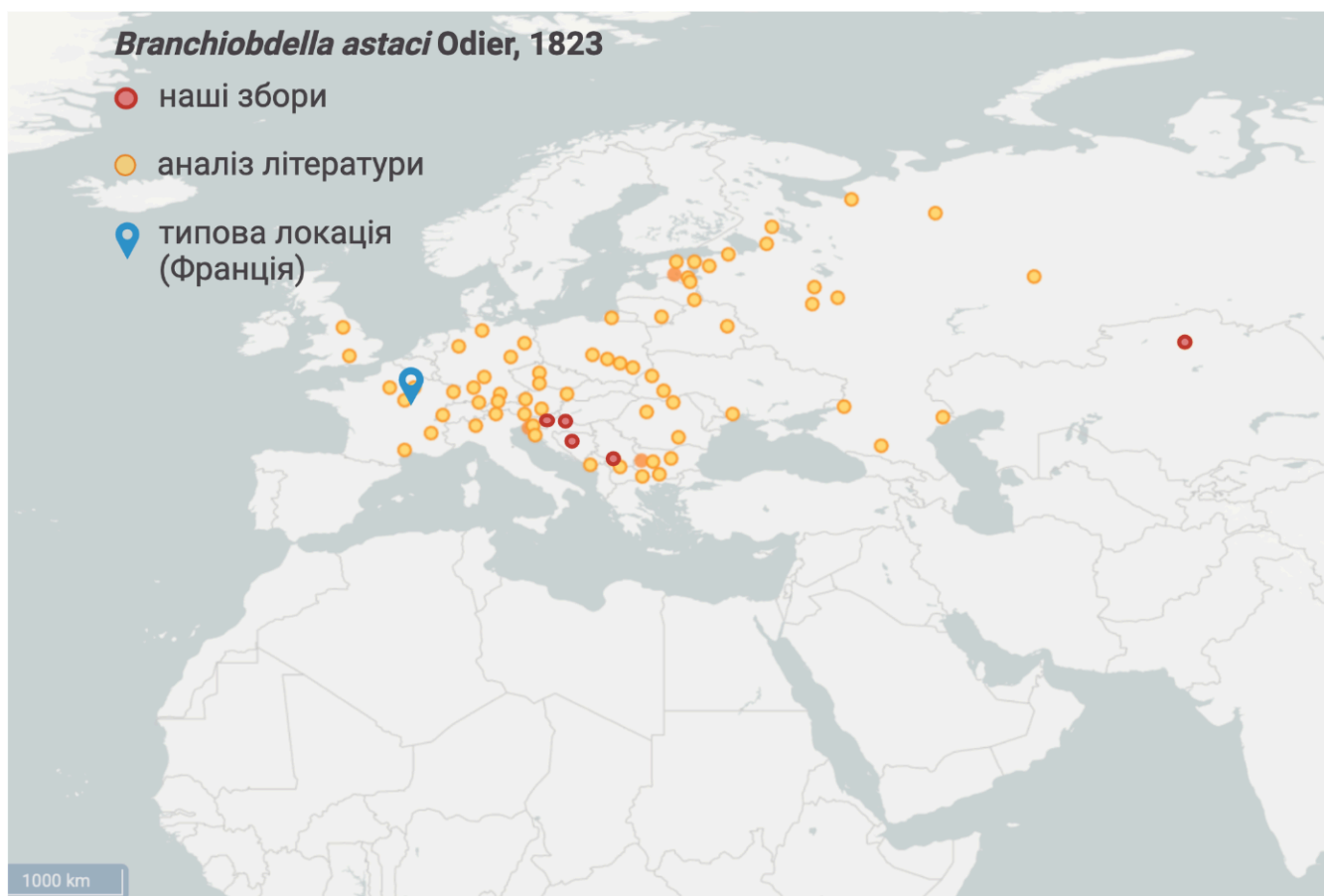


Рисунок 3.9. Візуалізація розповсюдження виду *Branchiobdella astaci* Odier, 1823 на території Західної Палеарктики. Червоним кольором позначені знахідки, ініційовані в цьому дослідженні, жовтим кольором - літературні данні. Типова локація виду позначена блакитною міткою. (модифіковано за <https://www.gbif.org>)

Асоціація з хазяями та співіснування з іншими видами бранхіобделід:

As. astacus, *Au. torrentium*, *As. leptodactylus*: *B. parasita*;

Au. pallipes: *B. parasita*; *B. italica* (Рис 1).

Філогенетичне положення та генетичне різноманіття.

Нами були отримані послідовності виду *B. astaci* з озера Якши (Казахстан). Для порівняльного філогенетичного аналізу по CO1 були проаналізовані послідовності з GenBank (JN204269, JN204271), які належали до цього виду, зібраному на *Au. pallipes* з Великобританії. На жаль, нам не вдалося отримати якісну ДНК з чисельних зразків з музею Люблянського університету, оскільки майже всі вони були достатньо старими і датувалися 1960-1970 рр. Деякі були зафіксовані у формаліні.

Не дивлячись на достатню географічну відстань між популяціями *B. astaci* та різних хазяїв, популяції не значно різнилися генетично, формуючи одну MOTU при делімітації по ASAP, ABGD та PTP. Низьке генетичне різноманіття *B. astaci* може бути пов'язане з його тісним симбіотичним зв'язком із річковими раками, зокрема з тим, що він мешкає в їхніх зябрах. Спеціалізований спосіб життя обмежує його генетичну мінливість, оскільки будь-які значні зміни можуть порушити здатність до виживання в цьому середовищі. Стабільні умови в зябрах раків, відсутність сильного селективного тиску на зміни та обмежений контакт із зовнішнім середовищем сприяють збереженню консерватизму.

***Branchiobdella hexadonta* Gruber 1882**

Опубліковано в: Gruber, A. (1883). Bemerkungen über die Gattung Branchiobdella. *Zoologischer Anzeiger*. 6(138): 243-248.

Синоніми: *Branchiobdella dubia* Pierantoni, 1912; *Branchiobdella hexodonta* Gruber, 1883; *Branchiobdella ochridensis* Georgevitch, 1957; *Branchiobdella pentadonta* Georgevitch, 1957; *Branchiobdella varians* var. *hexodonta* Gruber, 1883; *Cambarincola pluridentata* Georgevitch, 1957.

Типовий матеріал: не було позначено при описі

Типова локація: Німеччина, без уточнень локації

Етимологія: та, що має шість (“hexa”) зубців

Опис. Довжина зафіксованих екземплярів становить 3–4 мм. Тіло циліндричне, трохи розширене в сегментах тулуба 6–7. Голова циліндрична; розділена на дві частини помітною борозною; ширина голови дорівнює ширині першого сегмента тулуба. Згідно з Neseemann (1999), перистоміальні губи відокремлені від голови глибокою борозною (Рис. 3.11). Щелепи прямокутні; їх довжина вдвічі більша за ширину. Довжина дорсальної щелепи становить 18–20 мкм; довжина вентральної щелепи – 16–18 мкм; ширина щелеп – 7–9 мкм. Зубна формула 6/5. Зубці трикутні. Крайові зубці збільшені на обох кінцях щелеп. Чоловічий гонопор достатньо помітний, атріум займає ¼ частину 6-го сегмента тіла. Його залозиста частина

товстіша за трубчасту у два рази, не формує загибів. Трубчаста частина майже такої ж довжини, що і залозиста. Копулятивна бурса 100 мкм завширшки. Сперматека має форму риболовного гачка. Внутрішній відросток сперматеки теж загнутий у формі гачка. Середній канал розділяє сперматеку на дві частини: лопаткоподібну бульбу сперматеки та більш вузький зовнішній канал сперматеки, який закінчується дуже маленьким отвором і майже не помітний зовні.

Опис та локалізація коконів. Капсула кокона овальної форми з коричневим ковпачком, довжиною 0,2 мм і шириною 0,18 мм, з довжиною стебла 0,1 мм. Кокони не були знайдені вільно в контейнерах із зразками, а лише в зябрових камерах, зокрема прикріплені до зябрових ниток. Деякі зяброві нитки мали помітні пошкодження (Рис. 3.11), також їх фрагменти були присутні у вмісті кишечника цього виду.

Поширення. Західна Палеарктика (Рис. 3.10). У Західних Балканах цей вид вперше був зареєстрований у Хорватії Kloбуšar et al. (2006) та у Чорногорії Gelder (1999). Музейні зразки з Хорватії («Плітвиці» у 1939 році) та Чорногорії (біля Нікшича, річка Зета, 1998 р.) зберігаються в колекції Шведського музею природної історії (Subchev, 2009). Нещодавні дослідження повідомили про часту присутність цього виду на *Au. torrentium* та *Au. pallipes* у Хорватії (Šarič et al., 2018). Перше повідомлення про цей вид у Північній Македонії було з озера Дойран (Karaman, 1967). Пізніше Subchev (2007) зазначив його присутність у музейних зразках ракоподібних, зібраних у Північній Македонії, без детальних даних про місце збору. Зразки з Боснії та Герцеговини в колекції ракоподібних Музею природної історії у Відні (Австрія) включали бранхіобделід, асоційованих з *Au. pallipes*, але без точної інформації про їхні географічні локації (Subchev & Gelder, 2010). Перший запис для Боснії та Герцеговини (ВІН) був зі західної частини країни, району Гламоча (Karaman, 1967). Наш огляд колекції в Університеті Любляни підтвердив попередні записи *B. hexadonta* з Боснії та Герцеговини (потік біля Увіра, Кладань, 2004 р.). Ми також підтвердили низку локацій у Словенії: річка Драва (1975 р.), струмок біля Бохинської Бели, Блед (2000 р.), струмок біля Заплани (2000 р.), струмок Хотенька (2000 р.), водоспад Нежиця, річка Купа (2004 р.) та річка Колпа (2002 р.) (див. Табл.

2.1). Раніше єдиний запис цього виду у Словенії належав Karaman (1967), який знайшов його у невеликій річці Врхнишки Обрх біля озера Церкниця.

Вперше ми повідомляємо про цей вид з території України з річкового раку *As. astacus* (Закарпаття, озеро Синевір).

Асоціація з хазяями та співіснування бранхіобделід:

Au. pallipes: *B. pentadonta* + *B. parasita*; *B. italica*; *Au. torrentium*: *B. pentadonta* + *B. parasita*; *As. astacus*: *B. balcanica*; *As. leptodactylus*



Рисунок 3.10. Поширення *B. hexadonta* на території Західної Палеарктики. Збори, зроблені та проаналізовані в даній роботі, позначено червоним кольором. Типова локація позначена блакитною міткою (модифіковано за <https://www.gbif.org>).

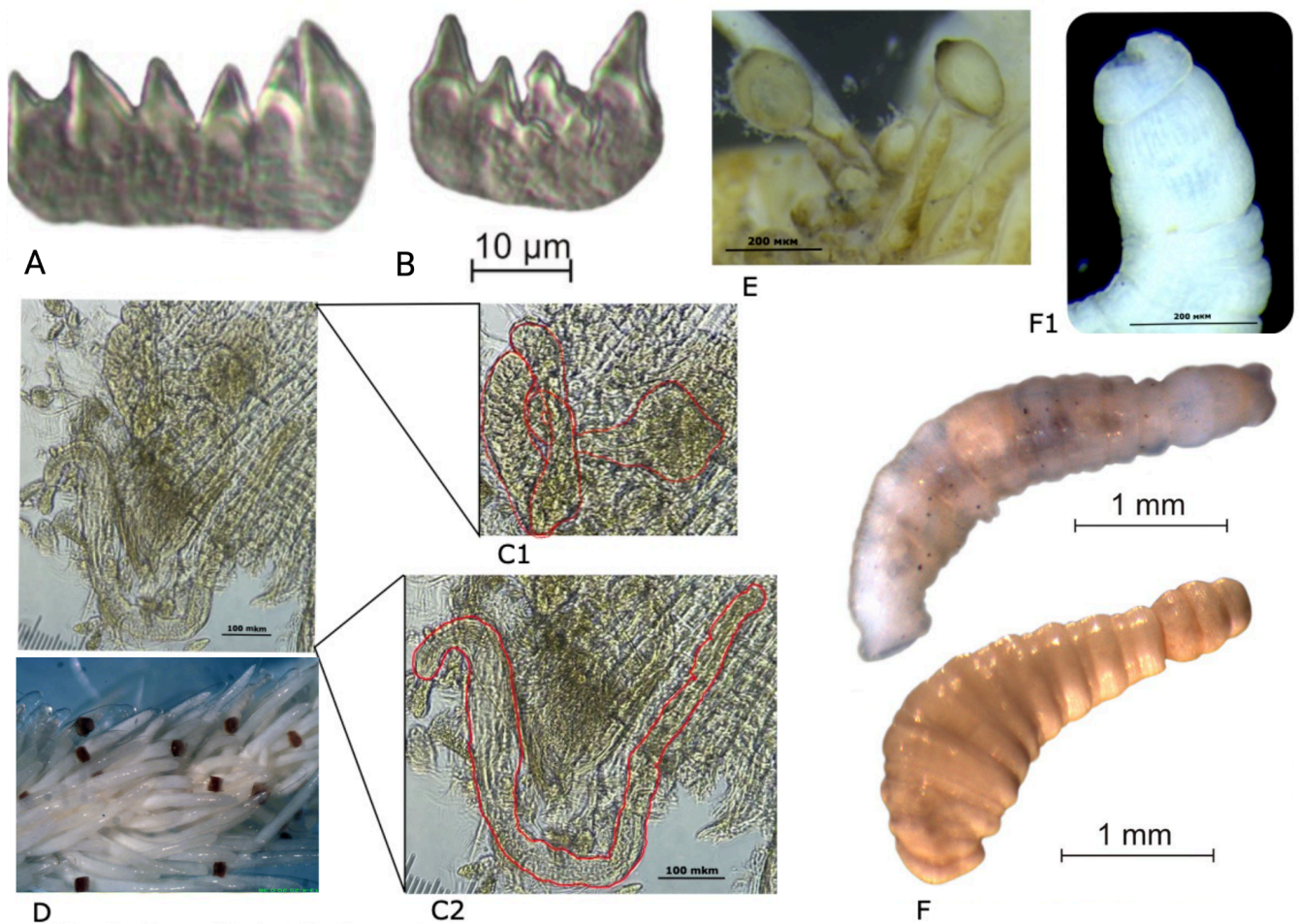


Рисунок 3.11. Морфологічні та анатомічні ознаки *Branchiobdella hexadonta*: А – дорсальна щелепа; В – вентральна щелепа; С - репродуктивна система: С1 - короткий атріум, С2 - сперматека у формі гачка; D – пошкоджені зяброві нитки річкового раку; Е - кокони на зябрових філаментах; F - загальний вигляд дорослої особини: F1 - головний відділ з перистоміумом.

***Branchiobdella kozarovi* Subchev, 1978**

Опубліковано в: Subchev, M. (1978). A new branchiobdellid - *Branchiobdella kozarovi* sp. n. (*Oligochaeta, Branchiobdellidae*) from Bulgaria. *Acta zoologica bulgarica*. 9: 78-80.

Синоніми: немає.

Типовий матеріал: 1. Національний музей природної історії в Софії, Болгарія. 2. Паратип *Branchiobdella kozarovi* Subchev, 1978 NHMUK ZOO 2011.18-27. Колекція зразків Національного музею природної історії (Лондон). 3. Паратип *Branchiobdella kozarovi* Subchev, 1978 MNHN IN VV-147. Джерело: Колекція нематод (IN)

Національного музею природної історії (MNHN – Париж). 4. Паратип *Branchiobdella kozarovi* Subchev, 1978 ZMB Collection Vermes 7422-E. Джерело: Колекція Vermes – ZMB.

Типова локація: штучні ставки поблизу с. Разделна, Варненська область, Болгарія.

Етимологія: назва виду походить на честь відомого болгарського дослідника, в тому числі бранхіобделід, Г. Козарова.

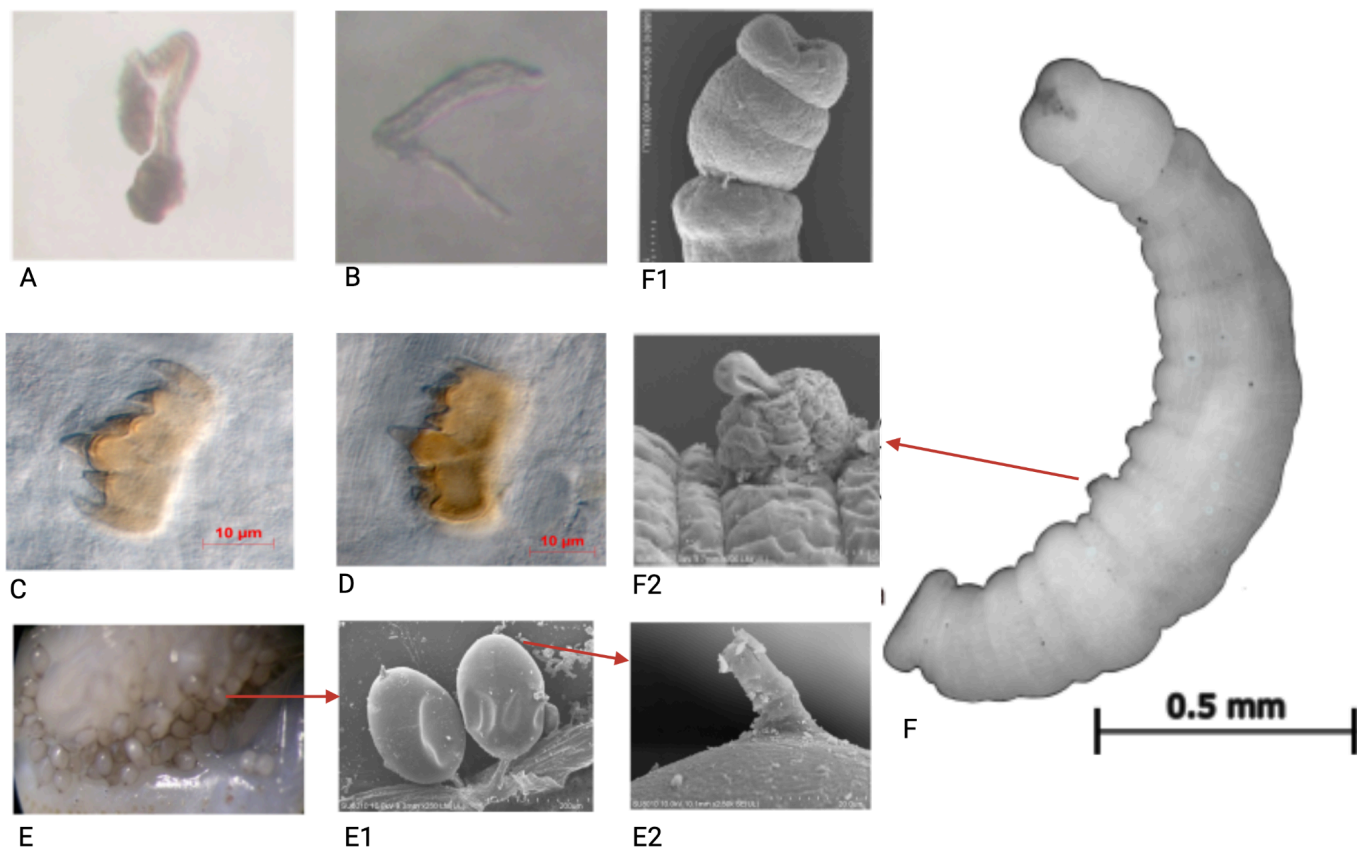


Рисунок 3.12. Морфологічні та анатомічні ознаки *Branchiobdella kozarovi*: А – короткий атріум; В – сперматека; С - дорзальна щелепа; D - вентральна щелепа; Е - кокони на зябрах; Е1 – кокони, SEM; Е2 - кришечка кокону у формі ковпачка, SEM; F - загальний вигляд дорослої особини: F1 - головний відділ з чітко віділеним перистоміумом, SEM; F2 - копулятивна бурса з вивернутим пенісом, SEM.

Опис. Живі бранхіобделіди безбарвні. Довжина їх тіла коливається від 0,9 до 3,5 мм. Тіло має циліндричну форму, рівномірно потовщене, розширюється до 8–11 сегментів. Голова овальна, її ширина не перевищує ширину першого сегмента

тулуба. Перистоміум відділений від голови чітко видимою борозною (Nesemann, 1999). Спинна та черевна губи добре виражені. Щелепи прямокутні, верхня щелепа лише трохи більша за нижню. Висота щелепи становить трохи більше половини її ширини. Щелепи мають зубці, серед яких центральний є найбільшим. По обидва боки від нього розташовані дрібні конічні зубці, кількість яких може варіювати. Зубна формула 5/5 або 5/6 (Рис. 3.12).

Атріум являє собою дуже коротку та товсту трубку. Залозиста частина атріуму коротка, має характерний вигин на передньому кінці та відносно великий діаметр. Незалозиста частина трохи довша за залозисту. Вона утворює гострий кут із залозистою частиною. У залозисту частину атріуму біля вигину його переднього кінця впадає сім'япровід. Великі сім'яні воронки (Subchev, 1978). Велика, добре помітна копулятивна бурса з гладким пенісом. Копулятивна бурса часто вивертається при фіксації.

Сперматека складається з бульби та вивідного каналу. Бульба має приблизно таку ж довжину, як і вивідний канал. Вона має овально-витягнуту форму та нерівномірну ширину (до проксимального кінця плавно звужується). Помітний маленький внутрішній відросток сперматеки. У незрілих особин бульба нагадує витягнуту трубку (Рис. 3.12).

Варіації: У знайдених екземплярів форма та пропорції тіла в основному відповідають опису *Branchiobdella kozarovi* (Subchev, 1978), але в наших популяціях виявлено деякі особливості:

1. Довжина тіла досліджених нами черв'яків сягає 3,5 мм, що відрізняється від даних Subchev, 1978 (він вказує довжину 1,1–1,7 мм), але збігається з даними Бошко, 1982.
2. Кількість зубців може варіювати від 5 до 7. У наших зразках частіше зустрічалася зубна формула 5/6 (60%), рідше – 5/5 (34%) та ще рідше – 5/7 (6%). Зубці часто спрямовані в різні боки і не лежать на одній лінії.
3. Кокони ніколи не виявлялися на зовнішніх покровах рака, а завжди розташовувалися біля основи зябрових пластин, у першій третині довжини

зябрових ниток, а також на внутрішній стороні зябрових кришок (у невеликій кількості).

4. Наші спостереження за поведінкою *Branchiobdella kozarovi* та дослідження вмісту їх кишечника показали, що навіть за умови достатньої кількості водоростей та детриту, *Branchiobdella kozarovi* часто вдаються до канібалізму.

Опис та локалізація коконів. Кокони безбарвні або коричнюваті, зазвичай містять одне яйце. Капсула кокону овальна, має кришечку у формі гострого ковпачка. Довжина капсули кокону трошки більша довжини його ніжки. Кокони ніколи не були знайдені на поверхні тіла рака; вони завжди локалізувалися біля основи зябрових пластин, у проксимальній частині зябрових філаментів і рідше на внутрішній частині зябрових кришок. Кількість коконів на одну зяброву пластину варіювалася в середньому від 250 коконів у березні до 150 коконів у серпні.

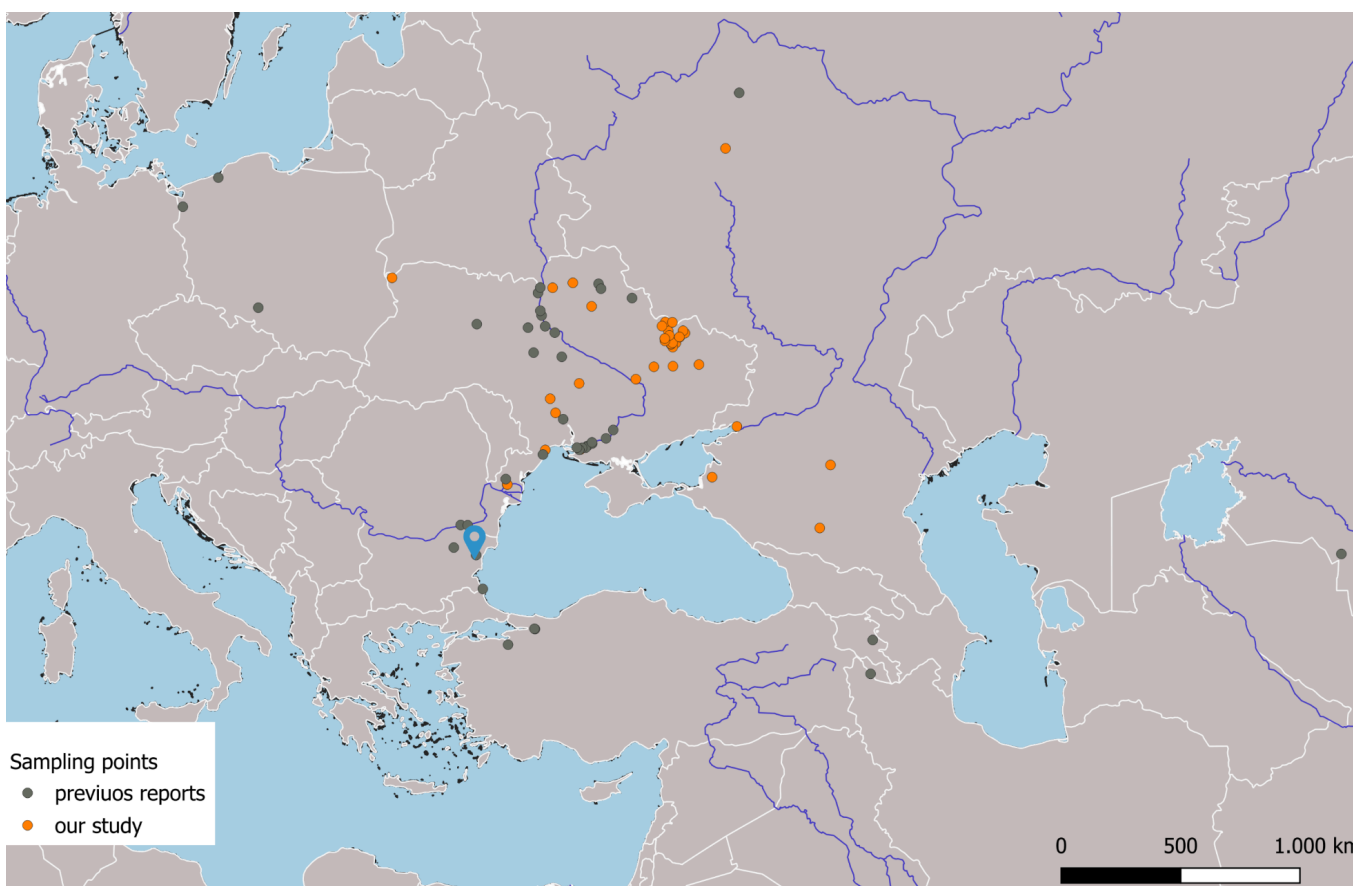


Рисунок 3.13. Поширення *B. kozarovi* на території Західної Палеарктики. Збори, зроблені та проаналізовані в даній роботі, позначені жовтим кольором (модифіковано за <https://www.gbif.org>).

Поширення. Вид був описаний на широкопалому раку *Astacus astacus* зі ставків Болгарії (Subchev, 1978). Детальний опис поширення *B. kozarovi* в Європі наведено у роботах Fard & Gelder (2011) та Kolesnykova et al. (2012). Найбільша кількість локацій для цього виду зареєстрована в Україні, що підтверджується в наших роботах (Kolesnykova, 2007; Kolesnykova, 2008) та у попередній узагальнюючій роботі Boshko (2005). Поява цього виду в деяких країнах, наприклад у Польщі (Śmietana & Wierzbicka, 1999), може бути пов'язана з інтродукцією довгопалого річкового раку з промисловою метою. На сході ареал *B. kozarovi* охоплює Іран, Туреччину, Грузію та Казахстан (Fard & Gelder 2011) (Рис. 3.13). Враховуючи широке використання *A. leptodactylus* в аквакультурі та харчовій промисловості у багатьох євро-середземноморських країнах, Fard та Gelder (2011) припускають, що *B. kozarovi* може поширюватися на нові території в цьому регіоні. Найостанніша знахідка цього виду була зроблена нами у Нідерландах (Kolesnykova et al. 2012).

Асоціація з хазяями та співіснування бранхіобделід: *As. leptodactylus*.

***Branchiobdella parasita* (Braun, 1805)**

Синоніми: *Branchiobdella anatis* Pierantoni, 1912, *Branchiobdella bidens* Georgevitch, 1957, *Branchiobdella cylindrica* Georgevitch, 1957, *Branchiobdella decidonta* Georgevitch, 1957, *Branchiobdella odontias* Georgevitch, 1957, *Branchiobdella parasitica* (Braun, 1805), *Branchiobdella tridens* Georgevitch, 1957, *Branchiobdella varians* subsp. *parasita* (Braun, 1805), *Branchiobdella varians* var. *parasita* (Braun, 1805), *Cambarincola cylindrica* Georgevitch, 1957, *Cambarincola odontias* Georgevitch, 1955, *Hirudo parasita* Braun, 1805, *Pterodrilus aliata* Georgevitch, 1957, *Pterodrilus dentata* Georgevitch, 1957, *Pterodrilus karamani* Moszynski, 1938, *Pterodrilus megas* Georgevitch, 1955, *Pterodrilus megodont* Georgevitch, 1957, *Pterodrilus prion* Georgevitch, 1955

Типовий матеріал: не вказано

Типова локація: Німеччина, без уточнень

Етимологія: та, що паразитує

Опис. Живі особини прозорі з коричневими, жовтими або червоними внутрішніми органами. Довжина тіла збережених черв'яків коливається від 2,5 до 10 мм. Тіло

циліндричне. Переднє кільце середнього сегмента тіла розширене та виступає дорсально (Рис. 3.14). Особливо це добре помітно на молодих особинах. Голова майже чотирикутна і трохи сплюснена; її ширина перевищує ширину першого сегмента тіла і дорівнює ширині третього сегмента тіла. Дорсальна та вентральна губи чітко виражені. Дорсальна губа відділена від голови глибокою борозною. Вентральна губа коротша за дорсальну. Щелепи мають трикутну форму; верхня та нижня щелепи однакові за розміром. Зубна формула — 3-1-3/3-1-3. Середній зубчик найбільший. Залозиста частина атріуму складена у три петлі. Трубочаста частина атріуму коротша і тонша за залозисту, формує дві петлі. Сперматека складається з овальної бульби з внутрішнім виростом на своєму кінці та дуже короткого вивідного протоку.

Опис та локалізація коконів. Кокон має обернено-яйцеподібну форму; довжина капсули 0,4–0,6 мм, ширина капсули 0,28–0,36 мм. Стебло кокона 0,24–0,27 мм; воно майже дорівнює половині довжини капсули; кришка кокона плоска. Кокони розташовані латеро-постеріально на головогруді рака (зазвичай симетрично з обох сторін). У випадку, якщо кокони вже відкладені на бічній частині головогрудей, інші кокони покривають 2-4 плеоподи (Рис. 3.14). Характер локалізації був однаковим у різних видів раків-хазяїнів. Кокони були присутні у 60% усіх спостережуваних раків із ділянок дельти Дунаю та у 90% раків із Теремлі в Закарпатті.

Поширення. *Branchiobdella parasita* широко поширений у Європі (Рис. 3.15). Цей вид був зареєстрований Карманом (1967) для Західних Балкан у Сербії (Косовська Мітровіца), Боснії та Герцеговині (Ключа, Мркониц) та Словенії (Біц при Бледі, Врхнішки обрх – Церкницьке озеро). Ми знайшли цей вид у струмку Осойниця в Берово та в озері Ресен (Преспа) (Македонія). Раніше він був зареєстрований у Македонії в озері Дойран (Карман, 1967). Ми наводимо дані про поширення цього виду в Словенії (Табл. 2.1, 3.1).

Асоціація з хазяями та співіснування бранхіобделід: *Au. pallipes*: *B. hexadonta*; *Au. torrentium*: *B. pentadonta* + *B. hexadonta*; *As. astacus*: *B. balcanica*, *B. pentadonta*. *As. leptodactylus*

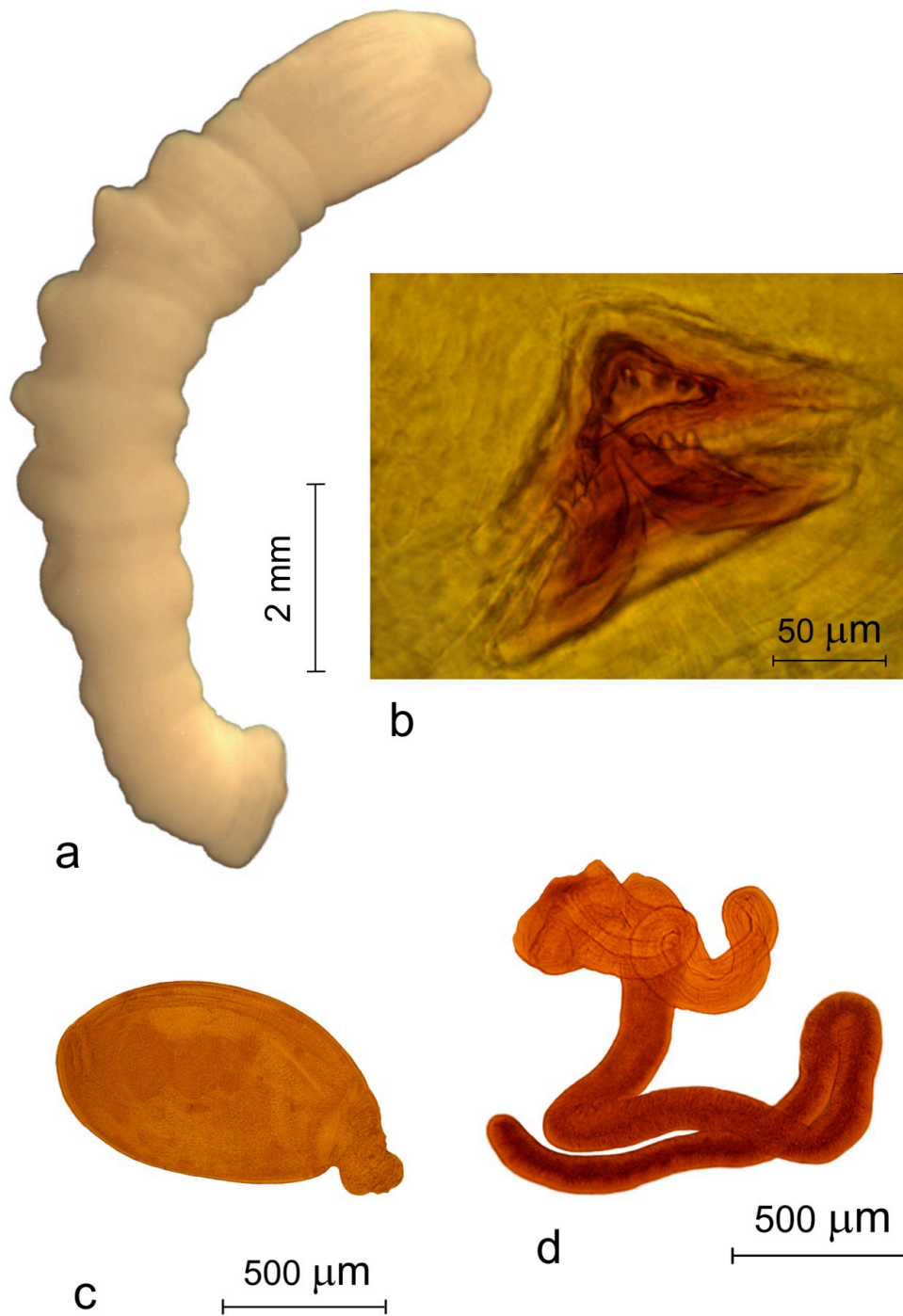


Рисунок 3.14. Морфологічні та анатомічні ознаки *Branchiobdella parasita*: a – загальний вигляд дорослої особини; b – дорзальна та вентральна щелепи; c - сперматека; d - атріум.



Рисунок 3.15. Поширення *B. parasita* species complex на території Західної Палеарктики. Збори, зроблені та проаналізовані в даній роботі, позначені червоним кольором (модифіковано за <https://www.gbif.org>).

Варіації у будові *Branchiobdella parasita* з обстежених нами локацій.

В річці Тересля в Закарпатті було зібрано 20 зразків раків, ідентифікованих як *Astacus astacus* (Linnaeus, 1758). *Branchiobdella parasita* був знайдений у співіснуванні з *Branchiobdella balcanica* Moszynski, 1937. Наші спостереження за *B. balcanica* описані вище. Спостереження популяцій *B. parasita* з Закарпаття (Межигірний район) показують варіації у структурі сперматеки (див. Рис. 3.16). Ми вважаємо, що розмір і форма сперматеки у цього виду залежать від стадії зрілості особини. Ми надаємо мікроскопічні зображення бранхіобделід різного розміру та, відповідно, різного ступеня зрілості.

Незрілі особини: Розмір особини: 3-5 мм. Ширина голови на 10% більша за ширину першого сегмента тіла. Довжина голови в 1,5 рази більша за її ширину. Губи

становлять 30% довжини голови. Верхня губа має 4 маленькі частки і трохи виступає вперед над нижньою губою; нижня губа має 2 частки. Папіли глоткові помітні. Сперматека маленька, з овальною бульбою та коротким вивідним протоком. Атріум має слаборозвинену залозисту частину, але ширина залозистої частини більша за трубчасту.

Особини середнього розміру. Розмір особини: 5-9 мм. Ширина голови на 17% більша за ширину першого сегмента тіла. Довжина голови в 1,5 рази більша за її ширину. Губи становлять 30% довжини голови. Верхня губа має 4 маленькі частки; нижня губа має 2 частки. Сперматека має бульбу, поділену на дві частини. Внутрішній відросток сперматеки поділяється бороздою на дві частини. Вивідний проток короткий. Атріум має розвинену залозисту частину, ширина та довжина залозистої та трубчастої частин однакові.

Зрілі особини. Розмір особини: 9-10 мм. Ширина голови на 20% більша за ширину першого сегмента тіла. Довжина голови в 1,5 рази більша за її ширину. Губи становлять 30% довжини голови. Верхня губа має 4 маленькі частки, але вони погано видно, як і 2 частки нижньої губи. Бульба сперматеки виглядає овальною, поділ на дві частини не помітний. Внутрішній відросток сперматеки слабо помітний, але його можна розгледіти. Вивідний проток короткий. Атріум має розвинену залозисту частину, ширина та довжина залозистої та трубчастої частин однакові (Рис. 3.16).

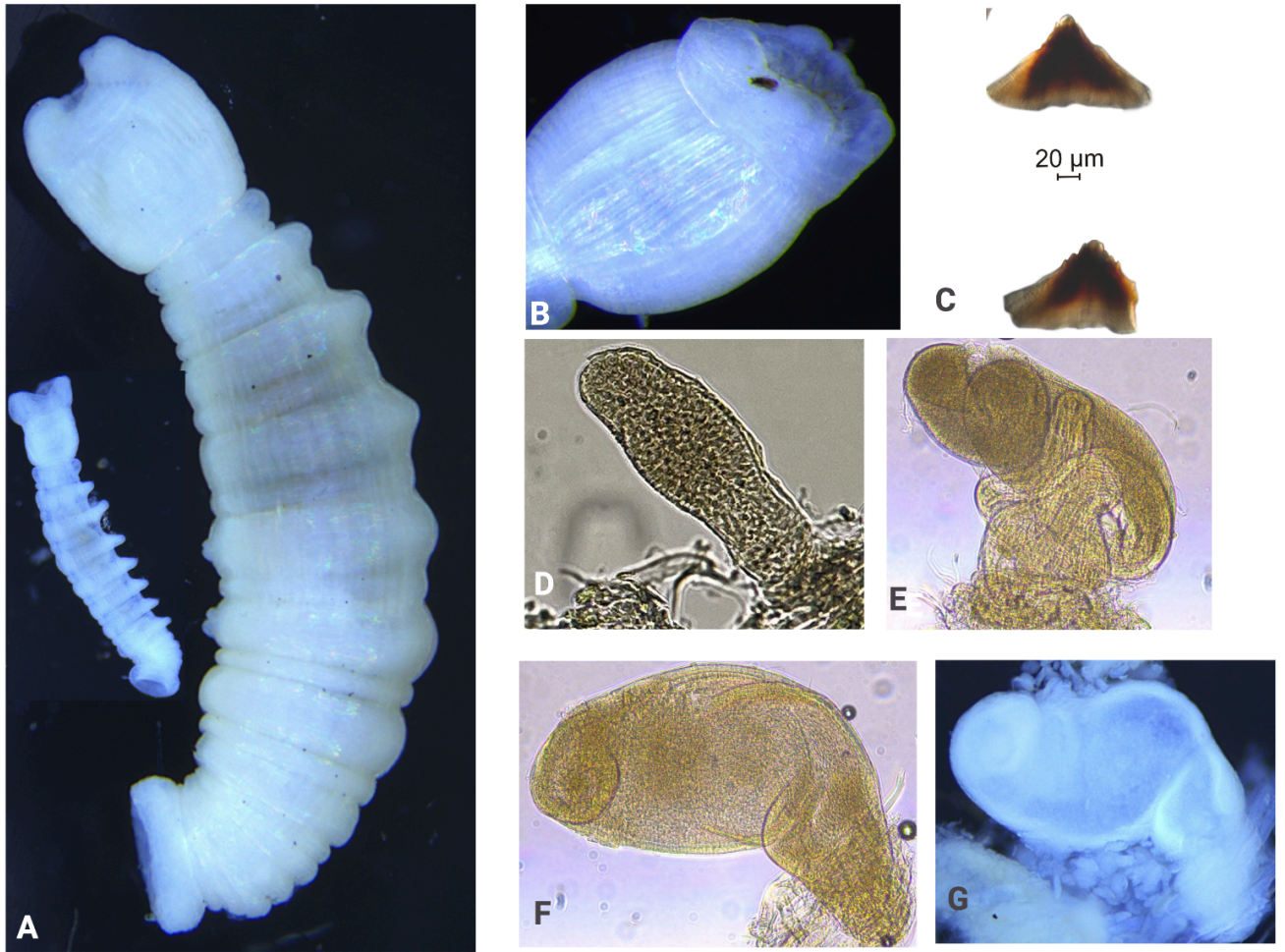


Рисунок 3.16. Варіації в будові *B. parasita* з Закарпаття (р. Теребля): А - незріла особина (3 мм) та доросла особина (9 мм); В - перістоміум; С - дорзальна і вентральна щелепи; D - сперматека незрілої особини; Е - атріум зрілої особини довжиною 9 мм; F - сперматека зрілої особини довжиною 9 мм; G - сперматека особини середнього розміру (6 мм).

Таким чином, спостереження варіацій у структурі сперматеки, на нашу думку, пов'язані зі стадією зрілості особини. Ми спостерігали, що розмір і форма сперматеки змінюються в залежності від розміру та ступеня зрілості бранхіобделід. Незрілі особини (3-5 мм) мають маленьку сперматеку з овальною бульбою та коротким вивідним протоком, тоді як у особини середнього розміру (5-9 мм) сперматека поділена на дві частини, а внутрішній відросток має чітку борозну. У зрілих особини (9-10 мм) сперматека набуває овальної форми, а поділ на дві частини стає менш помітним. Ці зміни в будові сперматеки можуть бути пов'язані з етапами

розвитку організму та його репродуктивною зрілістю. При ідентифікації важливо враховувати стадії зрілості *B. parasita*.

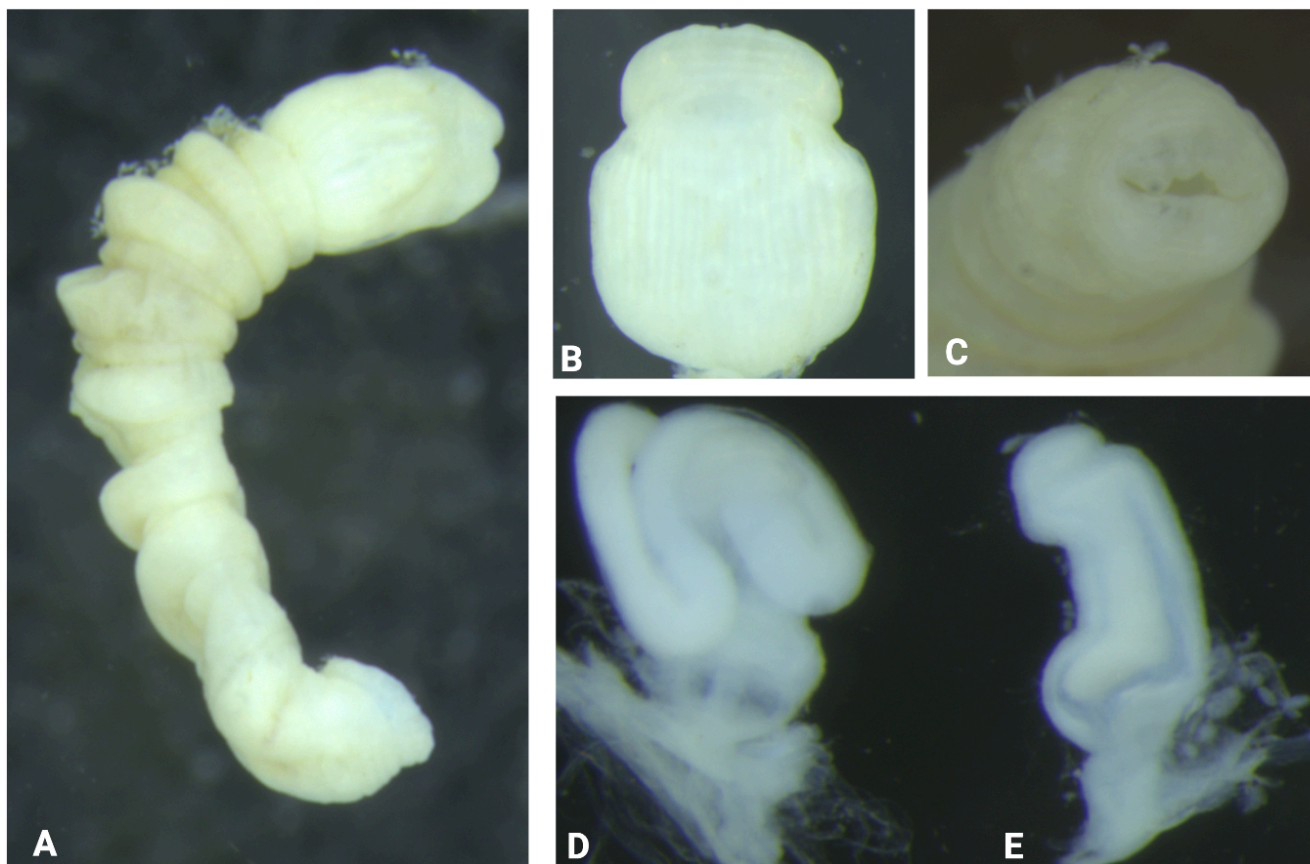


Рисунок 3.17. Варіації в будові *B. parasita*, Польща: А - доросла особина довжиною 9 мм; В,С - первостоміум; D - атріум; Е - сперматека.

Варіації в будові B. parasita, Польща

Голова мала близьку до квадратної форму, лопаті на верхній губі перистоміуму були маленькими, дві середні лопаті були меншими за дві крайні (Рис. 3.17). Тіло в зоні 5-7 тулубних сегментів було сплющено дорзо-вентрально. Переднє кільце кожного тулубного сегменту помітно виступало. Залозиста частина атріуму утворювала дві петлі. Сперматека за формою нагадувала сперматеку середньої зрілості зразків із Закарпаття: мала помітний внутрішній відросток, який був нахилений і була поділена на дві частини посередині з одного боку. Вивідний проток був коротким.

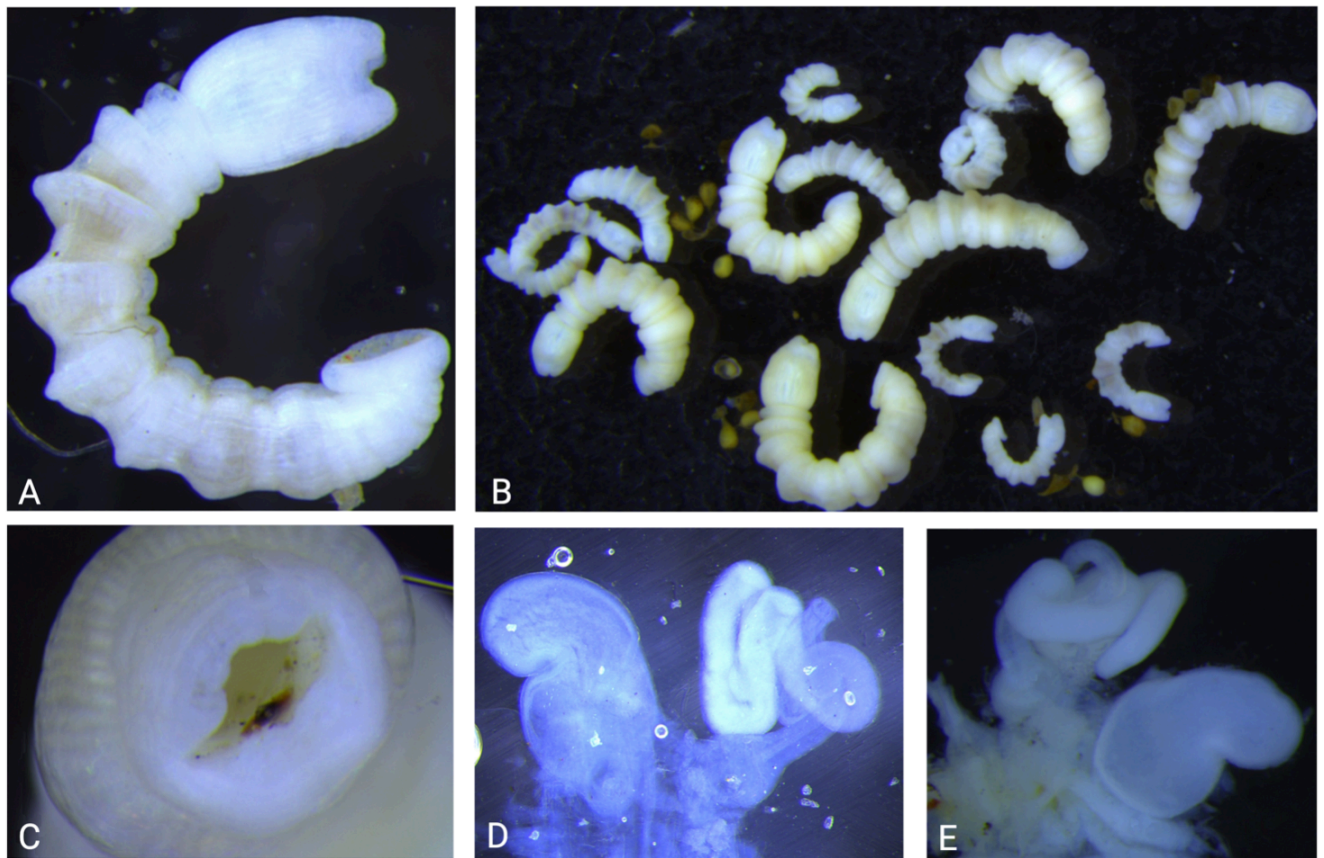


Рисунок 3.18. Варіації в будові *B. parasita*, с. Кислиця (оз. Котлабух): А - доросла особина, 10 мм; В - незрілі і зрілі особини; С - перістоміум з лопатями на дорзальній губі; D - сперматека і атріум дорослих особин.

Варіації в будові B. parasita, с. Кислиця (оз. Котлабух)

За зовнішньою морфологією екземпляри з озера Котлабух схожі на ті, що знайдені в Польщі. Бульба сперматеки має поділ посередині з одного боку та короткий вивідний проток, однак внутрішній відросток сперматеки відсутній (Рис. 3.18). Ці зразки схожі на опис *B. bulgariensis*, але впевнено можна сказати лише отримавши молекулярні дані *B. bulgariensis* для порівняння.

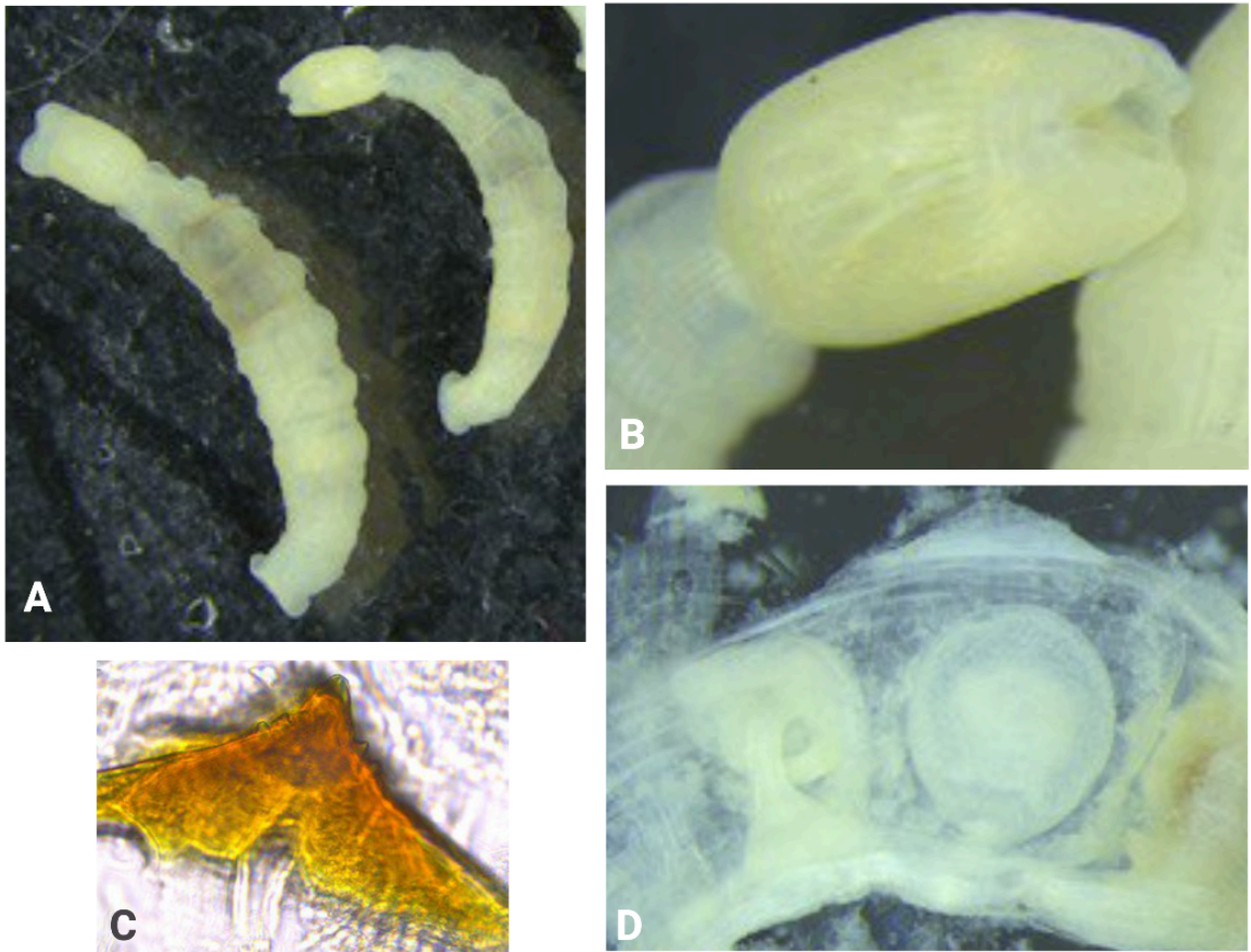


Рисунок 3.19. Варіації в будові *B. parasita*, р. Глінщиця, Словенія, *Au. torrentium*: А - дорослі особини, 8 мм; В - перистоміум; С - дорзальна щелепа; D - атріум і кругла сперматека.

У екземплярів із річки Глінщиця (Словенія) сперматека мала майже круглу форму з коротким і дуже тонким вивідним протоком і відсутністю внутрішнього відростка (Рис. 3.19). Атріум був добре розвинений, його залозиста частина утворювала вигін під прямим кутом. Варіацій у будові щелеп не було виявлено. Дорослі особини мали циліндричну форму без помітних розширень у зоні 6-7 тулубних сегментів. Верхня губа перистоміума була поділена на чотири лопаті, що в деяких екземплярів виглядало слабо помітним, а в інших — чітко вираженим. Це, ймовірно, залежало від ступеня скорочення тканин під час фіксації.

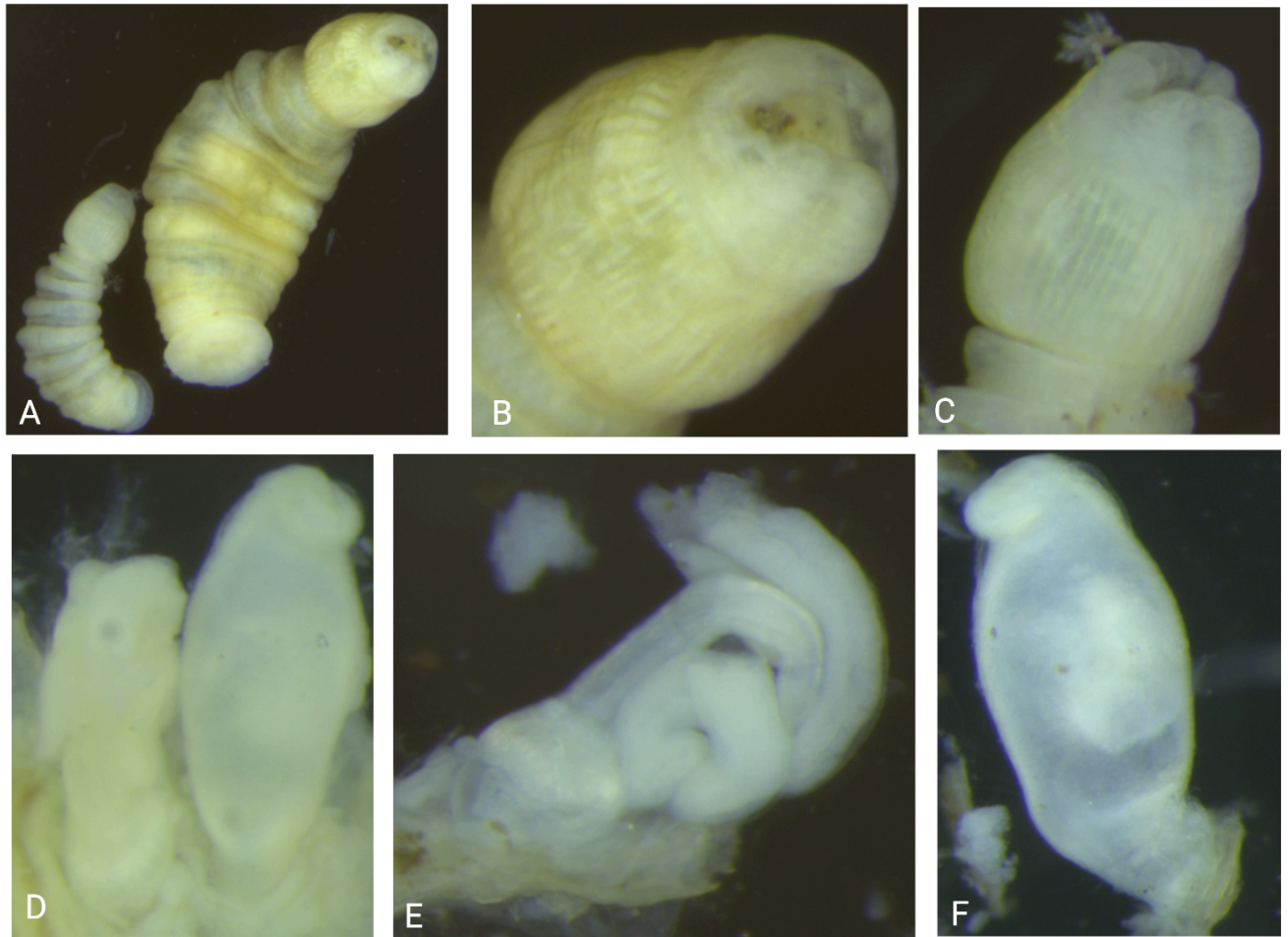


Рисунок 3.20. Варіації в будові *B. parasita*, Північна Македонія (Берово), *Au. torrentium*: А - загальний вигляд незрілої і зрілої особин; В, С - перістоміум; D - атріум і сперматека; Е - атріум; F - сперматека.

Зразки з Північної Македонії найбільше відповідають первинному опису виду *B. parasita*. Сперматека має чітко виражену овальну форму та короткий вивідний проток (Рис. 3.20). Внутрішній відросток сперматеки короткий, нахилений в один бік, тому, якщо розглядати сперматеку не з бокової сторони, його можна не помітити. Це може пояснювати, чому деякі дослідники при описі зразків могли не враховувати цю структуру. Цікаво, що у середніх за розміром екземплярів верхня губа має п'ять рівновеликих лопаті, тоді як у дорослих особин це поділення менш виражене. Нижня губа поділяється на два валика. Помітною відмінністю є великий задній адгезивний диск, ширина якого перевищує ширину останнього сегмента тулуба.

V. sp.n.

Типовий матеріал: Всього в 2009 році зібрано 4 екземпляри цього виду. Один екземпляр (S9) взято для проведення виділення ДНК і подальшого секвенування. Другий екземпляр (S10) взято для виділення щелеп та репродуктивної системи. Два інших екземпляри (S11, S12) зберігаються у 96 спирті у колекції біотехнічного факультету Люблянського університету.

Типова локація: річка Блошчиця, с. Блоке, Словенія на річковому раку *As. astacus*.

Опис. Переднє кільце 3 - 7 тулубного сегменту виступає назад. Тіло циліндричне в перших трьох тулубних сегментах, а далі сплющено з вентральної сторони і сегменти розширюються в цій частині тіла (Рис. 3.21). Довжина тіла особин: 4,79 мм, 4,54 мм. Ширина голови: 0,72 мм, 0,79 мм. Довжина голови: 0,93 мм, 0,89 мм. Довжина губ: 0,26 мм, 0,21 мм. Ширина 1го тулубного соміта: 0,59 мм, 0,54 мм. Нижня губа формує два валика, поділена на дві лопасті. Верхня губа також з нижньої частини формує два валика, але поділена на дві лопасті не чітко. Верхня губа трошки виступає над нижньою.

Щелепи однакового розміру, форми трикутної піраміди. Кожна має один центральний зубчик та 6 бокових (по три з кожної сторони від центрального зубчика) (Рис. 3.21).

Бульба сперматеки має видовжену форму і формує на передньому кінці овальне розширення, а задня частина трубкоподібна. Довжина бульби сперматеки 2 146 мкм (2,1 мм). Бульба має помітний краплеподібний внутрішній відросток. Канал бульби довгий, загинається під неї і доходить до середини довжини капсули 1 596 мкм (1,59 мм). Атріум формує бурсу довжиною 453 мкм, шириною 391 мкм шириною. Канали формують три щільні петлі всередині одного клубка (Рис. 3.21). Залозиста частина ширша за трубчасту в 2 рази. Також в два рази коротша. Гонопори маленькі, не виступають.

Поширення. Знайдений нами в одній локації в річці Блошчиця, поблизу села Блоке, Словенія.

Примітки. Цей вид найближчий до виду *B. parasita* за зовнішньою морфологією і будовою щелеп. Але помітно різниться будовою репродуктивної системи. На відміну від *B. parasita*, цей вид має довгий вивідний канал сперматеки, загнутий під бульбу сперматеки. Бульба не овальна, має форму колби.

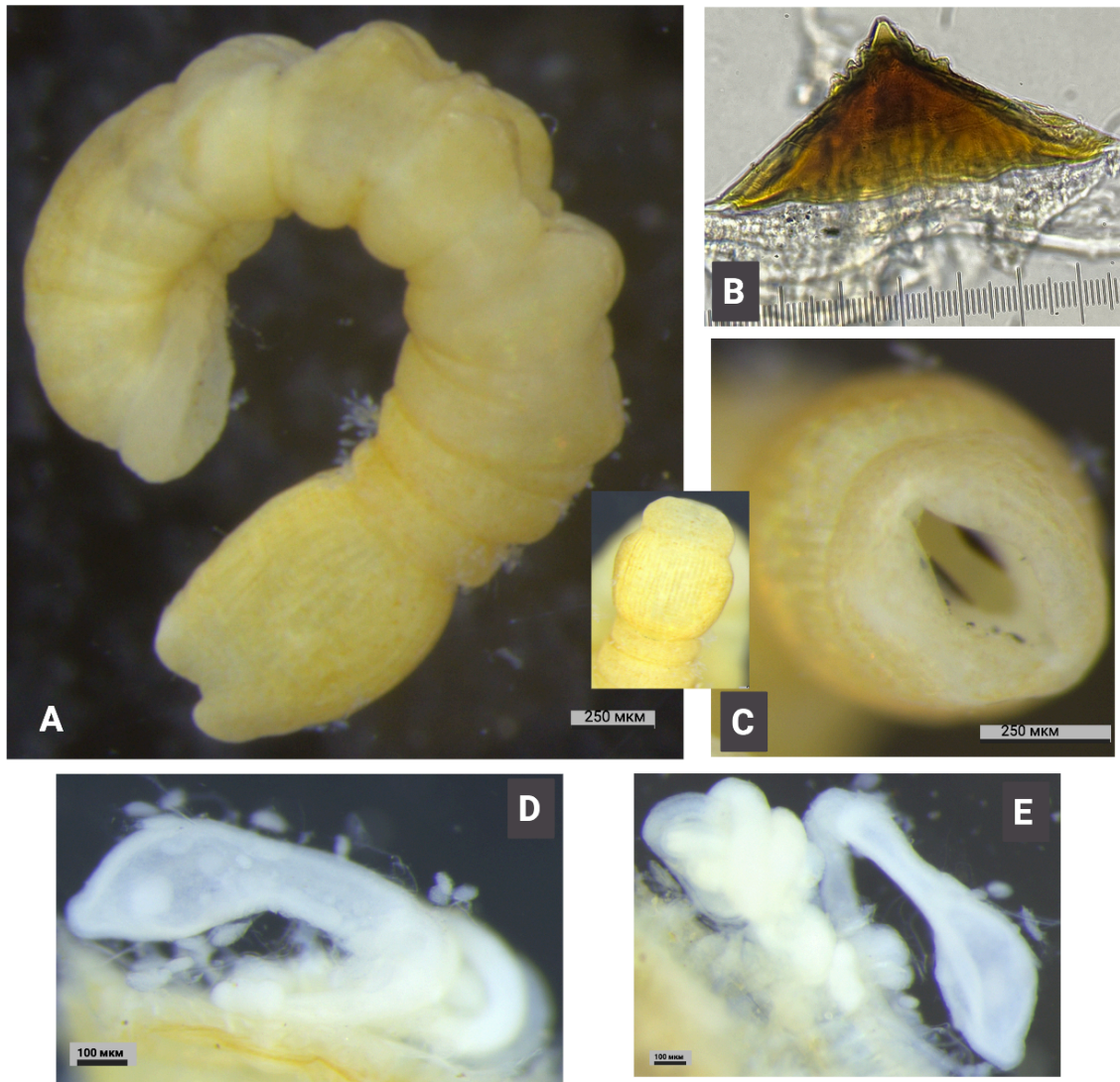


Рисунок 3.21. Морфологічні та анатомічні ознаки *B. sp.n.* (р. Блошчиця, Словенія): А – загальний вигляд дорослої особини; В – дорзальна щелепа; С - вигляд перистоміума з боку ротового отвору; D – сперматека з боку; Е - атріум і сперматека.

Branchiobdella balcanica Moszynski, 1938

Опубліковано в: *Moszynski, A. (1938). Oligochetes parasites de l'ecrevisse (Potamobius astacus) de la Yougoslavie. Bulletin de la société des sciences de Scopiye. 18: 69-75.*

Синоніми: *Branchiobdella insolita* (Moszyński, 1938) Karaman, 1967; *Branchiobdella balcanica* subsp. *balcanica* Moszynski, 1938; *Branchiobdella balcanica* subsp. *sketi* Karaman, 1967; *Xironogiton dolicoberos* (Georgévitch, 1957) Pop, 1965; *Branchiobdella pentodonta orientalis* (Pop, 1965) Karaman, 1967.

Типовий екземпляр: не вказано

Типова локація: річка Ібар, Косовська Мітровіца, Косово

Етимологія: та, що мешкає на Балканах

Опис. Довжина фіксованих особин коливалася від 1,8 до 4 мм. Тіло циліндричне та має однакову ширину від 1-го до 3-го сегментів, а потім сплющене дорзо-вентрально від 4-го до 8-го сегментів. Воно значно розширюється на 4-му сегменті, де переднє кільце утворює "плечі", і ширина подвоюється порівняно з 1-м сегментом, зберігаючи цю ширину до 7-го сегмента. Переднє кільце 8-го сегмента має чіткі бічні відростки, тоді як 9-й сегмент також має бічні відростки, розташовані на дорсальному кільці (Рис. 3.22). Ці відростки чітко видно у зразків, які були повільно фіксовані; однак у зразках, фіксованих швидко, відростки здаються скороченими. Голова овальна, її довжина приблизно на 10% більша за ширину і майже дорівнює ширині 1-го сегмента тіла. Вона становить 15% від загальної довжини тіла. Губи, які чітко відокремлені від голови, мають округлу форму і становлять 35% довжини голови, не маючи жодних лопатей.

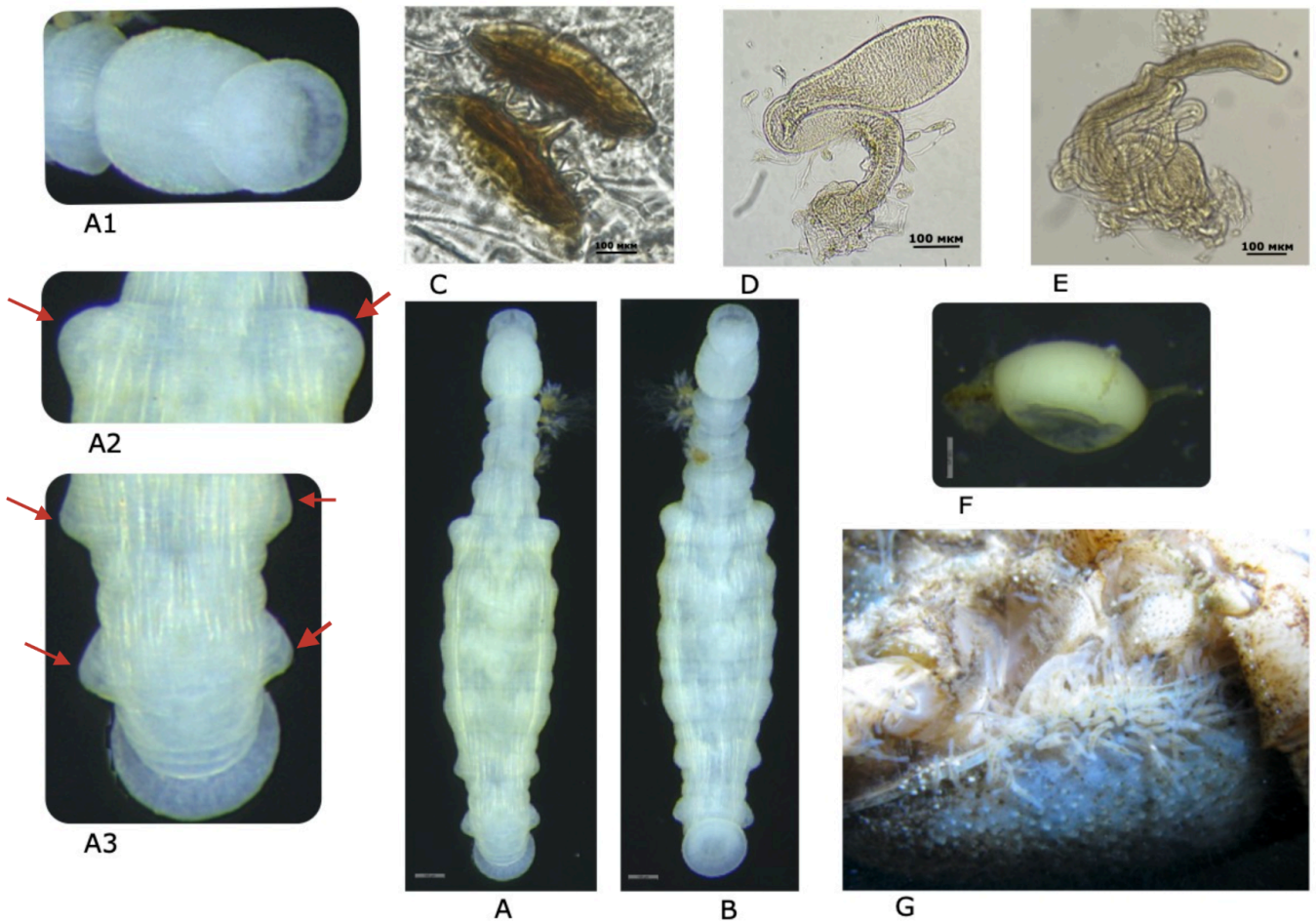


Рисунок 3.22. Морфологічні та анатомічні ознаки *Branchiobdella balcanica* (Закарпаття, р. Тересля): А – загальний вигляд дорослої особини, дорзальна сторона: А1 - головний відділ з перистоміумом, А2 - “плечі” переднього кільця 4го тулубного сегменту, А3 - вирости переднього кільця 8-го сегмента та заднього кільця 9го сегменту; В - загальний вигляд дорослої особини, вентральна сторона; С – дорзальна та вентральна щелепи; D - сперматека; Е - атріум; D - дорослі особини та їх кокони на внутрішньому краю карапаксу.

Щелепи однакові за розміром, темно-коричневі, видовжено-овальної форми, їх ширина втричі більша за висоту. Зуби розташовані вздовж прямого краю кожної щелепи. Дорзальна щелепа має п’ять або шість зубів, тоді як вентральна — п’ять. На обох щелепах зуби масивні і зазвичай однакові за розміром, причому середній зуб є помітно більшим за інші.

У дорослих черв’яків гонопори чітко видно на 5-му та 6-му сегментах тіла. Везикула сперматеки має бульбоподібну форму, з розширеним апікальним кінцем і

звуженим базальним кінцем. Вивідний проток дорівнює за довжиною везикулі, згинається під нею приблизно до половини її довжини, а потім згинається у протилежному напрямку до гонопори (Рис. 3.22). Залозиста частина атріуму має С-подібну форму, як описано Karaman (1967), і є широкою, тоді як трубчаста частина тонка та видовжена, утворюючи приблизно чотири петлі. Копулятивна bursa велика.

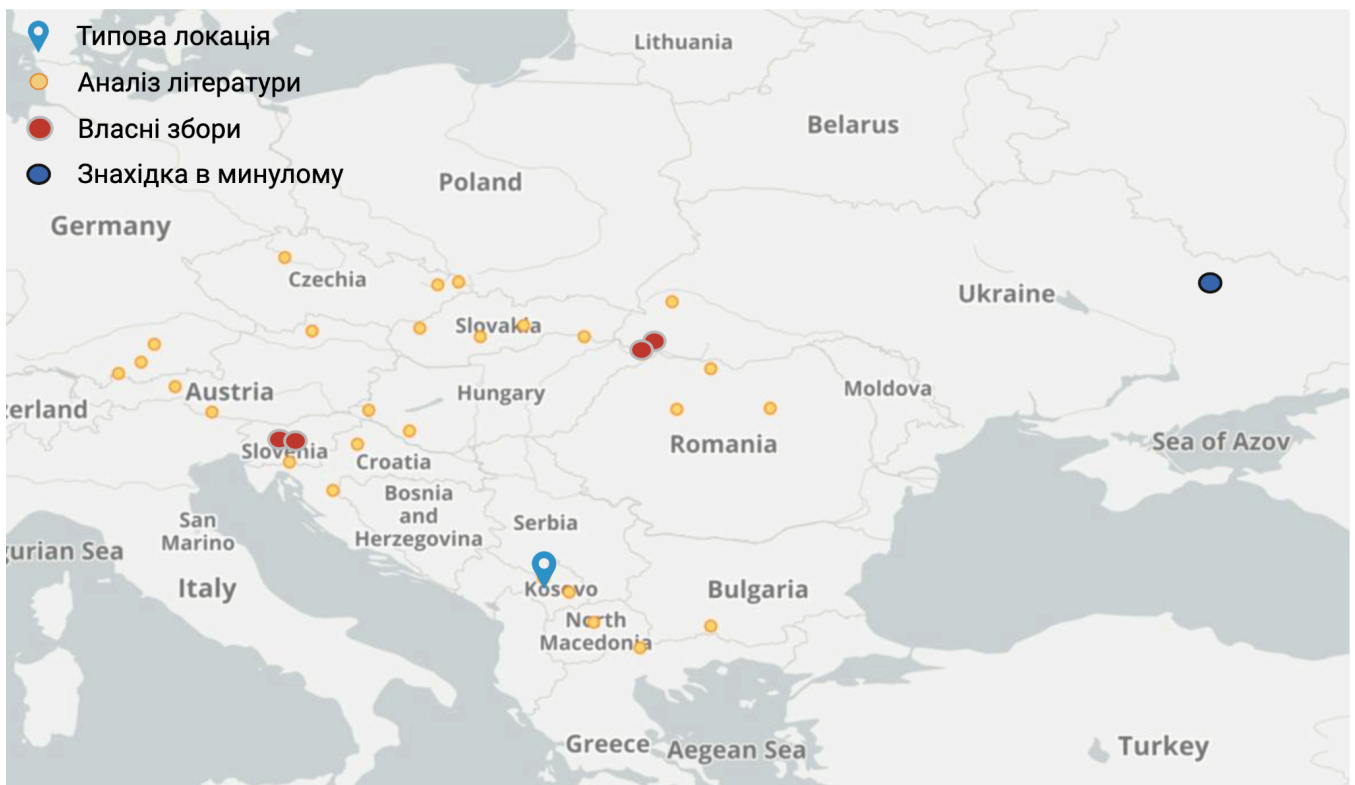


Рисунок 3.23. Поширення *V. balcanica* на території Західної Палеарктики. Збори, зроблені та проаналізовані в даній роботі, позначено червоним кольором (модифіковано за <https://www.gbif.org>).

Опис коконів та їх локалізація на тілі річкового рака. Кокон має форму пляшки, з капсулою довжиною 0,4–0,5 мм і шириною 0,3–0,35 мм. Стебло кокону коротке, довжиною 0,07–0,1 мм, і розширюється до основи капсули. Кришка кокону має мітриформну форму з довгим шипом довжиною 0,1–0,15 мм, який майже дорівнює або перевищує довжину стебла (Рис. 3.22). Кокони спостерігалися на раках у різних місцях, включаючи внутрішню сторону клешень та їх кутові з'єднання, вздовж

бічного краю карапаксу, біля основи переопод, на нижній частині шийної борозни та на плеоподах. Рідше кокони прикріплювалися біля основи антен та максиліподів.

Поширення. Цей вид вперше описав Moszynski (1937) з Косово. Пізніше його знаходили у річках і струмках Румунії, Угорщини (Subchev, 1984) та колишньої Югославії (Македонія, Сербія, Словенія) (Moszynski, 1937; Georgevitch, 1955). У Хорватії цей вид виявив Klobučar (2006) на *Astacus astacus*, а в Угорщині Kovač (2007) зафіксував його на *Astacus astacus* та *Austropotamobius torrentium*. У нашому дослідженні ми знайшли цей вид у трьох місцях у Словенії на *Astacus astacus* (Табл. 1.2, 1.4) та одному місці на *Austropotamobius torrentium* (Заплана, Логатець). В Україні *Branchiobdella balcanica* була знайдена в озері Синевир та річці Теремля (Рис. 3.23). Раніше її також виявили біля міста Трускавець у асоціації з *A. astacus* (Boshko, 1983).

Асоціація з хазяями та співіснування бранхіобделід: *As. astacus*, *Au. torrentium*

Варіації. Дослідження підвиду *Branchiobdella balcanica sketi* Karaman 1967.

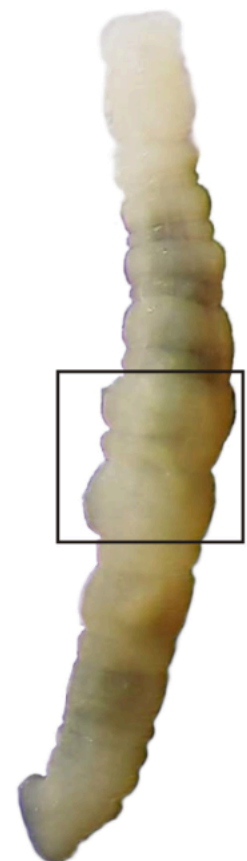
Цей підвид був описаний Karaman (1967) з річки Великий Обрх у Ложському полі (Словенія). При обстеженні типової місцевості, ми не знайшли там річкових раків, оскільки річка була сильно поросла травою. Згідно з повідомленнями місцевих жителів, раків там не спостерігали з 2007 року. Однак ми дослідили близько розташовані локації: річку Блошчиця (біля села Вольче), озеро Церкниця (збори з Мартинщиці, 1968) та Раковський мостик (з 1969). У цих місцях ми виявили *As. astacus* та асоційованих бранхіобделід, включаючи *B. balcanica*. Ми проводили дослідження в двох сезонах: навесні і восени.

Наші дослідження виявили сезонну динаміку у розмірі копулятивної бурси. У зразках, зібраних навесні, спостерігалися значні варіації: у дорослих особин були як звичайні, так і збільшені копулятивні бурси (Рис. 3.24). Навпаки, зразки, зібрані восени, були незрілими і не мали збільшення копулятивної бурси. Для остаточного уточнення таксономічного статусу підвидів нами було застосовано молекулярні методи (див. розділ “Делімітація видів”).



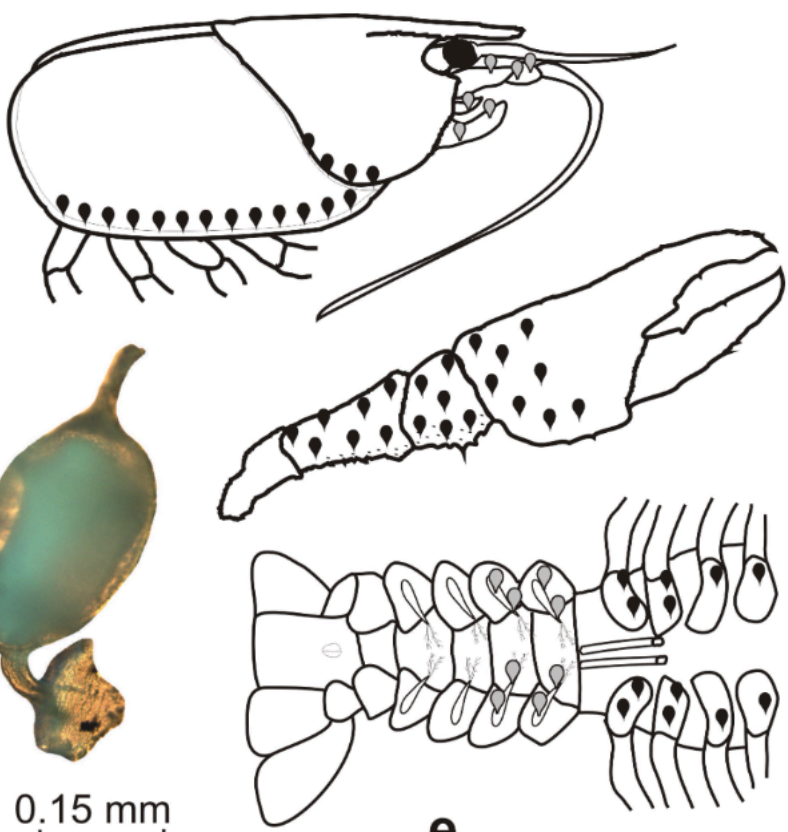
a

Серпень, 2009



b

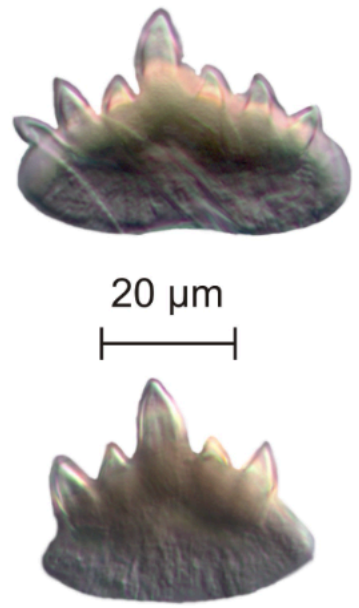
травень, 2018



d

0.15 mm

e



f

Рис. 3.24. Морфологічні та анатомічні ознаки *Branchiobdella balcanica* (Словенія, р. Блошчиця): а – загальний вигляд дорослої особини (серпень, 2009); б - загальний вигляд дорослої особини (травень, 2018); d - кокон з помітною ковпачкоподібною кришечкою; е - локалізація коконів на поверхні річкового раку; f - дорзальна та вентральна щелепи.

***Branchiobdella pentadonta* Whitman, 1882**

Опубліковано в: Whitman, С.О. (1882). A new species of *Branchiobdella*. *Zoologischer Anzeiger*. 5:636-637.

Синоніми: *Branchiobdella varians* var. *pentadonta* (Voigt, 1885) Pierantoni, 1912; *Branchiobdella capito* (Georgévitch, 1955) Pop, 1965; *Branchiobdella segmentata* (Georgévitch, 1957) Pop, 1965; *Branchiobdella septadonta* (Georgévitch, 1957) Pop, 1965; *Cambarincola dojranensis* (Georgévitch, 1955) Pop, 1965; *Cambarincola gastrax* (Georgévitch, 1955) Pop, 1965; *Xironodrilus crassus* (Georgévitch, 1955) Pop, 1965; *Xironogiton dilatatus* (Georgévitch, 1955) Pop, 1965; *Xironogiton doli-coderos* (Georgévitch, 1955) Pop, 1965; *Xironogiton latus* (Georgévitch, 1957) Pop, 1965

Типовий екземпляр: не доступний

Типова локація: Лейпциг, Німеччина

Етимологія: та, що має п'ять зубців

Опис. Довжина варіює від 3,5 до 4,5 мм. Тіло слабо сплюснене. Голова овальна; її ширина трохи перевищує ширину першого сегмента тулуба та дорівнює ширині другого сегмента тулуба. Перістомий відділений від голови борозною. Сегменти тулуба розширюються; ширина 4-го сегмента тулуба перевищує ширину 1-го сегмента в 1,7–2,0 рази. Максимальна ширина тіла в 5–7 сегментах; її ширина перевищує ширину першого сегмента тулуба в 2,3–2,5 рази. Сегменти тулуба поступово звужуються до останнього сегмента (Рис. 3.25). Щелепи прямокутні, овальної форми, майже однакового розміру; лінія основи щелепи опукла; ширина щелепи від її основи до основи середнього зубця становить 18–22 мкм; довжина щелепи — 37–40 мкм. Кількість зубців варіює від 5 до 6; середній зубець великий; зубна формула 5/5, 6/5. Сперматека велика, овальної форми, зі слабо звуженим дистальним кінцем; її бульба довша за проток. Пенис прямий і гладкий; чоловічий гонопор чітко видно.

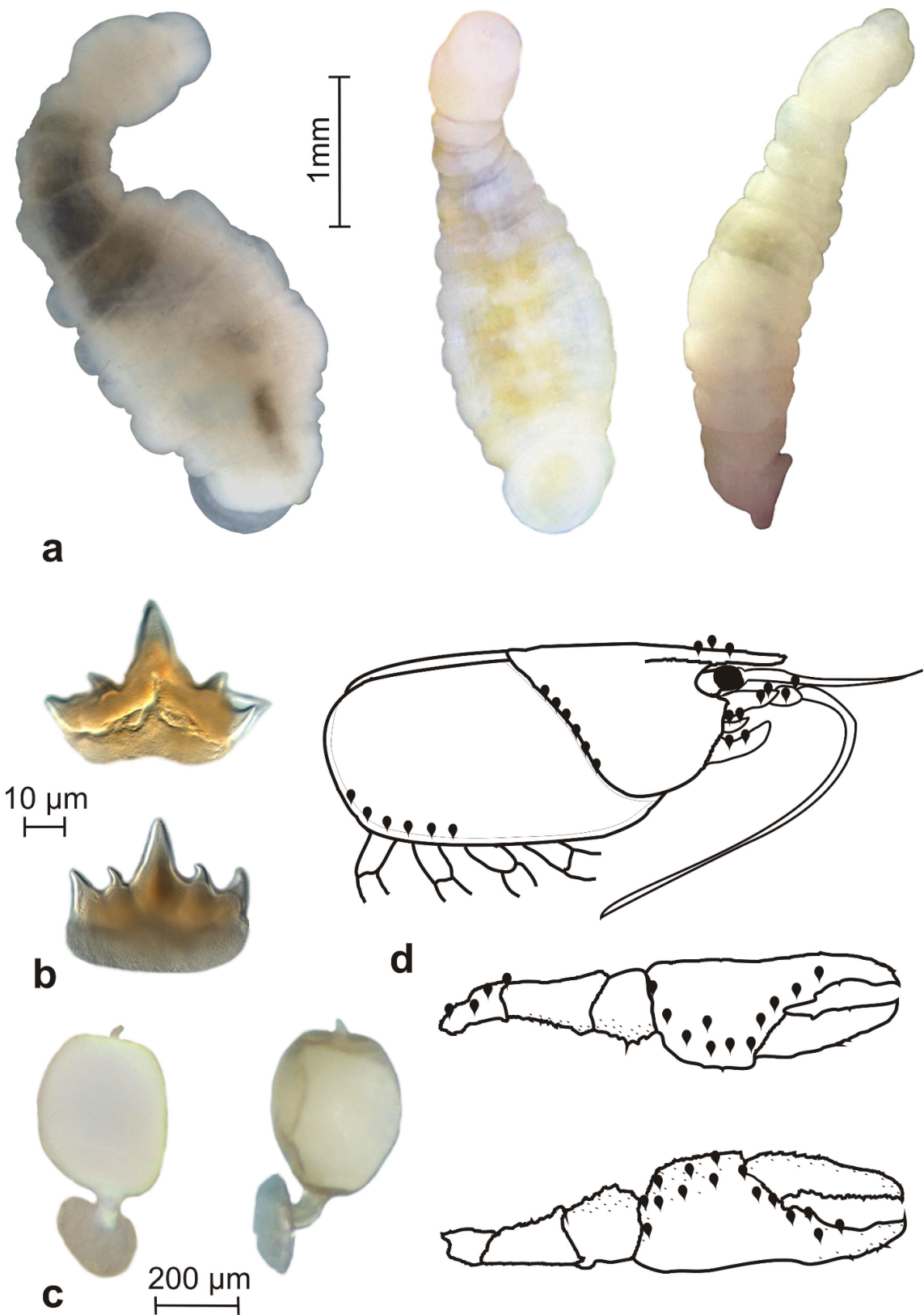


Рис. 3.25. Морфологічні та анатомічні ознаки *Branchiobdella pentadonta*: а – загальний вигляд дорослої особини; б - дорзальна та вентральна щелепи; с - кокони; д - локалізація коконів на поверхні річкового раку.

Опис коконів та їх локалізація на тілі річкового рака. Кокон овальний; довжина капсули 0,3–0,5 мм; ширина капсули 0,27–0,34 мм. Ніжка кокона коротка і товста, завдовжки 0,07–0,11 мм. Кришечка кокона сплюснена з маленьким шипом завдовжки 0,02–0,04 мм (Рис. 3.25). Кокони прикріплені до середньої частини шийної борозни, вентро-задньої частини карапаксу, кінчика роstrума, максиліпедів, основ антен, зовнішнього та внутрішнього боків згинів клешень та біля їх основ (Рис. 3.25).

Поширення. Широко відомий у Європі в басейні Дунаю. Караман (1970) зафіксував цей вид на Балканах: у південній Македонії (біля Консько), західній Сербії, потоки Сана в східній Боснії та Герцеговині. Savić (2018) зареєстрував цей вид у Хорватії. Ми знайшли *B. pentadonta* у східній Македонії (потік Осойниця біля Берово), східній та південній Боснії та Герцеговині (потоки біля Кладаня та Коніца). Ми також зафіксували цей вид у Хорватії, Боснії та Герцеговині (потік біля Увір, Кладань) та Чорногорії (річка Црнојевича та Скадарське озеро), а також виявили присутність *Branchiobdella pentadonta* у водах Словенії (Табл. 2.1). Раніше його знаходили лише один раз у північно-західній Словенії у потоці біля Бледу.

Асоціація з хазяями та співіснування бранхіобделід: *Austropotamobius torrentium*, *Astacus astacus*, *Astacus leptodactylus* та *Austropotamobius pallipes*.

***Branchiobdella italica* Canegallo, 1928**

Опубліковано в: Canegallo, Maria Alessandra. (1928). Una nuova specie di Branchiobdella - Branchiobdella italica. *Atti della Societa Italiana di Scienze Naturali e del Museo Civico di Storia Naturale di Milano*. 67: 214-224.

Синоніми: Synonyms: *Branchiobdella pentadonta italica* (Pop, 1965) Karaman, 1967; *Bdellodrilus hexadonta* (Georgévitch, 1957) Karaman, 1967; *Branchiobdella karamani* (Georgévitch, 1957) Karaman, 1967; *Branchiobdella unidonta* (Georgévitch, 1957) Karaman, 1967; *Cambarincolla hamata* (Georgévitch, 1957) Karaman, 1967; *Xirondrilus tetradonta* (Georgévitch, 1955) Karaman, 1967; *Xironogiton tridens* (Georgévitch, 1955) Karaman, 1967; *Branchiobdella pentadonta* (Georgévitch, 1957) Kozarov *et al.* (1972)

Типовий екземпляр: не доступний

Типова локація: Italy

Етимологія: та, що мешкає в Італії

Опис. Довжина варіює від 2,5 до 3,0 мм. Тіло циліндричне, слабо сплюснене. Голова подовжено-овальна; її ширина трохи перевищує ширину першого сегмента тулуба. Перістомий відділений від голови борозною. Тіло поступово розширюється до заднього кінця; ширина 4-го сегмента тулуба перевищує ширину 1-го сегмента в 1,5 рази. Максимальна ширина тіла в 6-му сегменті; її ширина перевищує ширину першого сегмента в 1,5–2 рази (Рис. 3.26). Щелепи прямокутні, майже однакового розміру; ширина щелепи від основи до середини середнього зубця становить 16–18 мкм, довжина щелепи — 37–40 мкм. Лінія основи щелепи пряма. Кількість зубців варіює від 5 до 7; зубна формула 6/5, 7/5. Середній зубець великий (Рис. 3.26). Бульба сперматеки грушоподібна, велика. Протока сперматеки в 1,5–2 рази довша за бульбу, зігнута; чоловічий гонопор відносно малий.

Опис коконів та їх локалізація на тілі річкового рака. Кокон овальний; довжина капсули 0,32–0,4 мм, ширина капсули 0,22–0,27 мм. Ніжка кокона коротка і товста, завдовжки 0,06–0,12 мм; кришечка кокона має маленький шип завдовжки 0,01–0,06 мм (Рис. 3.26). Кокони розташовані вздовж краю латеро-задньої частини карапаксу, іноді охоплюючи перший черевний сегмент. Ми також знаходили їх на шийній борозні, у згинах клешень, біля основ антен та максиліпедів (Рис. 3.26).

Поширення. Вперше виявлений Canegallo (1929) у північній Італії. Караман (1967) зареєстрував його у Югославії та в регіоні Адріатичного узбережжя Хорватії. Останні дослідження повідомляють про його присутність у *Austropotamobius pallipes* та *Procambarus clarkii* у північній Італії (Gelder et al., 1999). Klobucar (2006) та Savic (2018) надали детальнішу інформацію про поширення цього виду у Хорватії. Тут ми повідомляємо про присутність цього виду у деяких районах Хорватії, Словенії та Боснії і Герцеговини, де раніше його не фіксували.

Асоціація з хазяями та співіснування бранхіобделід: Віддає перевагу асоціації з *Austropotamobius pallipes* (Karaman, 1967; Klobučar, 2006), був зареєстрований у *Austropotamobius pallipes* та *Procambarus clarkii* у північній Італії (Gelder et al., 1999). Ми знайшли цей вид не лише на *Austropotamobius pallipes*, але й у чотирьох місцевостях на *Austropotamobius torrentium* (Табл. 2.1).

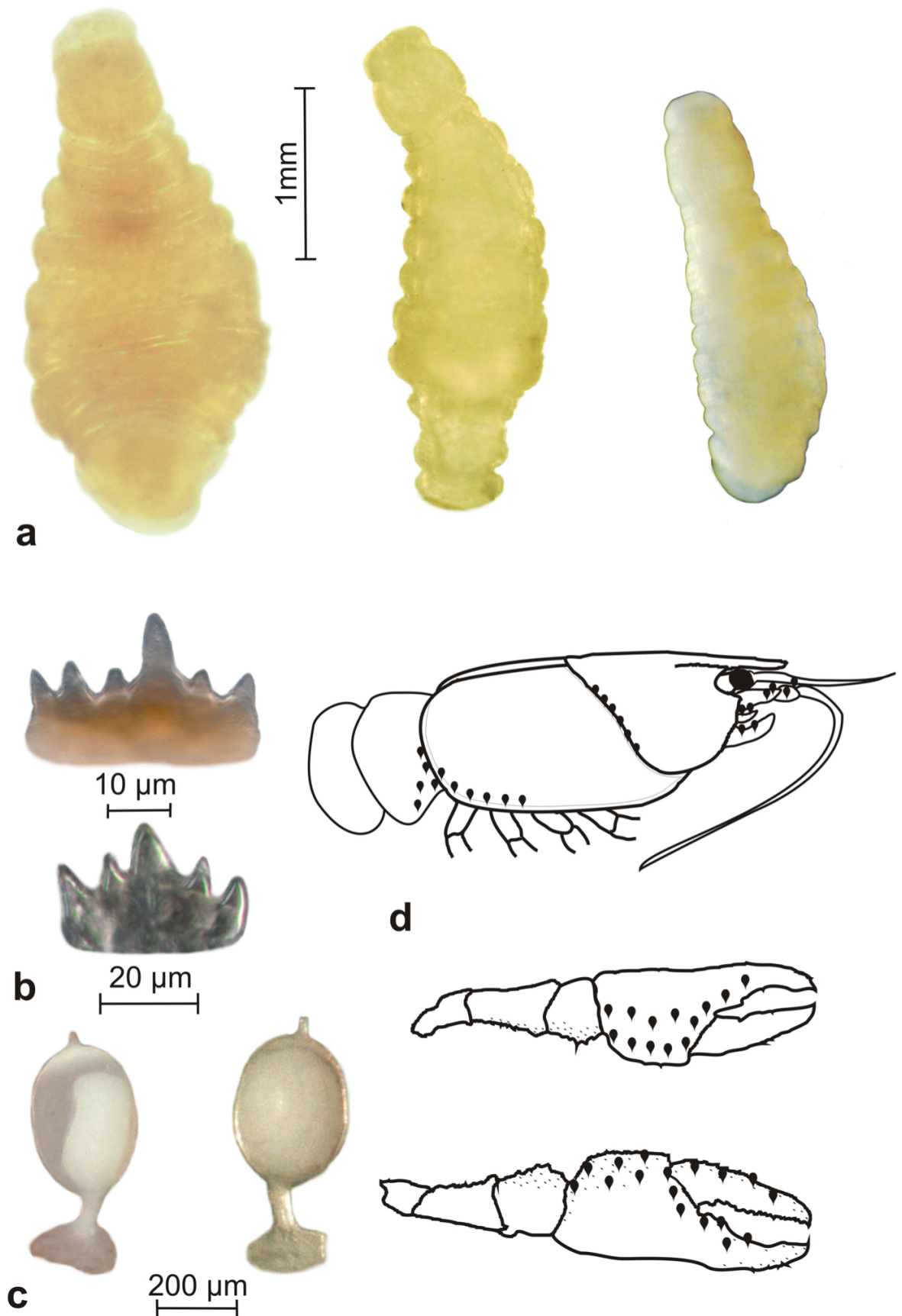


Рис. 3.26. Морфологічні та анатомічні ознаки *Branchiobdella italica* (Хорватія, оз. Модро Око): а – загальний вигляд дорослої особини; б - дорзальна та вентральна щелепи; с - кокон; d - локалізація коконів на поверхні річкового раку.

Порівняння *B. pentadonta* та *B. italica*. Згідно з оригінальним описом (Canegallo, 1928), *B. italica* незначно відрізняється за морфологією від *B. pentadonta*, за винятком репродуктивної системи, зокрема співвідношення довжини бульби сперматеки до довжини її протоки. Крім того, ці види можна відрізнити за зовнішньою морфологією, і ми спостерігали деякі відмінності у будові їх щелеп. Обидві щелепи майже однакові за довжиною (37–40 мкм) у однієї особини. Щелепи *B. italica* сягають 16–18 мкм у ширину, тоді як у *B. pentadonta* — 18–22 мкм. Через такі пропорції довжини/ширини щелепи *B. italica* виглядають видовженими прямокутними, тоді як у *B. pentadonta* вони овальні. Розташування зубців також є важливою ознакою. Так, зубці *B. italica* розташовані у слабко вигнутій, майже прямій лінії; зубці *B. pentadonta* утворюють дугу (Рис. 3.25). У *B. italica* лінія основи щелепи пряма або слабко увігнута, тоді як у *B. pentadonta* вона опукла. Щелепи *B. italica* часто можна чітко розгледіти крізь прозорі покриви коконів, і вони повністю відповідають будові щелеп дорослих особин (Рис. 3.26). Розміри черв'яків можуть варіювати, але всі дорослі особини *B. italica* завжди менші за *B. pentadonta* (див. опис вище). Ширина 4-го сегмента тулуба *B. pentadonta* перевищує ширину 1-го сегмента в 1,7–2,0 рази. У *B. italica* це співвідношення близьке до 1,5. Ширина тіла *B. pentadonta* у 6-му сегменті перевищує ширину першого сегмента в 2,3–2,5 рази, тоді як у *B. italica* це співвідношення становить близько 1,5–2,0.

3.3. Філогенетична структура бранхіобделід Західної Палеарктики

Попередні дослідження, проведені за допомогою однолокусного (за CO1) філогенетичного аналізу, виявили певну структуру всередині бранхіобделід, але отримані угруповання, не можуть бути охарактеризовані за своєю морфологією (Fureder et al., 2009). Філогенетичне положення розповсюдженого виду *B. kozarovi* не було відоме. Для вивчення філогенетичних зв'язків у роді *Branchiobdella* було проведено комплексний аналіз молекулярних маркерів (CO1, 16S, 28S та ITS), що включав як аналіз окремих генетичних локусів, так і об'єднані набори даних. Матеріал для дослідження був зібраний з різних річкових басейнів Західної

Палеарктики, з особливим акцентом на вид *B. parasita*, який демонстрував значну морфологічну мінливість, особливо у будові сперматеки.

Аналіз мітохондріального гена CO1 (164 послідовності, з яких 31% були отримані в рамках цього дослідження) проводився з використанням методу Максимальної правдоподібності в програмі IQTree (Рис. 3.27). За допомогою алгоритму ModelFinder було протестовано 88 моделей еволюції ДНК, серед яких оптимальною за критеріями Akaike (AIC) та Bayesian (BIC) виявилася модель TIM3+F+I+G4. Ця модель враховує: 1) різні швидкості нуклеотидних заміни (TIM3), 2) різні частоти нуклеотидів (F), 3) частку інваріантних сайтів I), та 4) гамма-розподіл швидкостей заміни з 4 категоріями (G4). Статистична підтримка гілок оцінювалася за допомогою ультрашвидкого бутстреп-аналізу з 10000 реплікацій (UFBoot), що дозволило отримати надійні оцінки при збереженні обчислювальних ресурсів.

У результаті філогенетичного аналізу послідовностей гена CO1 ми побудували дерево, на якому можна виділити сім основних монофілетичних клад, які мають високу бутстреп-підтримку (Рис. 3.27). Також ми виявили високу генетичну диференціацію всередині досліджуваних видів з максимальними значеннями *p*-distance до 17% для *B. parasita*. Новий вид *B. sp.n.* знаходиться всередині цієї кладки. Вид *B. hexadonta* розділився на дві субклади. Види *B. astaci*, *B. hexadonta*, *B. parasita* та *B. kozarovi* формували сусідні клади, що може відображати їхні спільні екологічні адаптації до тісного симбіотичного способу життя, але не філогенетичні відносини.

Окремо ми проаналізували послідовності генів, які найчастіше використовуються для філогенетичних реконструкцій п'явок, а саме 16S, 28S та ITS.

Філогенетичне дерево, побудоване методом Максимальної правдоподібності (IQ-TREE) для представників Branchiobdellida на основі фрагмента гена 16S показав відмінну топологію від генетичного локуса CO1. На дереві ми бачимо відокремлення восьми монофілетичних клад, що відповідають видам (Рис. 3.28). Новий вид *B. sp.n.* формує окрему кладу від схожого з ним виду *B. parasita*. Усі особини, що

розглядаються в даному дослідженні, належать до нашої вибірки, включаючи *X. victoriensis*, який належить до іншого роду та зовнішню групу п'явок *Hemiclepsis marginata*. Вид *B. kozarovi* формує сестринську кладу до видів *B. pentadonta* та *B. italica* і разом вони формують сестринську кладу до виду *B. balcanica*.

Дерево, отримане внаслідок філогенетичного аналізу послідовностей ядерного локусу 28S II (Рис. 3.29), демонструє принципово іншу топологію. Усього можна виділити сім головних монофілетичних груп. Бутстреп підтримка клад, яка формує вид *B. hexadonta* та *B. italica* є низькою і не є такою, якій можна довіряти. Вид *B. astaci* займає положення всередині виду *B. parasita*, що суперечить морфологічним описам видів. Однак, новий вид *B. sp.n.* формує окрему кладу від схожого з ним виду *B. parasita* з бутстреп підтримкою 90.

Філогенетичний аналіз бранхіобделід гена ITS продемонстрував високу бутстреп підтримку восьми основних клад, які відповідають видам. Вид *B. sp.n.* формує окрему кладу від схожого з ним виду *B. parasita*. Вид *B. kozarovi* формує сестринську кладу з видом *B. balcanica*, так само як і за геном 28S, а не з *B. pentadonta* та *B. italica*, як в аналізі *COI* та *16S*.

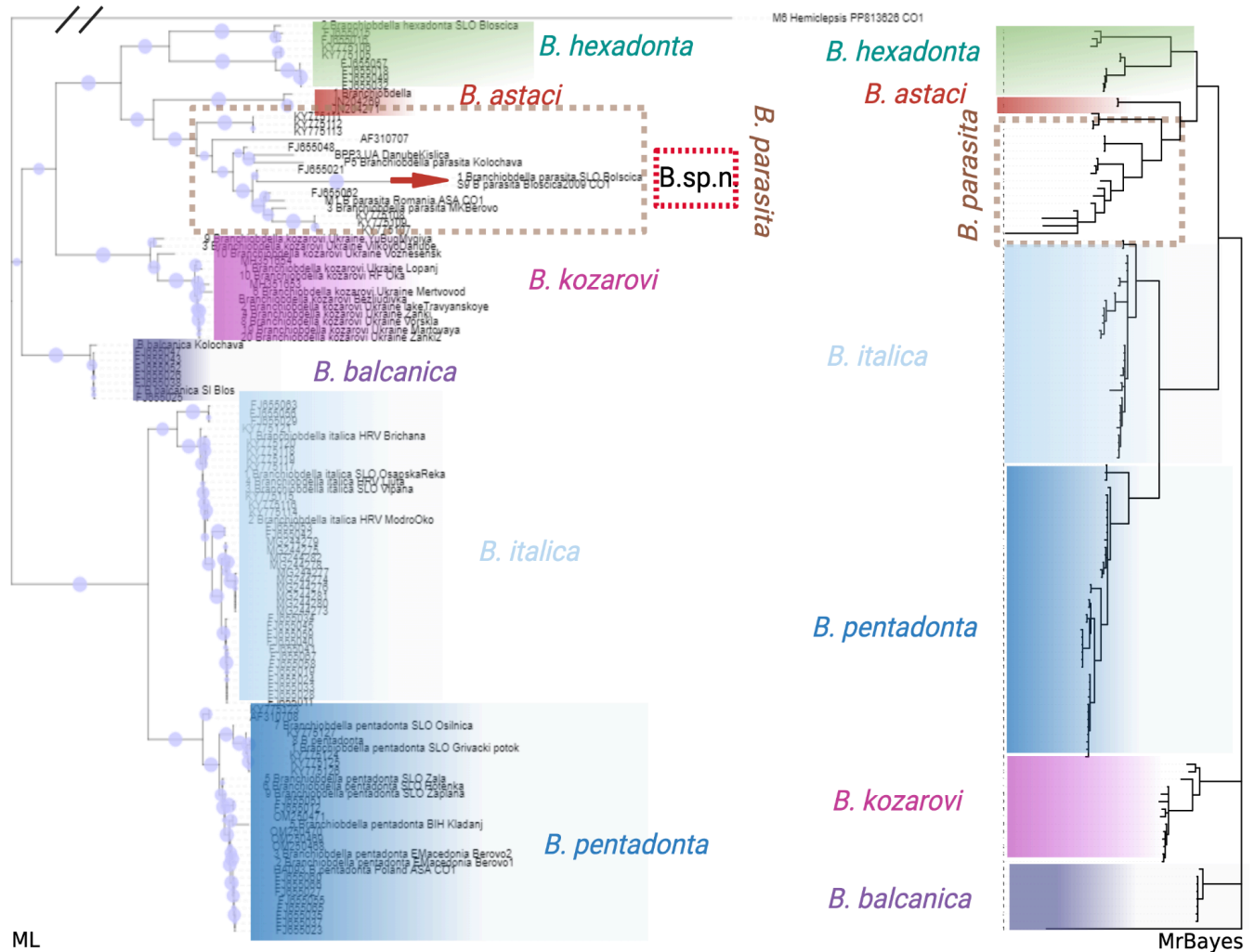


Рисунок 3.27. Філогенетичне дерево, побудоване методом Максимальної правдоподібності (IQ-TREE) та на основі Баєсового висновування (MrBayes) для представників Branchiobdellida на основі генетичного локусу CO1. Дерево відображає довжину гілок. Значення ймовірностей (posterior probabilities), що перевищують 75 %, позначені на вузлах сірим кольором.

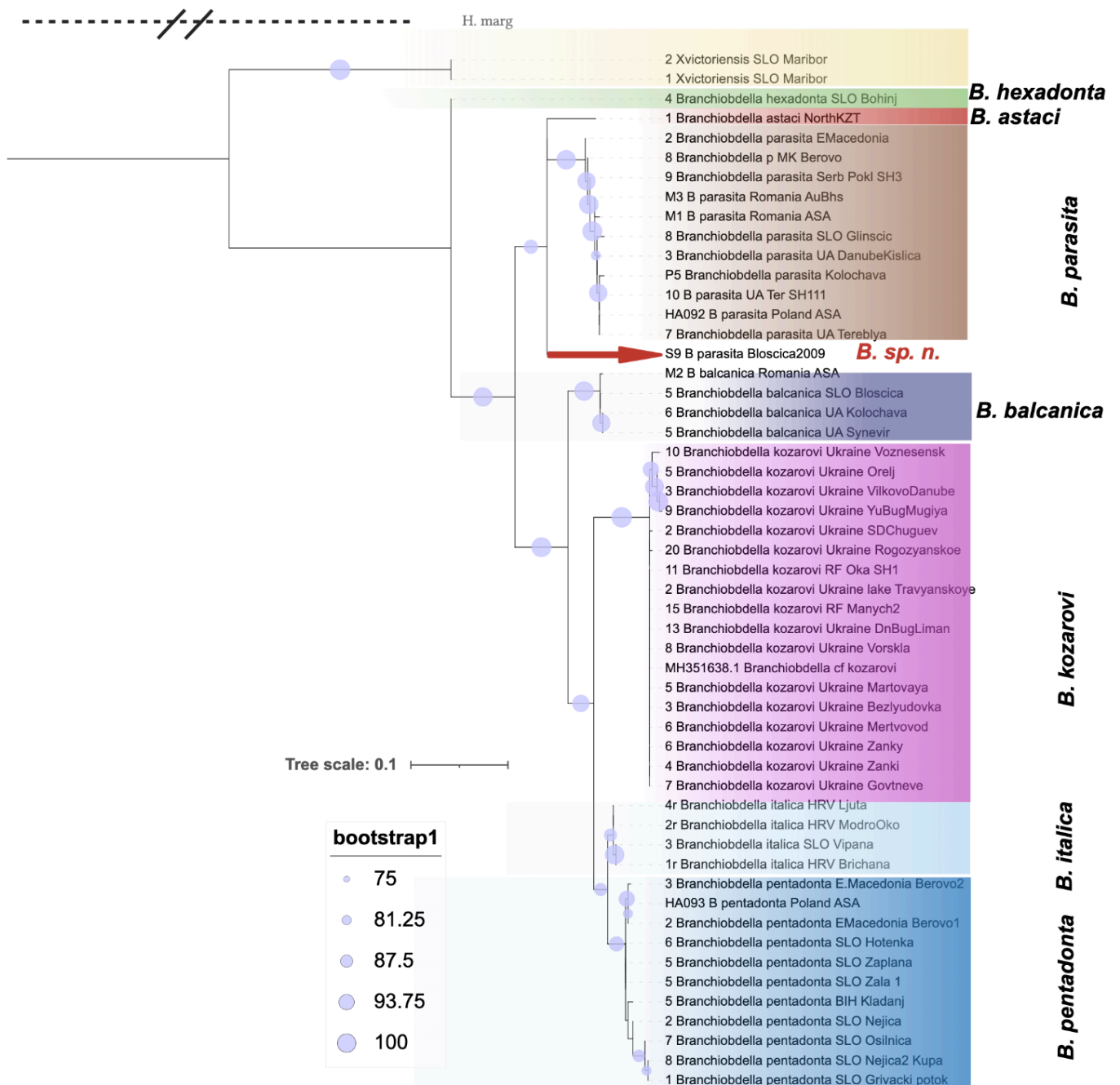


Рисунок 3.28. Філогенетичне дерево, побудоване методом Максимальної правдоподібності (IQ-TREE) для представників Branchiobdellida на основі фрагмента гена 16S. Усі особини, що розглядаються в даному дослідженні, належать до нашої вибірки, включаючи зовнішню групу (outgroup). Дерево відображає довжину гілок. Значення ймовірностей (posterior probabilities), що перевищують 75 %, позначені на вузлах сірими кружками.

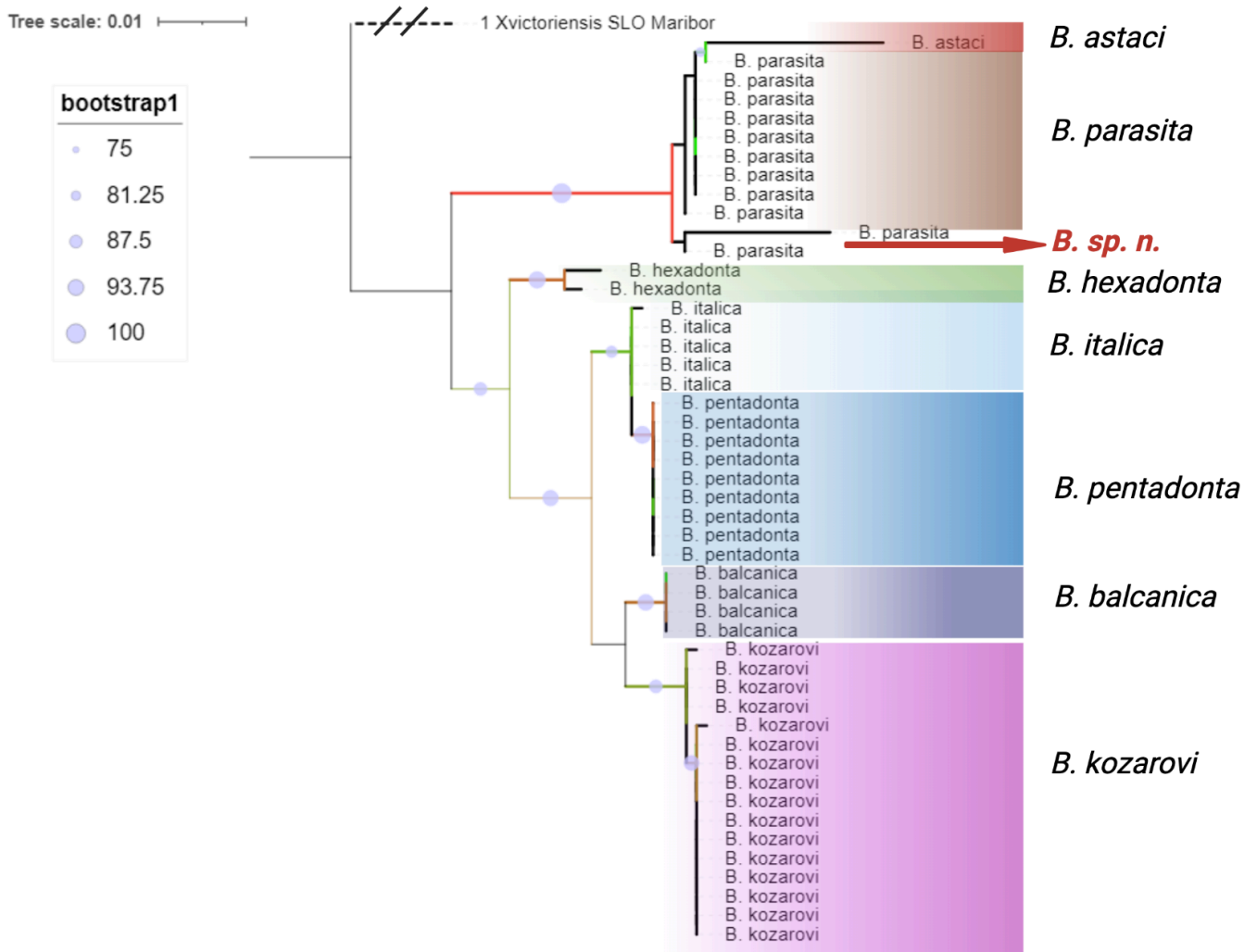


Рисунок 3.29. Філогенетичне дерево, побудоване методом Максимальної правдоподібності (IQ-TREE) для представників Branchiobdellida на основі фрагмента гена 28S II. Усі особини, що розглядаються в даному дослідженні, належать до нашої вибірки, включаючи зовнішню групу (outgroup). Дерево відображає довжину гілок. Значення на вузлах вказують на підтримку за методом бутстреп (bootstrap support).

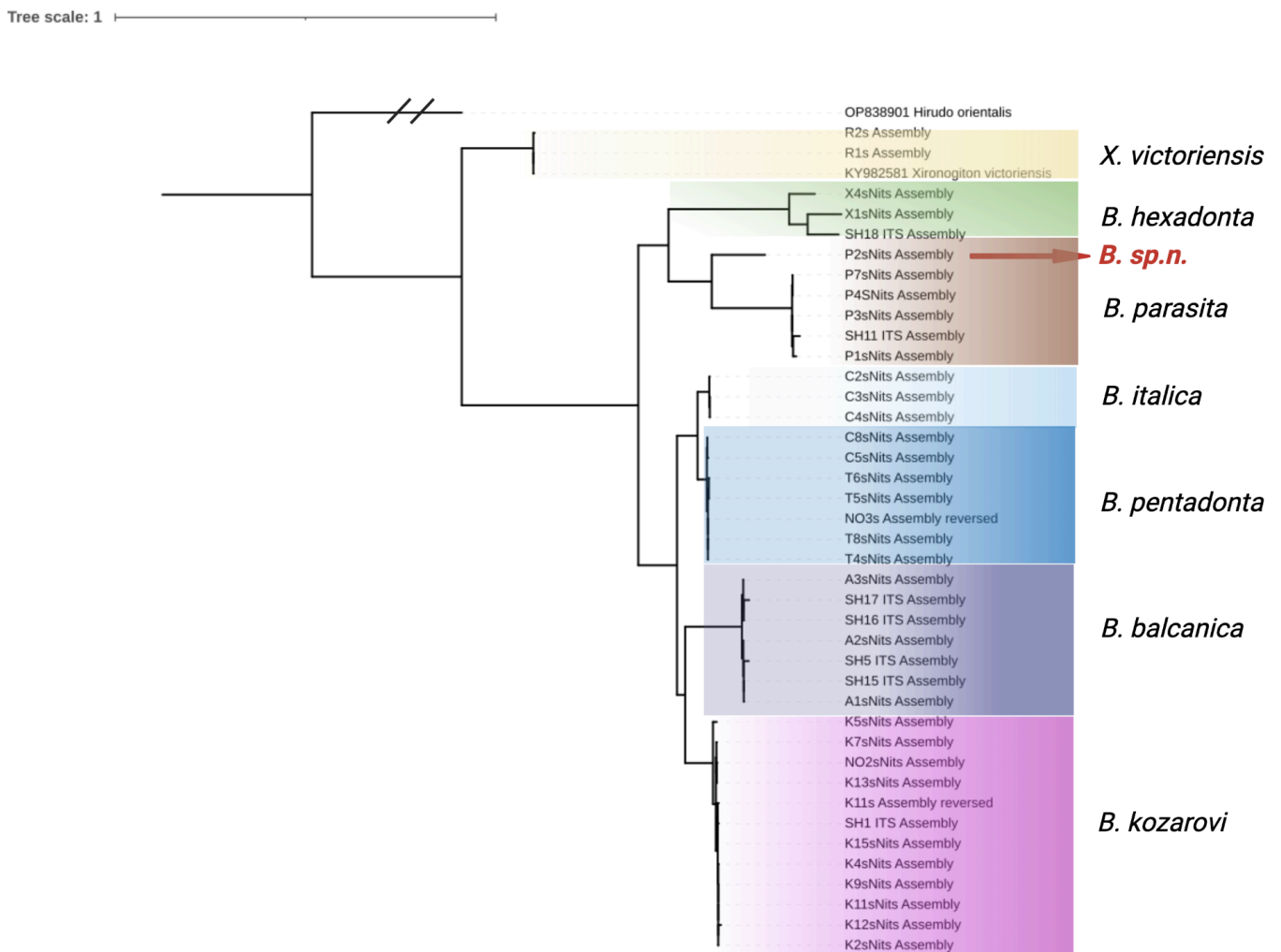


Рисунок 3.30. Філогенетичне дерево, побудоване методом Максимальної правдоподібності (IQ-TREE) для представників Branchiobdellida на основі фрагмента гена ITS. Усі особини, що розглядаються в даному дослідженні, належать до нашої вибірки, включаючи зовнішню групу (outgroup). Дерево відображає довжину гілок. Показані гілки з bootstrap support більше 75.

Через отримані суперечні дані філогенетичних дерев за окремими генами, а також для підвищення надійності філогенетичної реконструкції було проведено об'єднаний аналіз мітохондріальних (CO1, 16S рДНК) та ядерних (28S рДНК та ITS) генетичних локусів загальною довжиною 2914 пар основ. Оптимальною моделлю для аналізу стала GTR+F+I+G4, яка включає узагальнену модель (GTR) та враховує гетерогенність швидкостей еволюції. Як і в попередньому випадку, для оцінки підтримки гілок був застосований ультрашвидкий бутстреп з 1000 реплікацій.

Аналіз об'єднаної матриці значно підвищив підтримку ключових гілок (bootstrap>90%) і виявив чітку кофілогенетичну структуру (Рис. 3.31), зокрема:

1) монофілетичну групу, асоційовану з *As. leptodactylus* (*B. kozarovi*), яка поділяється на дві субклади: з Північного Бугу і зі Східної Європи (bootstrap більше 90)

2) монофілетичну групу, пов'язану з *As. astacus* (bootstrap 100) - *B. balcanica*-поділену на дві субклади: Закарпаття України та Західні Балкани і Румунію

3) монофілетичну групу виду, що живе на *Au. pallipes* - *B. italica*

4) монофілетичну групу виду, асоційованому з *Au. torrentium* - *B. pentadonta*-яка не має чіткого ділення на субклади

5) чітко простежується виділення сестринської до *B. parasita* клади (99 бутстреп) - окремого виду *B. sp.n.*

6) клада *B. parasita* поділяється всередині (бутстреп підтримка більше 90) на дві субклади. Одна - субклада з Закарпаття і гирла річки Дунай в Україні з широкопалого та довгопалого раку та з Польщі з широкопалого рака. Друга - з території Західних Балкан з кам'яного раку. Ще одна субклада з бутстреп підтримкою 68 виділяється з території Румунії з широкопалого і румунського річкових раків.

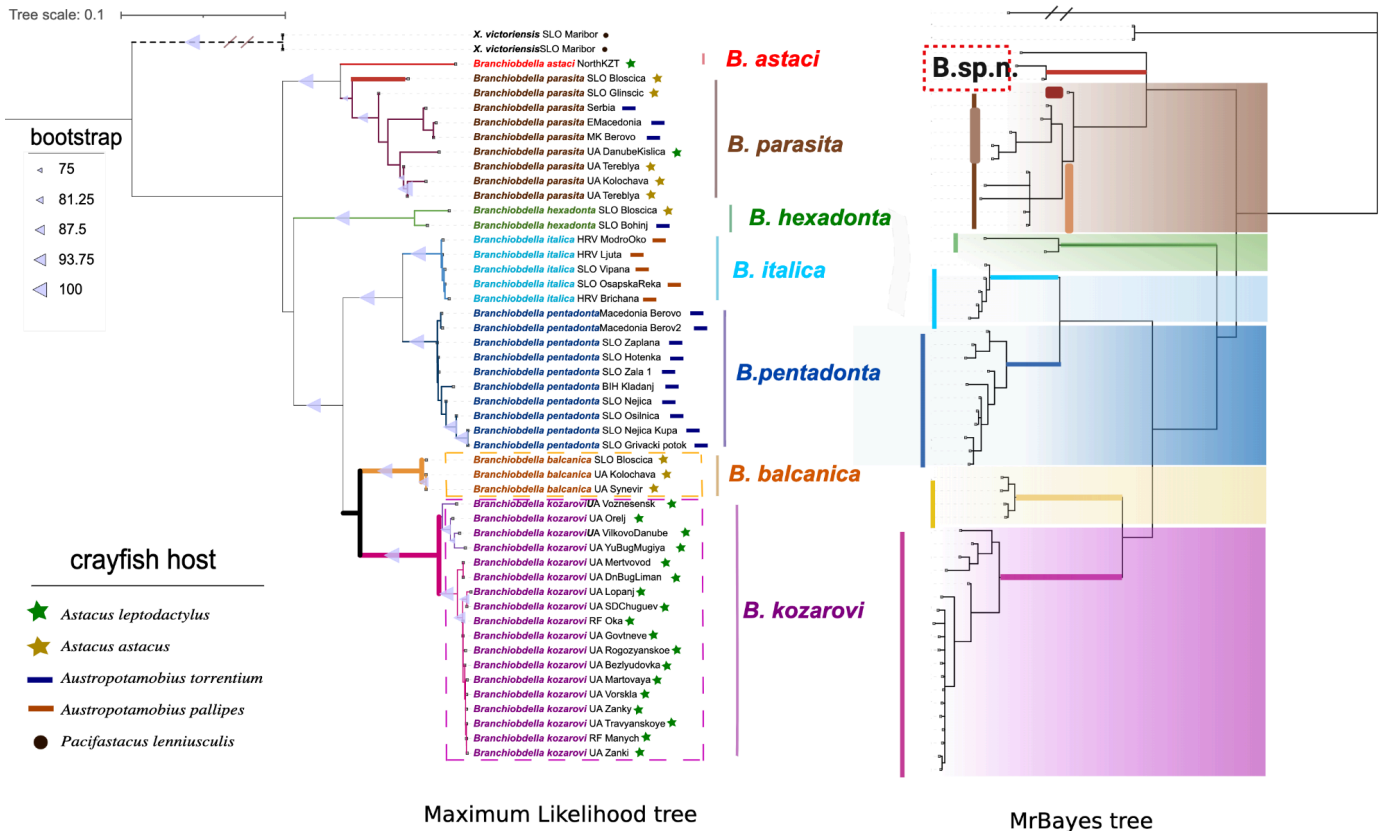


Рисунок 3.31. Філогенетичне дерево, побудоване методом Максимальної правдоподібності (IQ-TREE) та Баєсового висновування (MrBayes) для представників Branchiobdellida на основі чотирьох фрагментів генів. Усі особини, що розглядаються в даному дослідженні, належать до нашої вибірки, включаючи зовнішню групу (outgroup). Дерево відображає довжину гілок. Показані гілки з bootstrap support більше 75.

3.4. Делімітація видів роду Branchiobdella

У цьому розділі представлено результати молекулярно-генетичного аналізу, спрямованого на визначення меж видів за допомогою таких інструментів делімітації, як ASAP, ABGD, bPTP. Також представлено діапазони внутрішньовидових некорегованих парних відстаней (p-відстаней) всередині та між монофілетичними групами видів Branchiobdella за локусом CO1 (Табл. 3.2) та декількома локусами (Табл. 3.3).

Таблиця 3.2. Діапазони внутрішньовидових некорегованих парних відстаней (p-відстаней) всередині та між монофілетичними групами видів *Branchiobdella* за локусом CO1, як зазначено на філогенетичному дереві (див. рисунки 2.A та 2.B). Максимальна генетична відстань у межах груп виділена жовтим кольором, тоді як діапазон генетичної відстані між групами показано білим кольором.

	<i>B. hexadonta</i>	<i>B. italica</i>	<i>B. kozarovi</i>	<i>B. n.sp.</i>	<i>B. parasita</i>	<i>B. pentadonta</i>	<i>B. balcanica</i>
<i>B. hexadonta</i>	0.0933 + 0.008						
<i>B. italica</i>	0.1805	0.0282 + 0.004					
<i>B. kozarovi</i>	0.1806	0.1796	0.0338 + 0.004				
<i>B. n.sp.</i>	0.1541	0.1662	0.1690	0			
<i>B. parasita</i>	0.1678	0.1815	0.1652	0.1417	0.0898 + 0.007		
<i>B. pentadonta</i>	0.1678	0.1037	0.1765	0.1551	0.1730	0.0284 + 0.003	
<i>B. balcanica</i>	0.1791	0.170	0.147	0.1691	0.166	0.175	0.0043 + 0.0015

Таблиця 3.3. Діапазони внутрішньовидових некорегованих парних відстаней (p-відстаней) всередині та між монофілетичними групами видів *Branchiobdella* за матрицею з чотирьох локусів, як зазначено на філогенетичному дереві (див. рисунки 2.A та 2.B). Максимальна генетична відстань у межах груп виділена жовтим кольором, тоді як діапазон генетичної відстані між групами показано білим кольором.

	<i>B. italica</i>	<i>B. pentadonta</i>	<i>B. kozarovi</i>	<i>B. balcanica</i>	<i>B. astaci</i>	<i>B. parasita</i>	<i>B. hexadonta</i>
<i>B. italica</i>	0 %						
<i>B. pentadonta</i>	4.1 % ± 0.4 %	1 %					
<i>B. kozarovi</i>	6.4 % ± 0.5 %	6.6 % ± 0.2 %	1 %				
<i>B. balcanica</i>	5.2 % ± 0.4 %	5.8 % ± 0.5 %	5.0 % ± 0.4	0 %			
<i>B. astaci</i>	5.7 % ± 0.4 %	7.2 % ± 0.4	6.5 % ± 0.4	5.6 % ± 0.4	0 %		
<i>B. parasita</i>	7.6 % ± 0.4 %	7.6 % ± 0.4	7.6 % ± 0.4	6.9 % ± 0.4	3.7 % ± 0.4	2 %	
<i>B. hexadonta</i>	6.3 % ± 0.4 %	7.6 % ± 0.4	6.3 % ± 0.4	5.4 % ± 0.4	4.4 % ± 0.4	6.1 % ± 0.4	1 %

Таблиця 3.4. Підсумок делімітації (розмежування) видів, отриманий за допомогою ASAP, ABGD, PTP використовуючи ген CO1 та матрицю з чотирьох генів (16S, CO1, 28S, ITS). Для методів ASAP та ABGD наведено лише два розмежування з найвищими оцінками.

Species	Species delimitation method	Score CO1	Number of putative species groups CO1	score матриця	матриця (16S, CO1, 28S, ITS)	
<i>B. kozarovi</i>	ASAP <i>p</i> -distance	asap-score = 2.00	2	asap-score = 1.00	2	
		asap-score = 4.00	3	asap-score = 2.00	3	
	ASAP Kimura (K80)	asap-score = 1.50	2	asap-score = 1.50	4	
		asap-score = 3.50	3	asap-score = 1.50	3	
	ABDG Kimura (K80)	P=1.29e-02	2	P=1.00e-03	3	
		P=7.74e-03	3	P=1.67e-03	1	
		P=4.64e-03	5	/	/	
		P=2.78e-03 P=1.67e-03 P=1.00e-03	8	/	/	
	bPTP	/	4	/	/	
	<i>B. balcanica</i>	ASAP <i>p</i> -distance	asap-score = 1.00	2	asap-score = 2.00	3
asap-score = 2.00			4	asap-score = 2.00	2	
ASAP Kimura (K80)		asap-score = 1.00	2	asap-score = 2.00	3	
		asap-score = 2.50	3	asap-score = 2.00	2	
ABDG Kimura (K80)		P=2.78e-03 P=4.64e-03 P=7.74e-03	2	/	/	
		P=1.67e-03 P=1.00e-03	4	/	/	
		bPTP	/	1	/	/
<i>B. italica</i>		ASAP <i>p</i> -distance	asap-score = 1.50	6	asap-score = 1.00	2
			asap-score = 2.50	2	asap-score = 2.00	3

	ASAP Kimura (K80)	asap-score = 6 1.50		asap-score = 2 1.00		
		asap-score = 2 2.50		asap-score = 3 3.00		
	ABDG Kimura (K80)	P=2.15e-02 P=1.29e-02	2	/	/	
		P=7.74e-03	4	/	/	
		P=4.64e-03 P=2.78e-03 P=1.67e-03 P=1.00e-03	6	/	/	
	bPTP	/	1	/	/	
B. pentadont a	ASAP <i>p</i> -distance	asap-score = 6 4.50		asap-score = 7 2.00		
		asap-score = 5 4.50		asap-score = 9 3.00		
	ASAP Kimura (K80)	asap-score = 6 4.00		asap-score = 9 2.50		
		asap-score = 5 6.00		asap-score = 8 3.50		
	ABDG Kimura (K80)	P=7.74e-03	1			
		P=4.64e-03 P=2.78e-03 P=1.67e-03 P=1.00e-03	3			
		bPTP	/	3	/	/

Species	Species delimitation method	Score CO1	Number of putative species groups	Score matrica	Number of putative species groups Matrica
B. hexadont a	ASAP <i>p</i> -distance	asap-score = 1.00	3	/	/
		asap-score = 2.50	2	/	/
	ASAP Kimura (K80)	asap-score = 1.00	3	/	/
		asap-score = 2.00	3	/	/
	ABDG Kimura (K80)	P=1.00e-01 P=5.99e-02 P=3.59e-02	2	/	/

		P=1.00e-03 to P=2.15e-02	2	/	/
	bPTP	/	1	/	/
<i>B. kozarovi</i>	ASAP <i>p</i> -distance	asap-score = 2.00	12	asap-score = 3.50	9
		asap-score = 2.00	10	asap-score = 3.50	12
	ASAP Kimura (K80)	asap-score = 2.00	12	asap-score = 1.50	2
		asap-score = 2.50	10	asap-score = 2.00	11
	ABDG Kimura (K80)	P=1.00e-03 to P=2.15e-02	11	P=1.00e-03 P=1.67e-03	2 1
		bPTP	/	9	/

B. kozarovi*. Генетичне різноманіття.** Аналіз ASAP, використовуючи обидва варіанти відстаней (*p*-distance та K2P), розділив вид на дві окремі MOTU (molecular operational taxonomic unit). Аналіз ABDG, який використовував метод відстані K2P, розділив вид на три MOTU, а аналіз bPTP - на чотири. Важливо відзначити, що всі проаналізовані послідовності були віднесені до одного виду за нашим визначенням, використовуючи морфологічні і анатомічні ознаки. Дві MOTU, визначені за допомогою ASAP, також чітко видно на філогенетичній мережі (Рис. 3.33). Зразки з річки Південний Буг були відокремлені в окрему MOTU (G3). Також зразки з гирла Дунаю об'єдналися в окрему MOTU (G2). І один зразок з Вознесенську теж сформував MOTU G1. Тоді як зразки з Дніпровсько-Бузького лиману об'єдналися з зразками з басейнів річок Дніпро і Волга (G4). Генетичні відстані між виділеними чотирма MOTU за аналізом всіх чотирьох послідовностей ***B. kozarovi коливалися від 0,9% між G2 і G3 до 3% vs; G1 і G3 (Табл. 3.4, 3.5).

Таблиця 3.5. Діапазони внутрішньовидових некорегованих парних відстаней (*p*-відстаней) всередині та між MOTU (G1–G3) виду *B. kozarovi* за матрицею з чотирьох локусів, як зазначено на філогенетичному дереві та мережі (див. рисунок

45). Максимальна генетична відстань у межах груп виділена жовтим кольором, тоді як діапазон генетичної відстані між групами показано білим кольором.

	G1	G2	G3	
G4 SevDonetz	0.01			
G2 Danube Vilk	0.0642	n/c		
G1 South Bug	0.0485	0.048	0.07	
G3 Danube Voznes	0.0619	0.0445	0.0534	n/c

Генетична варіація за аналізом лише послідовності CO1 була вища і коливалася в межах від 1% до 7% (Табл. 3.5).

Таблиця 3.6. Діапазони внутрішньовидових некорегованих парних відстаней (p-відстаней) всередині та між групами (G1–G3) виду *B. kozarovi* за локусом CO1, як зазначено на філогенетичному дереві та мережі (див. рисунок 42). Максимальна генетична відстань у межах груп виділена жовтим кольором, тоді як діапазон генетичної відстані між групами показано білим кольором.

	G1	G2	G3	
G4 SevDonetz	0.01			
G2 Danube Vilk	0.0641	n/c		
G1 South Bug	0.071	0.023	0.04	
G3 Danube Voznes	0.0619	0.041	0.0534	n/c

Філогеографічний аналіз за CO1 за допомогою PopArt підтверджує виділення всередині виду шости гаплотипів (Табл. 3.6). Чорні точки на вузлах філограми TCS (Рис. 3.32), побудованої в PopART, вказують на неоднозначність в філогенетичних відносинах. Тобто алгоритм (Median Joining внизу рисунка або TCS в центрі) не зміг однозначно визначити порядок розгалуження. Це може бути або через недостатність інформативних сайтів у вирівнюванні (наприклад, мало варіабельних позицій) або одночасне розгалуження, якщо популяція дивергувала швидко.

Філогеографічний аналіз за чотирма генетичними локусами продемонстрував виділення чотирьох гаплотипів G1 - G4 , які відповідають результатам делімітації з виділенням чотирьох MOTU за алгоритмом ASAP та ABGD Kimura K80 (Рис. 3.33).

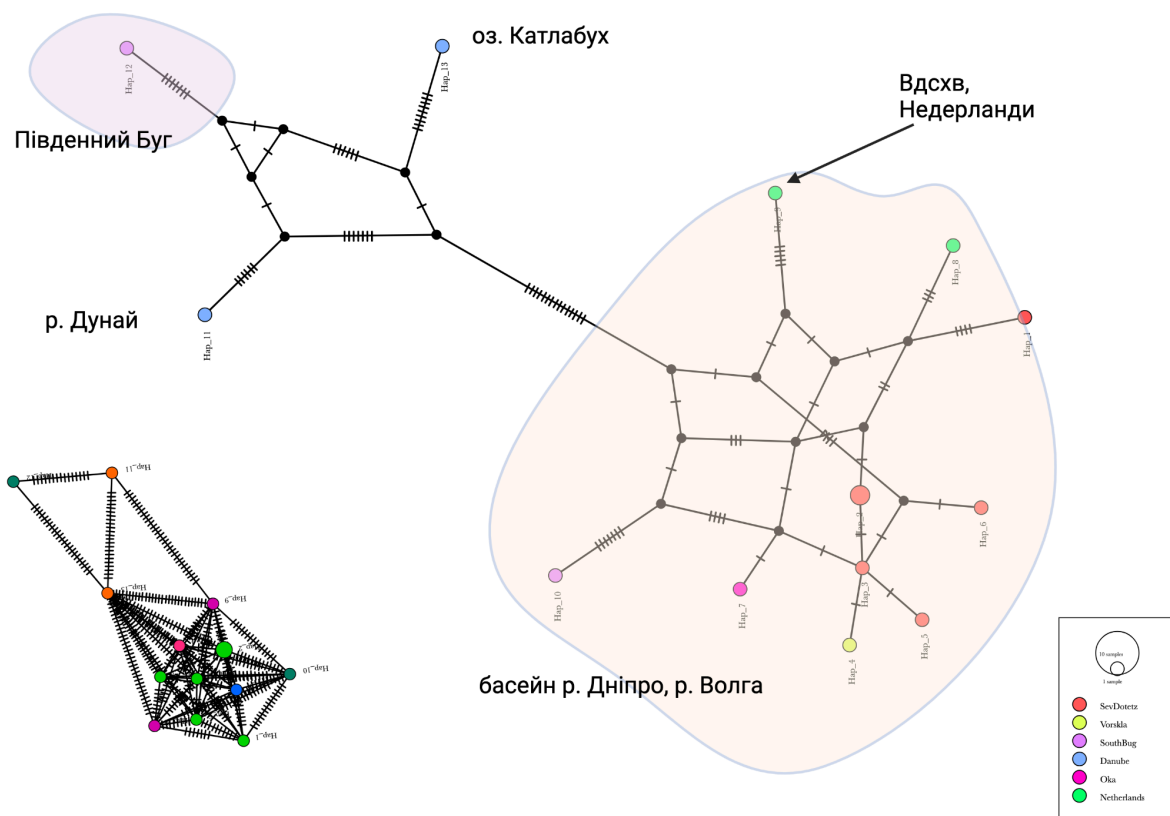


Рисунок 3.32. Філогеографічний аналіз *B. kozarovi*, оснований на фрагменті CO1. Філогенетична мережа, отримана за допомогою статистичного методу парсимонії (мережа TCS), створена за допомогою програми PopArt. Кольори вказують на місце відбору проб, де був знайдений гаплотип. Кожна риска позначає одну мутаційну подію між двома гаплотипами.

Додатково нами був розрахований нуклеотидний поліморфізм послідовностей *B. kozarovi* на основі даних мітохондріального гену (COI). Нижче приводимо

розрахунки (Табл. 3.7). Різноманіття гаплотипів було достатньо високим (0,989), що свідчить про високу генетичну варіабельність цього виду.

Таблиця 3.7. Нуклеотидний поліморфізм послідовностей видів на основі даних мітохондріального гену (COI). VS, кількість варіабельних ділянок; PI, кількість інформативних ділянок для парсимонії; N, кількість використаних послідовностей; H, кількість гаплотипів; Hd, різноманітність гаплотипів із стандартним відхиленням; π , нуклеотидна різноманітність

Вид	Генетичний локус	Довжина локусу	N, кількість послідовностей	π , нуклеотидна різноманітність	H, кількість гаплотипів	Hd, різноманітність гаплотипів зі стандартним відхиленням	VS, кількість варіабельних сайтів	PI, кількість інформативних ділянок для парсимонії
<i>B. balcanica</i>	COI	562	8	0,0043	4	0,0642 (0,024)	8	0
	16S	500	4					
	28S II	852	4					
	ITS	1000	7					
<i>B. parasita</i>	COI	562	16	0,0813	13	0,967 (0,036)	137	95
	16S	500	11					
	28S II	852	9					
	ITS	1000	5					
<i>B. kozarovi</i>	COI	562	14	0,031 (0,007)	4	0,989 (0,031)	64	42
	16S	500	18					
	28S II	852	16					
	ITS	1000	12					

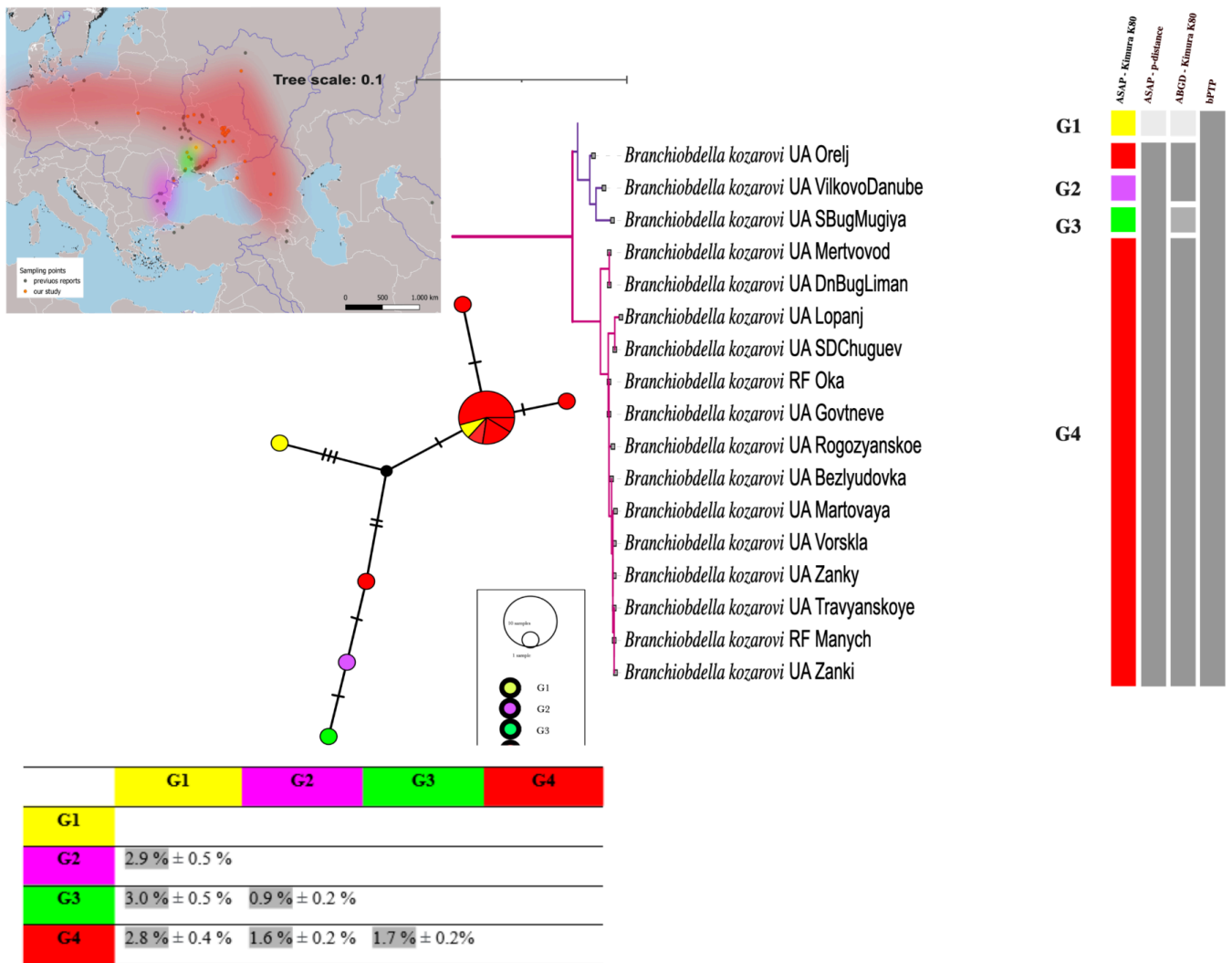


Рисунок 3.33. Філогеографічний аналіз та результати делімітації *B. kozarovi*, оснований на чотирьох генетичних локусах (CO1, 16S, 28SII, ITS). Філогенетична мережа, отримана за допомогою статистичного методу парсимонії (мережа TCS), створена за допомогою програми PopArt. Кольори вказують на місце відбору проб, де був знайдений гаплотип. Кожна риска позначає одну мутаційну подію між двома гаплотипами.

***B. parasita*. Генетичне різноманіття.**

Морфологічний аналіз зразків цього виду не дав однозначних результатів. Вивчені зразки з різних популяцій демонструють морфологічну схожість із видом *B. parasita*, але з певними варіаціями в будові репродуктивної системи (див. розділ 3.1

“Результатів”). Усі алгоритми визначення меж видів узгоджувалися щодо виділення 12 MOTU, за винятком bPTP, який об'єднав усі послідовності з Закарпаття і Польщі в одну групу (G3-G5), з Північної Італії - в окремі (G11 - G12 та G1). Дванадцять MOTU, визначених за допомогою ASAP, ABGD та PTP, не були підтверджені на філогенетичній мережі, як окремі монофілетичні таксони (Рис. 3.34).

Нижче приводимо кількість виділених MOTU на основі сумарного аналізу за ASAP, ABGD та PTP. Рішення щодо прийняття MOTU приймалося на основі схеми, виходячи з правила більшості (див. Додатки).

Group[1] n: 1 ;id: AF310707

Group[2]n:2;id:S9_B_parasita_Bloscica2009_CO1
1_Branchiobdella_parasita_SLO_Bolscica

Group[3] n: 3 ;id: KY775113 KY775111 KY775112

Group[4] n: 1 ;id: P5_Branchiobdella_parasita_Kolochava

Group[5] n: 1 ;id: BPP3_UA_DanubeKislica

Group[6] n: 1 ;id: M1_B_parasita_Romania_ASA_CO1

Group[7] n: 1 ;id: KY775107

Group[8] n: 2 ;id: KY775108 KY775109

Group[9] n: 1 ;id: FJ655048

Group[10] n: 1 ;id: 3_Branchiobdella_parasita_MKBerovo

Group[11] n: 1 ;id: FJ655021

Group[12] n: 1 ;id: FJ655062

Філогенетичне дерево видів, побудоване за CO1, характеризувалося декількома високопідтриманими кладами (Рис. 3.34), які за нашими спостереженнями відповідали трьом морфотипам: з Закарпаття, з гирла Дунаю, з Північної Македонії.

Філогеографічний аналіз за локусом CO1 продемонстрував виділення тринадцяти гаплотипів Har1 - Har13. Максимальна кількість мутаційних кроків між гаплотипами становила 37. Кількість виділених гаплотипів на один більше, ніж кількість виділених MOTU за результатами делімітації за алгоритмом ASAP та ABGD Kimura K80 (Рис. 3.34).

Генетичні відстані за CO1 між гаплотипами були великими та коливалися від 6% до 15%, тоді як міжвидові генетичні відстані між *B. parasita* та іншими видами досягали максимум 18% (Табл. 3.8).

Таблиця 3.8. Діапазони внутрішньовидових некорегованих парних дистанцій (p-дистанцій) між групами (G1–G12) за локусом CO1 виду *B. parasita*, як показано на філогенетичному дереві та мережі.

	G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7	G8	G9	G10	G11	G12
G1												
G2	0,104											
G3	0,072	0,087										
G4	0,134	0,095	0,058									
G5	0,148	0,107	0,066	0,089								
G6	0,103	0,069	0,041	0,060	0,081							
G7	0,161	0,092	0,057	0,121	0,150	0,070						
G8	0,105	0,092	0,064	0,081	0,102	0,042	0,007					
G9	0,140	0,102	0,060	0,083	0,076	0,056	0,105	0,069				
G10	0,148	0,096	0,053	0,114	0,148	0,041	0,080	0,045	0,094			
G11	0,135	0,086	0,050	0,097	0,121	0,037	0,083	0,052	0,058	0,053		
G12	0,144	0,093	0,055	0,105	0,141	0,028	0,080	0,047	0,072	0,041	0,034	

Дистанції між гаплотипами за чотирьма генами коливались між 0,1% до максимум 4,7% (Табл. 3.9).

Таблиця 3.9. Діапазони внутрішньовидових некорегованих парних дистанцій (p-дистанцій) між групами (G1–G12) за матрицею з чотирьох локусів виду *B. parasita*, як показано на філогенетичному дереві та мережі. Максимальну генетичну відстань між групами показано червоним кольором.

	Gr1	Gr2	Gr3	Gr4	Gr5	Gr6	Gr7	Gr8	Gr9	Gr10	Gr11	Gr12
Gr1												
Gr2	0,001											
Gr3	0,002	0,002										
Gr4	0,004	0,004	0,052									
Gr5	0,003	0,004	0,003	0,013								
Gr6	0,004	0,004	0,046	0,068	0,005							

Gr7	0,004	0,004	0,003	0,013	0,005	0,001						
Gr8	0,005	0,005	0,004	0,015	0,006	0,001	0,002					
Gr9	0,000	0,001	0,001	0,004	0,003	0,004	0,004	0,004				
Gr10	0,002	0,003	0,025	0,036	0,002	0,014	0,004	0,004	0,002			
Gr11	0,004	0,004	0,004	0,008	0,006	0,006	0,004	0,008	0,004	0,002		
Gr12	0,040	0,039	0,074	0,114	0,037	0,068	0,038	0,036	0,039	0,056	0,072	

В Таблиці 3.7 можна спостерігати досить високу кількість гаплотипів COI ($h = 12$) та їх різноманітність ($Hd = 0,967$). Шість з 12 гаплотипів, є новими послідовностями, які раніше не були ідентифіковані для *B. parasita*.

Інші гаплотипи були взяті з GenBank (ASA, FJ655021, FJ655062), відібраних у прісних водах Північного Тіролю в Австрії (Füreder et al., 2009). Гаплотип виду KY775111 - KY775111 був зібраний з кам'яного рака в Хорватії і був взятий з роботи Šarić et al., 2018. В нещодавній роботі Szenejko et al., 2023 було виявлено, що гаплотипи *B. parasita* з озер Польщі та Німеччини були близькими COI, знайденому в Австрії (FJ655062). Але бутстреп підтримка була 60. Враховуючи відстань, а також географічні та екологічні бар'єри, що розділяють ці водойми, де були зібрані зразки (північно-західна Польща, південно-західна Німеччина, Північні Альпи Австрії), автори припускають цей гаплотип предковим *B. parasita*. Наша робота доповнює дані по *B. parasita* і ми демонструємо філогенетичну близькість зразків з Польщі з зразками гирла Дунаю з бутстреп підтримкою більше 85 (Рис. 3.34). А зразки з Австрії (FJ655062) об'єднуються з зразками з Румунії. Кількістю в 45 мутацій на філогенетичній мережі відокремлюється новий вид зі Словенії, близький до виду *B. parasita* за зовнішніми ознаками, але помітно різниться за будовою репродуктивної системи. Генетична відстань між новим видом і *B. parasita* склала 14% (Рис. 3.34).

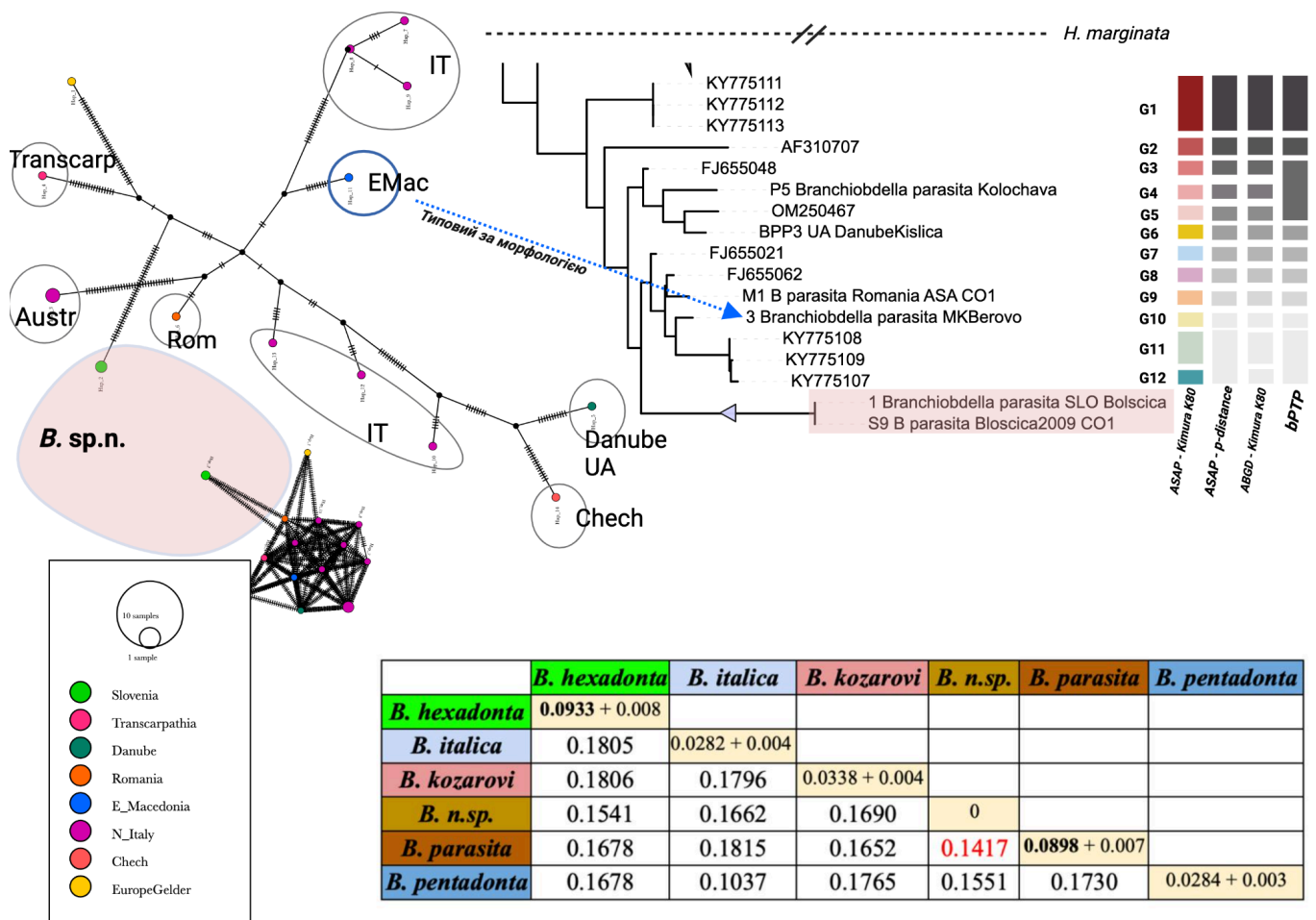


Рисунок 3.34. Філогеографічний аналіз, оснований на фрагменті CO1 та результати делімітації *B. parasita*, засновані на чотирьох генетичних локусах (CO1, 16S, 28SII, ITS). Філогенетична мережа, отримана за допомогою статистичного методу парсимонії (мережа TCS), створена за допомогою програми PopArt. Кольори вказують на місце відбору проб, де був знайдений гаплотип. Кожна риска позначає одну мутаційну подію між двома гаплотипами.

B. balcanica. Генетичне різноманіття.

Аналіз ASAP, використовуючи обидва варіанти відстаней (p-distance та K2P), розділив вид на дві MOTU. Аналіз ABGD, який використовував метод відстані K2P, визначив дві MOTU, тоді як аналіз bPTP об'єднав гаплотипи в одну MOTU. Морфологічно всі зразки з цього дослідження були визначені як один вид. Філогенетичне дерево видів характеризувалося однією монофілетичною кладою (Рис. 3.35). Внутрішньовидові генетичні відстані за локусом CO1 для *B. balcanica*

сягали до 0.3 %, тоді як міжвидові - до 18 % (Табл. 3.2). За мультилокусним аналізом міжвидова відстань була від 5 % з *B. kozarovi* та до 6,9 % з *B. parasita*. (Табл. 3.3).

Таблиця 3.10. Діапазони внутрішньовидових некорегованих парних відстаней (p-відстаней) всередині та між групами (G1–G2) за локусом CO1 виду *B. balcanica*, як зазначено на філогенетичному дереві та мережі (Рис. 3.35). Максимальна генетична відстань у межах груп виділена жовтим кольором, тоді як діапазон генетичної відстані між групами показано білим кольором.

	G1	G2
G1	n/c	
G2	0,0038	0,001

В Таблиці 3.7 ми приводимо розрахований нуклеотидний поліморфізм послідовностей *Branchiobdella balcanica* на основі даних мітохондріального гену CO1. Можна спостерігати низьке нуклеотидне різноманіття ($\pi = 0.004$) та не велике різноманіття гаплотипів (0,0642). Інформативних сайтів для парсимонії не виявлено.

Філогеографічний аналіз за локусом CO1 продемонстрував виділення трьох гаплотипів (Рис. 3.35). Максимальна кількість мутаційних кроків виявлена між гаплотипами з Закарпаття та Північної Італії і становила 7.

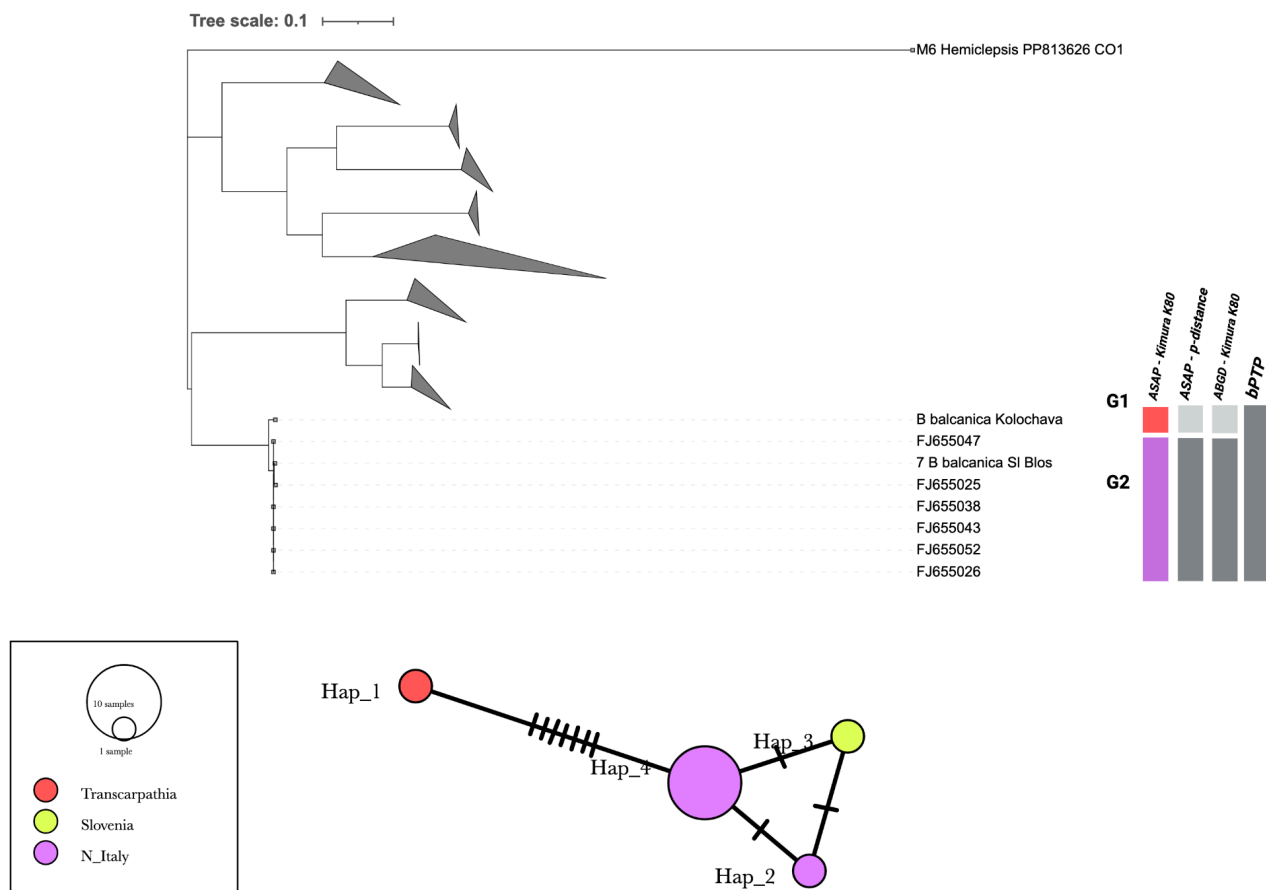


Рисунок 3.35. Філогеографічний аналіз *B. balcanica*, оснований на фрагменті CO1. Філогенетична мережа, отримана за допомогою статистичного методу парсимонії (мережа TCS), створена за допомогою програми PopArt. Кольори вказують на місце відбору проб, де був знайдений гаплотип. Кожна риска позначає одну мутаційну подію між двома гаплотипами.

***B. pentadonta*. Генетичне різноманіття.**

Зразки виду *B. pentadonta* з різних локацій слабо відрізняються морфологічно, але за алгоритмом делімітації bPTP, вони поділяються щонайменше на 3 MOTU. Один з MOTU групує зразки з *As. astacus* з Польщі та Закарпаття.

За алгоритмом ASAP K80 та ABGD p-distance виділяється 6 наступних MOTU:

Group[1] n: 18 ;id: 6_Branchiobdella_pentadonta_SLO_Hotenka

9_Branchiobdella_pentadonta_SLO_Zaplana 5_Branchiobdella_pentadonta_SLO_Zala

2_Branchiobdella_pentadonta_EMacedonia_Berovo1

3_Branchiobdella_pentadonta_EMacedonia_Berovo2 OM250468 OM250469 OM250470
HA093_B_pentadonta_Poland_ASA_CO1 FJ655027 FJ655066 FJ655060 FJ655023
FJ655037 FJ655035 FJ655065 OM250471 FJ655055

Group[2] n: 1 ;id: 5_Branchiobdella_pentadonta_BIH_Kladanj

Group[3] n: 1 ;id: 7_Branchiobdella_pentadonta_SLO_Osilnica

Group[4] n: 6 ;id: 1_Branchiobdella_pentadonta_SLO_Grivacki_potok 8_B_pentadonta
KY775124 KY775125 KY775126 KY775127

Group[5] n: 2 ;id: KY775123 AF310708

Group[6] n: 2 ;id: FJ655012 FJ655051

Зразки з далеких локацій Північної Македонії, декількох локацій Словенії, Польщі, Закарпаття та Австрії формують окремий MOTU. Належність далеких локацій до одного MOTU може свідчити про те, що розселення цього виду було недавнім з післяльодовикових рефугіумів і відбувалося декількома шляхами одночасно, що відповідає шляхам розповсюдження рака - хазяїна (Рис. 3.36). Інші MOTU, ймовірно, відображають старіші або ізольовані популяції. Як от MOTU 2, 3, які містять по одному зразку.

Генетичні відстані за CO1 між MOTU коливалися від 0,3 % до 3 %, тоді як міжвидові генетичні відстані між *B. pentadonta* та іншими видами склали максимум 17%.

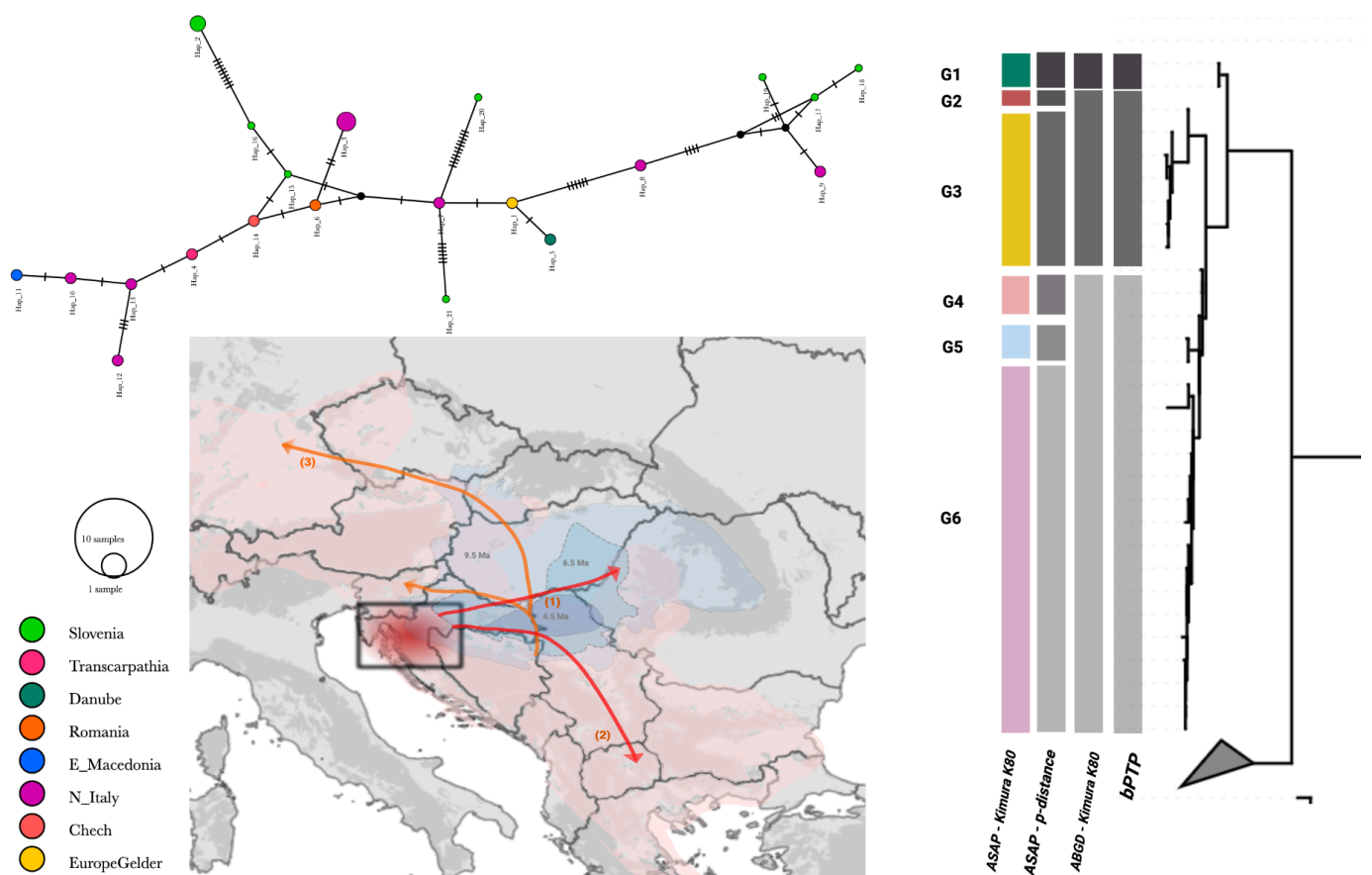


Рис. 3.36. Філогеографічний аналіз, оснований на фрагменті CO1 та результати делімітації *V. pentadonta*. Філогенетична мережа, отримана за допомогою статистичного методу парсимонії (мережа TCS), створена за допомогою програми PopArt. Кольори вказують на місце відбору проб, де був знайдений гаплотип. Кожна риска позначає одну мутаційну подію між двома гаплотипами. Межі озера Паннон позначені блакитним кольором. Можливі до- та післяльодовикові шляхи розселення рака-хазяїна *Au. torrentium* вказані стрілками: червоні стрілки позначають (1) можливе заселення Апусенських гір через дельтові системи палео-Дунаю та палео-Тиси на північному шельфі озера Паннон та (2) заселення південних Балкан після формування прісноводної системи Дунаю. Помаранчеві стрілки (3) вказують на післяльодовикове повторне заселення північної частини ареалу *A. torrentium* шляхом експансії (карту адаптовано за Lovrenčić et al., 2020)

***B. italica*. Генетичне різноманіття.**

Зразки виду *B. italica* з різних локацій слабо відрізняються морфологічно. За алгоритмами делімітації bPTP та ABGD K80, вони поділяються на 2 MOTU. Один з MOTU з великою кількістю мутацій групує зразки з північної Італії.

За алгоритмом ASAP K80 та ASAP p-distance виділяється 6 наступних MOTU:

Group[1] n: 2 ;id: FJ655029 FJ655056

Group[2] n: 13 ;id: KY775116 2_Branchiobdella_italica_HRV_ModroOko KY775115
3_Branchiobdella_italica_SLO_Vipana KY775114

4_Branchiobdella_italica_HRV_Ljuta 1_Branchiobdella_italica_SLO_OsapskaReka

1_Branchiobdella_italica_HRV_Brichana KY775117 KY775118 KY775119 KY775120
KY775121

Group[3] n: 6 ;id: MG244273 MG244274 MG244276 MG244280 MG244281
MG244277

Group[4] n: 12 ;id: FJ655067 FJ655034 FJ655040 FJ655045 FJ655059 FJ655011
FJ655019 FJ655024 FJ655028 FJ655033 FJ655041 FJ655058

Group[5] n: 4 ;id: MG244275 MG244279 MG244278 MG244282

Group[6] n: 2 ;id: FJ655042 FJ655053

B. italica мешкає виключно на *Au. pallipes*. Прив'язаність до цього виду раку пов'язана з минулими подіями виникнення Динарських гір, коли вид раку виявився ізольованим від решти територій (Рис. 3.37).

Філогеографічний аналіз демонструє найбільше різноманіття гаплотипів в Хорватії, Західній Словенії (центральне розмежування, MOTU G3) і їх поширення в центральну Італію (MOTU G5), а звідти в Північну (MOTU G6). Філогеографічна мережа відповідає виділенням MOTU G1-G6 (Рис. 3.37).

Генетичні відстані за CO1 між MOTU були коливалися від 0,3 % до 2,8 %, тоді як міжвидові генетичні відстані між *B. italica* та іншими видами складали максимум 18%.

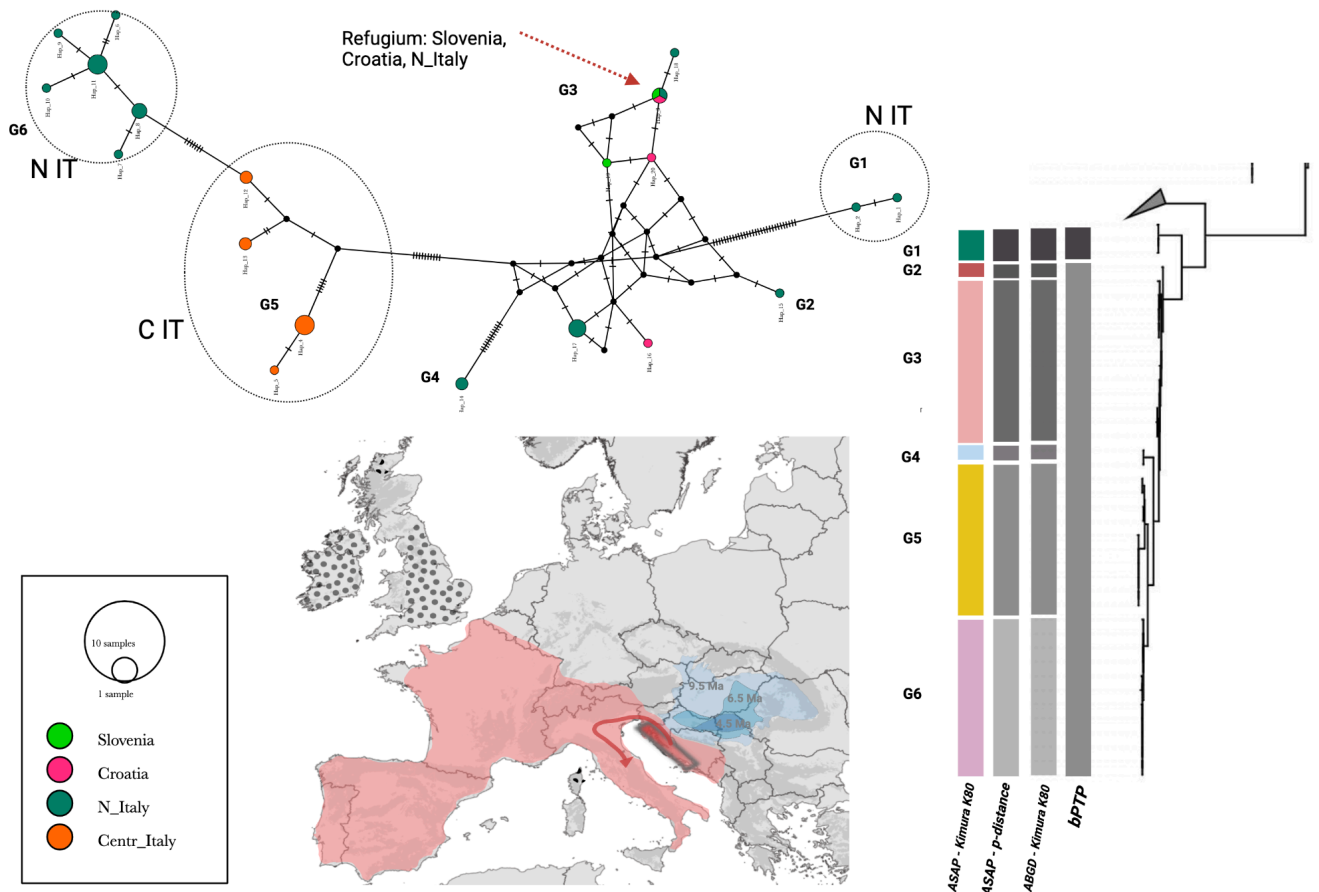


Рис. 3.37. Філогеографічний аналіз, оснований на фрагменті CO1 та результати делімітації *B. italica*. Філогенетична мережа, отримана за допомогою статистичного методу парсимонії (мережа TCS), створена за допомогою програми PopArt. Кольори вказують на місце відбору проб, де був знайдений гаплотип. Кожна риска позначає одну мутаційну подію між двома гаплотипами. Межі озера Паннон позначені блакитним кольором. Можливі до- та післяльодовикові шляхи розселення рака-хазяїна *Au. pallipes* вказано червоною стрілкою. Сірим кручечками позначено штучно інтродуковані місця білопалім раком, червоним фоном - природні шляхи міграції рака (карту адаптовано за Lovrenčić et al., 2020).

Тести на нейтральність еволюції.

Для перевірки гіпотези нейтральної еволюції серед видів ми застосували Z-тест нейтральної еволюції (z-test of neutral evolution), який заснований на порівнянні кількості синонімічних dN (нейтральних) та несинонімічних dS (вибіркових) замін у гені і розраховувався у програмі Mega11 за формулою: dN/dS

(Nei & Gojobori, 1986). У всіх проаналізованих видах Z -значення коливалося в негативних числах, але відхилення від нейтральної еволюції не було статистично значущим і було більше ніж 0,05 ($p > 0,05$). Можна припустити, що еволюція гена не відбувається під дією природного відбору і є нейтральною. Але при аналізі сукупності всіх видів (бутстреп 500) Z -значення було статистично значущим, що може відкидати нульову гіпотезу нейтральності еволюції.

Щоб отримати додаткові підтвердження щодо нейтральності еволюції гена CO1 серед вивчених видів бранхіобделід, ми вирішили врахувати інші статистичні тести, як тест МакДональда - Крайтмана (McDonald J H, Kreitman M, 1991). Але він виявився статистично незначущим. Лише у двох груп (*B. italica* та *B. kozarovi*) індекс тесту МакДональда - Крайтмана виявився статистично значущим і становив $NI = 0,474$.

3.5. Обговорення розділу. Таксономічна ревізія роду *Branchiobdella*

3.5.1. Еволюційні зв'язки, морфологічна мінливість та сучасний стан популяцій

B. astaci: еволюційні зв'язки, морфологічна мінливість та сучасний стан популяцій.

Знахідка виду *B. astaci* стала першим описом бранхіобделід як ектосимбіонтів ракоподібних загалом (Roesl, 1755). Історичні дані про поширення *B. astaci* свідчать про його широкий ареал у північно-західній, центральній та східній Європі, зокрема в Естонії, Німеччині, Франції, Латвії, Литві та Югославії (Georgevitch, 1955; Pop, 1965; Karaman, 1970; Мажиліс, 1973). Однак сучасні знахідки цього виду є рідкісними, що може свідчити про зменшення його популяції або зміну екологічних умов. Наприклад, наші дослідження в Україні не підтвердили наявності *B. astaci* у вказаних раніше локаціях, що може бути пов'язано з антропогенним впливом та значним скороченням популяцій широкопалого раку, як хазяїна.

Важливим результатом роботи є виявлення *B. astaci* на озері Якши в Казахстані, що є найсхіднішою точкою його ареалу. Однак більшість сучасних знахідок *B. astaci* обмежуються історичними зразками, що зберігаються в музейних

колекціях, що підкреслює необхідність подальших досліджень для оцінки сучасного стану популяції цього виду.

Результати дослідження локалізації, екстенсивності та інтенсивності інвазії бранхіобделід *Branchiobdella astaci* на довгопалих раках *Astacus leptodactylus* свідчать про високий рівень зараженості серед досліджуваних зразків. Екстенсивність інвазії склала 83 %, що підтверджує значну поширеність цього симбіонта серед популяції раків. Основні місця локалізації *B. astaci* включали область під зябровими кришками, поверхню карапаксу та очі рака, що узгоджується з даними попередніх досліджень (Odier, 1823; Neseemann, 1999). Середня інтенсивність інвазії склала 3,4 екземпляри на одного зараженого хазяїна, що вказує на низьку інтенсивність зараження.

У контексті еволюційних взаємин між *B. astaci* та річковими раками ми припускаємо коеволюційні аспекти їх взаємодії. Можна припустити, що *B. astaci* сформувалася як вид на предковій формі річкових раків, яка існувала близько 10,5 мільйонів років тому (що відповідає часу дивергенції двох родів річкових раків *As. astacus* та *As. leptodactylus*) (Kouba et al., 2013). Але згодом її поширення та виживання стали залежними від конкретних екологічних умов і доступності хазяїв. Після розходження цих родів *B. astaci* змогла успішно адаптуватися до раків роду *Astacus*, зокрема *Astacus astacus*, завдяки їхній екологічній та фізіологічній сумісності і разом з цим раком зайняла Західну Палеарктику. Також на виді раку *As. leptodactylus* вона знайшла оптимальні умови для масового поширення, про що свідчать численні знахідки у східній частині Західної Палеарктики. Також це пояснює зникнення *B. astaci* в Україні та скорочення її чисельності в Європі. В Україні, ймовірно, *B. astaci* зникла через вимирання та значне скорочення популяцій раків *Astacus astacus*, які були її основним хазяїном. У Європі чисельність *B. astaci* скоротилася через загальне скорочення оселищ раків цього виду, спричинене антропогенними факторами, такими як забруднення та інвазивні види раків, як *Pacifastacus leniusculus*. Наразі *B. astaci* є рідкісним видом, який знаходиться на межі зникнення через втрату хазяїв та зміни в екологічних умовах. Сучасні знахідки виду є вкрай рідкісними, що підтверджує його вразливість.

Спектр хазяїв *B. astaci* може включати інші види ракоподібних, зокрема *Austropotamobius torrentium* та *Austropotamobius pallipes* (Kozarov et al., 1972; Klobučar et al., 2006; Subchev, Gelder, 2010). Але такі знахідки не часті і, більшість спирається на знахідки у архівних музейних колекціях, аніж на сучасному стані розповсюдження виду, окрім відносно недавніх знахідок (Klobučar et al., 2006). Це свідчить про те, що адаптивність виду до різних хазяїв все ж таки існує і це може сприяти його виживанню в умовах змін середовища.

Таким чином, результати дослідження підкреслюють необхідність подальшого моніторингу популяцій *B. astaci* для оцінки його сучасного стану та тенденцій розповсюдження. Зменшення кількості сучасних знахідок цього виду може свідчити про його рідкісність та можливе зникнення, що потребує розробки заходів зі збереження біорізноманіття та екологічних умов його існування. В майбутньому необхідно провести детальний аналіз екологічних умов, у яких мешкають раки різних видів, дослідити фізіологічні особливості взаємодії *B. astaci* з хазяями та зібрати додаткові молекулярні дані для уточнення філогенетичного положення виду та його еволюційної історії.

B. hexadonta: еволюційні зв'язки, морфологічна мінливість та сучасний стан популяцій.

До наших досліджень не існувало чіткого опису репродуктивної системи виду *B. hexadonta*. У першому описі (Gruber, 1883) деталі репродуктивної системи не були наведені, хоча автор посилався на малюнки Dörner (1865), який не розрізняв цей вид від *B. astaci*, що також мешкає у зябрах ракоподібних. Лише Karaman (1965) згадував, що статева система *B. hexadonta* має найменші розміри порівняно з іншими видами. Він описував лише будову атріуму, зазначивши, що залозиста частина та трубчаста протока дуже короткі і займають незначний об'єм у 6-му сегменті тіла. Проте деталі будови сперматеки не були описані ні у його роботі, ні в узагальнюючих працях Nesemann (1999) та Subchev (2014), окрім згадки про те, що її отвір розташований у 5-му сегменті тіла.

У нашій роботі ми вперше детально описуємо будову як сперматеки, так і атріуму, вважаючи ці ознаки ключовими для подальшої ідентифікації виду *B. hexadonta*. Це особливо важливо, оскільки, як і у випадку з *B. parasita*, цей вид демонструє значну генетичну неоднорідність, і лише детальний аналіз репродуктивної системи може допомогти у розрізненні його популяцій. Також варто зазначити, що види *B. pentadonta* та *B. italica* є дуже схожими за будовою щелеп і зовнішньою морфологією, але мають чітку відмінність у довжині вивідного каналу сперматеки: у *B. italica* він закручений і перевищує довжину бульби сперматеки майже вдвічі, тоді як у *B. pentadonta* він прямий і не виходить за межі довжини бульби.

Під час наших досліджень ми спостерігали *B. hexadonta* у зябровій порожнині річкового рака на території Закарпаття (озеро Синевір), а також у контейнерах із зразками ракоподібних із музейної колекції Люблянського університету. При дослідженні вмісту кишечника ми виявили залишки детриту та фрагменти зябрових філаментів. Крім того, у багатьох випадках зяброві філаменти ракоподібних були пошкоджені.

Ареал *B. hexadonta* охоплює більшість країн Західної Палеарктики. Наші знахідки підтверджують його поширення у численних локаціях Словенії, Боснії та Герцеговини, а також Польщі. Subchev (2014) висловлював припущення, що цей вид не може мешкати на території України та Росії, а повідомлення про нього у роботі Svetlov (1926) є помилковим. Однак ми наводимо нову знахідку цього виду в Україні (Shrestkha, 2024), яка на сьогодні є найсхіднішою точкою його ареалу. Neseemann (1999) також повідомляв про неопубліковані знахідки цього виду в Марокко, які пізніше були підтверджені Subchev (2011) під час ревізії колекції у Греції. Таким чином, ця знахідка є першим документальним підтвердженням присутності бранхіобделід у Африці.

B. kozarovi: еволюційні зв'язки, морфологічна мінливість та сучасний стан популяцій

B. kozarovi не часто зустрічається разом із іншими видами бранхіобделід на ракоподібних у межах одних і тих самих локацій: *B. pentadonta* (Subchev & Stanimirova, 1998; Šmietana & Wierzbicka, 1999), *B. parasita*, *B. hexadonta* та *B. balcanica* (Šmietana & Wierzbicka, 1999). Однак у більшості обстежених нами локаціях в Україні (74 локації) та прилеглих територіях Росії (6 локацій) вид *B. kozarovi* був знайдений окремо на *A. leptodactylus* (Kolesnykova, 2007). Лише один випадок, коли ми зареєстрували цей вид разом з *B. parasita* - це в озері Катлабух (Одеська обл., Україна) з низькою інтенсивністю інвазії (5 екз. на одного рака хазяїна).

Як зазначає Boshko (2010), у деяких дослідженнях з Росії та України, де до опису *B. kozarovi* визначали *B. pentadonta*, згадувалося про наявність поперечної борозни на голові. Ймовірно, особини з Саратова, які Svetlov (1923) ідентифікував як *B. hexadonta*, насправді належали до *B. kozarovi* (див. вище). *B. kozarovi* був описаний як новий вид на широкопалому річковому раку *A. astacus* (Subchev, 1972). Але сам Subchev (2014) не виключає, що це могла була помилка в ідентифікації виду річкового раку через те, що пізніше його знаходили виключно на *A. leptodactylus* (Subchev, Stanimirova 1998; Šmietana, Wierzbicka 1999; Boshko 1983, 2010; Kolesnykova 2007; Kolesnykova et al. 2008; Kolesnykova et al. 2012). Згідно з Boshko (2010), цей вид має каспійське походження і тісно пов'язаний із *A. leptodactylus*. Нещодавні дослідження з використанням масштабних молекулярних даних (Vlaha et al., 2023) демонструють походження *Astacus leptodactylus* з території сучасної Турції, де спостерігається найбільше різноманіття гаплогруп довгопалого раку.

B. parasita species complex: еволюційні зв'язки, морфологічна мінливість та сучасний стан популяції

Відсутність інформативних та однозначних морфологічних ознак є проблемою, з якою часто стикаються в таксономії бранхіобделід.

Таксономія бранхіобделід в основному базується на формі тіла, структурі щелеп та репродуктивної системи. Репродуктивна система, зокрема структура сперматеки та атріуму, є останньою ознакою, яка використовується для визначення

видової приналежності. Наприклад, види *B. pentadonta* та *B. italica* можуть бути розрізнені майже виключно за структурою репродуктивної системи.

У цьому дослідженні морфологічну таксономію порівнювали з даними, отриманими з послідовностей ДНК. Метою є встановлення філогенетичної ваги ознак, які використовуються для визначення видів, що належать до видового комплексу *Branchiobdella parasita*.

Основні традиційні ознаки, які використовувалися для опису *B. parasita* Henle (1835), Karaman (1967), Neseemann (1997), Subchev (2009), Kolesnykova (2012) для визначення цього виду, включають:

1. Розмір дорослих черв'яків варіюється від 4,5 до 12 мм завдовжки, передні кільця більші за задні.
2. Трикутна форма нижньої та верхньої щелеп, майже однакові за розміром, кожна щелепа має великий середній зуб з кількома або 3 або від 2 до 4 маленькими бічними зубами з кожного боку.

Часто ці ознаки досить надійні для відрізнення *B. parasita* від усіх інших європейських видів бранхіобделід. Ймовірно, саме тому деякі автори не згадували у своїх описах деталей репродуктивної системи. Ознаки репродуктивної системи, які використовуються для ідентифікації виду *B. parasita*, включають:

1. Форма сперматеки: велика овальна капсула з коротким вивідним протоком, який майже непомітний або пляшкоподібна, овальна чи кругла капсула з дуже коротким вивідним протоком або овальна бульба та дуже короткий проток.
2. Залозиста частина атріуму велика, довга та щільно скручена в 6-му сегменті, а еякуляторний канал відносно короткий, а атріум видовжений, може утворювати петлі.

Нещодавно Subchev (2023) описав новий вид *Branchiobdella bulgariensis*, де він згадав основні відмінності:

1. Верхня губа має чотири лопасті.
2. Сперматека кругла з розширенням на передньому кінці.

При обслідуванні колекції Люблянського університету ми виявили різноманітність в будові репродуктивної системи, особливо сперматеки, серед

обслідуваних популяцій *B. parasita*. Форма капсули сперматеки варіювала, але при цьому вивідна протока залишалася дуже короткою у всіх популяціях.

Лише в популяції нового виду *B. sp.n.* з річки Блошчиці (Словенія) будова сперматеки різниться не лише формою капсули, а також виділяється досить довгим вивідним протоком.

***B. balcanica*: еволюційні зв'язки, морфологічна мінливість та сучасний стан популяцій**

У межах свого ареалу *Branchiobdella balcanica* переважно є ектосимбіонтом *A. astacus* (Kozarov et al., 1972; Subchev & Stanimirova, 1998; Klobučar et al., 2006; Kovács & Juhász, 2007; Füreder et al., 2009; Shrestkha & Utevsky, 2024) та *A. torrentium* (Kovács & Juhász, 2007). Важливо відзначити, що *Au. pallipes* не згадується як хазяїн для *B. balcanica* в існуючій літературі, і цей вид також не був виявлений під час дослідження музейних колекцій у рамках цієї роботи.

Ми спостерігаємо поширеність цього виду у водоймах басейну річки Дунай. На території України він знайдений на широкопалому раку в р. Теремля, що є притоком р. Тиса, що впадає в Дунай. Також нещодавня ревізія колекції бранхіобделід на слайдах у Харківському національному університеті імені В.Н. Каразіна (Харків, Україна) виявила цей вид в с. Гайдари, р. Сіверський Донець, 17.07.1959 (Рис. 3.38). Можна припустити, що в цей час на території Харківської області ще мешкав широкопалий річковий рак і у зв'язку з його зникненням майже по всій території України, зник і його ектосимбіонт *B. balcanica*.

Таксономічний статус *Branchiobdella balcanica sketi* Karaman 1967

Підвид *B. balcanica sketi* наразі відомий лише з типової місцевості у Західних Балканах та пізнішого запису з Польщі (Smietana 1999). Останній запис не містить детальної морфологічної інформації і не може бути підтверджений. Цей підвид був описаний Karaman (1967) з Ложського поля, зокрема з річки, яку він назвав «Verhniski Obrh», а яка зараз відома як Великий Обрх. Додаткові ілюстрації тих самих зразків були опубліковані Neseemann і Neubert (1999).

Ми дослідили історичний матеріал, зібраний у районі озера Церкниця (у Таблиці 2.1: озеро Церкниця, Мартинщиця (1968); озеро Церкниця, Раковський мостик (1969)) — район, близький до типової місцевості в Словенії, і підтвердили наявність лише *B. parasita* та *B. astaci*. Крім того, ми провели обстеження типової місцевості, звідки *B. balcanica sketi* був вперше описаний. Зразки, описані Karaman (1967), були спочатку зібрані Boris Sket, який вказав нам це місце. Однак на цій ділянці струмок зараз зарослий, і, згідно з неофіційними повідомленнями місцевих жителів, річкових раків там не спостерігали з 2007 року. Подальше дослідження найближчого струмка (у Таблиці 2.1: річка Blosčica, біля с. Volčje) у 2009 та 2018 роках призвело до виявлення *As. astacus* та асоційованих бранхіобделід, включаючи *B. balcanica*.

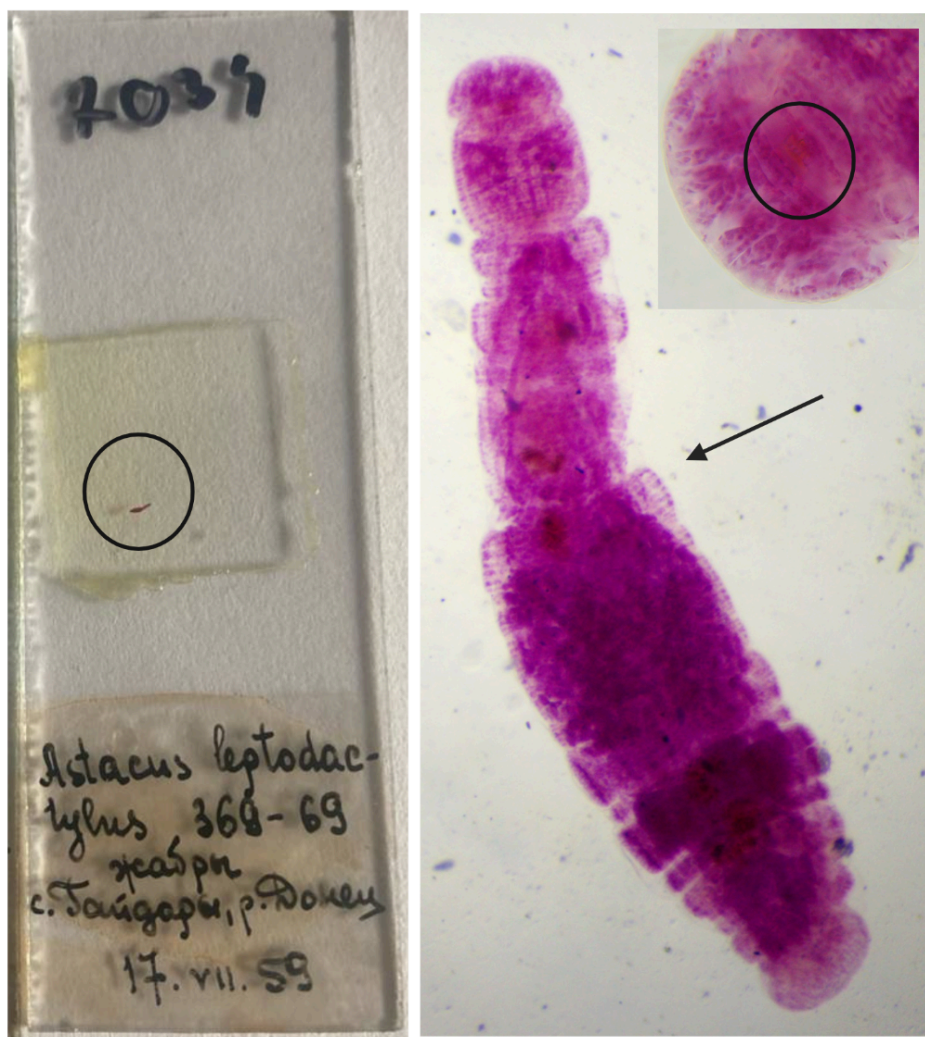


Рисунок 3.38. Слайд з *B. balcanica* з колекції препаратів у Харківському національному університеті імені В.Н. Каразіна. Вказано локацію: с. Гайдари, р. Сіверський Донець, 17.07.1959.

Згідно з Karaman (1967), ключова відмінність між двома підвидами — *B. balcanica balcanica* та *B. balcanica sketi* — полягає у розмірі копулятивної бурси та сперматеки. Ми припустили, що ця ознака може варіювати. Тому ми збирали матеріал з цієї локації протягом двох сезонів — пізньою весною та наприкінці літа. У зборах наприкінці літа були присутні як молоді, так і дорослі особини, яких ми віднесли до виду *B. balcanica*. У весняних зборах більшість особин була дорослими і ми виявили значну варіацію у розмірах копулятивної бурси. У однакових за розміром особинах були варіанти зі збільшеною копулятивною бурсою і зі звичайною. Екземпляри зі збільшеною копулятивною бурсою були взяті для молекулярно-генетичного аналізу і в результаті отримали послідовності, які свідчили про приналежність до виду *B. balcanica*.

На основі спостережуваного рівня варіації ми припускаємо, що матеріал, який зараз відносять до *B. balcanica sketi*, знаходиться в межах варіацій, характерних для *B. balcanica*, як описано Moszynski (1937).

3.5.2. Генетичне різноманіття та еволюція

***B. kozarovi*: генетичне різноманіття.**

Молекулярні дані, отримані в ході дослідження, свідчать про наявність трьох або чотирьох окремих гаплогруп (G1-G4) симбіонту *B. kozarovi*, які мешкають у різних географічних регіонах: басейні річки Дон та Східній Україні (G1), гирлі Дунаю (G2) в Україні та басейні річки Південний Буг (G3). Це вказує на складну історію географічного розповсюдження *B. kozarovi*, яка могла бути зумовлена як природними процесами, так і антропогенними факторами. Ми припускаємо, що шляхи розповсюдження *B. kozarovi*, пов'язані з розповсюдженням гаплогруп довгопалого рака. Згідно з нещодавньою великою роботою (Vlaha et al., 2023),

Туреччина є центром різноманітності гаплогруп довгопалого рака, з її складним геологічним минулим (підняття Анатолійського плато, формування Анатолійської діагоналі та ін.). В цій роботі виявлено три основні філогрупи довгопалого раку: європейську, азійську та турецьку. Формування гаплогруп довгопалого рака та його симбіонтів могло бути спричинено такими подіями, як підняття Анатолійського плато, утворення Анатолійської діагоналі та Мессінська солонісна криза (Krijgsman et al. 1999). Ці процеси призвели до фрагментації ареалів та ізоляції популяцій, що сприяло дивергенції видів. Турецька філогрупа, ймовірно, була зосереджена на північному узбережжі Анатолії, відокремленому від решти території Понтійськими горами (Bilgin, 2011). Однак її присутність у центральній Анатолії може бути пов'язана з історичними озерними системами, які дренивалися річками Кизилірмак та Єшилірмак (Meijers et al., 2020).

Ймовірно, що з Туреччини довгопалий рак та його симбіонти могли мігрувати в інші регіони, зокрема до України, через природні водні шляхи, пов'язані з Чорним морем.

Гаплогрупи *V. kozarovi* G2 та G3. Західний шлях міграції. Ці гаплогрупи були знайдені нами в гирлі Дунаю та басейні р. Південний Буг і, ймовірно, мігрували вздовж Західного узбережжя Чорного моря. Цей шлях міграції міг бути пов'язаний із природним розповсюдженням популяцій довгопалого рака, які рухалися з Анатолії через Балкани до нижньої течії Дунаю. Дунай, як одна з найбільших річок Європи, міг слугувати основним коридором для міграції водних організмів. Крім того, антропогенний вплив (наприклад, штучне заселення раків для аквакультури) міг посилити цей процес (Harlioğlu 2008; Harlioğlu і Harlioğlu 2009).

Гаплогрупа *V. kozarovi* G4. Східний шлях міграції. Ця гаплогрупа, яка мешкає в басейні Дону, Сіверського Дінця та Дніпра, ймовірно, мігрувала вздовж Східного узбережжя Чорного моря. Цей шлях міг бути пов'язаний із історичними зв'язками між Понто-Каспійським регіоном та північними водоймами. Через Азовське море та річку Волга популяції раків та їх симбіонтів могли проникати в басейни Сіверського Дінця та Дніпра. Цей процес міг бути посилений як природними змінами гідрології

(наприклад, коливання рівня моря), так і антропогенними факторами (переміщення раків для комерційних цілей) (Akhan et al. 2014).

Таким чином, наявність чотирьох гаплогруп симбіонту *B. kozarovi* в Україні відповідає двом основним шляхам міграції довгопалого рака: західному та східному. Це підтверджує гіпотезу про те, що симбіонти розповсюджувалися разом зі своїми хазяїнами. Різноманітність гаплогруп симбіонтів у Туреччині та їх подальше розповсюдження в Україну свідчить про те, що ці організми мають давню еволюційну історію, яка тісно пов'язана з геологічними та кліматичними змінами в регіоні (Meijers et al. 2020).

***B. parasita sensu latum*: генетичне різноманіття.**

Ми припускаємо, що вид *B. parasita* уже існував тоді, коли відбувалася дивергенція ліній довгопалого та широкопалого раків. Деякі дослідники річкових раків (Bartol et al., 2008; Perea et al., 2010), допускають, що період дивергенції між родами *Astacus* і *Austropotamobius*, корелює із закриттям Словенського коридору приблизно 20 мільйонів років тому (Рис. 3.37). Ця древня протока, яка з'єднувала Середземне море з Центральним Паратетісом, служила природним бар'єром між Балкано-Анатолійським масивом та іншою частиною Європи (Bartol et al., 2008; Perea et al., 2010). Ймовірно, пізніше *B. parasita* заселив кам'яного та білопалого раків на території сучасної Європи. Через значну ізоляцію оселищ, цей вид почав генетично сильно диференціюватися, що призвело до утворення різних гаплогруп та, можливо, нових видів.

Це припущення підтверджується тим фактом, що *B. parasita* знайдено на популяціях довгопалого раку, який мешкає на східному краї Західної Палеарктики у басейні річки Волга. Ці популяції географічно ізольовані від європейських видів раків, що підкреслює роль ізоляції у формуванні генетичного розмаїття *B. parasita*.

Крім того, наші дослідження показали, що всередині цього виду існують інші генетично відмінні форми, які можна розглядати як окремі види. Виявлені в нашому дослідженні гаплотипи COI *B. parasita* від благородного рака (*Astacus astacus*) з Закарпаття значно відрізнялися від гаплотипів COI *B. parasita* з дельти річки Дунай

та COI *B. parasita* з річки Блошчиця у Словенії, а також від тих, що знайдені на кам'яному та білопалому раках (Füreder et al., 2009; Šarić et al., 2018), що, ймовірно, представляють окремі таксономічні одиниці (Рис. 3.40).

Ми спостерігаємо високу генетичну диференціацію по мітохондріальному локусу COI між гаплогрупою G2 (з *Astacus astacus*, річка Блошчиця) та іншими гаплогрупами. Значення $\pi > 9\%$ вказує на це і може свідчити, що популяції належать до різних видів. Морфологічно екземпляри з цієї гаплогрупи також відрізняються, зокрема будовою сперматеки. Між гаплогрупами з річкового раку *Astacus astacus* з Закарпаття (G5) та *Astacus astacus* з Румунії (G6) значення π коливається у межах 6%. В цілому, різниця між гаплогрупами варіюється від мінімальної у 4% (між G3 та G6, G10 та G12) до максимальної у 15% (між G5 та G7). Наприклад, у багатьох тварин значення $\pi > 2-3\%$ вже може свідчити про видові відмінності, а $\pi > 10\%$ є дуже високим показником. Велике значення π може бути результатом тривалої ізоляції популяцій, що призвело до накопичення мутацій. Однак, значення π залежить від швидкості мутацій у досліджуваному гені. Наприклад, у мітохондріальних генах (як у нашому випадку - COI) швидкість мутацій зазвичай вища, ніж у ядерних генах, тому значення π може бути вищим.

Наш аналіз виявив 12 різних гаплогруп з різних локацій і хазяїнів. Одна група зі Словенії (річка Блошчиця) демонструвала значну генетичну відстань між собою, з r -відстанню 0.045–0.048, що підтверджує її відокремленість та можливість розглядати її як окремий таксономічний об'єкт.

Інші параметри, такі як VS (кількість варіабельних ділянок - 137), PI (кількість інформативних ділянок для парсимонії - 95) та Hd (різноманітність гаплотипів - 0,967), також підтверджують високу генетичну різноманітність у межах *B. parasita*. Велика кількість варіабельних ділянок (VS = 137) свідчить про значну генетичну гетерогенність у популяціях, що може бути наслідком тривалої ізоляції та адаптації до різних хазяїнів та середовищ. Кількість інформативних ділянок для парсимонії (PI = 95) вказує на наявність великої кількості мутацій, які можуть бути використані для побудови філогенетичних дерев та визначення еволюційних зв'язків між гаплогрупами. Високе значення різноманітності гаплотипів (Hd = 0,967) може

свідчити про те, що популяції *B. parasita* мають високу генетичну різноманітність, що характерно для видів із тривалою історією еволюції та ізоляції. Ці результати можуть свідчити, що *B. parasita* є не єдиним видом, а скоріше комплексом видів, які пройшли тривалу еволюцію в ізольованих популяціях, що призвело до їх генетичного та морфологічного розходження.

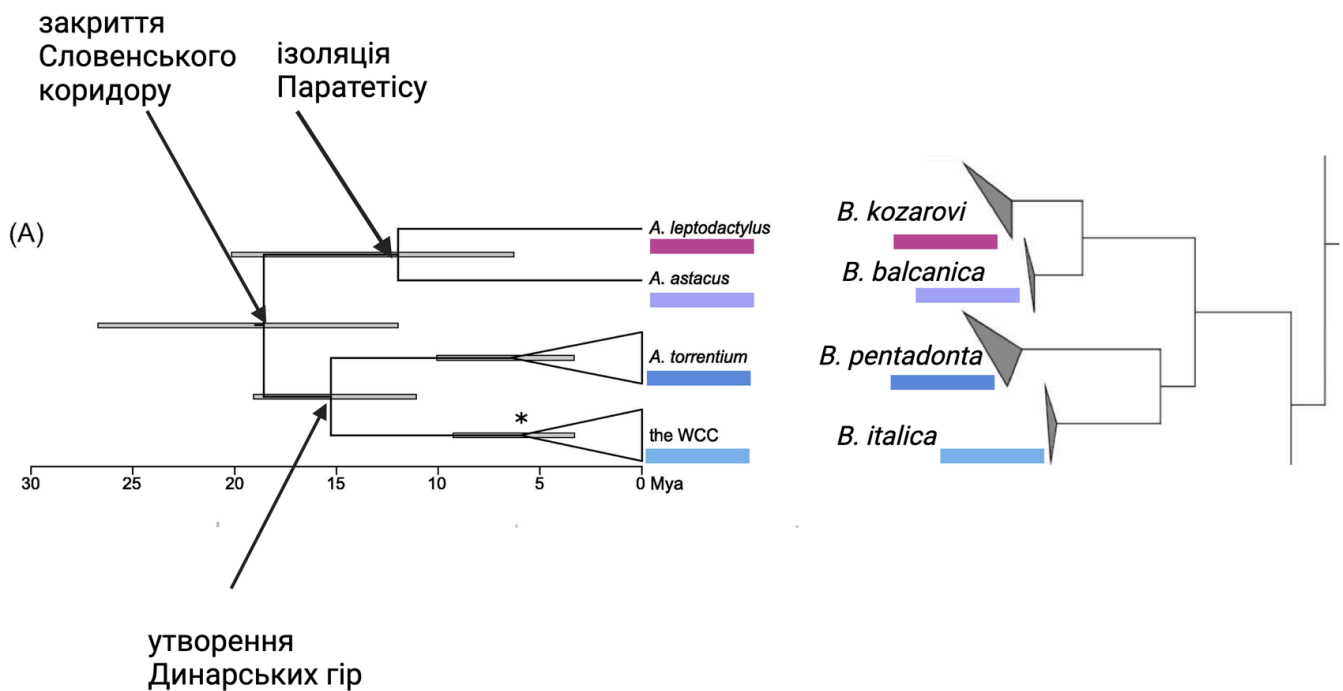


Рис. 3.39. Оцінки часу дивергенції річкових раків за COI мтДНК, часово-каліброване дерево, що відображає оцінки віку вузлів (за *Mišel Jelić, 2016*) та філогенетичне дерево бранхіобделід за COI мтДНК (ML).

Підводячи підсумки Розділу 3, ми можемо сказати, що еволюційна історія бранхіобделід і річкових раків пов'язана. Такі види, як *B. kozarovi*, *B. balcanica*, *B. italica* є специфічними до своїх хазяїв і їх філогенія відбиває філогенію їх раків-хазяїв (Рис. 3.39). Не специфічні види, такі як вид *B. parasita* та *B. hexadonta* уже існували тоді, коли відбувалася дивергенція ліній довгопалого та широкопалого раків. Ймовірно, пізніше вони заселили кам'яного та білопалого раків на території Західної Палеарктики. Через значну ізоляцію місцепомешкань та постплейстоценових рефугіумів, ці види почали генетично сильно диференціюватися, що призвело до утворення нових видів.

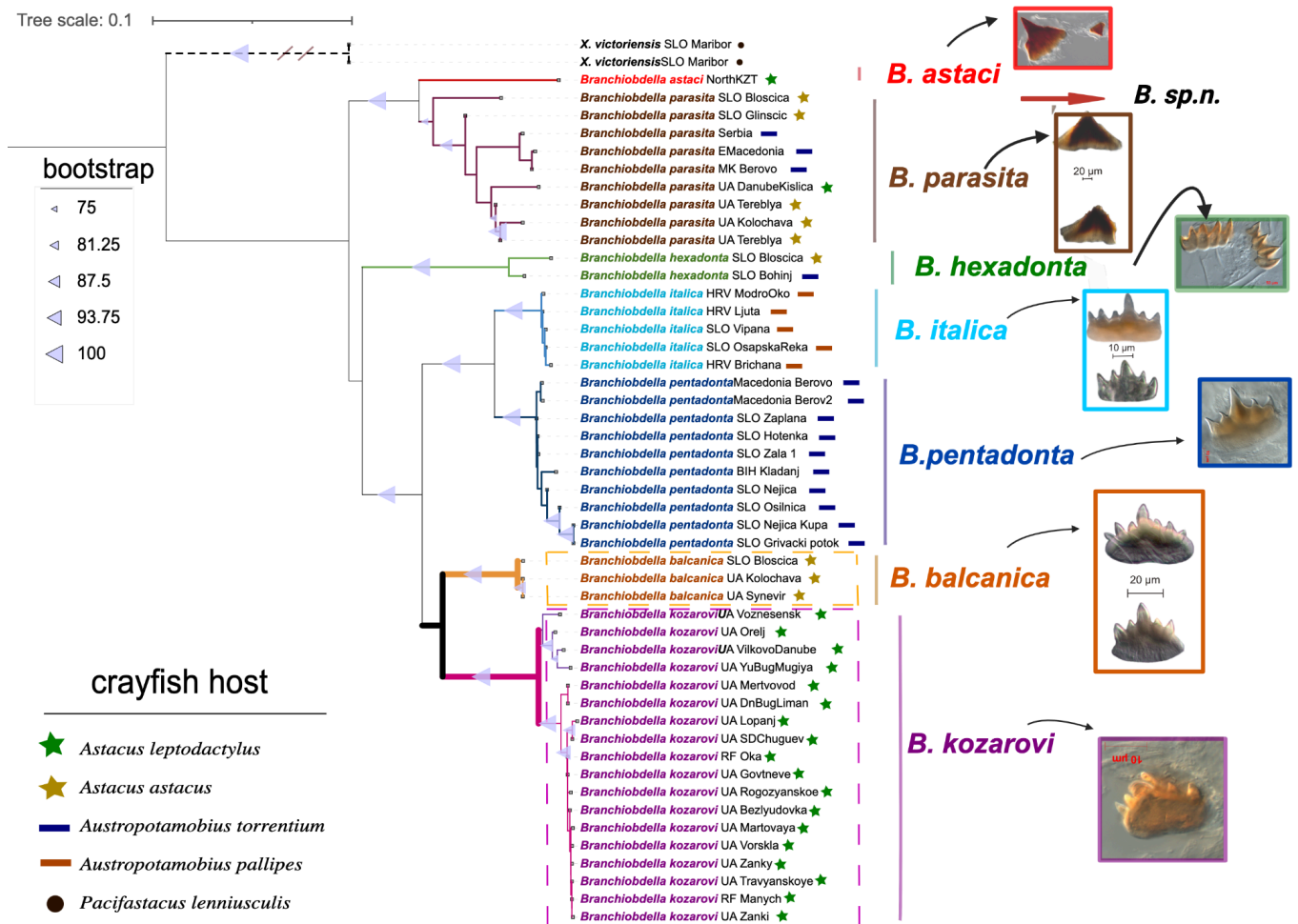


Рисунок 3.40. Філогенетичне дерево, побудоване методом Максимальної правдоподібності (IQ-TREE) для представників Branchiobdellida на основі чотирьох фрагментів генів. На дереві можна бачити специфічність бранхіобделід до їх хазяїв. Усі особини, що розглядаються в даному дослідженні, належать до нашої вибірки, включаючи зовнішню групу (outgroup). Дерево відображає довжину гілок. Показані гілки з bootstrap support більше 75.

4. РЕЗУЛЬТАТИ. СИМБІОТИЧНІ ВІДНОСИНИ

4.1 Життєвий цикл бранхіобделід

У ході дослідження ми спостерігали за варіацією інтенсивності та екстенсивності інвазії бранхіобделід виду *Branchiobdella kozarovi* протягом року в різних локаціях: Кампличанському та Безлюдівському кар'єрах, Печенізькому водосховищі та річці Сіверський Донець. Максимальна інтенсивність інвазії досягала 450 особин на одного рака влітку в Безлюдівському кар'єрі, тоді як мінімальна – 7 особин у Печенізькому водосховищі. Практично у всіх зразках на зябрах раків були присутні кокони бранхіобделід. Найвища інтенсивність інвазії у всіх водоймах спостерігалася навесні та влітку, знижуючись взимку. Сезонну динаміку чисельності можна простежити на прикладі Кампличанського кар'єру (Рис. 4.1). На графіку одна крива відображає зміну чисельності бранхіобделід, а інша – коконів протягом року. На першій кривій видно два піки – влітку та на початку весни, що свідчить про збільшення кількості черв'яків у ці періоди. Кількість коконів зменшується, але зростає пізньою весною та восени.

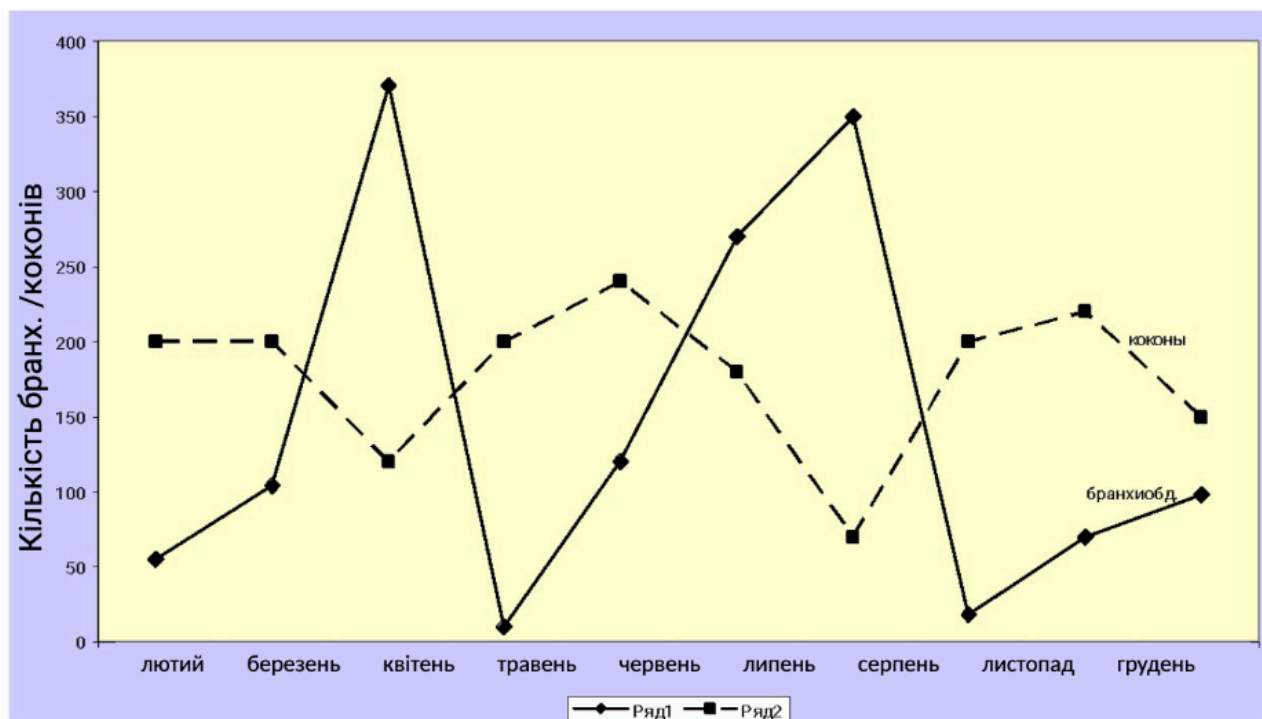


Рисунок 4.1. Інтенсивність інвазії *B. kozarovi* і її коконів протягом року у Кампличанському кар'єрі.

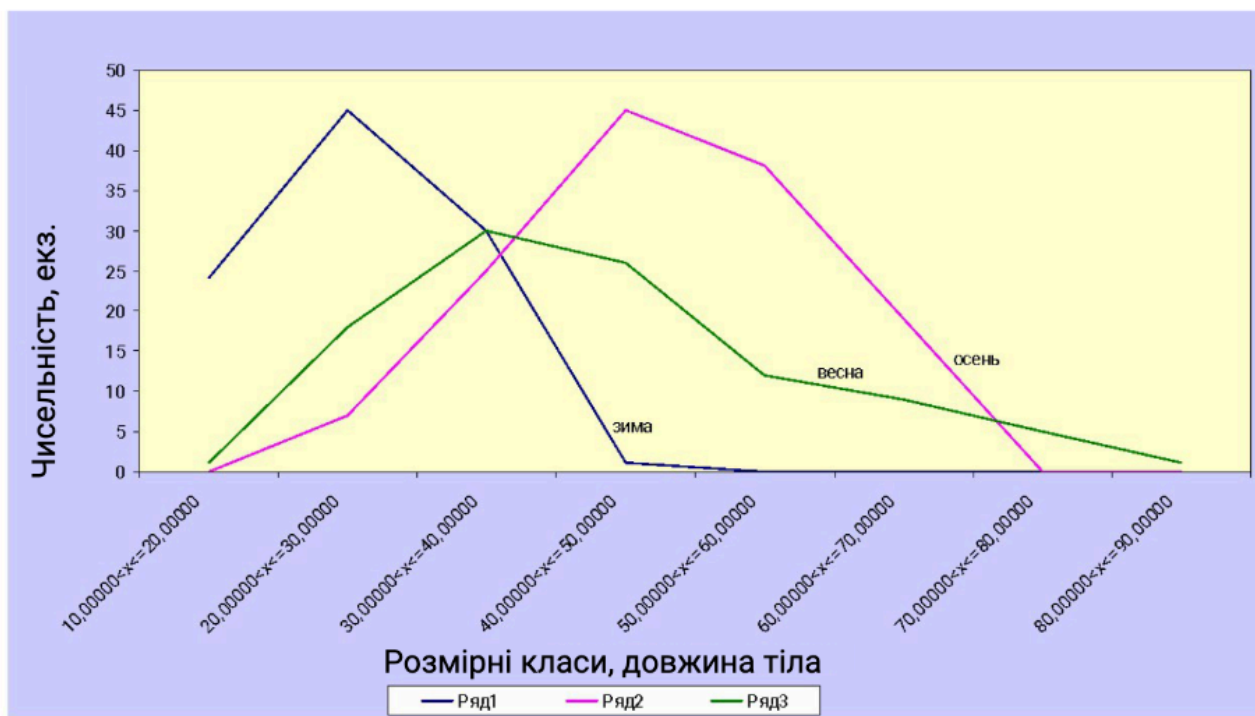


Рисунок 4.2. Сезонна динаміка розмірної структури популяції виду *B. kozarovi* в Кампличанському кар'єрі.

Сезонна динаміка розмірної структури популяції (Рис. 4.2) показує, що влітку та восени переважають дорослі особини, тоді як навесні збільшується кількість молодих особин. Ці дані підтверджують, що життєвий цикл бранхіобделід має чітку сезонну залежність.

Можливість існування бранхіобделід поза хазяїном.

За літературними даними, усі описані бранхіобделіди є облігатними симбіонтами ракоподібних. Їх виявляли на поверхні тіла раків та на зябрах, що дозволяє припустити, що вони не здатні існувати поза хазяїном. Однак для перевірки цієї гіпотези нами було проведено експерименти з виведення бранхіобделід з коконів та їх утримання поза хазяїном.

Раки *Astacus leptodactylus*, заражені бранхіобделідами, утримувалися в неаерованих ємностях. Після загибелі хазяїна бранхіобделіди могли прожити на ньому не більше двох діб. Черви, що залишилися на раках, були перенесені в пластикові ємності, а кокони разом із фрагментами зябрового апарату були

закріплені у підвішеному стані в скляних ємностях. Умови утримання: рН = 7,3, температура = 18°C. Після виходу з коконів бранхіобделіди поїдали їх оболонки, а потім переходили на залишки детриту на зябрах. У природних умовах локалізація бранхіобделід на хазяїні пов'язана з особливостями будови екзоскелета рака, вони віддають перевагу місцям, де накопичується найбільша кількість органіки.

4.2 Локалізація на річкових раках

Локалізація виду *B. astaci* на хазяїні, екстенсивність та інтенсивність інвазії.

Дослідження власних зборів базується на обстеженні 12 довгопалих раків *Astacus leptodactylus* Escholtz, 1823. У ході роботи було виявлено 34 екземпляри бранхіобделід, які ідентифіковані як *Branchiobdella astaci* Odier, 1823. Екстенсивність інвазії бранхіобделідами виявилася високою та склала 83 % (заражено 10 з 12 екземплярів раків). Основні місця локалізації симбіонтів включали область під зябровими кришками, поверхню карапаксу та очі рака. Середня інтенсивність інвазії склала 3,4 екземпляра бранхіобделід на одного зараженого хазяїна.

Колекційні збори складали невеликі кількості, тому ми не можемо за цими матеріалами судити про інтенсивність та екстенсивність інвазії. Ми використали їх як порівняльний матеріал і для аналізу ДНК.

Локалізація виду *B. hexadonta* на хазяїні, екстенсивність та інтенсивність інвазії.

Дослідження власних зборів базується на обстеженні 8 широкопалих раків *Astacus astacus* з озера Синевір (Закарпаття, Україна). У ході роботи було виявлено 18 екземплярів бранхіобделід, які ідентифіковані як *Branchiobdella hexadonta*. Екстенсивність інвазії цим видом склала 50 % (заражено 4 з 8 екземплярів раків). Основні місця локалізації симбіонтів включали область під зябровими кришками. Середня інтенсивність інвазії склала 4,5 екземпляри бранхіобделід на одного зараженого хазяїна.

Таблиця 4.1. Інтенсивність і екстенсивність інвазії *B. kozarovi* річкового рака *As.*

leptodactylus

місто збору	дата	оглянуто раків	інфіковано бранхіобделідами	екстенсивність інвазії в %	знайдено бранхіобделід	середня інтенсивність інвазії
Кампличанський кар'єр		40			2332	
	06.11.2005	5	5	100	350	70 + 9,91
	27.11.2005	10	10	100	255	26 + 2,96
	27.02.2006	5	5	100	272	55 + 10,24
	28.03.2006	5	5	100	520	104 + 13,56
	25.04.2006	2	2	100	741	370,5 + 29,50
	10.05.2006	3	3	100	31	10 + 5,44
	07.09.2006	9	9	100	163	18,1 + 14,67
Безлюдовський кар'єр		15			1040	
	07.03.2005	2	2	100	500	250 + 15,89
	11.08.2005	3	3	100	350	117 + 8,29
	26.02.2006	4	4	100	30	7,5 + 0,86
	травень, 2006	3	3	100	140	47 + 5,54
	17.12.2006	3	3	100	20	7 + 0,66
р. Сіверський Донець:						
Червоний Донець		3	3	100	500	167 + 83,56
Нижній Бішкин		5	5	100	352	70,4 + 5,80
Чугуїв		3	3	100	75	25 + 5,19
Борки		8	4	50	50	12,5 + 1,55
Печенізьке вдсхв.		174	110	63,2	1539	14 + 1,19
Жовтневе вдсхв.		8	4	50	50	12,5 + 1,92

Колекційні зразки були представлені невеликою кількістю, тому на їх основі неможливо зробити висновки щодо інтенсивності інвазії виду *B. hexadonta*. Ці матеріали були залучені нами для порівняльного аналізу та проведення молекулярно-генетичного аналізу.

Таблиця 4.2. Спільне існування видів бранхіобделід на досліджуваних річкових раках.

Комбінація видів бранхіобделід	Річковий рак	Кількість випадків
<i>B. parasita</i>	<i>As. astacus, Au. pallipes, Au. torrentium, As. leptodactylus</i>	12
<i>B. pentadonta</i>	<i>As. astacus, Au. torrentium</i>	6
<i>B. pentadonta</i> + <i>B. hexadonta</i>	<i>Au. pallipes, Au. torrentium</i>	5
<i>B. astaci</i>	<i>Au. pallipes, Au. torrentium</i>	5
<i>B. italica</i>	<i>Au. pallipes</i>	4
<i>B. parasita</i> + <i>B. pentadonta</i>	<i>As. astacus, Au. torrentium</i>	7
<i>B. hexadonta</i>	<i>As. astacus, Au. torrentium</i>	2
<i>B. parasita</i> + <i>B. astaci</i>	<i>Au. pallipes, Au. torrentium</i>	2
<i>B. parasita</i> + <i>B. hexadonta</i>	<i>Au. pallipes</i>	3
<i>B. italica</i> + <i>B. hexadonta</i>	<i>Au. torrentium</i>	2
<i>B. pentadonta</i> + <i>B. balcanica</i>	<i>As. astacus</i>	1
<i>B. hexadonta</i> + <i>B. balcanica</i>	<i>As. astacus</i>	1
<i>B. parasita</i> + <i>B. balcanica</i>	<i>As. astacus</i>	4
<i>B. hexad.</i> + <i>B. ital.</i> + <i>B. ast.</i> + <i>B. paras.</i>	<i>Au. pallipes</i>	1
<i>B. hexad.</i> + <i>B. ital.</i> + <i>B. balc.</i> + <i>B. paras.</i>	<i>Au. torrentium</i>	1
<i>B. astaci</i> + <i>B. parasita</i>	<i>Au. torrentium</i>	1
<i>B. astaci</i> + <i>B. pentadonta</i>	<i>Au. torrentium</i>	1
<i>B. kozarovi</i>	<i>As. leptodactylus</i>	20

Локалізація виду *B. kozarovi* на хазяїні, екстенсивність та інтенсивність інвазії.

Бранхіобделіди переважно розташовувалися на поверхні тіла рака, зосереджуючись на грудних та черевних кінцівках, антенах, антенулах та ногощелепах. У меншій мірі вони зустрічалися на анальній лопаті та карапаксі (Рис. 4.8). Невелика кількість бранхіобделід також була зафіксована в зябрах. Інтенсивність та екстенсивність інвазії бранхіобделід варіювали залежно від водойми (Табл. 4.1). Найвища інтенсивність інвазії спостерігалася у досліджених нами водоймах навесні та влітку (150–400 екз.), тоді як взимку їх кількість значно зменшувалася до 7 екземплярів (Рис. 4.7). Сезонну динаміку чисельності можна простежити на прикладі Кампличанського кар'єру у розділі “Результати: Життєвий цикл бранхіобделід”.

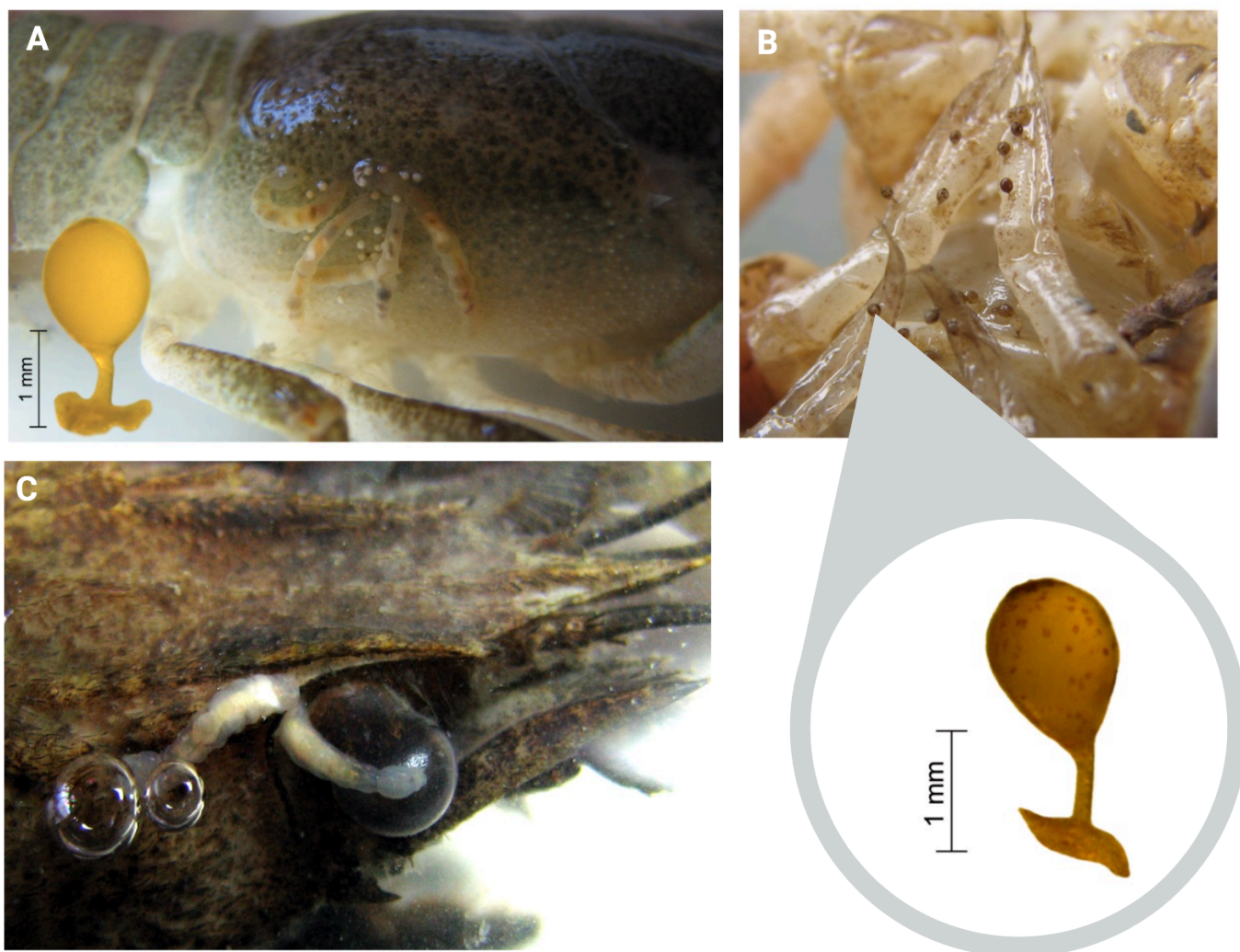


Рис. 4.3. Локалізація коконів виду *B. parasita* на *Astacus leptodactylus* з дельти р. Дунай, с. Кислиця: А – незрілі кокони на бічній частині головогрудей та дорослі особини; В – зрілі кокони на плеоподах рака; С - дорослі особини на очах рака.

Локалізація виду *B. parasita* на хазяїні, екстенсивність та інтенсивність інвазії

Дорослі особини *B. parasita* на всіх досліджених ділянках віддавали перевагу очам хазяїна, максиліпедам, плеоподам та бічній частині головогрудей (Рис. 4.3). Кількість особин *B. parasita* на одного хазяїна (інтенсивність інвазії) коливалася від 1 до 4 особин у Кислиці, від 1 до 8 особин у Вілковому (р. Дунай) та від 3 до 12 особин у р. Терєбля. Ймовірно, через досить великі розміри (10–12 мм) *B. parasita* не може заселяти одного хазяїна у великій кількості. Відсоток заражених раків (екстенсивність інвазії) у Кислиці становив 59%, тоді як у с. Вілковому та р. Терєбля поширеність досягала 100%.

Дослідження було зосереджено на популяціях *B. parasita*, які співіснують із популяціями чотирьох видів річкових раків: *As. astacus* (Закарпаття, річка Терєбля, Україна; Словенія, річка Блошчиця; Польща), *As. leptodactylus* (дельта річки Дунай, Україна), *Au. torrentium* та *Au. pallipes* (локації з Західних Балкан). Вид *B. parasita* є дуже помітним симбіонтом достатньо великих розмірів (до 10 мм) у порівнянні з іншими видами бранхіобделід. Він веде хижацький спосіб життя, харчуючись личинками хірономід, яких ми часто знаходили у шлунку.

Наше дослідження показало, що популяції *B. parasita* можуть існувати на всіх чотирьох аборигенних видах річкових раків (Табл. 4.2). У більшості випадків цей вид був єдиним симбіонтом (14 випадків з проаналізованих). Співіснування з іншими видами бранхіобделід було зафіксовано в наступних комбінаціях:

- 7 випадків з *B. pentadonta* (на *As. astacus* та *Au. torrentium*),
- 4 випадки з *B. balcanica* (на *As. astacus*),
- 3 випадки з *B. hexadonta* (на *Au. pallipes*).

За літературними даними, вид *B. parasita* здатний заселяти широкий спектр ракоподібних хазяїв, які мешкають на території Західної Палеарктики, і не

демонструє строгу специфічність до певного виду хазяїна (Рис. 4.4). Швидше за все, це є результатом обмеженої доступності хазяїнів у цьому регіоні (Vedia et al., 2015).

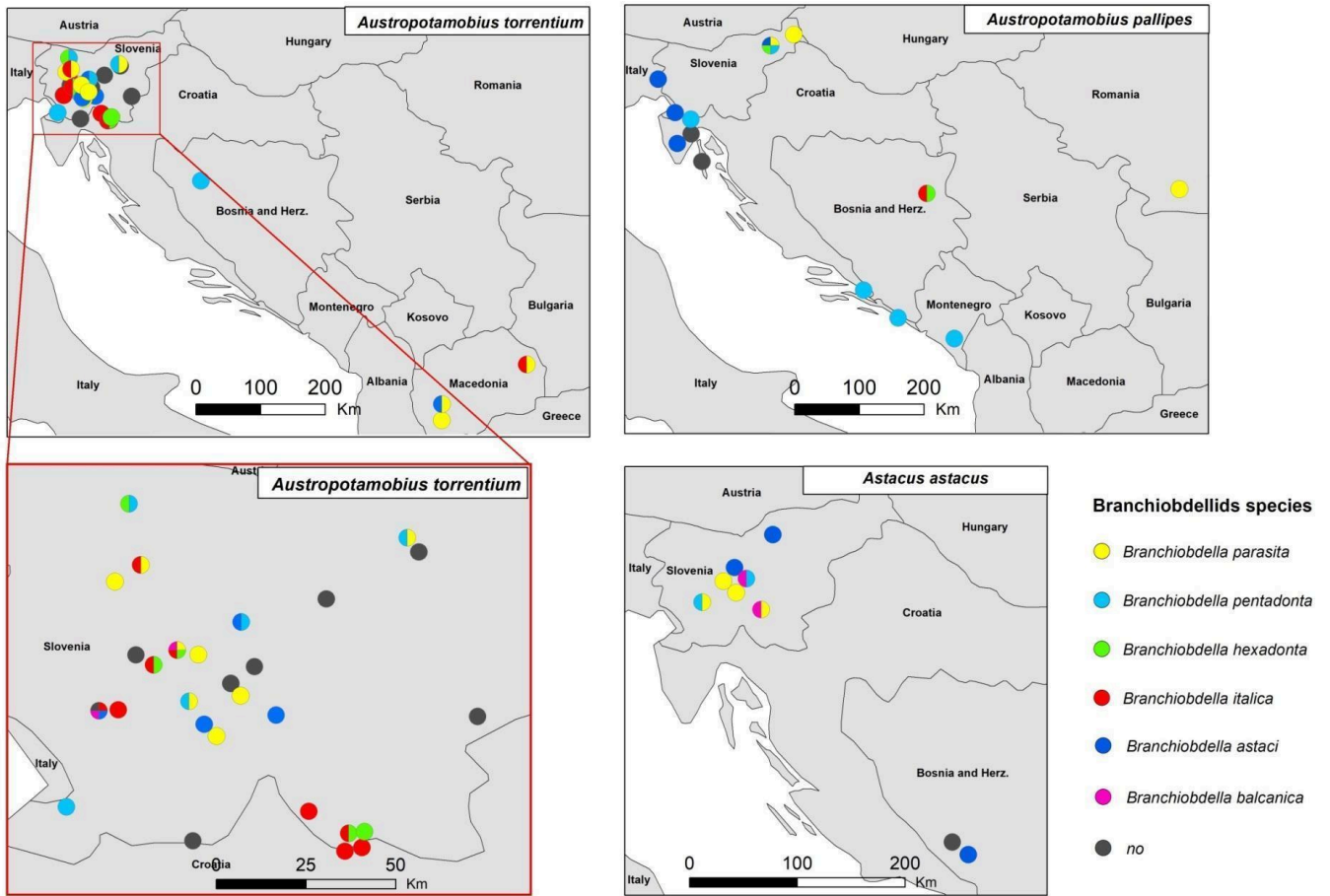


Рисунок 4.4. Географічне поширення бранхіобделід та їх співіснування на річкових раках у Західних Балканах.

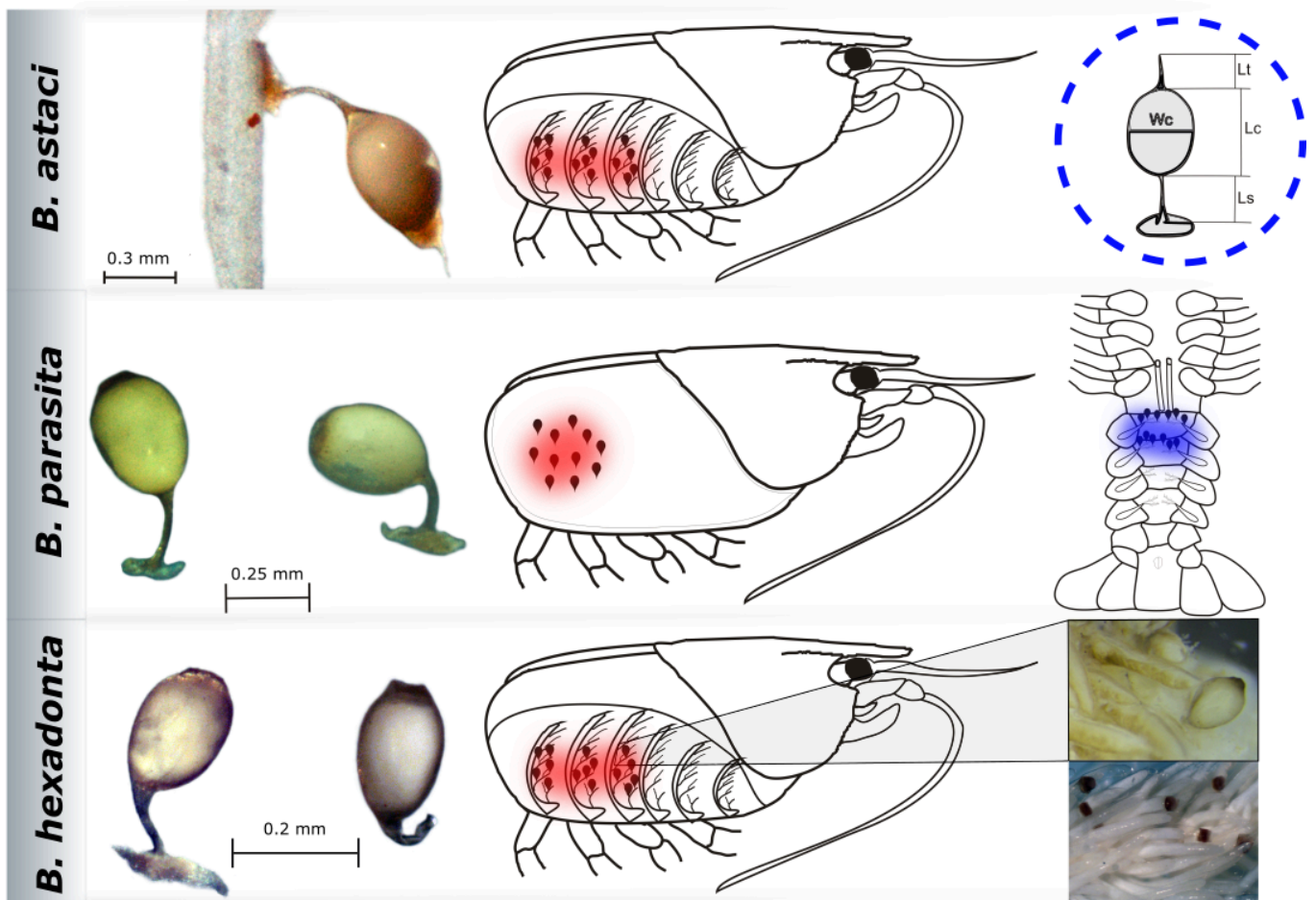


Рисунок 4.5. Структура та розташування коконів of *B. astaci*, *B. parasita* та *B. hexadonta* на їх хазяях-раках. Діаграма у верхньому правому куті ілюструє наступні розміри коконів: Lc – довжина капсули кокона, Lt – довжина кришечки кокона, Ls – довжина стебла, Wc – ширина кокона. Червоним кольором з позначкою “♥” вказано основне місце розташування коконів, тоді як синім кольором з позначкою “♠” (у середині праворуч) вказано додаткове місце розташування у випадках високої інтенсивності інвазії (фото: М. Шрестха).

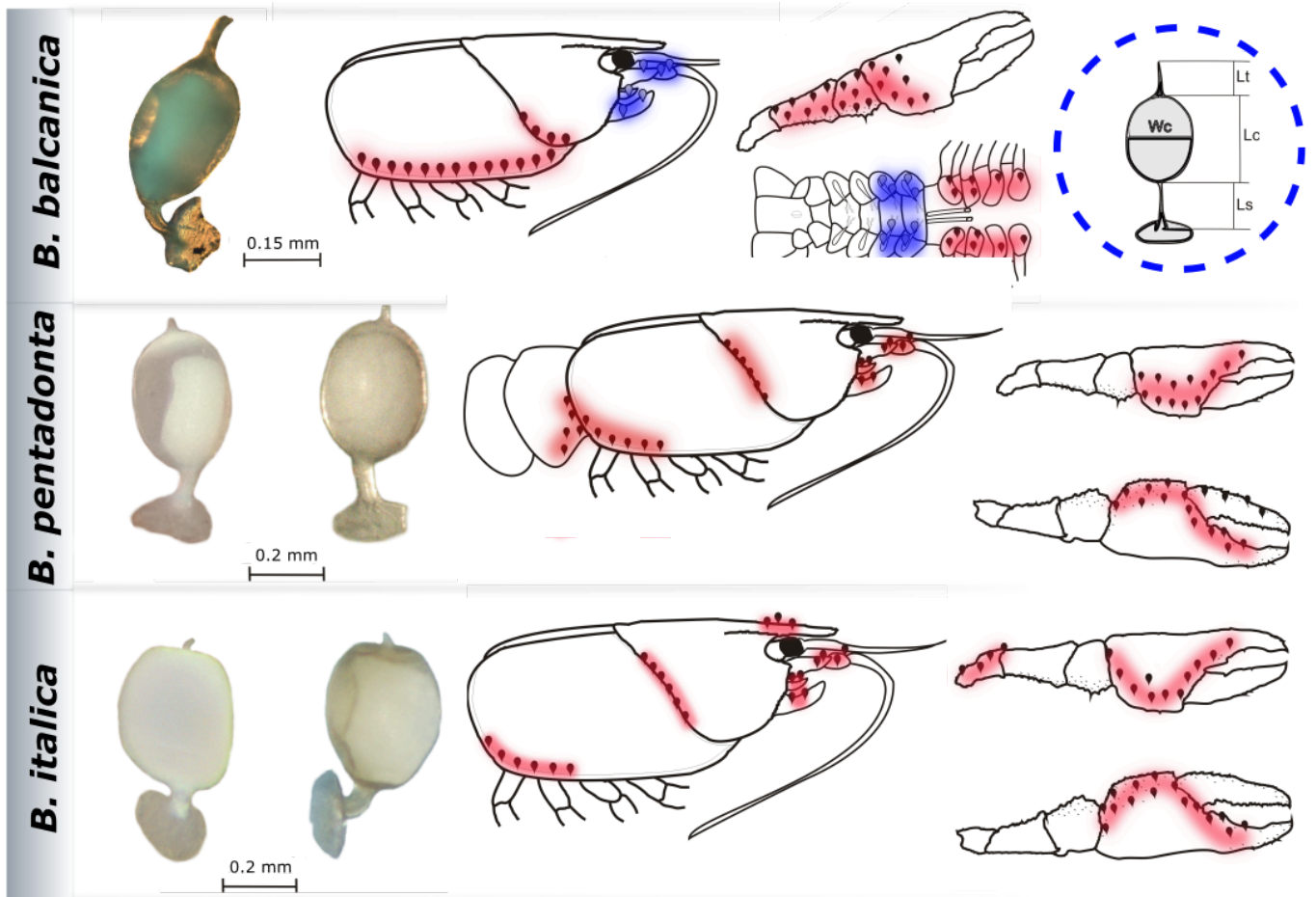


Рисунок 4.6. Структура та розташування коконів *B. balcanica*, *B. pentadonta* та *B. italica* на тілі річкового рака. Діаграма у верхньому правому куті ілюструє наступні розміри коконів: Lc – довжина капсули кокона, Lt – довжина кришечки кокона, Ls – довжина стебла, Wc – ширина кокона. Червоним кольором з позначкою “♥” вказано основне місце розташування коконів, тоді як синім кольором з позначкою “♠” вказано додаткове місце розташування у випадках високої інтенсивності інвазії (фото: М. Шрестха).

Ідентифікація бранхіобделід за структурою і розташуванням коконів

Розташування та характеристики коконів бранхіобделід на тілі хазяїна можуть бути корисними для ідентифікації видів. Creed et al. (2015) зафіксували, що значна частина життєздатних коконів зазвичай розташована на першому та другому абдомінальних сегментах раків, що вказує на чітку перевагу цих ділянок для відкладання коконів. Така локалізація може бути зумовлена фізичними

характеристиками хазяїна, включаючи розмір та наявність відповідних мікросередовищ для розвитку ембріонів (Skelton et al., 2015). Ми описуємо кілька ключових структур, які варіюються між видами, зокрема форму капсули кокона, наявність або відсутність кришечки кокона, співвідношення довжини капсули L_c до її ширини W_c , довжину кришечки кокона L_t та довжину стебла L_s (Рис. 4.5). На багатьох зразках раків, досліджених у цій роботі, були присутні лише дорослі особини черв'яків. Однак на деяких зразках кокони були виявлені на різних частинах екзоскелета раків та їх зябрах, а також часто знаходилися вільно в контейнерах, де зберігалися раки.

Наші спостереження вказують на те, що бранхіобделіди віддають перевагу відкладанню коконів на найбільш рухливих ділянках тіла хазяїна, зокрема на ротових органах, плеоподах, перейоподах, антенах та зябрах, які постійно піддаються впливу водних потоків. Кокони часто прикріплені до поверхні хазяїна за допомогою гнучких стебел, що пом'якшує вплив механічних сил. Також є тенденція розміщувати кокони в бороздах і щілинах карапаксу, які менш схильні до чищення і, таким чином, забезпечують безпечні умови для розвитку коконів (Yoder et al., 2007; Vlach et al., 2017).

Зазвичай бранхіобделіди займають ділянки тіла хазяїна, достатньо великі для розміщення кількох десятків коконів; однак наші спостереження свідчать, що щільність коконів може суттєво варіюватися і не обов'язково корелює з розміром займаної ділянки. Наші спостереження показали, що місця, які займають *B. pentadonta* та *B. italica*, перекриваються (Рис. 4.6). Можливо, конкуренція за ці ділянки може пояснювати, чому ці два види не зустрічаються разом на одному хазяїні, хоча, як зазначено вище, більшість записів про *B. italica*, включаючи наші дослідження, пов'язані з єдиним видом хазяїна – *Au. pallipes*. *Branchiobdella balcanica* відкладає кокони на різних ділянках тіла хазяїна, перекриваючись із *B. pentadonta* (Рис. 4.6). *Branchiobdella parasita* легко відрізнити за великими коконами, які розташовані симетрично латеро-постеріально на обох сторонах головогрудей рака (Рис. 4.5). Жоден інший вид не відкладає кокони в цих місцях. Специфічний мікрохижацький спосіб життя *B. parasita* може дозволяти цьому виду співіснувати

на одному хазяїні з майже усіма західноєвропейськими видами бранхіобделід. *Branchiobdella astaci* також є симбіотичним видом, який мешкає лише у зябровій камері, де він також відкладає свої кокони (Рис. 4.5). У нашому дослідженні цей вид часто виявлявся на раках, які також були хазяями для ектокоменсального виду *B. pentadonta*, хоча ймовірно, що окремі особини не зустрічаються одна з одною через специфічність їх локалізації. Кокони *B. hexadonta* розташовувалися на зябрових філаментах (Рис. 4.5). Крім того, у вмісті кишечника цього виду були виявлені фрагменти зябрових ниток. Ці спостереження свідчать про те, що основним середовищем існування дорослих особин цього виду є зяброва камера, де вони живляться епітеліальною тканиною зябрових ниток. Це узгоджується з попередніми дослідженнями, які вказують на подібну стратегію харчування серед деяких бранхіобделід (Chekanovskaya, 1962). Розташування коконів у зябровій камері також може вказувати на репродуктивну стратегію, яка максимізує виживання потомства в захищеному середовищі, де воно може розвиватися поблизу джерела, багатого поживними речовинами. Ця екологічна ніша підкреслює тісні симбіотичні взаємини між деякими бранхіобделідами та їх раками-хазяями, акцентуючи важливість зябрових камер як критичного середовища для харчування та розмноження.

Таким чином, дослідження коконів бранхіобделід та їх розташування на тілі хазяїна надає важливу інформацію для вивчення цих організмів. Це дозволяє не лише ідентифікувати види за відсутності дорослих особин, але й зрозуміти екологічні взаємини між різними видами бранхіобделід та їх хазяями.

4.3 Взаємовідносини з інтродукованими видами річкових раків

Експеримент з зараження інтродукованих раків.

В ході дослідження було обстежено 30 екземплярів річкових раків *Astacus leptodactylus*, на яких виявлено 494 екземпляри виду *Branchiobdella kozarovi*. Ці дані підтверджують високу частоту зараження даного виду раків бранхіобделідами в природних умовах.

Таблиця 4.3. Кількість досліджених видів та екземплярів раків, локалізація *B. kozarovi* на видах раків, які приймали участь в експерименті. Як контроль - вид *As. leptodactylus*.

вид	підсаджено	перемістились на хазяїна	у вільному стані	не знайдено
<i>Procambarus clarkii</i>	70	36	15	19
<i>Procambarus sp.</i>	70	0	12	58
<i>Cherax quadricarinatus</i>	70	26	3	41
<i>Procambarus sp.</i> Біла форма	70	0	14	56
<i>Neocaridina heteropoda</i> і <i>Macrobrachium asperulum</i>	70	0	7	63
<i>Procambarus sp.</i>	70	0	0	70
<i>Astacus leptodactylus</i>	70	61	6	3

Для вивчення можливості симбіозу *B. kozarovi* з інтродукованими видами раків, було проведено лабораторний експеримент, у якому взяли участь 5 видів та форм річкових раків та 2 види креветок (Табл. 4.3). Раки обиралися однакового розміру. Як контроль використали хазяїна *B. kozarovi* - довгопалого річкового раку *As. leptodactylus*. Результати показали, що бранхіобделіди прикріпилися лише до трьох видів раків: *Procambarus clarkii*, *Cherax quadricarinatus* та *As. leptodactylus* (Табл. 4.4). При цьому частина симбіонтів залишилася у вільному стані, а деякі екземпляри взагалі не були виявлені після завершення експерименту. Бранхіобделіди переважно заселяли щелепи і ногощелепи, базальну частину антен (Рис. 4.8), поверхню карапаксу і брюшні ножки. Цікаво, що місце їх локалізації було майже однаковим на всіх трьох видах раків (Рис. 4.7).

Таблиця 4.4. Особливості локалізації бранхіобделід на успішно колонізованих раках

Вид рака	Локалізація на хазяїні							Всього
	Антени і антенули	Карапакс	Грудні ножки	Брюшні ножки	Тельсон	Клешні	Брюшко	
<i>Astacus leptodactylus</i>	93	79	79	10	7	47	30	345
% локалізації на частинах тіла	26,96%	22,90%	22,90%	2,90%	2,90%	13,62%	8,70%	100%
<i>Procambarus clarkii</i>	12	7	9	2	2	1	3	36
% локалізації на частинах тіла	33,33%	19,44%	25,00%	5,56%	5,56%	2,78%	8,33%	100%
<i>Cherax quadricarinatus</i>	8	8	3	0	0	2	5	26
% локалізації на частинах тіла	30,77%	30,77%	11,54%	0,00%	0,00%	7,69%	19,23%	100,00%

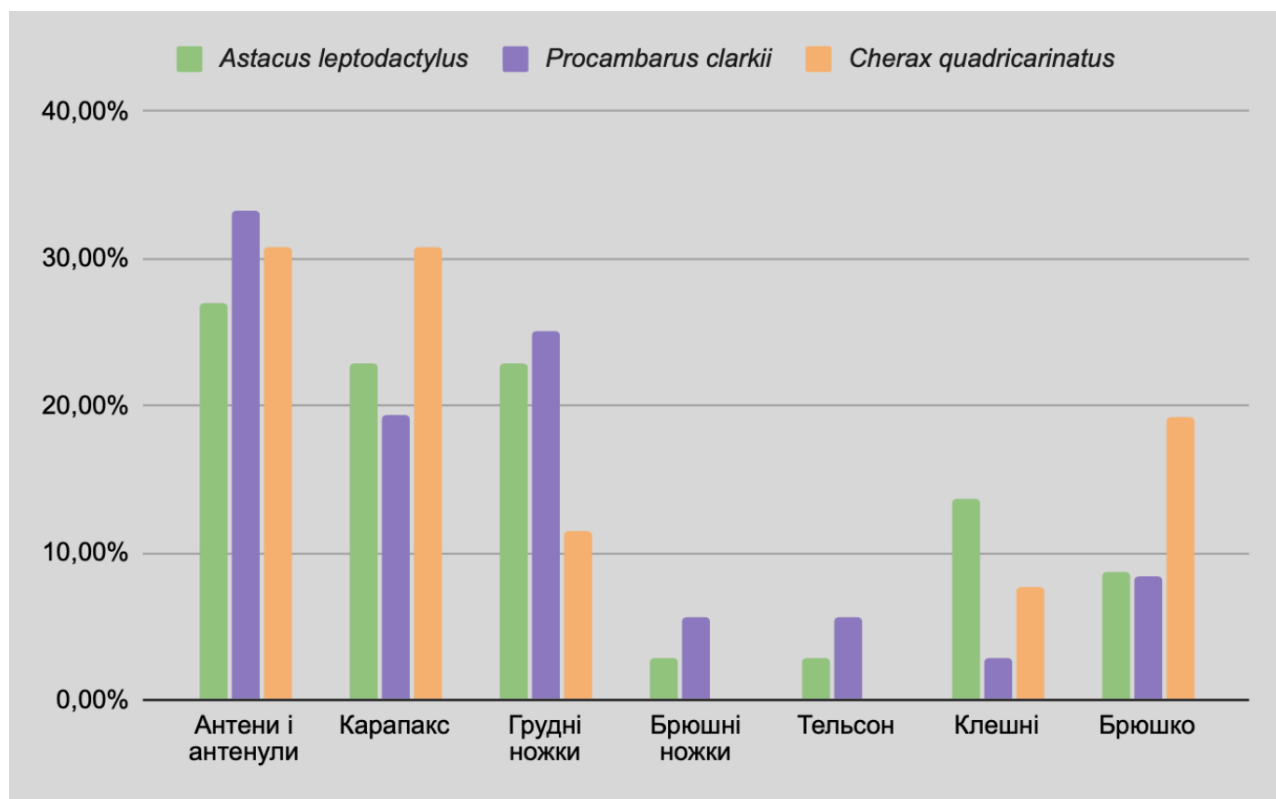


Рисунок 4.7. Локалізація *B. kozarovi* після колонізації на річкових раках *Astacus leptodactylus*, *Procambarus clarkii*, *Cherax quadricarinatus*.

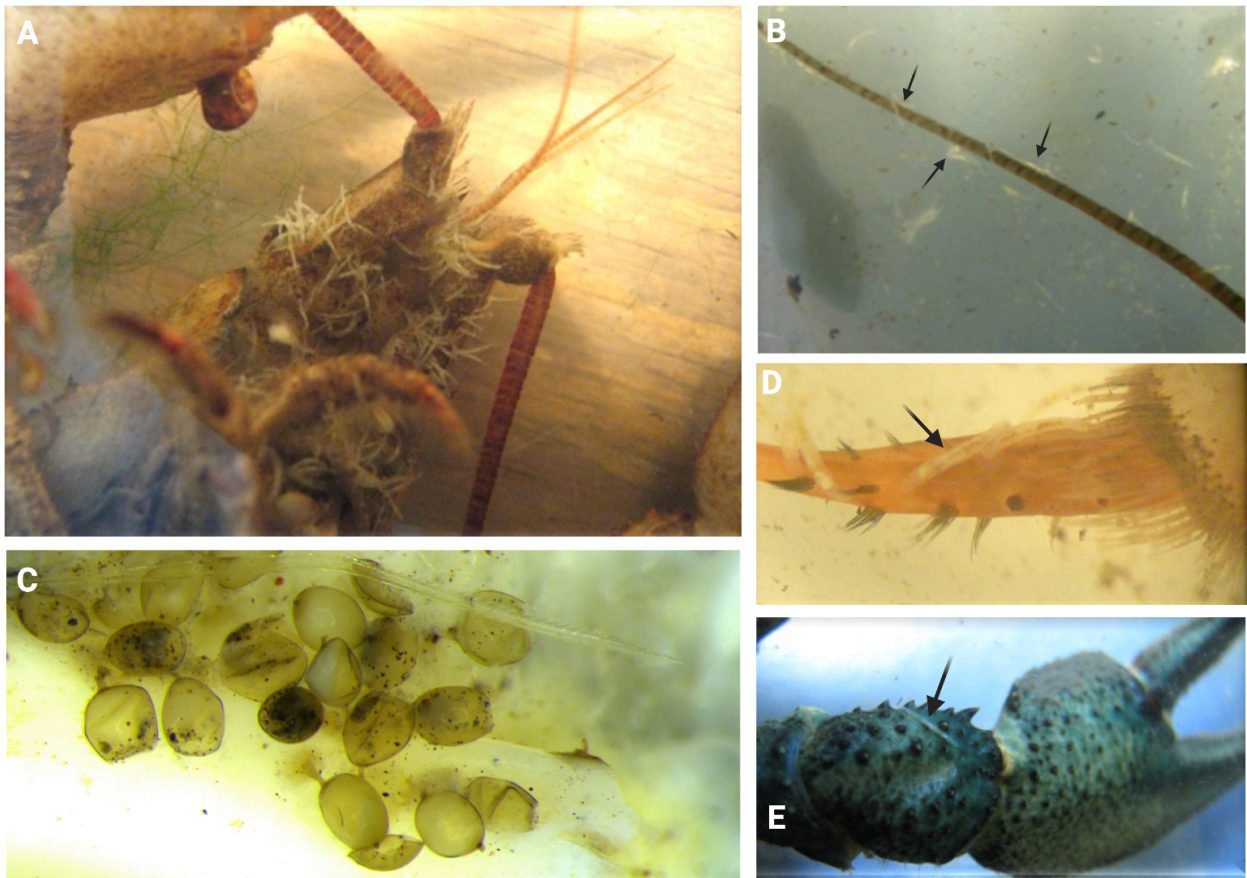


Рис. 4.8. Локалізація виду *B. kozarovi* на частинах тіла *Astacus leptodactylus*: А - щелепи і ногощелепи; В - антени; С - кокони у зябровій порожнині; D - грудні кінцівки; Е - клешні.

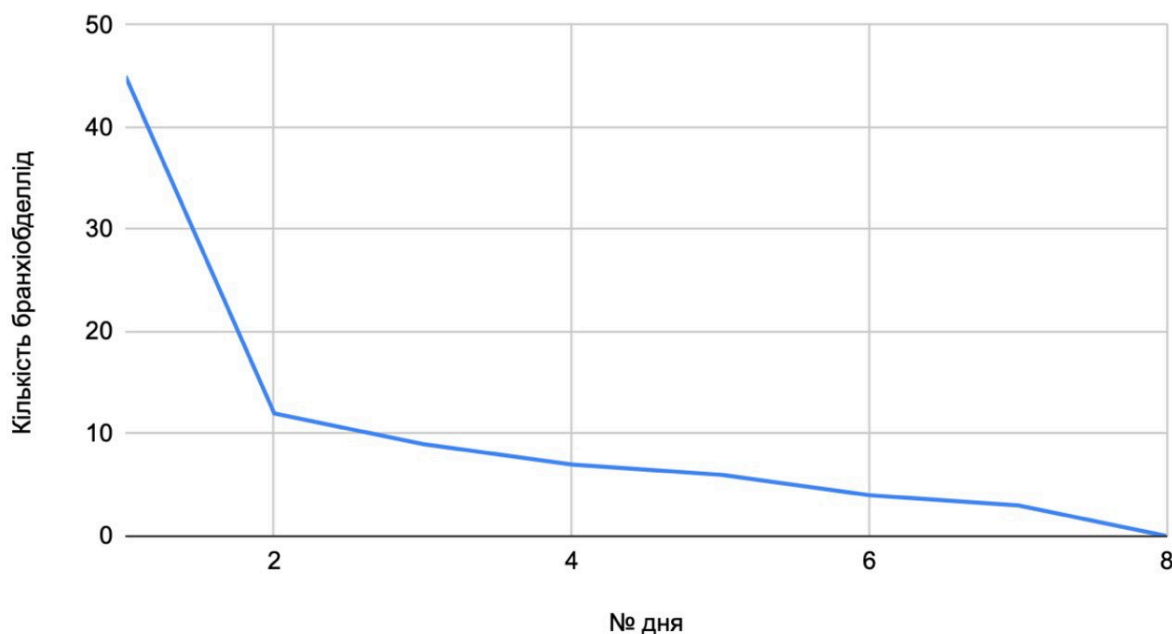
Вивчення можливості існування бранхіобделід поза хазяїном.

Окремим етапом дослідження була перевірка можливості існування *Branchiobdella kozarovi* поза раком-хазяїном. Для цього 90 екземплярів бранхіобделід було розміщено у дві ємності: одну з чистою водою, а іншу – з водою, куди кожен день додавали корм. У лабораторних умовах годували чистою культурою водоростей роду *Scenedesmus* та культурою інфузорій *Paramecium*. Зауважено, що бранхіобделіди жили довше за наявності *Paramecium*. Однак, при проникненні хижих інфузорій протягом 3–4 днів бранхіобделіди покривалися «бородавками»,

їхня активність знижувалася, і вони гинули. За оптимальних умов черви жили від одного до двох місяців (Табл.4.5).

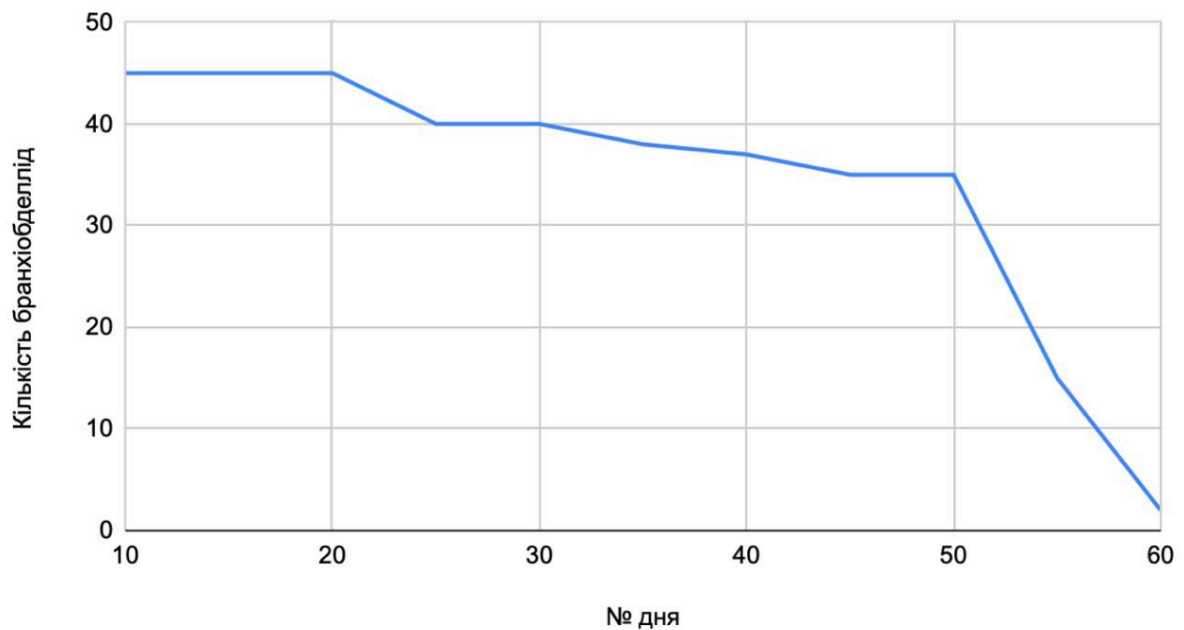
У першій ємності найбільші втрати чисельності спостерігалися в перші дні експерименту, а останній екземпляр загинув на 8-й день. У другій ємності, де було джерело живлення, бранхіобделіди жили значно довше – до 2 місяців, причому чисельність популяції залишалася стабільною протягом тривалого часу, а різке зменшення кількості особин відбулося лише наприкінці експерименту (Табл. 4.6). Ці результати підтверджують, що *Branchiobdella kozarovi* здатні існувати поза хазяїном за наявності джерела живлення, але їхня виживаність значно знижується у відсутності поживних ресурсів.

Таблиця 4.5. Кількість особин *Branchiobdella kozarovi*, які залишилися живими поза хазяїном у випадку відсутності годування.



№ дня	1	2	3	4	5	6	7	8
Кількість бранхіобделлід	45	12	9	7	6	4	3	0

Таблиця 4.6. Кількість особин *Branchiobdella kozarovi*, які залишилися живими поза хазяїном у випадку годування культурою водоростей та інфузорій кожного дня протягом 60 днів.



№ дня	10	15	20	25	30	35	40	45	50	55	60
Кількість бранхіобделід	45	45	45	40	40	38	37	35	35	15	2

Отримані нами результати свідчать про те, що бранхіобделіди можуть існувати поза хазяїном протягом тривалого часу за наявності поживних ресурсів. Ця особливість життєвого циклу може бути пов'язана з поведінкою та біологією рака. Бранхіобделіди можуть потребувати періодичного існування поза хазяїном, наприклад, під час регулярної линьки рака або у разі пошуку нового хазяїна після його хвороби загибелі. Ці дані підтверджують, що бранхіобделіди мають певний ступінь адаптації до умов, що виникають при тимчасовій відсутності хазяїна, що може мати важливе значення для їхнього виживання в природних умовах.

4.4. Обговорення розділу. Специфічність до хазяїв, вплив бранхіобделід на стан популяцій річкових раків.

Специфічність до хазяїв

Деякі види *Branchiobdella*, вивчені в дисертаційному дослідженні, виявилися гнучкими у виборі хазяїв та мають широке географічне поширення. Симбіотичний вид *B. hexadonta*, який мешкає у зябровій камері, був виявлений на всіх досліджуваних видах раків і зустрічався у різних комбінаціях з усіма ідентифікованими видами бранхіобделід. Мікрохижак *B. parasita* спостерігався на *As. astacus* та *Au. torrentium*, співіснуючи з ектокоменсальним європейським видом *B. pentadonta*. Співмешкання цих видів на одному хазяїні широко описане в літературі (Śmietana & Wierzbicka, 1999).

Два найбільші види бранхіобделід, *B. astaci*, який мешкає на зябрах, та мікрохижак *B. parasita*, також були виявлені разом на одному хазяїні, що свідчить про розділення екологічних ніш та відсутність конкуренції за їжу між ними. Ми ідентифікували *B. astaci* на *Au. torrentium* та *Au. pallipes* (Табл. 4.2); однак його не було виявлено на *As. astacus*, попри згадки про його присутність у попередній літературі (Klobučar, 2006).

У більшості випадків *B. balcanica* була знайдена у асоціації з *As. astacus*, лише в одному випадку її виявлено на *Au. torrentium*. Важливо відзначити, що *Au. pallipes* не згадується як хазяїн для *B. balcanica* в існуючій літературі, також цей вид не був ідентифікований як хазяїн для *B. balcanica* під час дослідження музейних колекцій у рамках цієї роботи (Табл. 4.2). Наші результати узгоджуються з нещодавнім повідомленням Shrestkha (2024) про те, що *B. balcanica* переважно пов'язана з *As. astacus*. На противагу цьому, *B. italica* переважно прикріплювалася до *Au. pallipes*, особливо на зразках з Чорногорії, Хорватії та Словенії. Варто зазначити, що *B. italica* була виявлена на *Au. torrentium* лише у двох зразках зі Словенії (Табл. 2.1, 3.1).

Інтродукція до Європи культивованих американських видів раків *Pacifastacus leniusculus* (Dana, 1852) та *Procambarus clarkii* (Girard, 1952) (Souty-Grosset et al., 2006) призвела до поширення північноамериканського виду бранхіобделід *Xironogiton victoriensis*. Цей вид був зареєстрований на сьогодні у Швеції, Іспанії, Італії та Франції (Franzen, 1962; Gelder, 1999; Oscoz et al., 2010; Vedia et al., 2015; Quaglio, 2002; Laurent, 2007). Ми надаємо перший запис про виявлення цього виду у Словенії (Марібор) на *Pa. leniusculus*.

Вплив на стан популяцій.

Чисельність бронхіобделід є ключовим фактором для розуміння екологічних взаємин між цими організмами та їх хазяями. Взаємодія між бронхіобделідами та раками може варіюватися від мутуалістичної до ектопаразитичної, а щільність бронхіобделід може суттєво впливати на здоров'я та пристосованість їх хазяїв-раків. Дослідження показують, що раки, які мають більшу кількість бронхіобделід, часто демонструють покращені темпи росту та знижену смертність порівняно з тими, у яких цих симбіонтів менше або взагалі немає. Наприклад, спостереження виявили, що раки з численними бронхіобделідами на їх зябрах мали кращий загальний стан здоров'я, що свідчить про мутуалістичні відносини, де бронхіобделіди сприяють очищенню поверхні зябер, живлячись органічними речовинами (Niwa et al., 2014). Цей ефект очищення покращує газообмін і знижує ймовірність виникнення захворювань, тим самим сприяючи пристосованості хазяїна-рака.

Динаміка популяцій бронхіобделід також може залежати від факторів навколишнього середовища та поведінки хазяїна. Було зазначено, що регулярна линька у раків може призводити до коливань чисельності бронхіобделід, оскільки змінення екзоскелета може видаляти цих симбіонтів (Landler et al., 2019). Це потребує горизонтальної передачі бронхіобделід від інших заражених раків для підтримки їх популяцій на хазяях. Крім того, внутрішньо симбіотична конкуренція при високій щільності може негативно впливати на пристосованість бронхіобделід, потенційно змінюючи їх харчову поведінку до більш агресивної, що може завдати шкоди хазяїну (Landler et al., 2019).

Взаємовідносини між бронхіобделідами та раками також ілюструються дослідженнями, які документують їх чисельність у різних регіонах. Наприклад, дослідження Vlach (2017) повідомили про середню кількість 6,9 бронхіобделід на *Austropotamobius torrentium* у північній Італії, тоді як у деяких популяціях у Греції цей показник сягав 145,5 особин на одного рака. Такі варіації в чисельності можуть надати інформацію про стан здоров'я популяцій раків та якість їх середовища

існування. Висока щільність бранхіобделід часто корелює з менш порушеними та чистішими водними середовищами, що свідчить про здорову екосистему.

Крім того, присутність бранхіобделід може служити біоіндикатором екологічного стану популяцій раків. Було помічено, що чисельність і різноманітність бранхіобделід можуть відображати стан здоров'я популяцій раків та їх середовищ існування, оскільки ці організми чутливі до змін якості води та структури середовища (Scalici et al., 2010). Зниження популяцій бранхіобделід може сигналізувати про наявність екологічних стресорів, які впливають на здоров'я раків, таких як забруднення або деградація середовища існування.

Чисельність бранхіобделід на річкових раках є важливим аспектом для розуміння симбіотичних взаємин. Їх присутність може вказувати на стан здоров'я популяцій раків та якість прісноводних екосистем. Моніторинг щільності бранхіобделід може надати цінну інформацію для заходів зі збереження, спрямованих на захист як раків, так і їх природних середовищ існування.

ВИСНОВКИ

1. Молекулярний філогенетичний аналіз за ядерними генами 28S і ITS та мітохондріальними генами 16S та CO1 показав, що рід *Branchiobdella* із Західної Палеарктики підрозділяється на вісім основних еволюційних ліній (клад), які відповідають видам *B. kozarovi*, *B. balcanica*, *B. pentadonta*, *B. italica*, *B. astaci*, *B. hexadonta*, *B. parasita*, *B. sp.n.*. Вперше отримано послідовності ДНК *B. kozarovi*.
2. Відмінності в зовнішній і внутрішній морфології, а також ступінь дивергенції за чотирма ядерними та мітохондріальними генами свідчать про видовий статус популяції бранхіобделід (*Branchiobdella sp.n.*) зі Словенії.
3. Комбінований морфологічний, філогенетичний та делімітаційний аналізи розділяють кладу виду *B. parasita* щонайменше на три субклади, які мають статус видів або підвидів.
4. Філогенетичний аналіз послідовностей ядерних і мітохондріальних генів з високою бутстреп-підтримкою виявляє філогенію бранхіобделід, яка відповідає філогенії їхніх хазяїв – річкових раків. Наш аналіз підтверджує спорідненість *B. kozarovi* з *B. balcanica*, як і їхніх хазяїв – довгопалого та широкопалого річкових раків.
5. Географічне поширення гаплотипів *B. kozarovi* в Україні відображає історичні шляхи міграції довгопалого рака, які включають два основні напрямки: західний (через Західне узбережжя Чорного моря до р. Дунай та р. Південний Буг) та східний (через Східне узбережжя Чорного моря до р. Дон, р. Сіверський Донець та р. Дніпро).
6. Експериментальні дослідження показали, що *Branchiobdella kozarovi* здатна протягом 60 днів переносити тимчасову відсутність рака, що може мати важливе значення для виживання цього ектосимбіонта в природних умовах. *B. kozarovi* заселяє інтродуковані види раків, обираючи ті самі ділянки тіла, що й у своїх нативних хазяїв.

7. Кокони бранхіобделід та їхнє розташування на тілі річкового рака дозволяють не лише ідентифікувати види бранхіобделід навіть у разі відсутності дорослих особин, але й виявити характер їхніх симбіотичних взаємин із раками – локалізацію, розподіл ніш, інтенсивність інвазії.
8. *Branchiobdella balcanica* є ектосимбіонтом *Astacus astacus*, має низьке генетичне різноманіття, тому його виживання залежить від збереження популяцій широкопалого рака.
9. Підвид *Branchiobdella balcanica sketi* Karaman, 1967 не є валідним. Варіації копулятивної бурси, зокрема ті, за якими виділили цей підвид у межах *Branchiobdella balcanica* Moszynski, 1938, залежать від стадії зрілості особин і не можуть служити для діагностування підвиду. Філогенетичний аналіз за чотирма генами не підтверджує його генетичної відокремленості.
10. *Branchiobdella astaci* був чисельним у старих музейних зразках, але його не знайшли в сучасних зборах, що може свідчити про суттєве скорочення його популяцій.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ЛІТЕРАТУРНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Ackefors, H. (2017). The positive effects of established crayfish introductions in Europe. In *Crayfish in Europe as alien species* (pp. 49-60). Routledge.
2. Alderman, D. R., & Polglase, J. L. (1988). Pathogens, parasites and commensals: *Freshwater crayfish: biology, management and exploitation*. Groom Helm; Portland (Oreg.): Timber press, London; Sydney, 167.
3. Amouret, J., Bertocchi, S., Brusconi, S., Fondi, M., Gherardi, F., Grandjean, F. & Souty-Grosset, C. (2015). The first record of translocated white-clawed crayfish from the *Austropotamobius pallipes* complex in Sardinia (Italy). *Journal of Limnology*, 74(3), 491-500.
4. Bănărescu, P. M. (2004). Distribution pattern of the aquatic fauna of the Balkan Peninsula. In *Balkan biodiversity: pattern and process in the European hotspot* (pp. 203-217). Dordrecht: Springer Netherlands.
5. Bilgin, R. (2011). Back to the suture: the distribution of intraspecific genetic diversity in and around Anatolia. *International Journal of Molecular Sciences*, 12(6), 4080-4103.
6. Bláha, M., Patoka, J., Policar, T., Šliwińska, K., Alekhnovich, A., Berezina, N., ... & Maguire, I. (2023). Phylogeographic patterns of genetic diversity in *Pontastacus leptodactylus* (Decapoda: Astacidae): is the hypothesis of the taxonomically rich genus *Pontastacus* true?. *Zoological journal of the linnean society*, 199(1), 140-155.
7. Boshko, E. (2010). The parasites and commensals of crayfishes of Russian and Ukrainian water bodies. *Izvestiya Penzenskogo Gosudarstvennogo Pedagogicheskogo Universiteta imeni VG Belinskogo*, 17(21), 39-44.
8. Boshko, E. G. (1983). Small worms dwelling on river crayfish of some water bodies in the Ukraine. *Vestnik zool.*, 7, 13-20.

9. Boshko, E. G. (2005). On distribution of the annelid commensal *Branchiobdella kozarovi* (Annelida: Clitellata). *III international conference "Biodiversity and role of zoocoenosis in natural and anthropogenic ecosystems"*, 4-6 October, Dnepropetrovsk, 25-26.
10. Bracken-Grissom, H. D., Ahyong, S. T., Wilkinson, R. D., Feldmann, R. M., Schweitzer, C. E., Breinholt, J. W., ... & Crandall, K. A. (2014). The emergence of lobsters: phylogenetic relationships, morphological evolution and divergence time comparisons of an ancient group (Decapoda: Achelata, Astacidea, Glypheidea, Polychelida). *Systematic Biology*, 63(4), 457-479.
11. *Branchiobdella* Odier, 1823 in GBIF Secretariat (2023). GBIF Backbone Taxonomy. Checklist dataset <https://doi.org/10.15468/39omei> accessed via GBIF.org on 2025-03-26.
12. Brinkhurst, R. O. (1999). Lumbriculids, branchiobdellidans and leeches: an overview of recent progress in phylogenetic research on clitellates. In *Aquatic Oligochaetes: Proceedings of the 7th International Symposium on Aquatic Oligochaetes held in Presque Isle, Maine, USA, 18–22 August 1997* (pp. 281-290). Springer Netherlands.
13. Brown, B. L., & Creed Jr, R. P. (2004). Host preference by an aquatic ectosymbiotic annelid on 2 sympatric species of host crayfishes. *Journal of the North American Benthological Society*, 23(1), 90-100.
14. Brown, B. L., Creed, R. P., & Dobson, W. E. (2002). Branchiobdellid annelids and their crayfish hosts: are they engaged in a cleaning symbiosis?. *Oecologia*, 132, 250-255.
15. Brown, B. L., Creed, R. P., Skelton, J., Rollins, M. A., & Farrell, K. J. (2012). The fine line between mutualism and parasitism: complex effects in a cleaning symbiosis demonstrated by multiple field experiments. *Oecologia*, 170, 199-207.
16. Canegallo, M. A. (1928). Una nuova specie di *Branchiobdella*—*Branchiobdella italica*. *Atti della Società italiana di scienze naturali, e del Museo civile di storia naturale*, 67, 214-224.
17. Cardini, A., & Ferraguti, M. (2004). The phylogeny of Branchiobdellida (Annelida, Clitellata) assessed by sperm characters. *Zoologischer Anzeiger-A Journal of Comparative Zoology*, 243(1-2), 37-46.

18. Cardini, A., Ferraguti, M., & Gelder, S. R. (2000). A phylogenetic assessment of the branchiobdellidan family Branchiobdellidae (Annelida, Clitellata) using spermatological and somatic characters. *Zoologica Scripta*, 29(4), 347-366.
19. Chekanovskaya, O. V. (1962). Aquatic Oligochaeta of the USSR. *Key to the Fauna of the USSR*. 411 pp.
20. Chucholl, C., & Daudey, T. (2008). First record of *Orconectes juvenilis* (Hagen, 1870) in eastern France: update to the species identity of a recently introduced orconectid crayfish (Crustacea: Astacida). *Aquatic Invasions*, 3(1), 105-107.
21. Clement, M., Snell, Q., Walker, P., Posada, D., & Crandall, K. (2004). TCS: estimating gene genealogies. In *Proceedings of the 16th International Parallel and Distributed Processing Symposium* (Vol. 311, No. 4, pp. 1110-1116). Fort Lauderdale, FL, 15–19 April.
22. Crandall, K. A., & Buhay, J. E. (2008). Global diversity of crayfish (Astacidae, Cambaridae, and Parastacidae—Decapoda) in freshwater. *Freshwater animal diversity assessment*, 295-301.
23. Creed, R. P., Thomas, M. J., Meeks, A. L., & Brown, B. L. (2024). Ectosymbionts improve host gill function in a freshwater cleaning symbiosis. *Symbiosis*, 94(2), 207-218.
24. DeWitt, P. D., Williams, B. W., Lu, Z. Q., Fard, A. N., & Gelder, S. R. (2013). Effects of environmental and host physical characteristics on an aquatic symbiont. *Limnologica*, 43(3), 151-156.
25. Dos Reis, M., Thawornwattana, Y., Angelis, K., Telford, M. J., Donoghue, P. C., & Yang, Z. (2015). Uncertainty in the timing of origin of animals and the limits of precision in molecular timescales. *Current biology*, 25(22), 2939-2950.
26. Duris, Z., Horká, I., Kristian, J., & Kozák, P. (2006). Some cases of macro-epibiosis on the invasive crayfish *Orconectes limosus* in the Czech Republic. *Bulletin Français de la Pêche et de la Pisciculture*, (380-381), 1325-1337.
27. Edgerton, B. F., Evans, L. H., Stephens, F. J., & Overstreet, R. M. (2002). Synopsis of freshwater crayfish diseases and commensal organisms. *Aquaculture*, 206(1-2), 57-135.
28. Erséus, C., & Källersjö, M. (2004). 18S rDNA phylogeny of Clitellata (Annelida). *Zoologica Scripta*, 33(2), 187-196.

29. Fard, A. N., & Gelder, S. R. (2011). First report of *Branchiobdella kozarovi* Subchev, 1978 (Annelida: Clitellata) in Iran, and its distribution in the eastern Euro-Mediterranean subregion. *Acta zoologica bulgarica*, 63(1), 105-108.
30. Ferraguti, M., & Erseus, C. (1999). Sperm types and their use for a phylogenetic analysis of aquatic clitellates. In *Reproductive strategies and developmental patterns in annelids* (pp. 225-237). Dordrecht: Springer Netherlands.
31. Fišer, C., Zagamajster, M., & Zakšek, V. (2013). Coevolution of life history traits and morphology in female subterranean amphipods. *Oikos*, 122(5), 770-778.
32. Folmer, O., Black, M., Hoeh, W., Lutz, R., & Vrijenhoek, R. (1994). DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 3(5), 294-299.
33. Franzén, Å. (1962). Notes on the morphology and histology of *Xironogiton instabila* (Moore, 1893)(Fam. Branchiobdellidae) with special reference to the muscle cells. *Zoologiska Bidrag från Uppsala*, 35, 369-383.
34. Fuerst, M. (1984). Introduction of *Pacifastacus leniusculus* (Dana) into Sweden. *FASO EIFAC Technical Paper*, 42, 400-404.
35. Füreder, L., & Machino, Y. (2002). A revised determination key of freshwater crayfish in Europe. *Berichte des naturwissenschaftlich-medizinischen Vereins in Innsbruck*, 89, 169-178.
36. Füreder, L., Summerer, M., & Brandstätter, A. (2009). Phylogeny and species composition of five European species of *Branchiobdella* (Annelida: Clitellata: Branchiobdellida) reflect the biogeographic history of three endangered crayfish species. *Journal of Zoology*, 279(2), 164-172.
37. Gelder, S. R. (1996). A review of the taxonomic nomenclature and a checklist of the species of the Branchiobdellae (Annelida: Clitellata). *Proceedings of the Biological Society of Washington*, 109, 653-663.
38. Gelder, S. R. (1996). A review of the taxonomic nomenclature and a checklist of the species of the Branchiobdellae (Annelida: Clitellata). *Proceedings of the Biological Society of Washington*, 109, 653-663.

39. Gelder, S. R. (1999). Zoogeography of branchiobdellidans (Annelida) and temnocephalidans (Platyhelminthes) ectosymbiotic on freshwater crustaceans, and their reactions to one another in vitro. *Hydrobiologia*, 406, 21-31.
40. Gelder, S. R. (1999). Zoogeography of branchiobdellidans (Annelida) and temnocephalidans (Platyhelminthes) ectosymbiotic on freshwater crustaceans, and their reactions to one another in vitro. *Hydrobiologia*, 406, 21-31.
41. Gelder, S. R. (2004). Endemic ectosymbiotic branchiobdellidans (Annelida: Clitellata) reported on three " export" species of North American crayfish (Crustacea: Astacoidea). *Freshwater Crayfish*, 14, 221-227.
42. Gelder, S. R. (2005). First report of Branchiobdellidans from Lake Tahoe. *Crayfish New: IAA Newsletter*, 27, 156-157.
43. Gelder, S. R. (2011). Reassignment of a Central American species of the Branchiobdellida (Annelida: Clitellata) to Forbesodrilus ng. *Acta zoologica bulgarica*, 63, 119-123.
44. Gelder, S. R., & Brinkhurst, R. O. (1990). An assessment of the phylogeny of the Branchiobdellida (Annelida: Clitellata), using PAUP. *Canadian Journal of Zoology*, 68(6), 1318-1326.
45. Gelder, S. R., & Hall, L. A. (1990). Description of Xironogiton victoriensis n. sp. from British Columbia, Canada, with remarks on other species and a Wagner analysis of Xironogiton (Clitellata: Branchiobdellida). *Canadian Journal of Zoology*, 68(11), 2352-2359.
46. Gelder, S. R., & Hall, L. A. (1990). Description of Xironogiton victoriensis n. sp. from British Columbia, Canada, with remarks on other species and a Wagner analysis of Xironogiton (Clitellata: Branchiobdellida). *Canadian Journal of Zoology*, 68(11), 2352-2359.
47. Gelder, S. R., & Messick, G. (2006). First Report of the Aberrant Association of Branchiobdellidans (Annelida: Clitellata) on Blue Crabs (Crustacea: Decapoda) in Chesapeake Bay, Maryland, USA. *Invertebrate Biology*, 51-55.

48. Gelder, S. R., & Siddall, M. E. (2001). Phylogenetic assessment of the Branchiobdellidae (Annelida, Clitellata) using 18S rDNA, mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I and morphological characters. *Zoologica Scripta*, 30(3), 215-222.
49. Gelder, S. R., & Williams, B. W. (2016). Global Overview of Branchiobdellida (Annelida: Clitellata). *Freshwater Crayfish: A Global Overview*. CRC Press, New York, 628-654.
50. Gelder, S. R., Carter, H. C., & Lausier, D. N. (2001). Distribution of crayfish worms or branchiobdellidans (Annelida: Clitellata) in New England. *Northeastern Naturalist*, 8(1), 79-92.
51. Gelder, S. R., Carter, H. C., & Lausier, D. N. (2001). Distribution of crayfish worms or branchiobdellidans (Annelida: Clitellata) in New England. *Northeastern Naturalist*, 8(1), 79-92.
52. Gelder, S. R., Delmastro, G. B., & Ferraguti, M. (1994). A report on branchiobdellidans (Annelida: Clitellata) and a taxonomic key to the species in northern Italy, including the first record of *Cambarincola mesochoreus* on the introduced American red swamp crayfish. *Boll. Zool*, 61, 179-183.
53. Gelder, S. R., Delmastro, G. B., & Rayburn, J. N. (1999). Distribution of native and exotic branchiobdellidans (Annelida: Clitellata) on their respective crayfish hosts in northern Italy, with the first record of native *Branchiobdella* species on an exotic North American crayfish. *Journal of Limnology*, 58, 20-24.
54. Gelder, S. R., Gagnon, N. L., & Nelson, K. (2002). Taxonomic considerations and distribution of the Branchiobdellida (Annelida: Clitellata) on the North American continent. *Northeastern Naturalist*, 9(4), 451-468.
55. Geneious Prime, Version 2024.1.2, Biomatters Ltd., Auckland, New Zealand. Available from: <https://www.geneious.com>
56. Georgévitch, J. (1957). Les branchiobdellides de Yougoslavie. *Bulletin de l'Académie des Sciences, XVIII, Classe des Sciences Mathématiques et Naturelles*, 5, 5-26.
57. Gherardi, F., Cenni, F., Crudele, G., & Mori, M. (2002). Infestation rate of branchiobdellids in *Austropotamobius pallipes italicus* from a stream of Central Italy: preliminary results. *Bulletin Francais de la Peche et de la Pisciculture*, (367), 785-792.

58. Grabda, E., & Wierzbicka, J. (1969). The problem of parasitism of the species of the genus *Branchiobdella* Odier, 1823. *Polskie archiwum hydrobiologii*, 16(29), 93-104.
59. Hall, B. G. (2013). Building phylogenetic trees from molecular data with MEGA. *Molecular biology and evolution*, 30(5), 1229-1235.
60. Hobbs Iii, H. H., Jass, J. P., & Huner, J. V. (1989). A review of global crayfish introductions with particular emphasis on two North American species (Decapoda, Cambaridae). *Crustaceana*, 299-316.
61. Holdich, D. M., Reynolds, J. D., Souty-Grosset, C., & Sibley, P. J. (2009). A review of the ever increasing threat to European crayfish from non-indigenous crayfish species. *Knowledge and management of aquatic ecosystems*, (394-395), 11.
62. Holdich, D. M., Reynolds, J. D., Souty-Grosset, C., & Sibley, P. J. (2009). A review of the ever increasing threat to European crayfish from non-indigenous crayfish species. *Knowledge and management of aquatic ecosystems*, (394-395), 11.
63. Hudson, R. R., Slatkin, M., & Maddison, W. P. (1992). Estimation of levels of gene flow from DNA sequence data. *Genetics*, 132(2), 583-589.
64. Ivković, M., & Plant, A. (2015). Aquatic insects in the Dinarides: identifying hotspots of endemism and species richness shaped by geological and hydrological history using Empididae (Diptera). *Insect Conservation and Diversity*, 8(4), 302-312.
65. Kalyaanamoorthy, S., Minh, B. Q., Wong, T. K., Von Haeseler, A., & Jermin, L. S. (2017). ModelFinder: fast model selection for accurate phylogenetic estimates. *Nature methods*, 14(6), 587-589.
66. Karaman, S. M. (1967). Branchiobdellidae Jugoslavije. *Buletin i Punimeve Shkencore të Fakulteti Filozofi k të Prishtinës, IV*, 39-64.
67. Kimura, M. (1980). A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of molecular evolution*, 16, 111-120.
68. Kliment, J., Turis, P., Janišová, M. (2016). Taxa of vascular plants endemic to the Carpathian Mts. *Preslia* 88:19–76.
69. Klobučar, G. I. V., Maguire, I., Gottstein, S., & Gelder, S. R. (2006, December). Occurrence of Branchiobdellida (Annelida: Clitellata) on freshwatercrayfish in Croatia. In

Annales de Limnologie-International Journal of Limnology (Vol. 42, No. 4, pp. 251-260).
EDP Sciences.

70. Klobučar, G. I., Podnar, M., Jelić, M., Franjević, D., Faller, M., Štambuk, A., ... & Maguire, I. (2013). Role of the Dinaric Karst (western Balkans) in shaping the phylogeographic structure of the threatened crayfish *Austropotamobius torrentium*. *Freshwater Biology*, 58(6), 1089-1105.

71. Kolesnikova, M. Y. (2007). New information on branchiobdellidans (Clitellata: Branchiobdellida) distribution in pools of Kharkiv region. *Visnik Harkivskogo nacional'nogo universitetu imeni VN Karazina. Serija: biologija*, 6(788), 97-103.

72. Kolesnikova, M., Soes, D. M., & Utevsky, S. (2012). First record of *Branchiobdella kozarovi* (Clitellata: Branchiobdellida) for the Netherlands, with an overview of the Dutch Branchiobdellida. *Lauterbornia*, 74, 101-103.

73. Kolesnikova, M.Yu. (2006). New records of Branchiobdellidans (Clitellata: Branchiobdellida). *Biology: from the Molecule to Biosphere, abstract book of the 1-st Int. Young Scientists Conference, V.N. Karazin Kharkiv National University, Kharkiv*, 58.

74. Kolesnykova, M., & Utevsky, S. (2013). New Ukrainian records of *Branchiobdella parasita* (Annelida: Clitellata: Branchiobdellida) from the Danube basin. *Scientific Annals of the Danube Delta Institute*, 19, 35-38.

75. Kovács, T., & Juhász, P. (2007). Data to the distribution of crayfish worms (Branchiobdellidae) in Hungary. *Folia Historico-Naturalia Musei Matraensis*, 31, 77-79.

76. Kozarov, G., Michailova, P., Subchev, M. (1972). Studies on Branchiobdellidae (Oligochaeta, Annelida) in Bulgaria. *Annuaire de l'Université de Sofia, Faculté de biologie*, 64 (1), 77-89. (In Bulgarian).

77. Krijgsman, W., Hilgen, F. J., Raffi, I., Sierro, F. J., & Wilson, D. S. (1999). Chronology, causes and progression of the Messinian salinity crisis. *Nature*, 400(6745), 652-655.

78. Kupchinskaya, O. S. (1970). Aquatic Oligochaetes and Their Parasites in the Fauna of the Western Regions of Ukraine. *Dissertation abstract for the degree of Candidate of Biological Sciences, Lviv*, Pp 21 (in Russian).

79. Landler, L., Skelton, J., Painter, M. S., Youmans, P. W., Muheim, R., Creed, R. P., ...

- & Phillips, J. B. (2019). Ectosymbionts alter spontaneous responses to the Earth's magnetic field in a crustacean. *Scientific Reports*, 9(1), 3105.
80. Laurent J. (2007). A French population of *Pacifastacus leniusculus* bears the North American parasite branchiobdellidan ectosymbionts *Xironogiton victoriensis*. *Crayfish News*. 29(4), 5-6.
81. Lee, J. H., Kim, T. W., & Choe, J. C. (2009). Commensalism or mutualism: conditional outcomes in a branchiobdellid–crayfish symbiosis. *Oecologia*, 159, 217-224.
82. Leigh, J.W., Bryant, D. (2015). POPART: full-feature software for haplotype network construction. *Methods Ecol. Evol.* 6, 1110–1116.
83. Let, M., Ložek, F., Kouba, A., Buřič, M., Bláha, M. (2023). Signal crayfish as a threat for European ectosymbionts: overlooked biodiversity losses. *Aquat. Sci.* 85, 1–13.
84. Lewontin, R. C. (2014). The apportionment of human diversity. In *The concept of race in natural and social science* (pp. 7-24). Routledge.
85. Lovrenčić, L., Bonassin, L., Boštjančić, L. L., Podnar, M., Jelić, M., Klobučar, G., ... & Maguire, I. (2020). New insights into the genetic diversity of the stone crayfish: taxonomic and conservation implications. *BMC Evolutionary Biology*, 20, 1-20.
86. Lovrenčić, L., Temunović, M., Gross, R., Grgurev, M., & Maguire, I. (2022). Integrating population genetics and species distribution modelling to guide conservation of the noble crayfish, *Astacus astacus*, in Croatia. *Scientific reports*, 12(1), 2040.
87. Mamos, T., Jażdżewski, K., Čiamporová-Zaťovičová, Z., Čiampor Jr, F., & Grabowski, M. (2021). Fuzzy species borders of glacial survivalists in the Carpathian biodiversity hotspot revealed using a multimarker approach. *Scientific reports*, 11(1), 21629.
88. Marotta, R., Ferraguti, M., Erseus, C., & Gustavsson, L. M. (2008). Combined-data phylogenetics and character evolution of Clitellata (Annelida) using 18S rDNA and morphology. *Zoological Journal of the Linnean Society*, 154(1), 1-26.
89. Mažylis, A., & Grigelis, A. (1979). On the disease of the broad-clawed crayfish in some Lithuanian lakes. *The biology of the crayfish of the Lithuanian inner waters. (Vilnius: Mosklas, pp. 121-127 (in Russian)).*

90. Meijers, M. J., Brocard, G. Y., Whitney, D. L., & Mulch, A. (2020). Paleoenvironmental conditions and drainage evolution of the central Anatolian lake system (Turkey) during late Miocene to Pliocene surface uplift. *Geosphere*, *16*(2), 490-509.
91. Minh, B. Q., Nguyen, M. A. T., & Von Haeseler, A. (2013). Ultrafast approximation for phylogenetic bootstrap. *Molecular biology and evolution*, *30*(5), 1188-1195.
92. Moszyński, A. (1938). Oligochetes parasites de l'ecrevisse (*Potamobius astacus* L.) de la Yougoslavie. *Bulletin de la Société Scientifique de Skoplje*, *18*, 69-75.
93. Moszynski, A., & Moszynska, M. (1957). Sk oszczety (Oligochaeta) Polski i niektórych krajów sąsiedzkich [Oligochaeta of Poland and several neighbour countries]. *Pr. Korn. Biol. Pozn. TPN*, *18*(6), 181-183.
94. Mráz, P., & Ronikier, M. (2016). Biogeography of the Carpathians: evolutionary and spatial facets of biodiversity. *Biological journal of the Linnean Society*, *119*(3), 528-559.
95. Nei, M., & Gojobori, T. (1986). Simple methods for estimating the numbers of synonymous and nonsynonymous nucleotide substitutions. *Molecular biology and evolution*, *3*(5), 418-426.
96. Neseemann, H., & Neubert, E. (1999). *Bd. 6/2: Annelida, Clitellata: Branchiobdellida, Acanthobdellea, Hirudinea*. Spektrum Heidelberg 187pp.
97. Niwa, N., Archdale, M. V., Matsuoka, T., Kawamoto, A., & Nishiyama, H. (2014). Microhabitat distribution and behaviour of Branchiobdellidan *Holtodrilus truncatus* found on the freshwater shrimp *Neocaridina* spp. from the Sugo River, Japan. *Central European Journal of Biology*, *9*, 80-85.
98. Nobile, L., Giannetto, S., Trentini, M., & Canestri Trotti, G. (1994). Diffusione di *Branchiobdella* spp.(Oligochaeta: Branchiobdellidae) in Emilia-Romagna e studio al SEM di *Branchiobdella pentodonta italica*. *Parassitologia*, *36*, 96-96.
99. Oberkofler, B., Quaglio, F., Füreder, L., Fioravanti, M. L., Giannetto, S., Morolli, C., & Minelli, G. (2002). Species of Branchiobdellidae (Annelida) on freshwater crayfish in south Tyrol (northern Italy). *Bulletin Francais de la Peche et de la Pisciculture*, (367), 777-784.

100. Oscoz, J., Tomds, P., & Duron, C. (2010). Review and new records of non-indigenous freshwater invertebrates in the Ebro River basin(Northeast Spain). *Aquatic Invasions*, 5(3), 263-284.
101. Panicz, R., Napora-Rutkowski, Ł., Keszka, S., Skuza, L., Szenejko, M., & Śmietana, P. (2019). Genetic diversity in natural populations of noble crayfish (*Astacus astacus* L.) in north-western Poland on the basis of combined SSR and AFLP data. *PeerJ*, 7, e7301.
102. Pârvulescu, L. (2019). Introducing a new Austropotamobius crayfish species (Crustacea, Decapoda, Astacidae): A miocene endemism of the Apuseni Mountains, Romania. *Zoologischer Anzeiger*, 279, 94-102.
103. Pârvulescu, L., Pacioglu, O., & Hamchevici, C. (2011). The assessment of the habitat and water quality requirements of the stone crayfish (*Austropotamobius torrentium*) and noble crayfish (*Astacus astacus*) species in the rivers from the Anina Mountains (SW Romania). *Knowledge and Management of Aquatic Ecosystems*, (401), 03.
104. Pedraza-Lara, C., Alda, F., Carranza, S., & Doadrio, I. (2010). Mitochondrial DNA structure of the Iberian populations of the white-clawed crayfish, *Austropotamobius italicus italicus* (Faxon, 1914). *Molecular phylogenetics and evolution*, 57(1), 327-342.
105. Phillips, A. J., Dornburg, A., Zapfe, K. L., Anderson, F. E., James, S. W., Erséus, C. & Williams, B. W. (2019). Phylogenomic analysis of a putative missing link sparks reinterpretation of leech evolution. *Genome Biology and Evolution*, 11(11), 3082-3093.
106. Pop, V. (1965). Systematische Revision der europäischen Branchiobdelliden (Oligochaeta). *Zool. Jahrb. Abt. Syst. Oekol. Geogr. Tiere*, 92, 219-238.
107. Puillandre, N., Brouillet, S., & Achaz, G. (2021). ASAP: assemble species by automatic partitioning. *Molecular Ecology Resources*, 21(2), 609-620.
108. Puillandre, N., Lambert, A., Brouillet, S., & Achaz, G. J. M. E. (2012). ABGD, Automatic Barcode Gap Discovery for primary species delimitation. *Molecular ecology*, 21(8), 1864-1877.
109. Purschke, G., Westheide, W., Rohde, D., & Brinkhurst, R. O. (1993). Morphological reinvestigation and phylogenetic relationship of *Acanthobdella peledina* (Annelida, Clitellata). *Zoomorphology*, 113(2), 91-101.

110. Quaglio, F., Fioravanti, M. L., Gelder, S. R., Giannetto, S., Trentini, M., Nobile, L., ... & Morolli, C. (2002). Infestation of the branchiobdellidan, *Xironogiton victoriensis* (Anellida: Clitellata), on the signal crayfish (*Pacifastacus leniusculus*) from Auenbachl Creek, Alto Adige/Südtirol, Italy. In *Freshwater Crayfish 13. Proceedings of the thirteenth symposium of the International Association of Astacology. Perth, Western Australia, 6-12 August 2000.* (pp. 274-279). Curtin Print and Design,.
111. Quaglio, F., Morolli, C., Galuppi, R., Bonoli, C., Marcer, F., Nobile, L., ... & Tampieri, M. P. (2006). Preliminary investigations of disease-causing organisms in the white-clawed crayfish *Austropotamobius pallipes* complex from streams of northern Italy. *Bulletin Francais de la Peche et de la Pisciculture*, (380-381), 1271-1290.
112. Rimcheska, B., Georgieva, G., Slaveska-Stamenkovic, V., Smijkov, S., Uzunov, Y., & Mitic-Kopanja, D. (2014). New data about occurrence of epibiotic Branchiobdellid (Annelida: Branchiobdellea) species on the stone crayfish *Austropotamobius torrentium* (Schrank, 1803) in the Republic of Macedonia. *Acta Zoologica Bulgarica*, 66, 261-263.
113. Rosewarne, P. J., Mortimer, R. J. G., & Dunn, A. M. (2012). Branchiobdellidan infestation on endangered white-clawed crayfish (*Austropotamobius pallipes*) in the UK. *Parasitology*, 139(6), 774-780.
114. Saffo, M. B. (1992). Invertebrates in endosymbiotic associations. *American Zoologist*, 32(4), 557-565.
115. Santucci, F., Iaconelli, M., Andreani, P., Cianchi, R., Nascetti, G., & Bullini, L. (1997). Allozyme diversity of european freshwater crayfish of the genus *Austropotamobius*. *Bulletin Français de la Pêche et de la Pisciculture*, (347), 663-676.
116. Šarić, I., Klobučar, G., Podnar, M., Štambuk, A., & Maguire, I. (2018). Molecular phylogeny of branchiobdellidans (Annelida: Clitellata) and their host–epibiont association with *Austropotamobius* freshwater crayfish. *Invertebrate systematics*, 32(1), 55-68.
117. Šarić, I., Klobučar, G., Podnar, M., Štambuk, A., & Maguire, I. (2018). Molecular phylogeny of branchiobdellidans (Annelida: Clitellata) and their host-epibiont association with *Austropotamobius* freshwater crayfish. *Invertebrate Systematics*, 32, 55–68.

118. Savić, I. R. (2008). Diversification of the Balkan fauna: its origin, historical development and present status. Inst. Zool., Belgrade; BAS, Sofia; Fac. Life Sci., Vienna; SASA, Belgrade & UNESCO MAB Committee, Serbia. Vienna-Belgrade-Sofia.
119. Sawyer, R. T. (1986). Leech biology and behaviour. *Feeding, Biology, Ecology and Systematics*, 1, 3.
120. Scalici, M., Di Giulio, A., & Gibertini, G. (2010). Biological and morphological aspects of *Branchiobdella italica* (Annelida: Clitellata) in a native crayfish population of central Italy. *Italian Journal of Zoology*, 77(4), 410-418.
121. Schmitt, C. B., Burgess, N. D., Coad, L., Belokurov, A., Besançon, C., Boisrobert, L., ... & Winkel, G. (2009). Global analysis of the protection status of the world's forests. *Biological Conservation*, 142(10), 2122-2130.
122. Schmitt, T. (2007). Molecular biogeography of Europe: Pleistocene cycles and postglacial trends. *Frontiers in zoology*, 4, 1-13.
123. Schrimpf, A., Theissinger, K., Dahlem, J., Maguire, I., Pârvulescu, L., Schulz, H. K., & Schulz, R. (2014). Phylogeography of noble crayfish (*Astacus astacus*) reveals multiple refugia. *Freshwater biology*, 59(4), 761-776.
124. Schulz, H. K., & Grandjean, F. (2005). Roundtable session 3: phylogeny of European crayfish—improving the taxonomy of European crayfish for a better conservation. *Bulletin Français de la Pêche et de la Pisciculture*, (376-377), 829-836.
125. Schulz, H. K., Śmietana, P., & Schulz, R. (2006). Estimating the human impact on populations of the endangered noble crayfish (*Astacus astacus* L.) in north-western Poland. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems*, 16(3), 223-233.
126. Shrestkha, M., & Utevsky, S. (2024). The distribution of branchiobdellidan worms (Annelida: Clitellata) on the noble crayfish, *Astacus astacus*, in the Transcarpathian region, Ukraine. *The Journal of VN Karazin Kharkiv National University. Series «Biology»*, 43, 85-95.
127. Siddall, M. E., Trontelj, P., Utevsky, S. Y., Nkamany, M., & Macdonald III, K. S. (2007). Diverse molecular data demonstrate that commercially available medicinal leeches are not *Hirudo medicinalis*. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 274(1617), 1481-1487.

128. Simon, C., Franke, A., & Martin, A. (1991). The polymerase chain reaction: DNA extraction and amplification. In *Molecular techniques in taxonomy* (pp. 329-355). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
129. Skelton, J., Creed, R. P., & Brown, B. L. (2014). Ontogenetic shift in host tolerance controls initiation of a cleaning symbiosis. *Oikos*, *123*(6), 677-686.
130. Skelton, J., Creed, R. P., & Brown, B. L. (2015). A symbiont's dispersal strategy: condition-dependent dispersal underlies predictable variation in direct transmission among hosts. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, *282*(1819), 20152081.
131. Skuza, L., Keszka, S., Panicz, R., & Śmietana, P. (2016). Molecular characterization of the noble crayfish (*Astacus astacus* L.) population from Pomeranian lakes (north-western Poland) based on mitochondrial DNA. *Knowledge and Management of Aquatic Ecosystems*, (417), 13.
132. Smietana, P. (2001). On the distribution of narrow-clawed crayfish [*Astacus leptodactylus* Esch.] in Western Poland. *Animal Science. Scientific Papers of Agricultural University of Poznan*, *3*.
133. Smietana, P. (2013). Distributional conditionings and interspecific competition of the noble crayfish (*Astacus astacus* L.) and the spiny-cheek crayfish (*Orconectes limosus* Raf.) in the waters of Pomerania. *Wydawnictwo Naukowe Uniwersytetu Szczecińskiego. Rozprawy i Studia–Uniwersytet Szczeciński*, *860*, 214.
134. Śmietana, P., & Wierzbicka, J. (1999). Species of Branchiobdella Odier, 1823 (Annelida: Clitellata) associated with the crayfish *Astacus astacus* and *Astacus leptodactylus* in Poland. *Freshwater crayfish*, *12*, 349-355.
135. Śmietana, P., Krzywosz, T., & Strużyński, W. (2004). Review of the national restocking programme “Active protection of native crayfish in Poland” 1999-2001. *Bulletin Francais de la Peche et de la Pisciculture*, (372-373), 289-299.
136. Śmietana, P., Schulz, H. K., Keszka, S., & Schulz, R. (2006). A proposal for accepting *Pontastacus* as a genus of European crayfish within the family Astacidae based on a revision of the West and East European taxonomic literature. *Bulletin Français de la Pêche et de la Pisciculture*, (380-381), 1041-1052.

137. Souty-Grosset, C., Haffner, P., Reynolds, J. D., Noel, P. Y., & Holdich, D. M. (2006). *Atlas of crayfish in Europe* (p. 188). Paris: Muséum national d'Histoire naturelle.
138. Strayer, D. L., & Dudgeon, D. (2010). Freshwater biodiversity conservation: recent progress and future challenges. *Journal of the North American Benthological Society*, 29(1), 344-358.
139. Subchev, M. (2007). Branchiobdellids (Annelida: Clitellata) found in the crayfish and annelid collections of the Natural History Museum of Humboldt University, Berlin, Germany. *Acta Zoologica Bulgarica*, 59(3), 275–282.
140. Subchev, M. (2008). Branchiobdellida (Annelida: Clitellata) found in the crayfish and annelid collections of Paris National Museum of Natural History and on recently collected crayfishes from France. *Acta Zoologica Bulgarica*, 60(3), 233–237.
141. Subchev, M. (2009). *Branchiobdellida* (Annelida: Clitellata) found in the crayfish collection of the Swedish Museum of Natural History with remarks on the Swedish branchiobdellid fauna. *Acta Zoologica Bulgarica*, 61(3), 284–292.
142. Subchev, M. (2014). The genus *Branchiobdella* Odier, 1823 (Annelida, Clitellata, Branchiobdellida): a review of its european species. *Acta Zoologica Bulgarica*, 66(1), 5-20.
143. Subchev, M. (2014). The genus *Branchiobdella* Odier, 1823 (Annelida, Clitellata, Branchiobdellida): A review of its European species. *Acta Zoologica Bulgarica*, 66(1), 5–20.
144. Subchev, M. A. (1984). On Hungarian branchiobdellids (Oligochaeta: Branchiobdellidae). *Miscellanea Zoologica Hungarica*, 2, 47–50.
145. Subchev, M. A. (2011). First record of *Branchiobdella* Odier, 1823 (Annelida: Clitellata) in Albania and an overview of the geographic distribution of *Branchiobdella hexodonta* Gruber, 1882 in Europe. *Acta Zoologica Bulgarica*, 63(1), 109–112.
146. Subchev, M. A. (2011). First record of *Branchiobdella* Odier, 1823 (Annelida: Clitellata) in Albania and an overview of the geographic distribution of *Branchiobdella hexodonta* Gruber, 1882 in Europe. *Acta Zoologica Bulgarica*, 63(1), 109–112.
147. Subchev, M. A., & Gelder, S. R. (2010). *Branchiobdellida* (Annelida: Clitellata) found in the crayfish collection of the Natural History Museum in Vienna, Austria, with a

re-description of *Branchiobdella papillosa* Neesemann & Hutter, 2002. *Acta Zoologica Bulgarica*, 62(1), 33–42.

148. Subchev, M. A., Vaitonis, G., Višinskienė, G., Rimcheska, B. J., & Vagalinski, B. L. (2024). The genus *Branchiobdella* Odier, 1823 (Annelida: Branchiobdellida) in Lithuania, with an overview and an identification key to the species in the Baltic countries. *Acta zoologica Bulgarica.*, 76(1), 3-10.

149. Subchev, M., & Rimcheska, B. (2021). Description of *Branchiobdella bulgariensis* sp. n. (Branchiobdellida) from Bulgaria. *Acta Zoologica Bulgarica*, 73(3), 331–338.

150. Subchev, M., & Stanimirova, L. (1986). The epibiont *Hystricosoma chappuisi* Michaelsen, 1926 (Oligochaeta, Aeolosomatidae) – new species for Bulgarian fauna. *Acta Zoologica Bulgarica*, 32, 66–68.

151. Subchev, M., Koutrakis, E., & Perdikaris, C. (2007). Crayfish epibionts *Branchiobdella* sp. and *Hystricosoma chappuisi* (Annelida: Clitellata) in Greece. *Bulletin Français de la Pêche et de la Pisciculture*, 387, 59–66.

152. Szenejko, M., Eljasik, P., Panicz, R., & Śmietana, P. (2023). Declining populations of *Astacus astacus* drag European *Branchiobdella parasita* (Annelida: Clitellata) ectosymbionts to serious biodiversity loss. *Global Ecology and Conservation*, 48, e02719.

153. Tajima, F. (1983). Evolutionary relationship of DNA sequences in finite populations. *Genetics*, 105(2), 437–460.

154. Tajima, F. (1989). Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics*, 123(3), 585–595.

155. Tamura, K., Stecher, G., & Kumar, S. (2021). MEGA11: molecular evolutionary genetics analysis version 11. *Molecular biology and evolution*, 38(7), 3022-3027.

156. Tessler, M., de Carle, D., Voiklis, M. L., Gresham, O. A., Neumann, J. S., Cios, S., & Siddall, M. E. (2018). Worms that suck: Phylogenetic analysis of Hirudinea solidifies the position of Acanthobdellida and necessitates the dissolution of Rhynchobdellida. *Molecular phylogenetics and evolution*, 127, 129-134.

157. Thompson, J. D., Higgins, D. G., & Gibson, T. J. (1994). CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting,

- position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, 22(22), 4673–4680.
158. Trifinopoulos, J., Nguyen, L. T., von Haeseler, A., & Minh, B. Q. (2016). W-IQ-TREE: a fast online phylogenetic tool for maximum likelihood analysis. *Nucleic acids research*, 44(W1), W232-W235.
159. Trontelj, P., Machino, Y., & Sket, B. (2005). Phylogenetic and phylogeographic relationships in the crayfish genus *Austropotamobius* inferred from mitochondrial COI gene sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 34(1), 212–226.
160. Vedia, I., & Miranda, R. (2013). Review of the state of knowledge of crayfish species in the Iberian Peninsula. *Limnetica*, 32(2), 269–286.
161. Vedia, I., Oscoz, J., Rueda, J., Miranda, R., García-Roger, E. M., Baquero, E., & Gelder, S. R. (2015). An alien ectosymbiotic branchiobdellidan (Annelida: Clitellata) adopting exotic crayfish: A biological co-invasion with unpredictable consequences. *Inland Waters*, 5(1), 89–92.
162. Veselý, L., Buřič, M., & Kouba, A. (2015). Hardy exotic species in temperate zone: Can “warm water” crayfish invaders establish regardless of low temperatures? *Scientific Reports*, 5(1), 16340.
163. Vlach, P., Šrámková, L., Fialová, K., & Nováková, K. (2017). The occurrence of branchiobdellidans on stone crayfish (*Austropotamobius torrentium*) in the Czech Republic. *Knowledge & Management of Aquatic Ecosystems*, 418, 39.
164. White, T. J., Bruns, T., Lee, S. J. W. T., & Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, 18(1), 315–322.
165. Wierzbicka, J., & Śmietana, P. (1999). The food of *Branchiobdella* Odier, 1832 (Annelida) dwelling on crayfish and the occurrence of the fish parasite *Argulus* Müller, 1875 (Crustacea) on the carapace of *Pontastacus leptodactylus* (Esch.). *Acta Ichthyologica et Piscatoria*, 29, 93–98.
166. Wojtas, F. (1964). Materiały do poznania skąposzczetów Branchiobdellidae rzeki Grabi [Notes on the Family Branchiobdellidae (Oligochaeta) of the river Grabia]. *Przegląd Zoologiczny*, 8, 149–152.

167. Wright, S. (1978). Evolution and the genetics of populations: Vol. 4. Variability within and among natural populations. *University of Chicago Press*.
168. Yoder, J. A., Tank, J. L., Brown, B. L., & Hobbs, H. H. (2007). Water exchange pertaining to host attachment sites and stream preference in crayfish-associated branchiobdellids, *Cambarincola fallax* and *Cambarincola ingens* (Annelida: Clitellata). *Hydrobiologia*, 592, 523-533.
169. Zhang, J., Kapli, P., Pavlidis, P., & Stamatakis, A. (2013). A general species delimitation method with applications to phylogenetic placements. *Bioinformatics*, 29(22), 2869-2876.
170. Živić, I., Božanić, M., Todorović, N., & Stojanović, K. (2022). *Branchiobdella* Odier, 1823 (Annelida: Branchiobdellea), a new genus for the fauna of Serbia. *Acta Zoologica Bulgarica*, 74(2), 325–327.

ДОДАТКИ

Додаток 1. Список публікацій здобувача за темою дисертації.

Наукові праці, в яких опубліковано основні наукові результати дисертації:

4. **Shrestkha, M., & Utevsky, S. (2024).** The distribution of branchiobdellidan worms (Annelida: Clitellata) on the noble crayfish, *Astacus astacus*, in the Transcarpathian region, Ukraine. *The Journal of V.N.Karazin Kharkiv National University. Series «Biology»*, 43, 85-95. <https://doi.org/10.26565/2075-5457-2024-43-7>
5. Sydorovsky, S., **Shrestkha, M. (2024).** Fauna of Crustaceans of the Kharkiv Region, Ukraine. *Biosystems Diversity*, 32 (3), 314–323. <https://doi.org/10.15421/012434>
6. Solijonov, K., Utevsky, S., Izzatullaev, Z., Umarov, F. U., Fazliddinov, F., **Shrestkha, M., & Utevsky, A. (2024).** First record of *Hemiclepsis marginata* (O.F.Müller, 1773) (Hirudinida: Glossiphoniidae) from the Ferghana Valley, Uzbekistan. *Ecologica Montenegrina*, 75, 74–84. <https://doi.org/10.37828/em.2024.75.6>

Наукові праці, які засвідчують апробацію матеріалів дисертації:

5. **Shrestkha M., Utevsky, S. (2024).** Phylogenetic position and genetic diversity of *Branchiobdella kozarovi*, an ectosymbiont of the narrow-clawed crayfish. *Abstract book of 4th Central European Symposium of aquatic invertebrates, Stara Lesna, Slovakia, 7-12 July.*

6. Mariia Kolesnykova (**Shrestkha**) (2011). Host associations and biogeography of *Branchiobdella* spp. in the Western Balkans. *4th International Conference HIRUDINEA: biology, taxonomy, faunistics. 18-21 May, Wierzba, Poland.*
7. Kolesnykova (**Shrestkha**) M. Yu. (2009). A report on the distribution of *Branchiobdella astaci* (Annelida, Clitellata) in a lake from northern Kazakhstan. *IV All-Russian Congress of the Parasitological Society of the Russian Academy of sciences "Parasitology in the XXI Century – problems, methods, decisions", St. Petersburg, 2, 49-51.*
8. Kolesnykova (**Shrestkha**) M. Yu. (2009). Localization of *Branchiobdella kozarovi* on the *Astacus leptodactylus* host. Young Zoologist Scientists Conference. *Zoology Shmalgauzen Institution, Ukrainian National Academy of Sciences, 8-9 April, Kyiv.*

Наукові праці, які додатково відображають наукові результати дисертації:

4. **Kolesnykova (Shrestkha) M., Utevsky S. (2013).** New Ukrainian records of *Branchiobdella parasita* (Annelida: Clitellata: Branchiobdellida) from the Danube basin. *Scientific annals of the Danube Delta Institute, Tulcea, Romania, 19, 35-38.*
<http://doi.org/10.7427/DDI.19.05>
5. **Mariia Kolesnykova (Shrestkha), D.M. Soes and Serge Utevsky (2012).** First record of *Branchiobdella kozarovi* (Clitellata: Branchiobdellida) for the Netherlands, with overview of the Dutch Branchiobdellida. *Lauterbornia, 74, 101-103.*
6. **Mariia Kolesnykova (Shrestkha), Andrei Utevsky and Serge Utevsky (2008).** First record of *Branchiobdella kozarovi* (Clitellata: Branchiobdellida) from eastern Ukraine. *Lauterbornia, 65, 77-81.*

Додаток 2. Результати тесту McDonald and Kreitman для оцінки нейтральності еволюції. Тест достовірний при рівні значущості $0.01 < P < 0.05$

<i>B. italica - B. kozarovi</i>
<p>Synonymous Substitutions: Fixed differences between species: 24 Polymorphic sites: 72</p> <p>Nonsynonymous Substitutions: Fixed differences between species: 26 Polymorphic sites: 37</p> <p>Neutrality Index, NI: 0,474</p> <p>Alfa value: 0,526</p> <p>P-value: 0,03158*</p> <p>* $0.01 < P < 0.05$</p>
<i>B. hexadonta - B.n.sp.</i>
<p>Synonymous Substitutions: Fixed differences between species: 26 Polymorphic sites: 70</p> <p>Nonsynonymous Substitutions: Fixed differences between species: 11 Polymorphic sites: 40</p> <p>Neutrality Index, NI: 1,351</p> <p>Alfa value: -0,351</p> <p>P-value: 0,45958 (not significant)</p>
<i>B. parasita - B.n.sp.</i>
<p>Synonymous Substitutions: Fixed differences between species: 17 Polymorphic sites: 59</p> <p>Nonsynonymous Substitutions: Fixed differences between species: 11 Polymorphic sites: 31</p> <p>Neutrality Index, NI: 0,812</p> <p>Alfa value: 0,188</p> <p>P-value: 0,64192 (not significant)</p>
<i>B. italica - B.n.sp.</i>

Synonymous Substitutions:

Fixed differences between species: 40 Polymorphic sites: 48

Nonsynonymous Substitutions:

Fixed differences between species: 25 Polymorphic sites: 18

Neutrality Index, NI: 0,600

Alfa value: 0,400

P-value: 0,17202 (not significant)

B. hexadonta - B.kozarovi

Synonymous Substitutions:

Fixed differences between species: 20 Polymorphic sites: 90

Nonsynonymous Substitutions:

Fixed differences between species: 16 Polymorphic sites: 48

Neutrality Index, NI: 0,667

Alfa value: 0,333

P-value: 0,28856 (not significant)

Додаток 3. Детальні результати розмежування видів за допомогою метода делімітації ASAP (*p*-distance та Kimura 2-parameter distance ts/tv option) та ABGD (Kimura 2-parameter distance ts/tv option).

Method, species, partitions, and groups
ABGD
<i>B. kozarovi</i>
Initial Partition with prior maximal distance P=1.29e-02 ; Barcode gap distance = 0.053 Distance K80 Kimura MinSlope=1.500000 Group[1] n: 11 ;id: 1_Branchiobdella_kozarovi_Ukraine_Lopanj 2_Branchiobdella_kozarovi_Ukraine_lakeTravyanskoye 4_Branchiobdella_kozarovi_Ukraine_Zanki Branchiobdella_kozarovi_Bezliudivka 8_Branchiobdella_kozarovi_Ukraine_Vorskla 20_Branchiobdella_kozarovi_Ukraine_Zanki2 19_Branchiobdella_kozarovi_Ukraine_Martovaya 10_Branchiobdella_kozarovi_RF_Oka MH351654 MH351653 6_Branchiobdella_kozarovi_Ukraine_Mertvovod Group[2] n: 3 ;id: 3_Branchiobdella_kozarovi_Ukraine_VilkovoDanube 9_Branchiobdella_kozarovi_Ukraine_YuBugMygiya 10_Branchiobdella_kozarovi_Ukraine_Voznesensk
Initial Partition with prior maximal distance P=7.74e-03 ; Barcode gap distance = 0.028 Distance K80 Kimura MinSlope=1.500000 Group[1] n: 11 ;id: 1_Branchiobdella_kozarovi_Ukraine_Lopanj 2_Branchiobdella_kozarovi_Ukraine_lakeTravyanskoye 4_Branchiobdella_kozarovi_Ukraine_Zanki Branchiobdella_kozarovi_Bezliudivka 8_Branchiobdella_kozarovi_Ukraine_Vorskla 20_Branchiobdella_kozarovi_Ukraine_Zanki2 19_Branchiobdella_kozarovi_Ukraine_Martovaya 10_Branchiobdella_kozarovi_RF_Oka MH351654 MH351653 6_Branchiobdella_kozarovi_Ukraine_Mertvovod Group[2] n: 2 ;id: 3_Branchiobdella_kozarovi_Ukraine_VilkovoDanube 9_Branchiobdella_kozarovi_Ukraine_YuBugMygiya Group[3] n: 1 ;id: 10_Branchiobdella_kozarovi_Ukraine_Voznesensk
Initial Partition with prior maximal distance P=4.64e-03 ; Barcode gap distance = 0.019 Distance K80 Kimura MinSlope=1.500000 Group[1] n: 10 ;id: 1_Branchiobdella_kozarovi_Ukraine_Lopanj 2_Branchiobdella_kozarovi_Ukraine_lakeTravyanskoye 4_Branchiobdella_kozarovi_Ukraine_Zanki Branchiobdella_kozarovi_Bezliudivka 8_Branchiobdella_kozarovi_Ukraine_Vorskla

20_Branchiobdella_kozarovi_Ukraine_Zanki2 19_Branchiobdella_kozarovi_Ukraine_Martovaya
10_Branchiobdella_kozarovi_RF_Oka MH351654 MH351653
Group[2] n: 1 ;id: 6_Branchiobdella_kozarovi_Ukraine_Mertvovod
Group[3] n: 1 ;id: 3_Branchiobdella_kozarovi_Ukraine_VilkovoDanube
Group[4] n: 1 ;id: 9_Branchiobdella_kozarovi_Ukraine_YuBugMygiya
Group[5] n: 1 ;id: 10_Branchiobdella_kozarovi_Ukraine_Voznesensk

Initial Partition with prior maximal distance $P=2.78e-03$; Barcode gap distance = 0.011

Distance K80 Kimura MinSlope=1.500000

Group[1] n: 1 ;id: 1_Branchiobdella_kozarovi_Ukraine_Lopanj
Group[2] n: 7 ;id: 2_Branchiobdella_kozarovi_Ukraine_lakeTravyanskoye
4_Branchiobdella_kozarovi_Ukraine_Zanki Branchiobdella_kozarovi_Bezliudivka
8_Branchiobdella_kozarovi_Ukraine_Vorskla 20_Branchiobdella_kozarovi_Ukraine_Zanki2
19_Branchiobdella_kozarovi_Ukraine_Martovaya 10_Branchiobdella_kozarovi_RF_Oka
Group[3] n: 1 ;id: MH351654
Group[4] n: 1 ;id: MH351653
Group[5] n: 1 ;id: 6_Branchiobdella_kozarovi_Ukraine_Mertvovod
Group[6] n: 1 ;id: 3_Branchiobdella_kozarovi_Ukraine_VilkovoDanube
Group[7] n: 1 ;id: 9_Branchiobdella_kozarovi_Ukraine_YuBugMygiya
Group[8] n: 1 ;id: 10_Branchiobdella_kozarovi_Ukraine_Voznesensk

Initial Partition with prior maximal distance $P=1.67e-03$; Barcode gap distance = 0.011

Distance K80 Kimura MinSlope=1.500000

Group[1] n: 1 ;id: 1_Branchiobdella_kozarovi_Ukraine_Lopanj
Group[2] n: 7 ;id: 2_Branchiobdella_kozarovi_Ukraine_lakeTravyanskoye
4_Branchiobdella_kozarovi_Ukraine_Zanki Branchiobdella_kozarovi_Bezliudivka
8_Branchiobdella_kozarovi_Ukraine_Vorskla 20_Branchiobdella_kozarovi_Ukraine_Zanki2
19_Branchiobdella_kozarovi_Ukraine_Martovaya 10_Branchiobdella_kozarovi_RF_Oka
Group[3] n: 1 ;id: MH351654
Group[4] n: 1 ;id: MH351653
Group[5] n: 1 ;id: 6_Branchiobdella_kozarovi_Ukraine_Mertvovod
Group[6] n: 1 ;id: 3_Branchiobdella_kozarovi_Ukraine_VilkovoDanube
Group[7] n: 1 ;id: 9_Branchiobdella_kozarovi_Ukraine_YuBugMygiya
Group[8] n: 1 ;id: 10_Branchiobdella_kozarovi_Ukraine_Voznesensk

Initial Partition with prior maximal distance $P=1.00e-03$; Barcode gap distance = 0.011

Distance K80 Kimura MinSlope=1.500000

Group[1] n: 1 ;id: 1_Branchiobdella_kozarovi_Ukraine_Lopanj
Group[2] n: 7 ;id: 2_Branchiobdella_kozarovi_Ukraine_lakeTravyanskoye
4_Branchiobdella_kozarovi_Ukraine_Zanki Branchiobdella_kozarovi_Bezliudivka
8_Branchiobdella_kozarovi_Ukraine_Vorskla 20_Branchiobdella_kozarovi_Ukraine_Zanki2
19_Branchiobdella_kozarovi_Ukraine_Martovaya 10_Branchiobdella_kozarovi_RF_Oka

Group[3] n: 1 ;id: MH351654

Group[4] n: 1 ;id: MH351653

Group[5] n: 1 ;id: 6_Branchiobdella_kozarovi_Ukraine_Mertvovod

Group[6] n: 1 ;id: 3_Branchiobdella_kozarovi_Ukraine_VilkovoDanube

Group[7] n: 1 ;id: 9_Branchiobdella_kozarovi_Ukraine_YuBugMygiya

Group[8] n: 1 ;id: 10_Branchiobdella_kozarovi_Ukraine_Voznesensk

B. balcanica

Initial Partition with prior maximal distance $P=4.64e-03$; Barcode gap distance = 0.007

Distance JC69 Jukes-Cantor MinSlope=1.500000

Group[1] n: 1 ;id: B_balcanica_Kolochava

Group[2] n: 7 ;id: FJ655025 7_B_balcanica_SI_Blos FJ655047 FJ655026 FJ655038 FJ655043
FJ655052

Initial Partition with prior maximal distance $P=1.67e-03$; Barcode gap distance = 0.001

Distance JC69 Jukes-Cantor MinSlope=1.500000

Group[1] n: 1 ;id: B_balcanica_Kolochava

Group[2] n: 1 ;id: FJ655025

Group[3] n: 1 ;id: 7_B_balcanica_SI_Blos

Group[4] n: 5 ;id: FJ655047 FJ655026 FJ655038 FJ655043 FJ655052

B. pentadonta

Initial Partition with prior maximal distance $P=4.64e-03$; Barcode gap distance = 0.021

Distance K80 Kimura MinSlope=1.500000

Group[1] n: 27 ;id: 6_Branchiobdella_pentadonta_SLO_Hotenka

2_Branchiobdella_pentadonta_EMacedonia_Berovo1 HA093_B_pentadonta_Poland_ASA_CO1

5_Branchiobdella_pentadonta_SLO_Zala 3_Branchiobdella_pentadonta_EMacedonia_Berovo2

9_Branchiobdella_pentadonta_SLO_Zaplana 7_Branchiobdella_pentadonta_SLO_Osilnica

1_Branchiobdella_pentadonta_SLO_Grivacki_potok 8_B_pentadonta FJ655023 FJ655037 FJ655035

FJ655065 FJ655055 FJ655027 FJ655066 FJ655060 OM250468 OM250469 OM250470 OM250471

KY775124 KY775125 KY775126 KY775127 FJ655012 FJ655051

Group[2] n: 1 ;id: 5_Branchiobdella_pentadonta_BIH_Kladanj

Group[3] n: 2 ;id: KY775123 AF310708

Initial Partition with prior maximal distance $P=2.78e-03$; Barcode gap distance = 0.021

Distance K80 Kimura MinSlope=1.500000

Group[1] n: 27 ;id: 6_Branchiobdella_pentadonta_SLO_Hotenka

2_Branchiobdella_pentadonta_EMacedonia_Berovo1 HA093_B_pentadonta_Poland_ASA_CO1

5_Branchiobdella_pentadonta_SLO_Zala 3_Branchiobdella_pentadonta_EMacedonia_Berovo2

9_Branchiobdella_pentadonta_SLO_Zaplana 7_Branchiobdella_pentadonta_SLO_Osilnica

1_Branchiobdella_pentadonta_SLO_Grivacki_potok 8_B_pentadonta FJ655023 FJ655037 FJ655035

FJ655065 FJ655055 FJ655027 FJ655066 FJ655060 OM250468 OM250469 OM250470 OM250471

KY775124 KY775125 KY775126 KY775127 FJ655012 FJ655051

Group[2] n: 1 ;id: 5_Branchiobdella_pentadonta_BIH_Kladanj

Group[3] n: 2 ;id: KY775123 AF310708

Initial Partition with prior maximal distance $P=1.67e-03$; Barcode gap distance = 0.021

Distance K80 Kimura MinSlope=1.500000

Group[1] n: 27 ;id: 6_Branchiobdella_pentadonta_SLO_Hotenka

2_Branchiobdella_pentadonta_EMacedonia_Berovo1 HA093_B_pentadonta_Poland_ASA_CO1

5_Branchiobdella_pentadonta_SLO_Zala 3_Branchiobdella_pentadonta_EMacedonia_Berovo2

9_Branchiobdella_pentadonta_SLO_Zaplana 7_Branchiobdella_pentadonta_SLO_Osilnica

1_Branchiobdella_pentadonta_SLO_Grivacki_potok 8_B_pentadonta FJ655023 FJ655037 FJ655035

FJ655065 FJ655055 FJ655027 FJ655066 FJ655060 OM250468 OM250469 OM250470 OM250471

KY775124 KY775125 KY775126 KY775127 FJ655012 FJ655051

Group[2] n: 1 ;id: 5_Branchiobdella_pentadonta_BIH_Kladanj

Group[3] n: 2 ;id: KY775123 AF310708

Initial Partition with prior maximal distance $P=1.00e-03$; Barcode gap distance = 0.021

Distance K80 Kimura MinSlope=1.500000

Group[1] n: 27 ;id: 6_Branchiobdella_pentadonta_SLO_Hotenka

2_Branchiobdella_pentadonta_EMacedonia_Berovo1 HA093_B_pentadonta_Poland_ASA_CO1

5_Branchiobdella_pentadonta_SLO_Zala 3_Branchiobdella_pentadonta_EMacedonia_Berovo2

9_Branchiobdella_pentadonta_SLO_Zaplana 7_Branchiobdella_pentadonta_SLO_Osilnica

1_Branchiobdella_pentadonta_SLO_Grivacki_potok 8_B_pentadonta FJ655023 FJ655037 FJ655035

FJ655065 FJ655055 FJ655027 FJ655066 FJ655060 OM250468 OM250469 OM250470 OM250471

KY775124 KY775125 KY775126 KY775127 FJ655012 FJ655051

Group[2] n: 1 ;id: 5_Branchiobdella_pentadonta_BIH_Kladanj

Group[3] n: 2 ;id: KY775123 AF310708

Initial Partition with prior maximal distance $P=7.74e-03$; Barcode gap distance = 0.030

Distance K80 Kimura MinSlope=1.500000

Group[1] n: 30 ;id: 6_Branchiobdella_pentadonta_SLO_Hotenka

5_Branchiobdella_pentadonta_BIH_Kladanj 2_Branchiobdella_pentadonta_EMacedonia_Berovo1

HA093_B_pentadonta_Poland_ASA_CO1 5_Branchiobdella_pentadonta_SLO_Zala

3_Branchiobdella_pentadonta_EMacedonia_Berovo2 9_Branchiobdella_pentadonta_SLO_Zaplana

7_Branchiobdella_pentadonta_SLO_Osilnica 1_Branchiobdella_pentadonta_SLO_Grivacki_potok

8_B_pentadonta FJ655023 FJ655037 FJ655035 FJ655065 FJ655055 FJ655027 FJ655066 FJ655060

OM250468 OM250469 OM250470 OM250471 KY775124 KY775125 KY775126 KY775127

KY775123 AF310708 FJ655012 FJ655051

B. italica

Initial Partition with prior maximal distance $P=2.15e-02$; Barcode gap distance = 0.053

Distance K80 Kimura MinSlope=1.500000

Group[1] n: 2 ;id: FJ655029 FJ655056

Group[2] n: 37 ;id: KY775116 MG244273 MG244274 MG244276 MG244280 MG244281 MG244277

FJ655067 FJ655034 FJ655040 FJ655045 FJ655059 FJ655041 FJ655058 FJ655011 FJ655019 FJ655024

FJ655028 FJ655033 MG244275 MG244279 MG244278 MG244282 FJ655042 FJ655053 KY775121

1_Branchiobdella_italica_HRV_Brichana KY775117 KY775118 KY775119 KY775120

2_Branchiobdella_italica_HRV_ModroOko KY775114 KY775115

3_Branchiobdella_italica_SLO_Vipana 1_Branchiobdella_italica_SLO_OsapskaReka

4_Branchiobdella_italica_HRV_Ljuta

Initial Partition with prior maximal distance $P=1.29e-02$; Barcode gap distance = 0.053

Distance K80 Kimura MinSlope=1.500000

Group[1] n: 2 ;id: FJ655029 FJ655056

Group[2] n: 37 ;id: KY775116 MG244273 MG244274 MG244276 MG244280 MG244281 MG244277

FJ655067 FJ655034 FJ655040 FJ655045 FJ655059 FJ655041 FJ655058 FJ655011 FJ655019 FJ655024

FJ655028 FJ655033 MG244275 MG244279 MG244278 MG244282 FJ655042 FJ655053 KY775121

1_Branchiobdella_italica_HRV_Brichana KY775117 KY775118 KY775119 KY775120

2_Branchiobdella_italica_HRV_ModroOko KY775114 KY775115

3_Branchiobdella_italica_SLO_Vipana 1_Branchiobdella_italica_SLO_OsapskaReka

4_Branchiobdella_italica_HRV_Ljuta

Initial Partition with prior maximal distance $P=7.74e-03$; Barcode gap distance = 0.023

Distance K80 Kimura MinSlope=1.500000

Group[1] n: 2 ;id: FJ655029 FJ655056

Group[2] n: 13 ;id: KY775116 KY775121 1_Branchiobdella_italica_HRV_Brichana KY775117

KY775118 KY775119 KY775120 2_Branchiobdella_italica_HRV_ModroOko KY775114 KY775115

3_Branchiobdella_italica_SLO_Vipana 1_Branchiobdella_italica_SLO_OsapskaReka

4_Branchiobdella_italica_HRV_Ljuta

Group[3] n: 22 ;id: MG244273 MG244274 MG244276 MG244280 MG244281 MG244277 FJ655067

FJ655034 FJ655040 FJ655045 FJ655059 FJ655041 FJ655058 FJ655011 FJ655019 FJ655024 FJ655028

FJ655033 MG244275 MG244279 MG244278 MG244282

Group[4] n: 2 ;id: FJ655042 FJ655053

Initial Partition with prior maximal distance $P=4.64e-03$; Barcode gap distance = 0.012

Distance K80 Kimura MinSlope=1.500000

Group[1] n: 2 ;id: FJ655029 FJ655056

Group[2] n: 13 ;id: KY775116 KY775121 1_Branchiobdella_italica_HRV_Brichana KY775117

KY775118 KY775119 KY775120 2_Branchiobdella_italica_HRV_ModroOko KY775114 KY775115

3_Branchiobdella_italica_SLO_Vipana 1_Branchiobdella_italica_SLO_OsapskaReka

4_Branchiobdella_italica_HRV_Ljuta

Group[3] n: 6 ;id: MG244273 MG244274 MG244276 MG244280 MG244281 MG244277
Group[4] n: 12 ;id: FJ655067 FJ655034 FJ655040 FJ655045 FJ655059 FJ655041 FJ655058 FJ655011
FJ655019 FJ655024 FJ655028 FJ655033
Group[5] n: 4 ;id: MG244275 MG244279 MG244278 MG244282
Group[6] n: 2 ;id: FJ655042 FJ655053

Initial Partition with prior maximal distance $P=2.78e-03$; Barcode gap distance = 0.012

Distance K80 Kimura MinSlope=1.500000

Group[1] n: 2 ;id: FJ655029 FJ655056
Group[2] n: 13 ;id: KY775116 KY775121 1_Branchiobdella_italica_HRV_Brichana KY775117
KY775118 KY775119 KY775120 2_Branchiobdella_italica_HRV_ModroOko KY775114 KY775115
3_Branchiobdella_italica_SLO_Vipana 1_Branchiobdella_italica_SLO_OsapskaReka
4_Branchiobdella_italica_HRV_Ljuta
Group[3] n: 6 ;id: MG244273 MG244274 MG244276 MG244280 MG244281 MG244277
Group[4] n: 12 ;id: FJ655067 FJ655034 FJ655040 FJ655045 FJ655059 FJ655041 FJ655058 FJ655011
FJ655019 FJ655024 FJ655028 FJ655033
Group[5] n: 4 ;id: MG244275 MG244279 MG244278 MG244282
Group[6] n: 2 ;id: FJ655042 FJ655053

Initial Partition with prior maximal distance $P=1.67e-03$; Barcode gap distance = 0.012

Distance K80 Kimura MinSlope=1.500000

Group[1] n: 2 ;id: FJ655029 FJ655056
Group[2] n: 13 ;id: KY775116 KY775121 1_Branchiobdella_italica_HRV_Brichana KY775117
KY775118 KY775119 KY775120 2_Branchiobdella_italica_HRV_ModroOko KY775114 KY775115
3_Branchiobdella_italica_SLO_Vipana 1_Branchiobdella_italica_SLO_OsapskaReka
4_Branchiobdella_italica_HRV_Ljuta
Group[3] n: 6 ;id: MG244273 MG244274 MG244276 MG244280 MG244281 MG244277
Group[4] n: 12 ;id: FJ655067 FJ655034 FJ655040 FJ655045 FJ655059 FJ655041 FJ655058 FJ655011
FJ655019 FJ655024 FJ655028 FJ655033
Group[5] n: 4 ;id: MG244275 MG244279 MG244278 MG244282
Group[6] n: 2 ;id: FJ655042 FJ655053

Initial Partition with prior maximal distance $P=1.00e-03$; Barcode gap distance = 0.012

Distance K80 Kimura MinSlope=1.500000

Group[1] n: 2 ;id: FJ655029 FJ655056
Group[2] n: 13 ;id: KY775116 KY775121 1_Branchiobdella_italica_HRV_Brichana KY775117
KY775118 KY775119 KY775120 2_Branchiobdella_italica_HRV_ModroOko KY775114 KY775115
3_Branchiobdella_italica_SLO_Vipana 1_Branchiobdella_italica_SLO_OsapskaReka
4_Branchiobdella_italica_HRV_Ljuta
Group[3] n: 6 ;id: MG244273 MG244274 MG244276 MG244280 MG244281 MG244277
Group[4] n: 12 ;id: FJ655067 FJ655034 FJ655040 FJ655045 FJ655059 FJ655041 FJ655058 FJ655011
FJ655019 FJ655024 FJ655028 FJ655033

Group[5] n: 4 ;id: MG244275 MG244279 MG244278 MG244282

Group[6] n: 2 ;id: FJ655042 FJ655053

B. hexadonta

Initial Partition with prior maximal distance $P=1.00e-01$; Barcode gap distance = 0.103

Distance K80 Kimura MinSlope=1.500000

Group[1] n: 3 ;id: 2_Branchiobdella_hexadonta_SLO_Bloscica FJ655015 FJ655016

Group[2] n: 6 ;id: FJ655018 FJ655032 FJ655049 FJ655057 KY775105 KY775106

Initial Partition with prior maximal distance $P=5.99e-02$; Barcode gap distance = 0.103

Distance K80 Kimura MinSlope=1.500000

Group[1] n: 3 ;id: 2_Branchiobdella_hexadonta_SLO_Bloscica FJ655015 FJ655016

Group[2] n: 6 ;id: FJ655018 FJ655032 FJ655049 FJ655057 KY775105 KY775106

Initial Partition with prior maximal distance $P=3.59e-02$; Barcode gap distance = 0.103

Distance K80 Kimura MinSlope=1.500000

Group[1] n: 3 ;id: 2_Branchiobdella_hexadonta_SLO_Bloscica FJ655015 FJ655016

Group[2] n: 6 ;id: FJ655018 FJ655032 FJ655049 FJ655057 KY775105 KY775106

Initial Partition with prior maximal distance $P=2.15e-02$; Barcode gap distance = 0.012

Distance K80 Kimura MinSlope=1.500000

Group[1] n: 1 ;id: 2_Branchiobdella_hexadonta_SLO_Bloscica

Group[2] n: 1 ;id: FJ655015

Group[3] n: 1 ;id: FJ655016

Group[4] n: 4 ;id: FJ655018 FJ655032 FJ655049 FJ655057

Group[5] n: 2 ;id: KY775105 KY775106

Initial Partition with prior maximal distance $P=1.00e-03$; Barcode gap distance = 0.012

Distance K80 Kimura MinSlope=1.500000

Group[1] n: 1 ;id: 2_Branchiobdella_hexadonta_SLO_Bloscica

Group[2] n: 1 ;id: FJ655015

Group[3] n: 1 ;id: FJ655016

Group[4] n: 4 ;id: FJ655018 FJ655032 FJ655049 FJ655057

Group[5] n: 2 ;id: KY775105 KY775106

ASAP Kimura (K80)

B. kozarovi

Partition 1

Asap-Score: 1.500000

Proba: 5.009980e-01

Nb groups: 2

Group[1] n: 11 ;id: 1_Branchiobdella_kozarovi_Ukraine_Lopanj

2_Branchiobdella_kozarovi_Ukraine_lakeTravyanskoye 4_Branchiobdella_kozarovi_Ukraine_Zanki

Branchiobdella_kozarovi_Bezliudivka 8_Branchiobdella_kozarovi_Ukraine_Vorskla

20_Branchiobdella_kozarovi_Ukraine_Zanki2 10_Branchiobdella_kozarovi_RF_Oka

19_Branchiobdella_kozarovi_Ukraine_Martovaya MH351654 MH351653

6_Branchiobdella_kozarovi_Ukraine_Mertvovod

Group[2] n: 3 ;id: 3_Branchiobdella_kozarovi_Ukraine_VilkovoDanube

9_Branchiobdella_kozarovi_Ukraine_YuBugMygiya 10_Branchiobdella_kozarovi_Ukraine_Voznesensk

Partition 2

Asap-Score: 3.500000

Proba: 8.882236e-01

Nb groups: 3

Group[1] n: 11 ;id: 1_Branchiobdella_kozarovi_Ukraine_Lopanj

2_Branchiobdella_kozarovi_Ukraine_lakeTravyanskoye 4_Branchiobdella_kozarovi_Ukraine_Zanki

Branchiobdella_kozarovi_Bezliudivka 8_Branchiobdella_kozarovi_Ukraine_Vorskla

20_Branchiobdella_kozarovi_Ukraine_Zanki2 10_Branchiobdella_kozarovi_RF_Oka

19_Branchiobdella_kozarovi_Ukraine_Martovaya MH351654 MH351653

6_Branchiobdella_kozarovi_Ukraine_Mertvovod

Group[2] n: 2 ;id: 3_Branchiobdella_kozarovi_Ukraine_VilkovoDanube

9_Branchiobdella_kozarovi_Ukraine_YuBugMygiya

Group[3] n: 1 ;id: 10_Branchiobdella_kozarovi_Ukraine_Voznesensk

Partition 3

Asap-Score: 3.000000

Proba: 7.225549e-01

Nb groups: 8

Group[1] n: 1 ;id: 1_Branchiobdella_kozarovi_Ukraine_Lopanj

Group[2] n: 7 ;id: 2_Branchiobdella_kozarovi_Ukraine_lakeTravyanskoye

4_Branchiobdella_kozarovi_Ukraine_Zanki Branchiobdella_kozarovi_Bezliudivka

8_Branchiobdella_kozarovi_Ukraine_Vorskla 20_Branchiobdella_kozarovi_Ukraine_Zanki2

10_Branchiobdella_kozarovi_RF_Oka 19_Branchiobdella_kozarovi_Ukraine_Martovaya

Group[3] n: 1 ;id: MH351654

Group[4] n: 1 ;id: MH351653

Group[5] n: 1 ;id: 6_Branchiobdella_kozarovi_Ukraine_Mertvovod

Group[6] n: 1 ;id: 3_Branchiobdella_kozarovi_Ukraine_VilkovoDanube

Group[7] n: 1 ;id: 9_Branchiobdella_kozarovi_Ukraine_YuBugMygiya

Group[8] n: 1 ;id: 10_Branchiobdella_kozarovi_Ukraine_Voznesensk

B. balcanica

Partition 1

Asap-Score: 1.000000

Proba: 6.455696e-02

Nb groups:2

Group[1] n: 1 ;id: B_balcanica_Kolochava

Group[2] n: 7 ;id: FJ655025 7_B_balcanica_Sl_Blos FJ655047 FJ655026 FJ655038 FJ655043 FJ655052

Partition 2

Asap-Score: 2.500000

Proba: 5.928144e-01

Nb groups:4

Group[1] n: 1 ;id: B_balcanica_Kolochava

Group[2] n: 1 ;id: FJ655025

Group[3] n: 1 ;id: 7_B_balcanica_Sl_Blos

Group[4] n: 5 ;id: FJ655047 FJ655026 FJ655038 FJ655043 FJ655052

Partition 3

Asap-Score: 2.500000

Proba: 7.664671e-01

Nb groups:3

Group[1] n: 1 ;id: B_balcanica_Kolochava

Group[2] n: 1 ;id: FJ655025

Group[3] n: 6 ;id: 7_B_balcanica_Sl_Blos FJ655047 FJ655026 FJ655038 FJ655043 FJ655052

B. pentadonta

Partition 1

Asap-Score: 4.000000

Proba: 7.025948e-01

Nb groups:6

- Group[1] n: 18 ;id: 6_Branchiobdella_pentadonta_SLO_Hotenka
9_Branchiobdella_pentadonta_SLO_Zaplana 5_Branchiobdella_pentadonta_SLO_Zala
2_Branchiobdella_pentadonta_EMacedonia_Berovo1
3_Branchiobdella_pentadonta_EMacedonia_Berovo2 OM250468 OM250469 OM250470
HA093_B_pentadonta_Poland_ASA_CO1 FJ655027 FJ655066 FJ655060 FJ655023 FJ655037 FJ655035
FJ655065 OM250471 FJ655055
- Group[2] n: 1 ;id: 5_Branchiobdella_pentadonta_BIH_Kladanj
- Group[3] n: 1 ;id: 7_Branchiobdella_pentadonta_SLO_Osilnica
- Group[4] n: 6 ;id: 1_Branchiobdella_pentadonta_SLO_Grivacki_potok 8_B_pentadonta KY775124
KY775125 KY775126 KY775127
- Group[5] n: 2 ;id: KY775123 AF310708
- Group[6] n: 2 ;id: FJ655012 FJ655051

Partition 2

Asap-Score: 4.000000

Proba: 7.544910e-01

Nb groups:12

- Group[1] n: 3 ;id: 6_Branchiobdella_pentadonta_SLO_Hotenka
9_Branchiobdella_pentadonta_SLO_Zaplana 5_Branchiobdella_pentadonta_SLO_Zala
- Group[2] n: 1 ;id: 5_Branchiobdella_pentadonta_BIH_Kladanj
- Group[3] n: 5 ;id: 2_Branchiobdella_pentadonta_EMacedonia_Berovo1
3_Branchiobdella_pentadonta_EMacedonia_Berovo2 OM250468 OM250469 OM250470
- Group[4] n: 8 ;id: HA093_B_pentadonta_Poland_ASA_CO1 FJ655027 FJ655066 FJ655060 FJ655023
FJ655037 FJ655035 FJ655065
- Group[5] n: 1 ;id: 7_Branchiobdella_pentadonta_SLO_Osilnica
- Group[6] n: 2 ;id: 1_Branchiobdella_pentadonta_SLO_Grivacki_potok 8_B_pentadonta
- Group[7] n: 1 ;id: FJ655055
- Group[8] n: 1 ;id: OM250471
- Group[9] n: 3 ;id: KY775124 KY775125 KY775126
- Group[10] n: 1 ;id: KY775127
- Group[11] n: 2 ;id: KY775123 AF310708
- Group[12] n: 2 ;id: FJ655012 FJ655051

Partition 3

Asap-Score: 6.000000

Proba: 8.063872e-01

Nb groups:5

Group[1] n: 18 ;id: 6_Branchiobdella_pentadonta_SLO_Hotenka
 9_Branchiobdella_pentadonta_SLO_Zaplana 5_Branchiobdella_pentadonta_SLO_Zala
 2_Branchiobdella_pentadonta_EMacedonia_Berovo1
 3_Branchiobdella_pentadonta_EMacedonia_Berovo2 OM250468 OM250469 OM250470
 HA093_B_pentadonta_Poland_ASA_CO1 FJ655027 FJ655066 FJ655060 FJ655023 FJ655037 FJ655035
 FJ655065 OM250471 FJ655055
 Group[2] n: 2 ;id: FJ655012 FJ655051
 Group[3] n: 1 ;id: 5_Branchiobdella_pentadonta_BIH_Kladanj
 Group[4] n: 7 ;id: 7_Branchiobdella_pentadonta_SLO_Osilnica
 1_Branchiobdella_pentadonta_SLO_Grivacki_potok 8_B_pentadonta KY775124 KY775125 KY775126
 KY775127
 Group[5] n: 2 ;id: KY775123 AF310708

B. italica

Partition 1

Asap-Score: 1.500000

Proba: 2.455090e-01

Nb groups:6

Group[1] n: 2 ;id: FJ655029 FJ655056
 Group[2] n: 13 ;id: KY775116 2_Branchiobdella_italica_HRV_ModroOko KY775115
 3_Branchiobdella_italica_SLO_Vipana KY775114 4_Branchiobdella_italica_HRV_Ljuta
 1_Branchiobdella_italica_SLO_OsapskaReka 1_Branchiobdella_italica_HRV_Brichana KY775117
 KY775118 KY775119 KY775120 KY775121
 Group[3] n: 6 ;id: MG244273 MG244274 MG244276 MG244280 MG244281 MG244277
 Group[4] n: 12 ;id: FJ655067 FJ655034 FJ655040 FJ655045 FJ655059 FJ655011 FJ655019 FJ655024
 FJ655028 FJ655033 FJ655041 FJ655058
 Group[5] n: 4 ;id: MG244275 MG244279 MG244278 MG244282
 Group[6] n: 2 ;id: FJ655042 FJ655053

Partition 2

Asap-Score: 2.500000

Proba: 6.087824e-01

Nbgroups:2

Group[1] n: 2 ;id: FJ655029 FJ655056
 Group[2] n: 37 ;id: KY775116 2_Branchiobdella_italica_HRV_ModroOko KY775115
 3_Branchiobdella_italica_SLO_Vipana KY775114 4_Branchiobdella_italica_HRV_Ljuta
 1_Branchiobdella_italica_SLO_OsapskaReka 1_Branchiobdella_italica_HRV_Brichana KY775117
 KY775118 KY775119 KY775120 KY775121 MG244273 MG244274 MG244276 MG244280
 MG244281 MG244277 FJ655067 FJ655034 FJ655040 FJ655045 FJ655059 FJ655011 FJ655019
 FJ655024 FJ655028 FJ655033 FJ655041 FJ655058 MG244275 MG244279 MG244278 MG244282
 FJ655042 FJ655053

Partition 3

Asap-Score: 3.000000

Proba: 3.193613e-01

Nb groups:11

Group[1] n: 2 ;id: FJ655029 FJ655056

Group[2] n: 7 ;id: KY775116 2_Branchiobdella_italica_HRV_ModroOko KY775115

3_Branchiobdella_italica_SLO_Vipana KY775114 4_Branchiobdella_italica_HRV_Ljuta

1_Branchiobdella_italica_SLO_OsapskaReka

Group[3] n: 6 ;id: MG244273 MG244274 MG244276 MG244280 MG244281 MG244277

Group[4] n: 1 ;id: FJ655067

Group[5] n: 11 ;id: FJ655034 FJ655040 FJ655045 FJ655059 FJ655011 FJ655019 FJ655024 FJ655028

FJ655033 FJ655041 FJ655058

Group[6] n: 2 ;id: MG244275 MG244279

Group[7] n: 2 ;id: MG244278 MG244282

Group[8] n: 2 ;id: FJ655042 FJ655053

Group[9] n: 1 ;id: KY775121

Group[10] n: 1 ;id: 1_Branchiobdella_italica_HRV_Brichana

Group[11] n: 4 ;id: KY775117 KY775118 KY775119 KY775120

B. hexadonta

Partition 1

Asap-Score: 1.000000

Proba: 8.011310e-03

Nb groups:3

Group[1] n: 3 ;id: 2_Branchiobdella_hexadonta_SLO_Bloscica FJ655015 FJ655016

Group[2] n: 4 ;id: FJ655018 FJ655032 FJ655049 FJ655057

Group[3] n: 2 ;id: KY775105 KY775106

Partition 2

Asap-Score: 2.000000

Proba: 7.657658e-02

Nb groups:3

Group[1] n: 3 ;id: 2_Branchiobdella_hexadonta_SLO_Bloscica FJ655015 FJ655016

Group[2] n: 4 ;id: FJ655018 FJ655032 FJ655049 FJ655057

Group[3] n: 2 ;id: KY775105 KY775106

Partition 3

Asap-Score: 3.000000

Proba: 9.680639e-01

Nb groups:4

Group[1] n: 1 ;id: 2_Branchiobdella_hexadonta_SLO_Bloscica

Group[2] n: 2 ;id: FJ655015 FJ655016

Group[3] n: 4 ;id: FJ655018 FJ655032 FJ655049 FJ655057

Group[4] n: 2 ;id: KY775105 KY775106

B. parasita

Partition 1

Asap-Score: 2.000000

Proba: 7.524950e-01

Nb groups:12

Group[1] n: 1 ;id: AF310707

Group[2] n: 2 ;id: S9_B_parasita_Bloscica2009_CO1 1_Branchiobdella_parasita_SLO_Bolscica

Group[3] n: 3 ;id: KY775113 KY775111 KY775112

Group[4] n: 1 ;id: P5_Branchiobdella_parasita_Kolochava

Group[5] n: 1 ;id: BPP3_UA_DanubeKislica

Group[6] n: 1 ;id: M1_B_parasita_Romania_ASA_CO1

Group[7] n: 1 ;id: KY775107

Group[8] n: 2 ;id: KY775108 KY775109

Group[9] n: 1 ;id: FJ655048

Group[10] n: 1 ;id: 3_Branchiobdella_parasita_MKBerovo

Group[11] n: 1 ;id: FJ655021

Group[12] n: 1 ;id: FJ655062

Partition 2

Asap-Score: 2.500000

Proba: 9.401198e-01

Nbgroups:10

Group[1] n: 1 ;id: AF310707

Group[2] n: 2 ;id: S9_B_parasita_Bloscica2009_CO1 1_Branchiobdella_parasita_SLO_Bolscica

Group[3] n: 3 ;id: KY775113 KY775111 KY775112

Group[4] n: 1 ;id: P5_Branchiobdella_parasita_Kolochava

Group[5] n: 1 ;id: BPP3_UA_DanubeKislica

Group[6] n: 2 ;id: M1_B_parasita_Romania_ASA_CO1 FJ655062

Group[7] n: 1 ;id: FJ655021

Group[8] n: 3 ;id: KY775107 KY775108 KY775109

Group[9] n: 1 ;id: FJ655048

Group[10] n: 1 ;id: 3_Branchiobdella_parasita_MKBerovo

Partition 3

Asap-Score: 4.500000

Proba: 9.181637e-01

Nb groups:8

Group[1] n: 1 ;id: AF310707

Group[2] n: 2 ;id: S9_B_parasita_Bloscica2009_CO1 1_Branchiobdella_parasita_SLO_Bolscica

Group[3] n: 3 ;id: KY775113 KY775111 KY775112
 Group[4] n: 1 ;id: P5_Branchiobdella_parasita_Kolochava
 Group[5] n: 1 ;id: BPP3_UA_DanubeKislica
 Group[6] n: 4 ;id: M1_B_parasita_Romania_ASA_CO1 FJ655062 FJ655021
 3_Branchiobdella_parasita_MKBerovo
 Group[7] n: 1 ;id: FJ655048
 Group[8] n: 3 ;id: KY775107 KY775108 KY775109

ASAP *p*-distance

B. kozarovi

Partition 1

Asap-Score: 2.000000

Proba: 5.568862e-01

Nb groups:2

Group[1] n: 11 ;id: 1_Branchiobdella_kozarovi_Ukraine_Lopanj
 2_Branchiobdella_kozarovi_Ukraine_lakeTravyanskoye 4_Branchiobdella_kozarovi_Ukraine_Zanki
 Branchiobdella_kozarovi_Bezliudivka 8_Branchiobdella_kozarovi_Ukraine_Vorskla
 20_Branchiobdella_kozarovi_Ukraine_Zanki2 10_Branchiobdella_kozarovi_RF_Oka
 19_Branchiobdella_kozarovi_Ukraine_Martovaya MH351654 MH351653
 6_Branchiobdella_kozarovi_Ukraine_Mertvovod
 Group[2] n: 3 ;id: 3_Branchiobdella_kozarovi_Ukraine_VilkovoDanube
 9_Branchiobdella_kozarovi_Ukraine_YuBugMygiya 10_Branchiobdella_kozarovi_Ukraine_Voznesensk

Partition 2

Asap-Score: 3.000000

Proba: 7.405190e-01

Nb groups:8

Group[1] n: 1 ;id: 1_Branchiobdella_kozarovi_Ukraine_Lopanj
 Group[2] n: 7 ;id: 2_Branchiobdella_kozarovi_Ukraine_lakeTravyanskoye
 4_Branchiobdella_kozarovi_Ukraine_Zanki Branchiobdella_kozarovi_Bezliudivka
 8_Branchiobdella_kozarovi_Ukraine_Vorskla 20_Branchiobdella_kozarovi_Ukraine_Zanki2
 10_Branchiobdella_kozarovi_RF_Oka 19_Branchiobdella_kozarovi_Ukraine_Martovaya
 Group[3] n: 1 ;id: MH351654
 Group[4] n: 1 ;id: MH351653
 Group[5] n: 1 ;id: 6_Branchiobdella_kozarovi_Ukraine_Mertvovod
 Group[6] n: 1 ;id: 3_Branchiobdella_kozarovi_Ukraine_VilkovoDanube
 Group[7] n: 1 ;id: 9_Branchiobdella_kozarovi_Ukraine_YuBugMygiya
 Group[8] n: 1 ;id: 10_Branchiobdella_kozarovi_Ukraine_Voznesensk

Partition 3

Asap-Score: 4.000000

Proba: 9.061876e-01

Nbgroups:3

Group[1] n: 11 ;id: 1_Branchiobdella_kozarovi_Ukraine_Lopanj

2_Branchiobdella_kozarovi_Ukraine_lakeTravyanskoye 4_Branchiobdella_kozarovi_Ukraine_Zanki

Branchiobdella_kozarovi_Bezliudivka 8_Branchiobdella_kozarovi_Ukraine_Vorskla

20_Branchiobdella_kozarovi_Ukraine_Zanki2 10_Branchiobdella_kozarovi_RF_Oka

19_Branchiobdella_kozarovi_Ukraine_Martovaya MH351654 MH351653

6_Branchiobdella_kozarovi_Ukraine_Mertvovod

Group[2] n: 2 ;id: 3_Branchiobdella_kozarovi_Ukraine_VilkovoDanube

9_Branchiobdella_kozarovi_Ukraine_YuBugMygiya

Group[3] n: 1 ;id: 10_Branchiobdella_kozarovi_Ukraine_Voznesensk

B. balcanica

Partition 1

Asap-Score: 1.000000

Proba: 6.800000e-02

Nb groups:2

Group[1] n: 1 ;id: B_balcanica_Kolochava

Group[2] n: 7 ;id: FJ655025 7_B_balcanica_Sl_Blos FJ655047 FJ655026 FJ655038 FJ655043 FJ655052

Partition 2

Asap-Score: 2.000000

Proba: 5.029940e-01

Nb groups:4

Group[1] n: 1 ;id: B_balcanica_Kolochava

Group[2] n: 1 ;id: FJ655025

Group[3] n: 1 ;id: 7_B_balcanica_Sl_Blos

Group[4] n: 5 ;id: FJ655047 FJ655026 FJ655038 FJ655043 FJ655052

B. pentadonta

Partition 1

Asap-Score: 4.500000

Proba: 7.345309e-01

Nb groups:6

- Group[1] n: 18 ;id: 6_Branchiobdella_pentadonta_SLO_Hotenka
9_Branchiobdella_pentadonta_SLO_Zaplana 5_Branchiobdella_pentadonta_SLO_Zala
2_Branchiobdella_pentadonta_EMacedonia_Berovo1
3_Branchiobdella_pentadonta_EMacedonia_Berovo2 OM250468 OM250469 OM250470
HA093_B_pentadonta_Poland_ASA_CO1 FJ655027 FJ655066 FJ655060 FJ655023 FJ655037 FJ655035
FJ655065 FJ655055 OM250471
- Group[2] n: 1 ;id: 5_Branchiobdella_pentadonta_BIH_Kladanj
- Group[3] n: 1 ;id: 7_Branchiobdella_pentadonta_SLO_Osilnica
- Group[4] n: 6 ;id: 1_Branchiobdella_pentadonta_SLO_Grivacki_potok 8_B_pentadonta KY775124
KY775125 KY775126 KY775127
- Group[5] n: 2 ;id: KY775123 AF310708
- Group[6] n: 2 ;id: FJ655012 FJ655051

Partition 2

Asap-Score: 4.500000

Proba: 7.804391e-01

Nb groups:5

- Group[1] n: 18 ;id: 6_Branchiobdella_pentadonta_SLO_Hotenka
9_Branchiobdella_pentadonta_SLO_Zaplana 5_Branchiobdella_pentadonta_SLO_Zala
2_Branchiobdella_pentadonta_EMacedonia_Berovo1
3_Branchiobdella_pentadonta_EMacedonia_Berovo2 OM250468 OM250469 OM250470
HA093_B_pentadonta_Poland_ASA_CO1 FJ655027 FJ655066 FJ655060 FJ655023 FJ655037 FJ655035
FJ655065 FJ655055 OM250471
- Group[2] n: 2 ;id: FJ655012 FJ655051
- Group[3] n: 1 ;id: 5_Branchiobdella_pentadonta_BIH_Kladanj
- Group[4] n: 7 ;id: 7_Branchiobdella_pentadonta_SLO_Osilnica
1_Branchiobdella_pentadonta_SLO_Grivacki_potok 8_B_pentadonta KY775124 KY775125 KY775126
KY775127
- Group[5] n: 2 ;id: KY775123 AF310708

Partition 3

Asap-Score: 4.500000

Proba: 8.802395e-01

Nb groups:11

- Group[1] n: 3 ;id: 6_Branchiobdella_pentadonta_SLO_Hotenka
9_Branchiobdella_pentadonta_SLO_Zaplana 5_Branchiobdella_pentadonta_SLO_Zala
- Group[2] n: 1 ;id: 5_Branchiobdella_pentadonta_BIH_Kladanj

Group[3] n: 13 ;id: 2_Branchiobdella_pentadonta_EMacedonia_Berovo1
3_Branchiobdella_pentadonta_EMacedonia_Berovo2 OM250468 OM250469 OM250470
HA093_B_pentadonta_Poland_ASA_CO1 FJ655027 FJ655066 FJ655060 FJ655023 FJ655037 FJ655035
FJ655065
Group[4] n: 1 ;id: 7_Branchiobdella_pentadonta_SLO_Osilnica
Group[5] n: 2 ;id: 1_Branchiobdella_pentadonta_SLO_Grivacki_potok 8_B_pentadonta
Group[6] n: 1 ;id: FJ655055
Group[7] n: 1 ;id: OM250471
Group[8] n: 3 ;id: KY775124 KY775125 KY775126
Group[9] n: 1 ;id: KY775127
Group[10] n: 2 ;id: KY775123 AF310708
Group[11] n: 2 ;id: FJ655012 FJ655051

B. italica

Partition 1

Asap-Score: 1.500000

Proba: 2.395210e-01

Nb groups:6

Group[1] n: 2 ;id: FJ655029 FJ655056
Group[2] n: 13 ;id: KY775116 2_Branchiobdella_italica_HRV_ModroOko KY775115
3_Branchiobdella_italica_SLO_Vipana KY775114 4_Branchiobdella_italica_HRV_Ljuta
1_Branchiobdella_italica_SLO_OsapskaReka 1_Branchiobdella_italica_HRV_Brichana KY775117
KY775118 KY775119 KY775120 KY775121
Group[3] n: 6 ;id: MG244273 MG244274 MG244276 MG244280 MG244281 MG244277
Group[4] n: 12 ;id: FJ655067 FJ655034 FJ655040 FJ655045 FJ655059 FJ655011 FJ655019 FJ655024
FJ655028 FJ655033 FJ655041 FJ655058
Group[5] n: 4 ;id: MG244275 MG244279 MG244278 MG244282
Group[6] n: 2 ;id: FJ655042 FJ655053

Partition 2

Asap-Score: 2.500000

Proba: 6.706587e-01

Nb groups:2

Group[1] n: 2 ;id: FJ655029 FJ655056
Group[2] n: 37 ;id: KY775116 2_Branchiobdella_italica_HRV_ModroOko KY775115
3_Branchiobdella_italica_SLO_Vipana KY775114 4_Branchiobdella_italica_HRV_Ljuta
1_Branchiobdella_italica_SLO_OsapskaReka 1_Branchiobdella_italica_HRV_Brichana KY775117
KY775118 KY775119 KY775120 KY775121 MG244273 MG244274 MG244276 MG244280
MG244281 MG244277 FJ655067 FJ655034 FJ655040 FJ655045 FJ655059 FJ655011 FJ655019
FJ655024 FJ655028 FJ655033 FJ655041 FJ655058 MG244275 MG244279 MG244278 MG244282
FJ655042 FJ655053

Partition 3

Asap-Score: 3.000000

Proba: 3.373253e-01

Nb groups:10

Group[1] n: 2 ;id: FJ655029 FJ655056

Group[2] n: 7 ;id: KY775116 2_Branchiobdella_italica_HRV_ModroOko KY775115

3_Branchiobdella_italica_SLO_Vipana KY775114 4_Branchiobdella_italica_HRV_Ljuta

1_Branchiobdella_italica_SLO_OsapskaReka

Group[3] n: 6 ;id: MG244273 MG244274 MG244276 MG244280 MG244281 MG244277

Group[4] n: 12 ;id: FJ655067 FJ655034 FJ655040 FJ655045 FJ655059 FJ655011 FJ655019 FJ655024

FJ655028 FJ655033 FJ655041 FJ655058

Group[5] n: 2 ;id: MG244275 MG244279

Group[6] n: 2 ;id: MG244278 MG244282

Group[7] n: 2 ;id: FJ655042 FJ655053

Group[8] n: 1 ;id: KY775121

Group[9] n: 1 ;id: 1_Branchiobdella_italica_HRV_Brichana

Group[10] n: 4 ;id: KY775117 KY775118 KY775119 KY775120

B. hexadonta

Partition 1

Asap-Score: 1.000000

Proba: 1.082113e-02

Nb groups:3

Group[1] n: 3 ;id: 2_Branchiobdella_hexadonta_SLO_Bloscica FJ655015 FJ655016

Group[2] n: 4 ;id: FJ655018 FJ655032 FJ655049 FJ655057

Group[3] n: 2 ;id: KY775105 KY775106

Partition 2

Asap-Score: 2.500000

Proba: 1.237525e-01

Nb groups:2

Group[1] n: 3 ;id: 2_Branchiobdella_hexadonta_SLO_Bloscica FJ655015 FJ655016

Group[2] n: 6 ;id: FJ655018 FJ655032 FJ655049 FJ655057 KY775105 KY775106

Partition 3

Asap-Score: 2.500000

Proba: 9.700599e-01

Nb groups:4

Group[1] n: 1 ;id: 2_Branchiobdella_hexadonta_SLO_Bloscica

Group[2] n: 2 ;id: FJ655015 FJ655016
Group[3] n: 4 ;id: FJ655018 FJ655032 FJ655049 FJ655057
Group[4] n: 2 ;id: KY775105 KY775106

B. parasita

Partition 1

Asap-Score: 2.000000

Proba: 7.864271e-01

Nb groups:12

Group[1] n: 1 ;id: AF310707
Group[2] n: 2 ;id: S9_B_parasita_Bloscica2009_CO1 1_Branchiobdella_parasita_SLO_Bolscica
Group[3] n: 3 ;id: KY775113 KY775111 KY775112
Group[4] n: 1 ;id: P5_Branchiobdella_parasita_Kolochava
Group[5] n: 1 ;id: BPP3_UA_DanubeKislica
Group[6] n: 1 ;id: M1_B_parasita_Romania_ASA_CO1
Group[7] n: 1 ;id: KY775107
Group[8] n: 2 ;id: KY775108 KY775109
Group[9] n: 1 ;id: FJ655048
Group[10] n: 1 ;id: 3_Branchiobdella_parasita_MKBerovo
Group[11] n: 1 ;id: FJ655021
Group[12] n: 1 ;id: FJ655062

Partition 2

Asap-Score: 2.500000

Proba: 9.341317e-01

Nb groups:10

Group[1] n: 1 ;id: AF310707
Group[2] n: 2 ;id: S9_B_parasita_Bloscica2009_CO1 1_Branchiobdella_parasita_SLO_Bolscica
Group[3] n: 3 ;id: KY775113 KY775111 KY775112
Group[4] n: 1 ;id: P5_Branchiobdella_parasita_Kolochava
Group[5] n: 1 ;id: BPP3_UA_DanubeKislica
Group[6] n: 2 ;id: M1_B_parasita_Romania_ASA_CO1 FJ655062
Group[7] n: 1 ;id: FJ655021
Group[8] n: 3 ;id: KY775107 KY775108 KY775109
Group[9] n: 1 ;id: FJ655048
Group[10] n: 1 ;id: 3_Branchiobdella_parasita_MKBerovo

Partition 3

Asap-Score: 4.500000

Proba: 9.261477e-01

Nb groups:8

Group[1] n: 1 ;id: AF310707

Group[2] n: 2 ;id: S9_B_parasita_Bloscica2009_CO1 1_Branchiobdella_parasita_SLO_Bolscica

Group[3] n: 3 ;id: KY775113 KY775111 KY775112

Group[4] n: 1 ;id: P5_Branchiobdella_parasita_Kolochava

Group[5] n: 1 ;id: BPP3_UA_DanubeKislica

Group[6] n: 4 ;id: M1_B_parasita_Romania_ASA_CO1 FJ655062 FJ655021

3_Branchiobdella_parasita_MKBerovo

Group[7] n: 1 ;id: FJ655048

Group[8] n: 3 ;id: KY775107 KY775108 KY775109

Додаток 4. Послідовності гену CO1 бранхіобделід, використані в філогенетичному аналізі

№	Вид	Номер послідовності в ГенБанку/номер в колекції Ун-та Любляни
1	<i>Hemiclepsis marginata</i>	M6_Hemiclepsis_PP813626_CO1
2	<i>Branchiobdella hexadonta</i>	2_Branchiobdella_hexadonta_SLO_Bloscica
3	<i>Branchiobdella hexadonta</i>	FJ655015
4	<i>Branchiobdella hexadonta</i>	FJ655016
5	<i>Branchiobdella hexadonta</i>	FJ655063
6	<i>Branchiobdella pentadonta</i>	6_Branchiobdella_pentadonta_SLO_Hotenk
7	<i>Branchiobdella pentadonta</i>	5_Branchiobdella_pentadonta_BIH_Kladanj
8	<i>Branchiobdella pentadonta</i>	FJ655012
9	<i>Branchiobdella pentadonta</i>	FJ655051
10	<i>Branchiobdella pentadonta</i>	FJ655055
11	<i>Branchiobdella pentadonta</i>	OM250471
12	<i>Branchiobdella pentadonta</i>	FJ655065
13	<i>Branchiobdella pentadonta</i>	FJ655023
14	<i>Branchiobdella pentadonta</i>	FJ655035
15	<i>Branchiobdella pentadonta</i>	FJ655037
16	<i>Branchiobdella pentadonta</i>	HA093_B_pentadonta_Poland_ASA_CO1
17	<i>Branchiobdella pentadonta</i>	FJ655027
18	<i>Branchiobdella pentadonta</i>	FJ655060

19	<i>Branchiobdella pentadonta</i>	FJ655066
20	<i>Branchiobdella pentadonta</i>	2_Branchiobdella_pentadonta_EMac_Berov
21	<i>Branchiobdella pentadonta</i>	3_Branchiobdella_pentadonta_EMac_Ber2
22	<i>Branchiobdella pentadonta</i>	OM250468
23	<i>Branchiobdella pentadonta</i>	OM250470
24	<i>Branchiobdella pentadonta</i>	OM250469
25	<i>Branchiobdella pentadonta</i>	5_Branchiobdella_pentadonta_SLO_Zala
26	<i>Branchiobdella pentadonta</i>	9_Branchiobdella_pentadonta_SLO_Zaplan
27	<i>Branchiobdella pentadonta</i>	7_Branchiobdella_pentadonta_SLO_Osilnica
28	<i>Branchiobdella pentadonta</i>	KY775127
29	<i>Branchiobdella pentadonta</i>	1_Branchiobdella_pentadontaSLOGrivpotok
30	<i>Branchiobdella pentadonta</i>	8_B_pentadonta
31	<i>Branchiobdella pentadonta</i>	KY775126
32	<i>Branchiobdella pentadonta</i>	KY775125
33	<i>Branchiobdella pentadonta</i>	KY775124
34	<i>Branchiobdella pentadonta</i>	AF310708
35	<i>Branchiobdella pentadonta</i>	KY775123
36	<i>Branchiobdella pentadonta</i>	FJ655029
37	<i>Branchiobdella pentadonta</i>	FJ655056
38	<i>Branchiobdella pentadonta</i>	HA093_B_pentadonta_Poland_ASA_CO1
39	<i>Branchiobdella italica</i>	KY775116
40	<i>Branchiobdella italica</i>	MG244273
41	<i>Branchiobdella italica</i>	MG244274
42	<i>Branchiobdella italica</i>	MG244276

43	<i>Branchiobdella italica</i>	MG244280
44	<i>Branchiobdella italica</i>	MG244281
45	<i>Branchiobdella italica</i>	MG244277
46	<i>Branchiobdella italica</i>	FJ655067
47	<i>Branchiobdella italica</i>	FJ655034
48	<i>Branchiobdella italica</i>	FJ655040
49	<i>Branchiobdella italica</i>	FJ655045
50	<i>Branchiobdella italica</i>	FJ655059
51	<i>Branchiobdella italica</i>	FJ655041
52	<i>Branchiobdella italica</i>	FJ655058
53	<i>Branchiobdella italica</i>	FJ655011
54	<i>Branchiobdella italica</i>	FJ655019
55	<i>Branchiobdella italica</i>	FJ655024
56	<i>Branchiobdella italica</i>	FJ655028
57	<i>Branchiobdella italica</i>	FJ655033
58	<i>Branchiobdella italica</i>	MG244275
59	<i>Branchiobdella italica</i>	MG244279
60	<i>Branchiobdella italica</i>	MG244278
61	<i>Branchiobdella italica</i>	MG244282
62	<i>Branchiobdella italica</i>	FJ655042
63	<i>Branchiobdella italica</i>	FJ655053
64	<i>Branchiobdella italica</i>	KY775121
65	<i>Branchiobdella italica</i>	1_Branchiobdella_italica_HRV_Brichana
66	<i>Branchiobdella italica</i>	KY775117

67	<i>Branchiobdella italica</i>	KY775118
68	<i>Branchiobdella italica</i>	KY775119
69	<i>Branchiobdella italica</i>	KY775120
70	<i>Branchiobdella italica</i>	2_Branchiobdella_italica_HRV_ModroOko
71	<i>Branchiobdella italica</i>	KY775114
72	<i>Branchiobdella italica</i>	KY775115
73	<i>Branchiobdella italica</i>	3_Branchiobdella_italica_SLO_Vipana
74	<i>Branchiobdella italica</i>	1_Branchiobdella_italica_SLO_OsapskaRek
75	<i>Branchiobdella italica</i>	4_Branchiobdella_italica_HRV_Ljuta
76	<i>Branchiobdella balcanica</i>	B_balcanica_Kolochava
77	<i>Branchiobdella balcanica</i>	FJ655025
78	<i>Branchiobdella balcanica</i>	7_B_balcanica_SI_Blos
79	<i>Branchiobdella balcanica</i>	FJ655047
80	<i>Branchiobdella balcanica</i>	FJ655026
81	<i>Branchiobdella balcanica</i>	FJ655038
82	<i>Branchiobdella balcanica</i>	FJ655043
83	<i>Branchiobdella balcanica</i>	FJ655052
84	<i>Branchiobdella kozarovi</i>	4_Branchiobdella_kozarovi_Ukraine_Zanki
85	<i>Branchiobdella kozarovi</i>	6_Branchiobdella_kozarovi_Ukk_Mertvovod
86	<i>Branchiobdella kozarovi</i>	MH351653
87	<i>Branchiobdella kozarovi</i>	1_Branchiobdella_kozarovi_Ukraine_Lopanj
88	<i>Branchiobdella kozarovi</i>	MH351654
89	<i>Branchiobdella kozarovi</i>	10_Branchiobdella_kozarovi_RF_Oka
90	<i>Branchiobdella kozarovi</i>	20_Branchiobdella_kozarovi_Ukraine_Zanki

91	<i>Branchiobdella kozarovi</i>	19_Branchiobdella_kozarovi_Ukraine_Mart
92	<i>Branchiobdella kozarovi</i>	2_Branchiobdella_kozarovi_Ukraine_Trav
93	<i>Branchiobdella kozarovi</i>	Branchiobdella_kozarovi_Bezliudivka
94	<i>Branchiobdella kozarovi</i>	8_Branchiobdella_kozarovi_Ukraine_Vorskla
95	<i>Branchiobdella kozarovi</i>	10_Branchiobdella_kozarovi_Ukr_Voznes
96	<i>Branchiobdella kozarovi</i>	3_Branchiobdella_kozarovi_Ukr_VilkovoDan
97	<i>Branchiobdella kozarovi</i>	9_Branchiobdella_kozarovi_Ukr_YuBugMygi
98	<i>Branchiobdella hexadonta</i>	FJ655018
99	<i>Branchiobdella hexadonta</i>	FJ655032
100	<i>Branchiobdella hexadonta</i>	FJ655049
101	<i>Branchiobdella hexadonta</i>	FJ655057
102	<i>Branchiobdella hexadonta</i>	KY775105
103	<i>Branchiobdella hexadonta</i>	KY775106
104	<i>Branchiobdella parasita</i>	AF310707
105	<i>Branchiobdella astaci</i>	1_Branchiobdella
106	<i>Branchiobdella astaci</i>	JN204271
107	<i>Branchiobdella astaci</i>	JN204269
108	<i>Branchiobdella parasita</i>	S9_B_parasita_Bloscica2009_CO1
109	<i>Branchiobdella parasita</i>	1_Branchiobdella_parasita_SLO_Bolscica
110	<i>Branchiobdella parasita</i>	KY775113
111	<i>Branchiobdella parasita</i>	KY775111
112	<i>Branchiobdella parasita</i>	KY775112
113	<i>Branchiobdella parasita</i>	P5_Branchiobdella_parasita_Kolochava
114	<i>Branchiobdella parasita</i>	BPP3_UA_DanubeKislica

115	<i>Branchiobdella parasita</i>	M1_B_parasita_Romania_ASA_CO1
116	<i>Branchiobdella parasita</i>	KY775107
117	<i>Branchiobdella parasita</i>	KY775108
118	<i>Branchiobdella parasita</i>	KY775109
119	<i>Branchiobdella parasita</i>	FJ655048
120	<i>Branchiobdella parasita</i>	3_Branchiobdella_parasita_MKBerovo
121	<i>Branchiobdella parasita</i>	FJ655021
122	<i>Branchiobdella parasita</i>	FJ655062
123	<i>Branchiobdella parasita</i>	OM250467
124	<i>Branchiobdella parasita</i>	OR145400
125	<i>Branchiobdella parasita</i>	OR145399
126	<i>Branchiobdella parasita</i>	OR145398
127	<i>Branchiobdella parasita</i>	OR145397
128	<i>Branchiobdella parasita</i>	OR145396
129	<i>Branchiobdella parasita</i>	OR145395
130	<i>Branchiobdella parasita</i>	OR145394
131	<i>Branchiobdella parasita</i>	OR145393
132	<i>Branchiobdella parasita</i>	OR145392
133	<i>Branchiobdella parasita</i>	OR145391
134	<i>Branchiobdella parasita</i>	OR145390
135	<i>Branchiobdella parasita</i>	OR145389
136	<i>Branchiobdella parasita</i>	OR145388
137	<i>Branchiobdella parasita</i>	OR145387
138	<i>Branchiobdella parasita</i>	OR145386

139	<i>Branchiobdella parasita</i>	OR145385
140	<i>Branchiobdella parasita</i>	OR145384
141	<i>Branchiobdella parasita</i>	OR145383
142	<i>Branchiobdella parasita</i>	OR145382
143	<i>Branchiobdella parasita</i>	OR145381
144	<i>Branchiobdella parasita</i>	OR145380
145	<i>Branchiobdella parasita</i>	OR145379
146	<i>Branchiobdella parasita</i>	OR145378
147	<i>Branchiobdella parasita</i>	OR145377
148	<i>Branchiobdella parasita</i>	OR145376
149	<i>Branchiobdella parasita</i>	OR145375
150	<i>Branchiobdella parasita</i>	OR145374
151	<i>Branchiobdella parasita</i>	OR145373
152	<i>Branchiobdella parasita</i>	OR145372
153	<i>Branchiobdella parasita</i>	OR145371
154	<i>Branchiobdella parasita</i>	OR145370
155	<i>Branchiobdella parasita</i>	OR145369
156	<i>Branchiobdella parasita</i>	OR145368
157	<i>Branchiobdella parasita</i>	OR145367
158	<i>Branchiobdella parasita</i>	OR145366
159	<i>Branchiobdella parasita</i>	OR145365
160	<i>Branchiobdella parasita</i>	OR145364
161	<i>Branchiobdella parasita</i>	OR145363
162	<i>Branchiobdella parasita</i>	OR145362

163	<i>Branchiobdella parasita</i>	OR145361
164	<i>Branchiobdella parasita</i>	OR145360

Додаток 5. Послідовності гену 16S бранхіобделід, використані в філогенетичному аналізі

№	Вид	Номер послідовності в ГенБанку/номер в колекції Ун-та Любляни
1	<i>Branchiobdella italica</i>	1r_Branchiobdella_italica_HRV_Brichana
2	<i>Branchiobdella italica</i>	3_Branchiobdella_italica_SLO_Vipana
3	<i>Branchiobdella italica</i>	2r_Branchiobdella_italica_HRV_ModroOko
4	<i>Branchiobdella italica</i>	4r_Branchiobdella_italica_HRV_Ljuta
5	<i>Branchiobdella pentadonta</i>	5_Branchiobdella_pentadonta_BIH_Kladanj
6	<i>Branchiobdella pentadonta</i>	2_Branchiobdella_pentadonta_SLO_Nejica
7	<i>Branchiobdella pentadonta</i>	2_Branchiobdella_pentadonta_EMac_Berovo1
8	<i>Branchiobdella pentadonta</i>	3_Branchiobdella_pentadonta_E.Mac_Berov2
9	<i>Branchiobdella pentadonta</i>	5_Branchiobdella_pentadonta_SLO_Zala_1
10	<i>Branchiobdella pentadonta</i>	6_Branchiobdella_pentadonta_SLO_Hotenka
11	<i>Branchiobdella pentadonta</i>	5_Branchiobdella_pentadonta_SLO_Zaplana
12	<i>Branchiobdella pentadonta</i>	1_Branchiobdella_pentadonta_SLO_Grivac_p
13	<i>Branchiobdella pentadonta</i>	8_Branchiobdella_pentadonta_SLO_Nej_Kupa
14	<i>Branchiobdella pentadonta</i>	7_Branchiobdella_pentadonta_SLO_Osilnica
15	<i>Branchiobdella kozarovi</i>	7_Branchiobdella_kozarovi_Ukraine_Govtnev
16	<i>Branchiobdella kozarovi</i>	11_Branchiobdella_kozarovi_RF_Oka_SH1
17	<i>Branchiobdella kozarovi</i>	2_Branchiobdella_kozarovi_Ukraine_Travyans
18	<i>Branchiobdella kozarovi</i>	6_Branchiobdella_kozarovi_Ukraine_Mertvov
19	<i>Branchiobdella kozarovi</i>	5_Branchiobdella_kozarovi_Ukraine_Martov
20	<i>Branchiobdella kozarovi</i>	6_Branchiobdella_kozarovi_Ukraine_Zanky
21	<i>Branchiobdella kozarovi</i>	3_Branchiobdella_kozarovi_Ukraine_Bezlyud
22	<i>Branchiobdella kozarovi</i>	4_Branchiobdella_kozarovi_Ukraine_Zanki
23	<i>Branchiobdella kozarovi</i>	15_Branchiobdella_kozarovi_RF_Manych2
24	<i>Branchiobdella kozarovi</i>	8_Branchiobdella_kozarovi_Ukraine_Vorskla
25	<i>Branchiobdella kozarovi</i>	13_Branchiobdella_kozarovi_Ukr_DnBugLim
26	<i>Branchiobdella kozarovi</i>	20_Branchiobdella_kozarovi_Ukraine_Rogozy
27	<i>Branchiobdella kozarovi</i>	2_Branchiobdella_kozarovi_Ukraine_SDChug
28	<i>Branchiobdella kozarovi</i>	10_Branchiobdella_kozarovi_Ukraine_Voznes
29	<i>Branchiobdella kozarovi</i>	5_Branchiobdella_kozarovi_Ukraine_Orelj
30	<i>Branchiobdella kozarovi</i>	9_Branchiobdella_kozarovi_Ukr_YuBugMugiy
31	<i>Branchiobdella kozarovi</i>	3_Branchiobdella_kozarovi_Ukraine_VilkDanu

32	<i>Branchiobdella balcanica</i>	5_Branchiobdella_balcanica_UA_Synevir
33	<i>Branchiobdella balcanica</i>	6_Branchiobdella_balcanica_UA_Kolochava
34	<i>Branchiobdella balcanica</i>	5_Branchiobdella_balcanica_SLO_Bloscica
35	<i>Branchiobdella astaci</i>	1_Branchiobdella_astaci_NorthKZT
36	<i>Branchiobdella parasita</i>	7_Branchiobdella_parasita_UA_Tereblya
37	<i>Branchiobdella parasita</i>	10_B_parasita_UA_Ter_SH111
38	<i>Branchiobdella parasita</i>	3_Branchiobdella_parasita_UA_DanubeKislica
39	<i>Branchiobdella parasita</i>	P5_Branchiobdella_parasita_Kolochava
40	<i>Branchiobdella parasita</i>	8_Branchiobdella_parasita_SLO_Glinscic
41	<i>Branchiobdella parasita</i>	8_Branchiobdella_p_MK_Berovo
42	<i>Branchiobdella parasita</i>	9_Branchiobdella_parasita_Serb_Pokl_SH3
43	<i>Branchiobdella parasita</i>	2_Branchiobdella_parasita_EMacedonia
44	<i>Branchiobdella hexadonta</i>	4_Branchiobdella_hexadonta_SLO_Bohinj
45	<i>Xironogiton victoriensis</i>	1_Xvictoriensis_SLO_Maribor
46	<i>Xironogiton victoriensis</i>	2_Xvictoriensis_SLO_Maribor
47	<i>Branchiobdella parasita</i>	HA092_B_parasita_Poland_ASA
48	<i>Branchiobdella pentadonta</i>	HA093_B_pentadonta_Poland_ASA
49	<i>Branchiobdella parasita</i>	M1_B_parasita_Romania_ASA
50	<i>Branchiobdella balcanica</i>	M2_B_balcanica_Romania_ASA
51	<i>Branchiobdella parasita</i>	M3_B_parasita_Romania_AuBhs
52	<i>Branchiobdella parasita</i>	S9_B_parasita_Bloscica2009
53	<i>Branchiobdella kozarovi</i>	MH351638.1_Branchiobdella_cf_kozarovi

Додаток 6. Послідовності гену 28S бранхіобделід, використані в філогенетичному аналізі

№	Вид	Номер послідовності в ГенБанку/номер в колекції Ун-та Любляни
1	<i>Branchiobdella italica</i>	1r_Branchiobdella_italica_HRV_Brichana
2	<i>Branchiobdella italica</i>	3_Branchiobdella_italica_SLO_Vipana
3	<i>Branchiobdella italica</i>	2r_Branchiobdella_italica_HRV_ModroOko
4	<i>Branchiobdella italica</i>	4r_Branchiobdella_italica_HRV_Ljuta
5	<i>Branchiobdella pentadonta</i>	5_Branchiobdella_pentadonta_BIH_Kladanj
6	<i>Branchiobdella pentadonta</i>	2_Branchiobdella_pentadonta_SLO_Nejica
7	<i>Branchiobdella pentadonta</i>	2_Branchiobdella_pentadonta_EMac_Berovo1
8	<i>Branchiobdella pentadonta</i>	5_Branchiobdella_pentadonta_SLO_Zala_1
9	<i>Branchiobdella pentadonta</i>	6_Branchiobdella_pentadonta_SLO_Hotenka
10	<i>Branchiobdella pentadonta</i>	1_Branchiobdella_pentadonta_SLO_Grivac_p
11	<i>Branchiobdella pentadonta</i>	8_Branchiobdella_pentadonta_SLO_Nej2Kupa
12	<i>Branchiobdella pentadonta</i>	7_Branchiobdella_pentadonta_SLO_Osilnica
13	<i>Branchiobdella kozarovi</i>	7_Branchiobdella_kozarovi_Ukraine_Govtneve
14	<i>Branchiobdella kozarovi</i>	11_Branchiobdella_kozarovi_RF_Oka_SH1
15	<i>Branchiobdella kozarovi</i>	2_Branchiobdella_kozarovi_Ukraine_Travyans
16	<i>Branchiobdella kozarovi</i>	6_Branchiobdella_kozarovi_Ukr_Mertvovod
17	<i>Branchiobdella kozarovi</i>	5_Branchiobdella_kozarovi_Ukr_Martovaya
18	<i>Branchiobdella kozarovi</i>	6_Branchiobdella_kozarovi_Ukraine_Zanky
19	<i>Branchiobdella kozarovi</i>	3_Branchiobdella_kozarovi_Ukr_Bezlyudovka
20	<i>Branchiobdella kozarovi</i>	4_Branchiobdella_kozarovi_Ukraine_Zanki
21	<i>Branchiobdella kozarovi</i>	15_Branchiobdella_kozarovi_RF_Manych2
22	<i>Branchiobdella kozarovi</i>	13_Branchiobdella_kozarovi_Ukr_DnBugLima
23	<i>Branchiobdella kozarovi</i>	20_Branchiobdella_kozarovi_Ukr_Rogozyansk
24	<i>Branchiobdella kozarovi</i>	2_Branchiobdella_kozarovi_Ukr_SDChuguev
25	<i>Branchiobdella kozarovi</i>	5_Branchiobdella_kozarovi_Ukraine_Orelj
26	<i>Branchiobdella kozarovi</i>	9_Branchiobdella_kozarovi_Ukr_YuBugMugiya
27	<i>Branchiobdella kozarovi</i>	3_Branchiobdella_kozarovi_Ukr_VilkovoDanub
28	<i>Branchiobdella balcanica</i>	5_Branchiobdella_balcanica_UA_Synevir
29	<i>Branchiobdella balcanica</i>	6_Branchiobdella_balcanica_UA_Kolochava
30	<i>Branchiobdella balcanica</i>	5_Branchiobdella_balcanica_SLO_Bloscica
31	<i>Branchiobdella astaci</i>	1_Branchiobdella_astaci_NorthKZT

32	<i>Branchiobdella parasita</i>	7_Branchiobdella_parasita_UA_Tereblya
33	<i>Branchiobdella parasita</i>	10_B_parasita_UA_Ter_SH111
34	<i>Branchiobdella parasita</i>	3_Branchiobdella_parasita_UA_DanubeKislica
35	<i>Branchiobdella parasita</i>	8_Branchiobdella_parasita_SLO_Glinscic
36	<i>Branchiobdella parasita</i>	8_Branchiobdella_p_MK_Berovo
37	<i>Branchiobdella parasita</i>	9_Branchiobdella_parasita_Serb_Pokl_SH3
38	<i>Branchiobdella parasita</i>	2_Branchiobdella_parasita_EMacedonia
39	<i>Branchiobdella hexadonta</i>	4_Branchiobdella_hexadonta_SLO_Bohinj
40	<i>Xironogiton victoriensis</i>	1_Xvictoriensis_SLO_Maribor
41	<i>Branchiobdella parasita</i>	1_Branchiobdella_parasita_SLO_Bolscica
42	<i>Branchiobdella hexadonta</i>	2_Branchiobdella_hexadonta_SLO_Bloscica
43	<i>Branchiobdella italica</i>	1_Branchiobdella_italica_SLO_OsapskaReka
44	<i>Branchiobdella kozarovi</i>	1_Branchiobdella_kozarovi_Ukraine_Lopanj
45	<i>Branchiobdella parasita</i>	HA092_B_parasita_Poland_ASA
46	<i>Branchiobdella pentadonta</i>	HA093_B_pentadonta_Poland_ASA
47	<i>Branchiobdella parasita</i>	M1_B_parasita_Romania_ASA
48	<i>Branchiobdella balcanica</i>	M2_B_balcanica_Romania_ASA
49	<i>Branchiobdella parasita</i>	S9_B_parasita_Bloscica2009

Додаток 7. Послідовності гену ITS бранхіобделід, використані в філогенетичному аналізі

№	Вид	Номер послідовності в ГенБанку/номер в колекції Ун-та Любляни	
1	<i>Branchiobdella balcanica</i>	A1s-its	BBA 1_UA_Synevir
2	<i>Branchiobdella balcanica</i>	SH15_ITS	B_balcanica_Kolochava_SH15
3	<i>Branchiobdella balcanica</i>	A2s-its	BBA 2_UA_Tereblya
4	<i>Branchiobdella balcanica</i>	A3s-its	BBA 3_SLO_Bolscica
5	<i>Branchiobdella balcanica</i>	SH16_ITS	8_B_balcanica_Sl_Blos_SH16
6	<i>Branchiobdella balcanica</i>	SH17_ITS	7_B_balcanica_Sl_Blos_SH17
7	<i>Branchiobdella italica</i>	C2s-its	BIC 2_HRV_Brichana
8	<i>Branchiobdella italica</i>	C4s-its	BIC 4_HRV_Ljuta
9	<i>Branchiobdella italica</i>	C3s-its	BIC 3_HRV_ModroOko
10	<i>Branchiobdella pentadonta</i>	C5s-its	BIC 5_BIH_Kladanj
11	<i>Branchiobdella pentadonta</i>	C8s-its	BIC 8_MK
12	<i>Branchiobdella pentadonta</i>	NO3s	BNO3_SLO_Nejica
13	<i>Branchiobdella pentadonta</i>	T4s-its	BPT 4_SLO_Osilnica
14	<i>Branchiobdella pentadonta</i>	T5s-its	BPT 5_SLO_Zaplana
15	<i>Branchiobdella pentadonta</i>	T6s-its	BPT 6_SLO_Hotenka
16	<i>Branchiobdella pentadonta</i>	T8s-its	BPT 8_SLO_Nejica
17	<i>Branchiobdella kozarovi</i>	K2s-its	BKK 2_UA_SDChuguev
18	<i>Branchiobdella kozarovi</i>	K4s-its	BKK 4_UA_Lopanj
19	<i>Branchiobdella kozarovi</i>	K9s-its	BKK 9_UA_Zanky
20	<i>Branchiobdella kozarovi</i>	K11s-its	BKK 11_UA_Govtneve

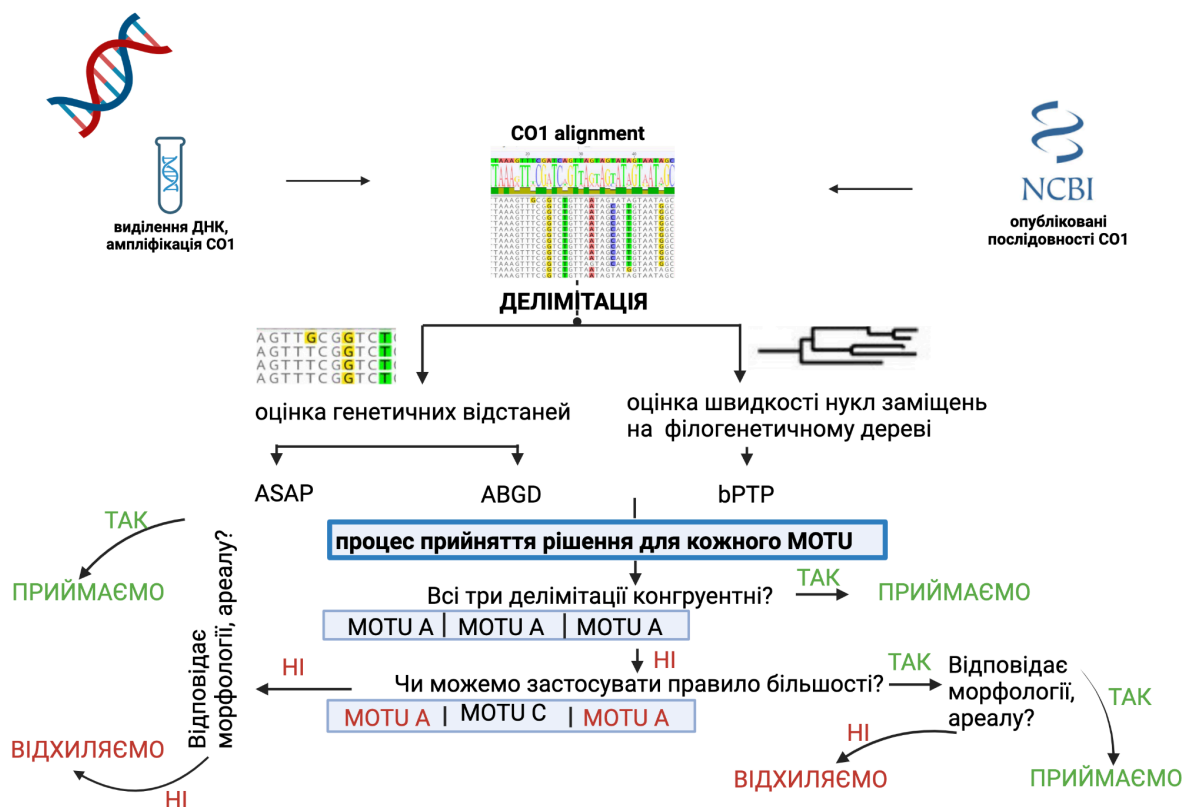
21	<i>Branchiobdella kozarovi</i>	K15s-its	BKK 15_RU_Manych
22	<i>Branchiobdella kozarovi</i>	K12s-its	BKK 12_UA_Pechenegi
23	<i>Branchiobdella kozarovi</i>	SH1_ITS	B_kozarovi_RF_Oka_SH1
24	<i>Branchiobdella kozarovi</i>	K13s-its	BKK 13_UA_DnBugLiman
25	<i>Branchiobdella kozarovi</i>	NO2s-its	BNO2_UA_VilkovoDanube
26	<i>Branchiobdella kozarovi</i>	K7s-its	BKK 7_UA_YuBugMygiya
27	<i>Branchiobdella kozarovi</i>	K5s-its	BKK 5_UA_Orelj
28	<i>Branchiobdella parasita</i>	P1s-its	BPP 1_MK
29	<i>Branchiobdella parasita</i>	P3s-its	BPP 3_UA_DanubeKislica
30	<i>Branchiobdella parasita</i>	P4S-its	BPP 4_UA_DanubeVilkovo
31	<i>Branchiobdella parasita</i>	P7s-its	BPP 7_UA_Tereblya
32	<i>Branchiobdella parasita</i>	SH11_ITS	10_B_parasita_UA_Ter_SH111
33	<i>Branchiobdella parasita</i>	P2s-its	BPP 2_SLO_Bolscica
34	<i>Branchiobdella hexadonta</i>	SH18_ITS	4_B_hexadonta_SL_Blos_SH18
35	<i>Branchiobdella hexadonta</i>	X1s-its	BHX 1_SLO_Zaplana
36	<i>Branchiobdella hexadonta</i>	X4s-its	BHX 4_SLO_Bohinj
37	<i>Xironogiton victoriensis</i>	KY982581	Xironogiton_victoriensis
38	<i>Xironogiton victoriensis</i>	R1s	XVR 1_SLO_Maribor
39	<i>Xironogiton victoriensis</i>	R2s	XVR 2_SLO_Maribor
40	<i>Hirudo orientalis</i>	OP838901	Hirudo_orientalis

Додаток 8. Порівняння методів делімітації видів: ABGD, ASAP, PTP за критеріями надійності, доступності та зручності використання. Методи розмежування таксонів ранжуються від значення “+” (низький) до +++++ (високий). Таблиця модифікована нами за *Nicolas Hubert, 2024*.

	ABGD	ASAP	PTP
Вхідні дані	Вирівнювання послідовності ДНК або матриця генетичної відстані	Вирівнювання послідовності ДНК або матриця генетичної відстані	Філограма
Підтримка	веб-сервер	веб-сервер	веб-сервер/код Python
Надійність	+ Немає оцінки статистичної підтримки схем розподілу та груп	++ Є оцінка статистичної підтримки схем розподілу та груп	+++ Статистична підтримка оцінюється для кожного розділення/вузла в неультраметричному дереві
Доступність	+++ Доступний веб-сервер; код C доступний за запитом	+++ Доступний веб-сервер; код C доступний за запитом	++/+ версія на веб-сервері доступна; вхідні дерев потребують додаткових програм (напр., IQTree, MrBayes, RAxML)
Масштабованість	+++ Простий в обчислюванні; може обробляти великі набори даних	+++ Простий в обчислюванні; може обробляти великі набори даних	+ / ++++ Веб-сервер має обмежені ресурси, тому запуск баєсівської версії є обов'язковим ML версія - у mPTP
Зрозумілість	++++ Метод на основі відстані з зрозумілими аналітичними алгоритмами; підходить для	+++ Метод на основі відстані з зрозумілими аналітичними алгоритмами; підходить для	+ Базові розрахунки нелегко доступні; необхідні знання статистичних розподілів

	початківців	користувачів середнього рівня	ймовірностей; рекомендовано для досвідчених користувачів
Зручність у використанні	+ Немає доступних критеріїв для порівняння альтернативного розподілу	+++ Рішення приймається за зваженим критерієм ASAP score	+++ Рішення приймається за критерієм максимальної ймовірності

Додаток 9. Застосована нами процедура делімітації. Ми об'єднали послідовності COI отримані нами та з GenBank в одне вирівнювання. Використали три методи делімітації: ASAP, ABGD з двома налаштуваннями та PTP, і призначили відповідні статуси MOTU для кожного індивіда.



ШРЕСТХА МАРІЯ ЮРІЇВНА

Результат перевірки підпису

Підпис вірний

П.І.Б.

ШРЕСТХА МАРІЯ ЮРІЇВНА

РНОКПП

3151107326

Організація (установа)

ФІЗИЧНА ОСОБА

Код ЄДРПОУ

Посада

Час підпису (підтверджено кваліфікованою позначкою часу для даних від Надавача)

12:30:20 23.04.2025

Сертифікат виданий

КНЕДП АЦСК АТ КБ "ПРИВАТБАНК"

Серійний номер

5E984D526F82F38F040000009827C60142C53F06

Тип носія особистого ключа

Захищений

Алгоритм підпису

dstu4145

Тип підпису

Кваліфікований

Формат підпису

CAAdES-T

Сертифікат

Кваліфікований