

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
ХАРКІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
імені В.Н. КАРАЗІНА

Біологічний факультет

Кафедра зоології та екології тварин

Кваліфікаційна робота
здобувачки другого (магістерського) рівня вищої освіти
за темою:

**ТАКСОНОМІЯ ТА ФІЛОГЕНЕТИЧНІ ЗВ'ЯЗКИ П'ЯВОК РОДУ
TROCHETA (HIRUDINEA: ERPOBDELLIDAE) З БАСЕЙНІВ ТИСИ
ТА ВЕРХІВ'Я ДНІСТРА**

Спеціальність (спеціалізація) 091 Біологія та біохімія
Освітня програма Біологія

Виконавець:  Аліна Казакова

Науковий керівник:  Сергій Утевський

Харків 2025

АНОТАЦІЯ

Казакова А. А. Таксономія та філогенетичні зв'язки п'явок роду *Trocheta* (Hirudinea: Erpobdellidae) з басейнів Тиси та верхів'я Дністра. – Магістерська робота. – Харківський національний університет імені В. Н. Каразіна, кафедра зоології та екології тварин, Харків, 2025

Магістерська робота викладена на 52 сторінках, що включає в себе наступні розділи: зміст, вступ, основна частина, висновки та список використаної літератури. Дана робота включає 2 таблиці, 15 рисунків, 31 використане джерело та 2 додатка.

Ця робота присвячена вивченню таксономічного положення представників роду *Trocheta* (Hirudinea: Erpobdellidae) з басейну річки Тиси та верхів'я Дністра. Цей рід є одним з найменш досліджених родів глоткових п'явок, щодо якого існують певні суперечності та неточності стосовно його видового складу. Застосування різних методів дослідження, таких як морфологічний та молекулярно-генетичний підходи у межах нашого дослідження дають змогу уточнити таксономічний статус наявних зразків та виявити нові еволюційні лінії у межах роду.

Матеріал для дослідження було взято з колекції кафедри зоології та екології тварин Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна. Зразки були зафіксовані в 96% етанолі, що забезпечує якісне збереження як морфологічних, так і молекулярно-генетичних характеристик.

Морфологічний аналіз включає в себе детальний опис зовнішньої та внутрішньої морфології: кольору, розміру й форми зразків, кільчастості сомітів, будови статеві системи, розташування гонопорів і форми та розмірів атріуму. Для порівняння морфологічних характеристик використовувалися описи та малюнки вже описаних видів, такі як *Trocheta*

cylindrica Örley, 1886 та *Trocheta bykowskii* Gedroyc, 1913. У результаті цих досліджень виявлено, що зразки з Карпатського регіону відрізняються від вже відомих видів за комплексом морфологічних ознак, зокрема за положенням гонопорів та будовою атріуму.

Молекулярно-генетичний аналіз виконувався на основі мітохондріального гена COI (cytochrome c oxidase subunit I). Секвеновані послідовності порівнювалися з опублікованими послідовностями у генетичних базах даних GenBank та BOLD Systems. Для побудови філогенетичних дерев використовували методи Bayesian Inference (MrBayes) та Maximum Likelihood (MEGA12). Делімітацію видів проводили за допомогою алгоритмів ABGD (Automatic Barcode Gap Discovery), ASAP (Assemble Species by Automatic Partitioning), PTP (Poisson Tree Processes model) і GMYC (Generalized Mixed Yule Coalescent).

За результатами цих аналізів можна зробити висновки, що морфологічні характеристики повністю узгоджуються з молекулярними даними. Досліджувані зразки утворюють окрему монофілетичну групу з високою статистичною підтримкою, що має статус виду. Виявлена генетична відстань між досліджуваними кладами перевищує межі внутрішньовидової варіації вже відомих представників роду *Trocheta*, що може розглядатися як наявність окремих еволюційних ліній в межах роду. Досліджені зразки можуть належати до потенційно нового для науки виду.

Отже, на території Карпатського регіону України виявлено потенційно нові таксони роду *Trocheta*, які можуть мати обмежене поширення та бути ендемічними видами для цього регіону. Рекомендується продовжити дослідження представників роду *Trocheta* із використанням географічно ширшої території, додаткових молекулярних маркерів та екологічних даних. Виконання даних рекомендацій дозволить глибше дослідити внутрішньородові зв'язки видів, рівень криптичного різноманіття та еволюційну історію групи.

Наукова новизна роботи полягає у проведенні морфологічно-філогенетичному дослідженні представників роду *Trocheta* з території Карпатського регіону України, яке дозволило уточнити їхній таксономічний статус та дослідити еволюційні зв'язки. Наукове значення роботи безпосередньо полягає у описі потенційно нового виду та дослідженні окремої еволюційної лінії. Практичне значення отриманих результатів полягає в ревізії родини Erpobdellidae, представники якої є важливими компонентами прісноводних екосистем, вдосконаленні визначників п'явок, а також у рекомендаціях для проведення відповідних обліків для підготовки матеріалів для оновленої версії Червоної книги України.

Ключові слова: кільчасті черви, Erpobdellidae, Trocheta, морфологічний опис, систематика, молекулярна філогенетика, таксономія, делімітація видів, Карпати.

ЗМІСТ

АНОТАЦІЯ	2
ВСТУП	6
ОСНОВНА ЧАСТИНА	8
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД І АНАЛІЗ НАУКОВОЇ ЛІТЕРАТУРИ	8
1.1 Основні характеристики п'явок	8
1.2 Історія вивчення видового складу <i>Trocheta</i>	11
1.3 Морфологічний опис представників роду <i>Trocheta</i>	13
1.4 Географічне та екологічне поширення	15
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ	17
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ	21
3.1 Результати	21
3.1.1 Морфологічний аналіз	21
3.1.2 Молекулярний аналіз	24
3.1.2.1 Філогенетичний аналіз	24
3.1.2.2 Делімітація видів	28
3.2 ОБГОВОРЕННЯ	36
ВИСНОВКИ	40
ПЕРЕЛІК ПОСИЛАНЬ	42
ABSTRACT	46
ДОДАТКИ	49

ВСТУП

Фауна Карпат є важливим компонентом фауни України, що характеризується високим рівнем біорізноманіття. Однак наразі біорізноманіття цього регіону залишається недостатньо вивченим, що створює труднощі у формуванні ефективних природоохоронних заходів та глибшого дослідження природних екосистем на цій території.

Особливий інтерес становлять п'явки роду *Trocheta* (Hirudinea: Erpobdellidae), які представляють собою великих за розміром кільчастих червів. Представники цього роду занесені до Червоної книги України переважно як вразливі види. Вони відіграють важливу роль у водних біоценозах, проте їхня таксономія та систематичне положення залишаються недостатньо дослідженими. Незважаючи на проведені раніше дослідження, питання їхнього систематичного статусу, еволюційних зв'язків та чіткої видової ідентифікації залишаються відкритими.

Актуальність цього дослідження зумовлена необхідністю більш детального вивчення карпатського регіону та п'явок роду *Trocheta* в цілому, особливо з огляду на недостатнє знання їхньої таксономії та охоронного статусу інших представників цього роду.

Мета дослідження полягає у визначенні таксономічного статусу карпатських трохет. З огляду на поставлену мету були поставлені завдання 1) з'ясувати поширення представників роду *Trocheta*, 2) вивчити їхню морфологію, 3) провести молекулярні дослідження та визначити їхні філогенетичні зв'язки. Результатом цього дослідження є опис потенційно нового виду трохет, що надає значну наукову новизну цій роботі.

Наукове значення роботи безпосередньо полягає у описі потенційно нового виду та дослідженні окремої еволюційної лінії. З іншого боку, практичне значення цього дослідження полягає в отриманні важливої

інформації, необхідної для охорони нового виду, та збереження біорізноманіття карпатського регіону. Отримані результати можуть бути використані для обґрунтування внесенні виду до Червоної книги України та у програмах моніторингу стану водних екосистем.

ОСНОВНА ЧАСТИНА

РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД І АНАЛІЗ НАУКОВОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1.1 Основні характеристики п'явок

Розмір тіла є характеристикою з великою варіабельністю, навіть в межах одного виду. Цю характеристику можна розділити на три групи: малий, середній та великий розміри тіла. Малий розмір характеризується довжиною від 10 до 15 мм. У той же час у середнього розміру п'явок розмір тіла варіюється від 15 до 50-70 мм. Для великих п'явок цей показник дорівнює від 50-70 до 150 мм та більше [1].

Також не потрібно забувати, що розмір тіла напряму залежить від умов середовища в яких проживає п'явка. Такі фактори як особливість біотопу, кліматичні умови та вік п'явки впливають на те, якого розміру буде п'явка. Спираючись на ці фактори, ми можемо розуміти варіативність розміру тіла нашого об'єкта [1].

Наступною характерною ознакою є форма тіла, яка визначається відношенням довжини до ширини п'явки. Існує дві основні форми: червоподібна та листоподібна форми тіла [1]. Перша характеризується тим, що довжина тіла значно більша за ширину. Це співвідношення довжина/ширина створює форму тіла схожу на черв'яка, від чого пішла назва «червоподібні» [1]. Друга форма тіла – листоподібна, характеризується тим, що довжина не перевищує ширину більш ніж у 2 рази [1]. Інколи це співвідношення є рівним, наприклад, у глосифоніїд. Однією з характерних ознак є сплюснуте тіло, яке спостерігається у більшості п'явок. Але у деяких з них, наприклад, у риб'ячих, спостерігається більш циліндрична форма [1].

Потрібно пам'ятати, що форма тіла п'явки може змінюватись під час руху. Листоподібні п'явки можуть витягуватись, а червоподібні –

звужуватись, що надає хибну думку про їхню форму тіла. Також форма тіла може змінюватись за рахунок фіксації. При сильній фіксації ми маємо шанс спостерігати сильне звужування особини, що надає хибне уявлення про форму тіла певного виду. На форму тіла також може впливати вміст кишківника, що на певний період роздуває досліджуваний об'єкт [1].

Тіло п'явки розділяють на 5 основних областей: голова, преклітеллярний, клітеллярний, постклітеллярний області та хвостова присоска [22].

1. Область переднього присоска характеризується наявністю простоміума, злитих I-VI сомітів та від 1 до 10 пар очей.

2. Преклітеллярна область розташована після області голови та характеризується VII-X (XI) сомітами.

3. Клітеллярна область. В цій області розташовані статеві пори. У статевозрілих особин ця ділянка має помітне набрякання. Утворена XI-XIV сомітами.

4. Постклітеллярна область утворена XV-XXVII сомітами. В останньому соміті можна спостерігати дорсальний анус.

5. Задній присосок утворення злиттям XVIII-XXXIV сомітів.

Ануляція (кільчастість) соміту — одна з основних ознак для ідентифікації родів і видів п'явок. Соміт може бути або гомономний або гетерономний. У першому випадку ми спостерігаємо кільця однакової ширини, тим часом у другому випадку вони можуть бути різної ширини (одні ширші за інші) [22].

Ануляція соміта складається з певної формули, що позначається літерами та цифрами (рис. 1.1). Залежно від порядку кільця використовуються різні буквені позначення: первинні позначаються як a_1 , a_2 , a_3 , вторинні – b_1 , b_2 , b_3 , b_4 і тд, третинні – c_1 , c_2 , c_3 , c_4 тощо, четвертинні – d_1 , d_2 , d_3 , d_4 тощо. Цифрові позначення в цьому випадку символізують положення кільця в соміті [1, 22].

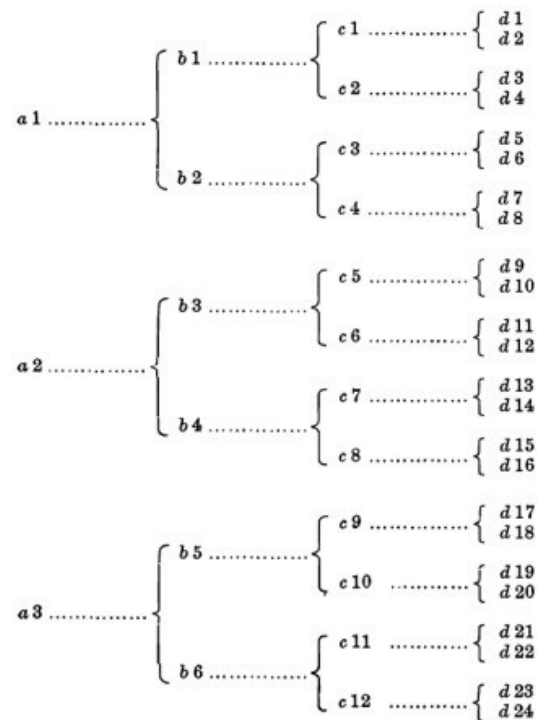


Рис. 1.1. Таблиця розділення кілець на кільця нижчого порядку за Harding & Moore, 1927 [1]

Згідно з теорією трьох кілець, початково соміт п'явок складався лише з трьох кілець, які в подальшому почали диференціюватися (рис. 1.2). Першим кільцем розділилося третє кільце (a_3), що призвело до формування 4-х кільцевого соміту. Після третього кільця підверглося диференціації перше кільце соміта (a_1). В результаті цього процесу у складі соміту спостерігається 5 кілець. Останнім розділилось центральне кільце

(a2), яке виявилось найстійкішим з усіх, що призвело до утворення шестикільечного соміту. Таким чином, кількість кілець у сегменті збільшилася з трьох до шести в результаті диференціювання на основі теорії трьох кілець [1].

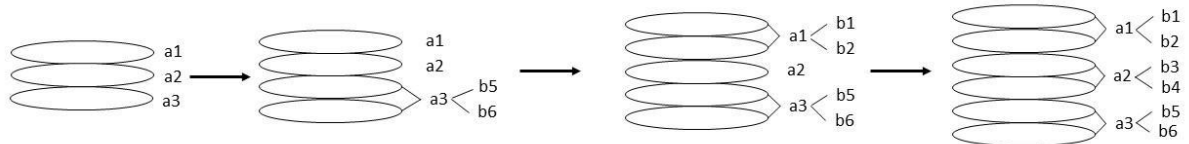


Рис. 1.2. Схематичне зображення ділення кілець

Також потрібно взяти до уваги, що кількість кілець в соміті може варіюватися в залежності від розташування сомітів. Зазвичай передні та задні соміти мають меншу кількість кілець по відношенню до середніх. Тому щоб правильно визначити точну кількість кілець в соміті, потрібно використовувати морфологічні методи дослідження. Одним із таких способів є препарування. Препарування п'явки відбувається таким чином, щоб було видно нервові ганглії та частину кілець. Важливо зазначити, що розташування нервового ганглія відповідає центральному кільцю (a2), що може бути характерною ознакою для правильного визначення кількості кілець в соміті [1].

1.2 Історія вивчення видового складу *Trocheta*

Історія роду *Trocheta* доволі заплутана через брак достатньої кількості досліджень біорізноманіття. Розберемо це на прикладі видів *Trocheta cylindrica* Örley, 1886 та *Trocheta bykowskii* Gedroyc, 1913. Для останнього виду було виокремлено окремий рід *Blanchardia* [10]. Але у 1936 році уявлення про систематичний статус цього роду змінилося і його

синонімізували з родом *Trocheta* [26]. Також через брак досліджень, зокрема морфологічних, великий проміжок часу знахідки представників роду *Trocheta* відносили до двох видів: *Trocheta bykowskii* Gedroyc, 1913 та *Trocheta subviridis* Dutrochet, 1817. Вже з часом появи більшої кількості морфологічних даних, досліджень та описів нових на той час видів, знахідки, які відносили до видів *Trocheta bykowskii* та *Trocheta subviridis* було віднесено до інших видів. Одним з таких видів виявився *Trocheta pseudodina* [22].

У своїх роботах Неземанн описував *T. bykowskii* та *T. cylindrica* як два окремих вида [21]. Згодом він переглянув свої погляди і почав використовувати назву *Trocheta* sp. замість *T. cylindrica* [22]. Через деякий час словацький дослідник В. Кошель висловив свою думку щодо таксономічного статусу цих видів. На думку Кошеля, зразки описані Неземаном все ж таки належать до виду *Trocheta cylindrica*. Про це він вказав в своїй роботі «Taxonomical position of two species of *Trocheta*(Hirudinea) described from Central Europe», що була опублікована у 2004 році. У цій роботі він запропонував синонімізувати види *T. bykowskii* та *T. cylindrica* [18]. Він також виразив свою думку щодо видів яких Неземан називав *Trocheta cylindrica*, а пізніше *Trocheta* sp. Дослідник вважає, що для цього виду краще використовувати назву *Trocheta longiatriata*. Нова назва виду походить від форми чоловічого атріума, який є особливо довгий і тонкий [18]. Але згодом даний вид було синонімізовано з *Trocheta danastrica* [15].

Знахідки, що вважалися *Trocheta cylindrica* зі східної Німеччини [13] з часом віднесли до *Trocheta haskonis*. Даний вид пізніше також спостерігався на території Австрії, Сербії, Боснії та Герцеговині [14, 16]. Через декілька років був описаний ще один новий вид під назвою *Trocheta taunensis* [12], що за морфологією є подібним до *T. cylindrica*.

1.3 Морфологічний опис представників роду *Trocheta*

Представники роду *Trocheta* мають середній та великий розміри тіла [22]. Ідентифікаційною ознакою роду є характерна будова соміта, що представлена семи-одинадцятьма кільцями, де останні три не є рівними по ширині. Ця нерівність пояснюється тим, що останні кільця поділяються на кільця більш нижнього порядку, які у свою чергу відносяться до третинного та четвертинного порядків [1, 22]. Зазначають, що п'явки цього роду ведуть амфібіотичний спосіб життя [1, 9, 22].

Наразі такі види як *Trocheta cylindrica* та *Trocheta bykowskii* вважаються синонімічними. Питання, чи ця синонімізація виправдана і є коректною стосовно цих видів, залишається відкритим. Аналізуючи відповідну літературу, можна дійти висновку, що все ж таки існує певна відмінність між цими видами.

В. Кошель описує *Trocheta cylindrica* як п'явку з довгим тілом, яка у зафіксованому вигляді становить від 95 мм до 116 мм, ширина – 8-10 мм [18]. Форма тіла є стрункою, чітко втиснутою – овальною [18]. Поясок ледь помітний. Забарвлення тіла у живих екземплярів одноколірний коричневий або сіро-коричневий [18]. Поверхня тіла гладка, без сосочків. Гонопори розділені двома кільцями. Атріум короткий, а ріг конічний, чітко вигнутий при погляді збоку [18].

Водночас у оригінальному описі *Trocheta bykowskii* описується як п'явка довжиною 100-140 мм і шириною 6-10 мм, форма тіла якої субциліндричне, звужене спереду [9]. Повний соміт складається з 5 кілець, чотири з яких вужчі, і кожне з них розділене на два кільця другого порядку неглибокою поперечною борозенкою [9]. Третє кільце ширше та розділене на три кільця другого порядку двома неглибокими поперечними борозенками [9]. Чоловічий статевий отвір розташований між 5-м кільцем X соміта та 1-м кільцем XI соміта, жіночий статевий гонопор – між першим та другим кільцем II порядку XI соміту [9]. Спостерігається

наявність восьми очей, розташованих у два поперечні ряди, дуже маленькі та рудиментарні, іноді відсутні або зменшені; у молодих особин вони здаються краще розвиненими [9]. Саме забарвлення особини світло-сіре з виразним жовтуватим або рожевим відтінком, напівпрозорі; крізь шкіру просвічує вся нервова система, гонади тощо [9].

Також важливо звернути увагу на опис *Trocheta bykowskii* Павловського, котрий використовує Лукін в своїх працях [1, 25]. Зазначається, що *T. bykowskii* має довжину 76-150 мм, а ширину близько 5.5-12 мм. За даними Павловського [1, 25], п'явка довжиною в 100 мм мала найбільшу ширину на відстані 80 мм від переднього кінця; ширина околоротового кільця дорівнювала 2.5 мм, а ширина області статевих отворів 5 мм. Тіло дуже подовжене, відношення довжини до ширини тіла дорівнює 1: 14. Передня частина тіла циліндрична [1, 25]. Розмір задньої присоски відносно невеликий, її діаметр трохи менше ширини тіла в області статевих отворів [1, 25]. Чоловічий статевий отвір знаходиться між кільцями b2 та a2 XII соміту. У той час жіночий статевий отвір лежить найчастіше в борозні між кільцями b5 і d21 або рідше в борозні між кільцями d21 і d22 XII соміту [1, 25]. Атріум даного виду великий і займає два малі і одне велике кільце, його роги дуже подовжені і посередині злегка звужені. Семепроводи доходять до кільця a2 XI соміту і загинаються назад під гострими кутами [25].

Павловський характеризує забарвлення *T. bykowskii* як одноманітно сіро-тілесне забарвлення зі бронзовим відтінком. Також зазначається, що даний вид має прозорі зовнішні покриви тіла, внаслідок чого у живої п'явки помітні різні внутрішні органи, такі як нервовий ланцюжок [25].

Павловський у свій час ретельно вивчав склад сомітів виду *Trocheta bykowskii* [25, 27]. За результатами його досліджень тіло п'явки складається з близько 164 кілець, а сам соміт має сім глибоких борозен, що утворює 8 кілець, котрі мають менш виражені борозни та в результаті загальна

кількість кілець соміту дорівнює одинадцять. Дослідник підкреслює, що склад кілець сомітів у різних екземплярів та в різних частинах тіла одного й того ж екземпляра може бути різним. З цієї причини, Павловський запропонував наступний склад сомітів [25]:

- I-III соміти складаються з одного кільця, але інколи можуть складатись і з 2-х кілець;
- IV соміт у своєму складі має три кільця, де останнє кільце є навколоротове;
- V соміт складається з 4-х кілець;
- VI соміт – 5 кілець;
- VII-XXIV соміти у свою сергу є повними, тобто складаються з 11 кілець;
- XXV соміт – 3 кільця;
- XXVI соміт - 2 (або 3) кільця;
- XXVII: 2.

1.4 Географічне та екологічне поширення

Представники роду *Trocheta* поширені в межах палеарктичного біогеографічного регіону, що охоплює територію Європи, Північної Африки і Кавказу [2]. Цей регіон характеризується значним кліматичним і ландшафтним різноманіттям – від арктичних тундр до середземноморських лісів і пустель. Характерною рисою Палеарктичного регіону є чітка сезонність, що впливає на формування біорізноманіття [2].

Досліджувані види мають певні уподобання щодо середовища існування. Наприклад, *Trocheta bykowskii* віддає перевагу фреатичним середовищам існування з температурою води нижче 15°C [21]. Інший автор зазначає, що температура води може коливалася від 11.8 до 18.2°C [24]. Його можна зустріти в джерелах та невеликих струмках у гірських районах

до висоти 1000 м. А також його часто можна зустріти в печерах або підземних місцях існування [21, 24]. Тим часом інші автори зазначають, що даний вид зустрічається у вапняних джерельних водах або в безпосередній близькості від них [1, 9, 24, 25, 27]. П'явки не віддаляються від джерел або залишаються лише у верхів'ях струмків, що з них витікають. Вже під час зміни часів року, а саме настання осені, вони мігрують до джерел, щоб перезимувати [9]. Також спостерігається, що в цей період вони зариваються в землю, де часто продовжують мігрувати у напрямку, протилежному течії води. *Trocheta bykowskii* живиться тубіфіцидами та люмбрицидами, зариваючись у вологий ґрунт [9]. Натомість *Trocheta cylindrica*, згідно з дослідженнями, віддає перевагу рівнинним річкам і струмкам [21].

Варто зазначити, що представлене вище уявлення про екологію обох видів було сформовано ще до їх синонімізації. Наразі *Trocheta bykowskii* та *Trocheta cylindrica* розглядаються як синонімічні види під назвою *Trocheta cylindrica* [18]. Це спричинило певну плутанину в науковій літературі, зокрема в питаннях вивчення ареального поширення виду. На сьогодні *Trocheta cylindrica* (= *Trocheta bykowskii*) зареєстрована на території України [3, 10], Словаччині [18], Угорщині [21], Польщі [6] та Чехії [7].

РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

Екземпляри п'явок були отримані з колекції Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна. Досліджувана особина зібрана зі струмка Ріг (координати: 48°58'02.3"N, 23°01'45.8"E). Крім цього, для аналізу були використані інші зразки з колекції університету. Детальна інформація наведена на етикетках представлена в таблиці 2.1. Усі зразки були зафіксовані в 96% етанолі для подальшого морфологічного та генетичного дослідження.

Таблиця 2.1

Відомості з етикеток колекційних зразків

Назва виду	Місце збору	Збирач	Дата збору
<i>Trocheta</i> sp.	Верхів'я Дністра	В. Дядичко	29.04.2008
<i>Trocheta</i> sp.	Струмок Ріг, Карпати	-	2023 рік

Морфологічні вимірювання виконувалися за допомогою міліметрового паперу та програмного забезпечення AxioVision (Version 4.8 1.0) усі результати подані в міліметрах. Для дослідження морфологічних ознак використовувався біокулярний мікроскоп. Виділення ДНК здійснювалося за стандартним протоколом і проводилося професором кафедри зоології та екології тварин Сергієм Юрійовичем Утевським.

Для молекулярного аналізу використовувалися послідовності маркерного гена COI (cytochrome c oxidase subunit I), отримані як із власних зразків, так і з баз даних GenBank [11] та BOLD Systems [29]. Використані послідовності представлені в додатку 1. Для реконструкції

філогенетичних дерев застосовувалися методи MrBayes та Maximum Likelihood (ML).

Філогенетичний аналіз за методом MrBayes включав такі етапи:

1. Завантаження послідовностей із баз даних і додавання власних послідовностей.
2. Вирівнювання нуклеотидних послідовностей у сервісі MAFFT [17].
3. Створення NEXUS-файлу за допомогою програми Kakusan4 [31].
4. Аналіз у MrBayes [20], зокрема:
 - `execute data.nex` – відкриття вирівняних послідовностей;
 - `mcmc ngen=1000000 samplefreq=100` – запуск аналізу на 1000000 генерацій;
 - `sump burnin=2500` – обчислення параметрів моделі;
 - `sumt burnin=2500` – отримання консенсусного дерева.
5. Візуалізація та редагування отриманих дерев у програмах Figtree та Inkscape.

Філогенетичний аналіз за методом Maximum Likelihood (ML) виконувався за допомогою програмного забезпечення MEGA12 [19] за такою схемою:

1. Завантаження послідовностей і їхнє вирівнювання в MAFFT.
2. Імпорт вирівняних послідовностей у MEGA12 із вибором відповідного генетичного коду для плоских червів.
3. За потреби зміна старт-кодона.
4. Визначення моделі нуклеотидних замін через модуль Find Best DNA/Protein Model.

5. Побудова дерева методом Maximum Likelihood (Phylogeny → Construct/Test Maximum Likelihood Tree) із використанням визначеної моделі.

6. Збереження отриманого дерева та його подальша візуалізація в Figtree та Inkscape.

Для визначення таксономічних одиниць у дослідженні застосовувалися різні методи делімітації видів: ABGD (Automatic Barcode Gap Discovery) [5], ASAP (Assemble Species by Automatic Partitioning) [28], PTP (Poisson Tree Processes model) [4] та GMYC (Generalized Mixed Yule Coalescent) [8].

Метод ABGD [5] дозволяє автоматично розподіляти послідовності на потенційні види на основі аналізу розподілу генетичних відстаней, виявляючи «баркодовий розрив» – різкий перехід між внутрішньовидовими та міжвидовими генетичними відмінностями. ABGD не потребує побудови філогенетичних дерев і є зручним для великих наборів даних, швидко виокремлюючи групи послідовностей, що ймовірно відповідають окремим видам. Метод можна застосовувати без попередньо визначених таксономічних гіпотез, що робить його корисним для аналізу груп із невідомим або спірним видовим складом. У цьому дослідженні аналіз проводився через веб-інтерфейс ABGD (<https://bioinfo.mnhn.fr/abi/public/abgd/>) із використанням стандартних параметрів на основі послідовностей маркерного гену COI.

Метод ASAP [28] реалізує алгоритм ієрархічної кластеризації на основі парних генетичних відстаней між послідовностями, також без необхідності побудови філогенетичних дерев. Він пропонує кілька альтернативних гіпотез поділу послідовностей, ранжованих за системою балів, незалежною від попередніх біологічних припущень щодо внутрішньовидової мінливості. Завдяки цьому ASAP ефективний для дослідження груп організмів із недостатньо вивченою таксономією. У

даній роботі метод застосовувався до послідовностей COI, що дало змогу виокремити та сформулювати попередні гіпотези щодо видового складу.

Для делімітації видів на основі філогенетичного дерева використовувалася РТР-модель [4], яка оцінює число замін між послідовностями й моделює відмінності між внутрішньовидовими та міжвидовими еволюційними процесами. На відміну від методів із пороговими значеннями генетичних відстаней, РТР безпосередньо працює з довжинами гілок дерева. Це дозволяє відокремлювати групи послідовностей, що ймовірно відповідають різним видам, навіть серед близькоспоріднених таксонів. У межах дослідження делімітація проводилася на філогенетичному дереві, побудованому за допомогою MEGA 12

Метод GMYC [8] застосовується для делімітації видів на основі даних одного локусу, аналізуючи часові інтервали між вузлами у філогенетичному дереві. Він поєднує модель, що описує міжвидові процеси дивергенції, та коалесцентну модель, яка відображає внутрішньовидові розгалуження. Визначаючи момент переходу між цими двома режимами, GMYC розмежовує незалежно еволюціонуючі кластери послідовностей, які відповідають потенційним видам. Метод реалізується у варіантах з одним або кількома порогами, що дозволяє враховувати різні сценарії еволюції, та забезпечує статистичну перевірку отриманих результатів. У цьому дослідженні аналіз проводився у середовищі R [30] з використанням пакета splits [8] та ape [23] на основі ультраметричних дерев, отриманих у BEAST2 (Clock Model: Relaxed Clock Log Normal, Priors: Yule Model) для маркерного гену COI. Використаний скрипт представлений у додатку 2.

РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

3.1 Результати

3.1.1 Морфологічний аналіз

Trocheta sp.

Місце збору: Карпати, струмок Ріг, Львівська область (координати: 48°58'02.3"N 23°01'45.8"E)

Зовнішня морфологія. Досліджувана п'явка у живому стані має темно-сірувато-червоний колір тіла з простежувальною полупрозорістю тіла (рис. 3.1). Найдовша частина досліджуваного об'єкта сягає 104 мм, найширша – 7,2 мм, що відповідає великій за розміром п'явці. Поверхня тіла є гладкою, без наявних сосочків (рис. 3.1, 3.2 А). Соміт складається з одинадцяти або семи (чотири з них є подвійними) кілець (рис. 3.2 С).

Формула	соміту	наступна:
$b1(c1+c2)+b2(c3+c4)+a2(b3+b4)+b5(c9+c10)+c11+d23+d24.$		Чоловічий
гонопор		

розташований
в борозні між
кільцями c4 і
b3 XII соміту
(рис. 3.2 В, С).

Жіночий

гонопор

розташований

між кільцями

b5 і c11 XII соміту (рис. 3.2 В, С). Відстань між гонопорами дорівнює двом подвійним кільцям (рис. 3.2 С).

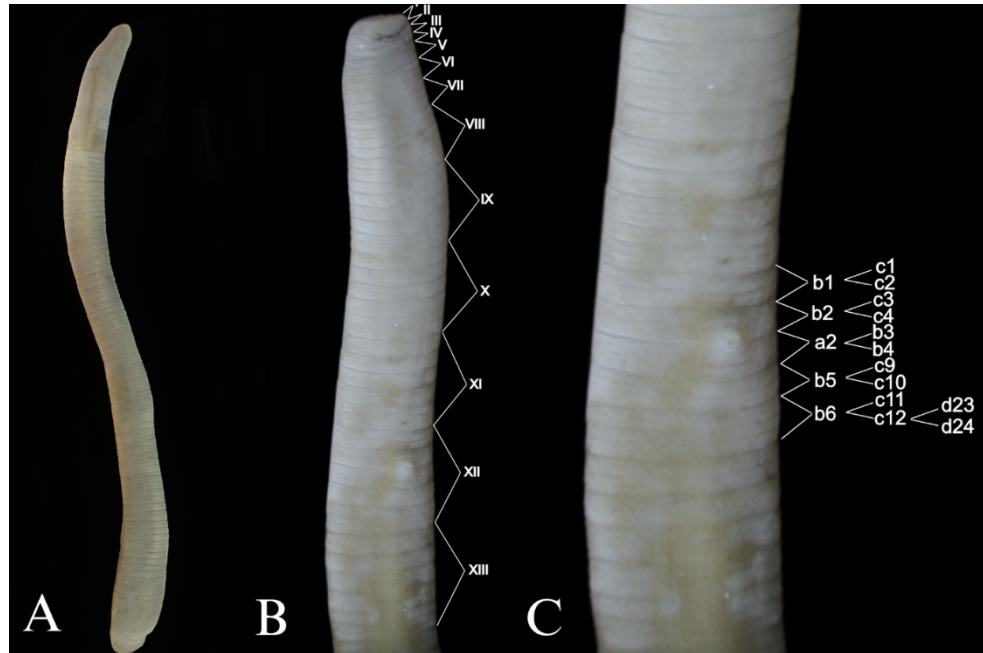


Рис. 3.1. Досліджуваний зразок *Trocheta* sp. зі струмка Ріг, Карпати у живому стані

Рис. 3.2.

Зовнішня
морфологія

Trocheta sp. зі
струмка Ріг. А –
загальний вигляд
п'явки, В –



нумерація сомітів, С – ануляція соміту, пояскова зона з черевної сторони.

Внутрішня морфологія. Атріум відносно тіла невеликий (рис. 3.3 А). Його розмір дорівнює близько 2,19 мм. Спільний відділ атріуму округлий, а роги атріуму видовжені та довгі відносно спільного відділу та розташовані паралельно один до одного (рис 3.3 А, В).

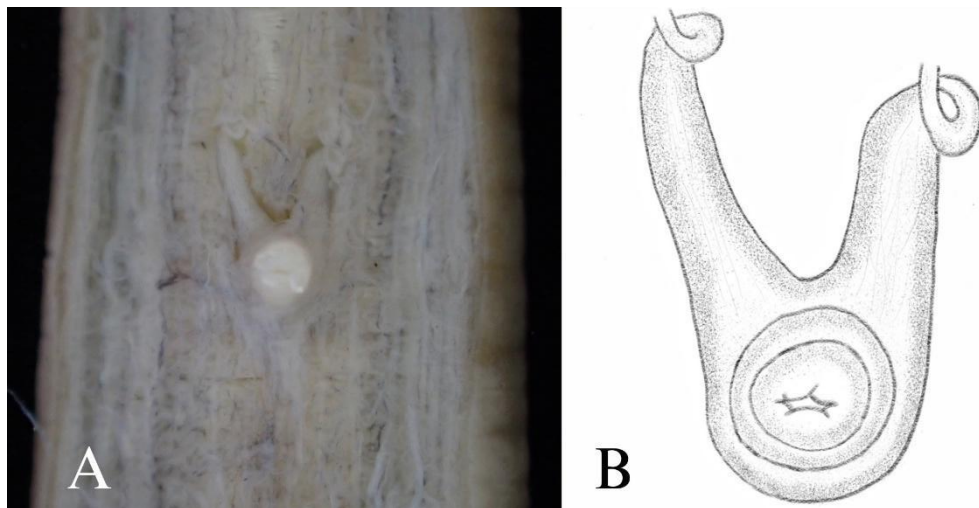


Рис. 3.3. Атріум *Trocheta* sp. зі струмка Ріг. А – загальний вигляд атріума, В – схематичне зображення атріуму

Trocheta sp.

Місце збору: верхів'я Дністра, Львівська область

Зовнішня морфологія. Найдовша частина тіла сягає 65 мм, найширша – 7 мм, що відповідає великій за розміром п'явці. Поверхня тіла є гладкою, без наявних сосочків (рис. 3.4). Соміт складається з одинадцяти або семи (чотири з них є подвійними) кілець (рис. 3.5). Формула соміту наступна: $b1(c1+c2)+b2(c3+c4)+a2(b3+b4)+b5(c9+c10)+c11+d23+d24$. Чоловічий гонопор розташований в борозні між кільцями $c4$ і $b3$ соміту (рис. 3.5 В). Також спостерігається незначне зміщення гонопору на середину кільця $c4$ (рис. 3.5 В). Жіночий гонопор розташований між кільцями $c11$ і $d23$ соміту, що створює відстань між гонопорами у 5 кілець (два повійних кільця та одне кільце потрійного) (рис. 3.5 В).



Рис. 3.4. Зовнішня морфологія *Trocheta* sp. з верхів'я Дністра. А – спинна сторона тіла, В – черевна сторона тіла

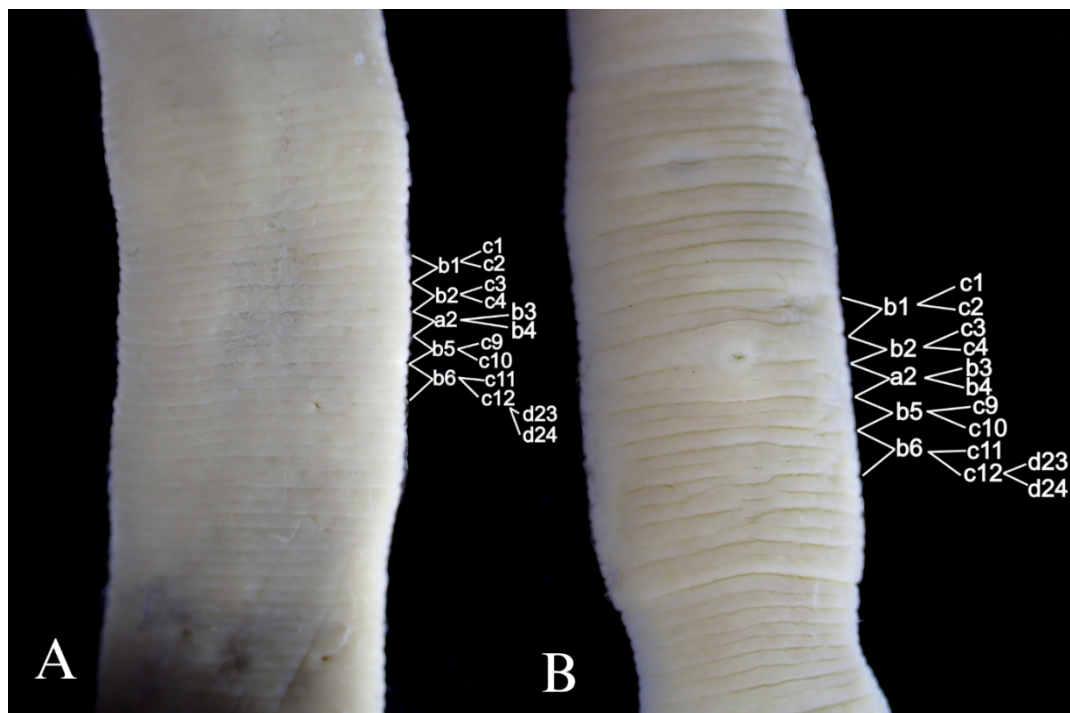


Рис. 3.5. Ануляція соміту *Trocheta* sp. з верхів'я Дністра. А – спинна сторона тіла, В – пояскова сторона з черевної сторони

3.1.2 Молекулярний аналіз

3.1.2.1 Філогенетичний аналіз

У результаті філогенетичного аналізу послідовностей гена *cox1* було побудовано дерево, яке відображає еволюційні взаємозв'язки між досліджуваними та порівняльними зразками. Аналіз проводився з використанням двох підходів – байесівської методології (рис. 3.7) та методу максимальної правдоподібності (рис. 3.8). Оптимальною виявилася модель нуклеотидних замін GTR + G + I (General Time Reversible + Gamma + Invariant sites), яка враховує різні швидкості переходів і трансверсій (GTR), варіацію швидкостей еволюції між сайтами (G) та наявність інваріантних позицій (I) (таблиця 3.1)

Результати аналізу моделей заміщення нуклеотидів методом
максимальної правдоподібності (Maximum Likelihood)

Model	Param	BIC	AICc	lnL
GTR+G+I	141	14764,15107	13566,45122	-6641,67331
TN93+G+I	138	14827,15496	13654,91516	-6688,928493
HKY+G+I	137	14891,84761	13728,09471	-6726,525897
T92+G+I	135	14927,22841	13780,44966	-6754,718458
GTR+I	140	15188,2733	13999,06002	-6858,985504
TN93+I	137	15227,7363	14063,9834	-6894,470242
HKY+I	136	15290,93143	14135,66555	-6931,318888
T92+I	134	15332,86379	14194,57228	-6962,787231
K2+G+I	134	15387,70234	14249,41083	-6990,206506
K2+I	133	15719,09692	14589,29276	-7161,154874
JC+G+I	133	15808,37199	14678,56782	-7205,792406
JC+I	132	16108,38094	14987,06424	-7361,047962
GTR+G	140	16905,83106	15716,61778	-7717,764384
TN93+G	137	17000,00378	15836,25088	-7780,603982
HKY+G	136	17033,70071	15878,43484	-7802,703531
T92+G	134	17106,50254	15968,21103	-7849,606603
K2+G	133	17544,32573	16414,52157	-8073,76928
JC+G	132	18054,54121	16933,22451	-8334,128096
GTR	139	19608,33511	18427,60852	-9074,267491
TN93	136	19812,25779	18656,99191	-9191,982071
HKY	135	19868,90462	18722,12587	-9225,556563
T92	133	19958,27376	18828,46959	-9280,743291
K2	132	20012,07928	18890,76258	-9312,897134
JC	131	20457,65342	19344,82429	-9540,93528

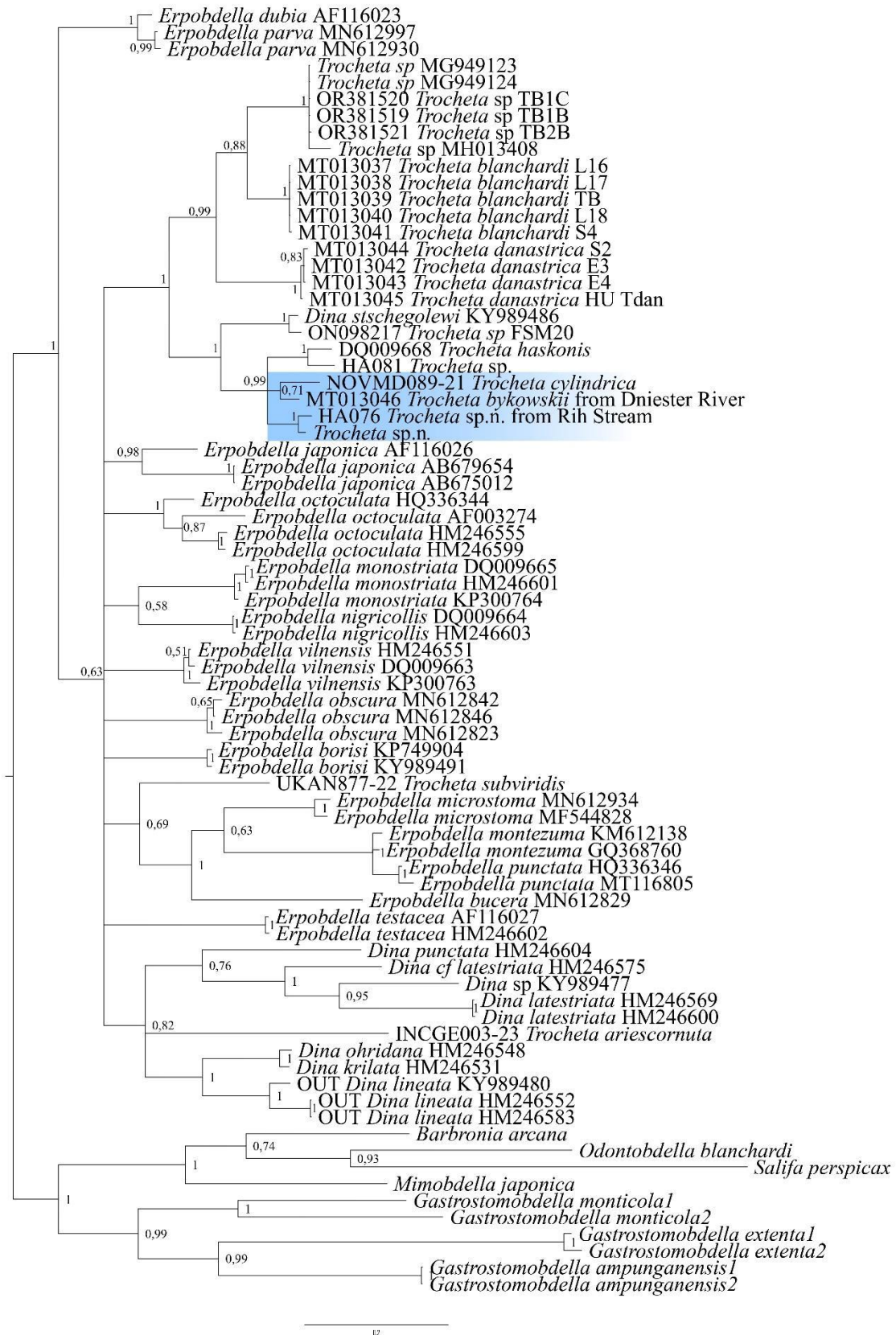


Рис. 3.7. Філогенетичні зв'язки глоткових п'явок родини *Erpobdellidae*, реконструйовані за послідовностями гена *cox1* з

використанням баєсівської методології. Числа на гілках відображають рівень бутстреп-підтримки.

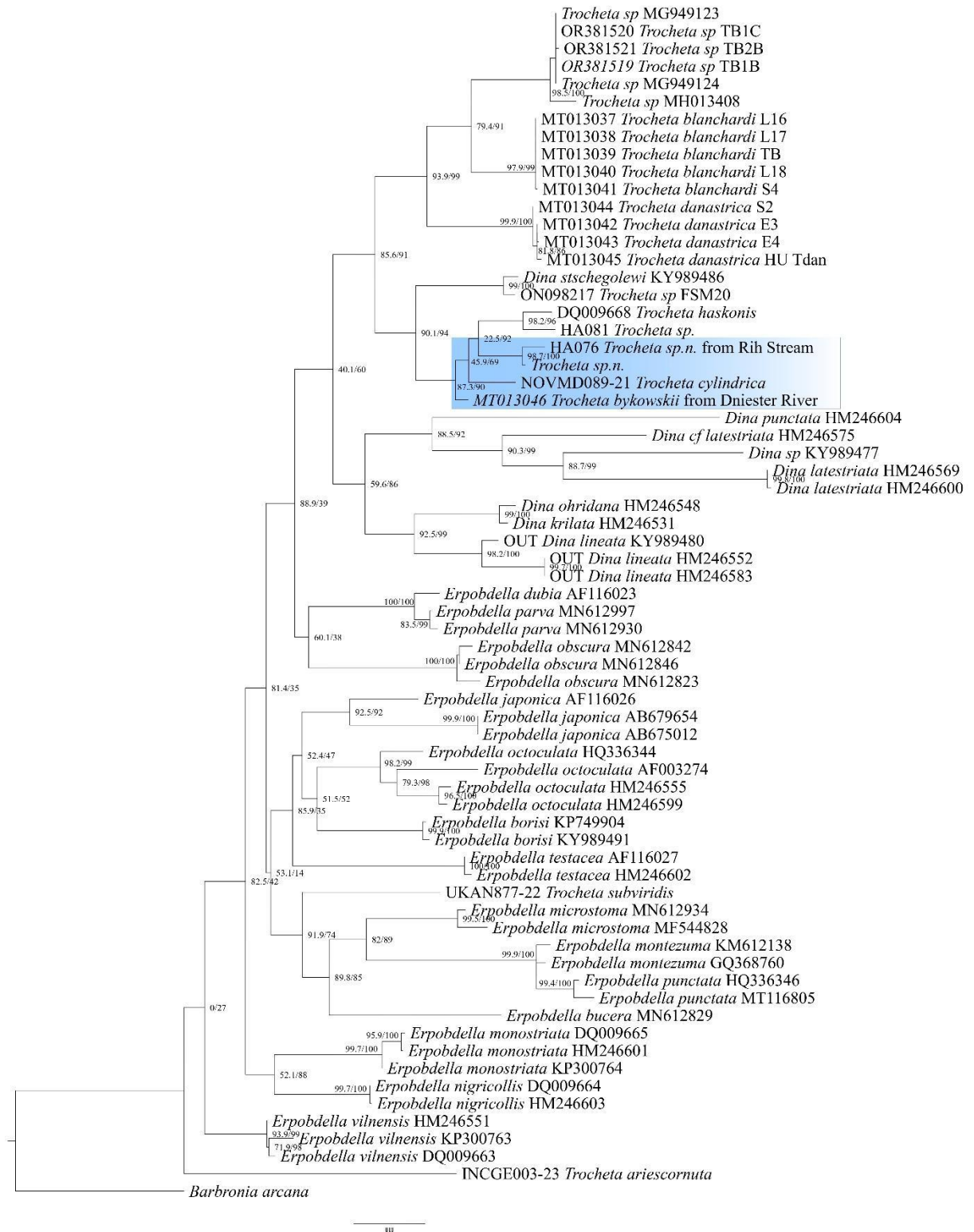


Рис. 3.8. Філогенетичні зв'язки глоткових п'явок родини *Erpobdellidae*, реконструйовані за послідовностями гена *cox1* за методом

максимальної правдоподібності. Числа на гілках відображають рівень бутстреп-підтримки.

Отримані дерева мають подібну топологію та характеризуються високими показниками підтримки. Досліджувані зразки *Trocheta* sp. з Карпат (струмок Ріг) відповідають зразку HA076 *Trocheta* sp.n. from Rih Stream та *Trocheta* sp. з Верхів'я Дністра – MT013046 *Trocheta bykowskii* from Dniester River . Вони формують спільну монофілетичну кладу з високою статистичною підтримкою (posterior probability / bootstrap ≈ 0.99) (рис 3.7, 3.8). При цьому HA076 *Trocheta* sp.n. from Rih Stream групується зі іншим зразком *Trocheta* sp.n. з Карпат, що свідчить про їхню генетичну спорідненість та спільне географічне походження (рис 3.7, 3.8). Натомість MT013046 *Trocheta bykowskii* from Dniester River займає сестринське положення відносно цієї пари, залишаючись у складі тієї ж монофілетичної гілки, що вказує на спільне походження, але й демонструє певну генетичну диференціацію (рис 3.7, 3.8).

3.1.2.2 Делімітація видів

Делімітація видів проводилась кількома методами, першим з яких був Automatic Barcode Gap Discovery (ABGD), котрий ґрунтується на пошуку розриву між внутрішньою видовою та міжвидовою дивергенцією, так званого barcoding gap. Розрахунок парних відстаней здійснювався із використанням кількох моделей: Kimura (K80), Simple Distance (p-distance) та Jukes-Cantor (JK69), що дало змогу перевірити, чи є отримані результати сталими незалежно від вибору моделі. У ході аналізу були отримані гістограми розподілу відстаней та кумулятивні криві для різних значень відносної ширини розриву X , а саме $X = 0,5; 1; 1,5$ (рис. 3.9). Усі результати мали схожий вигляд: гістограма характеризувалася наявністю одного

вираженого піку, а кумулятивна крива зростала плавно, із невеликими «зламами» у ділянках, що відповідають можливому *barcode gap*. (рис. 3.9)

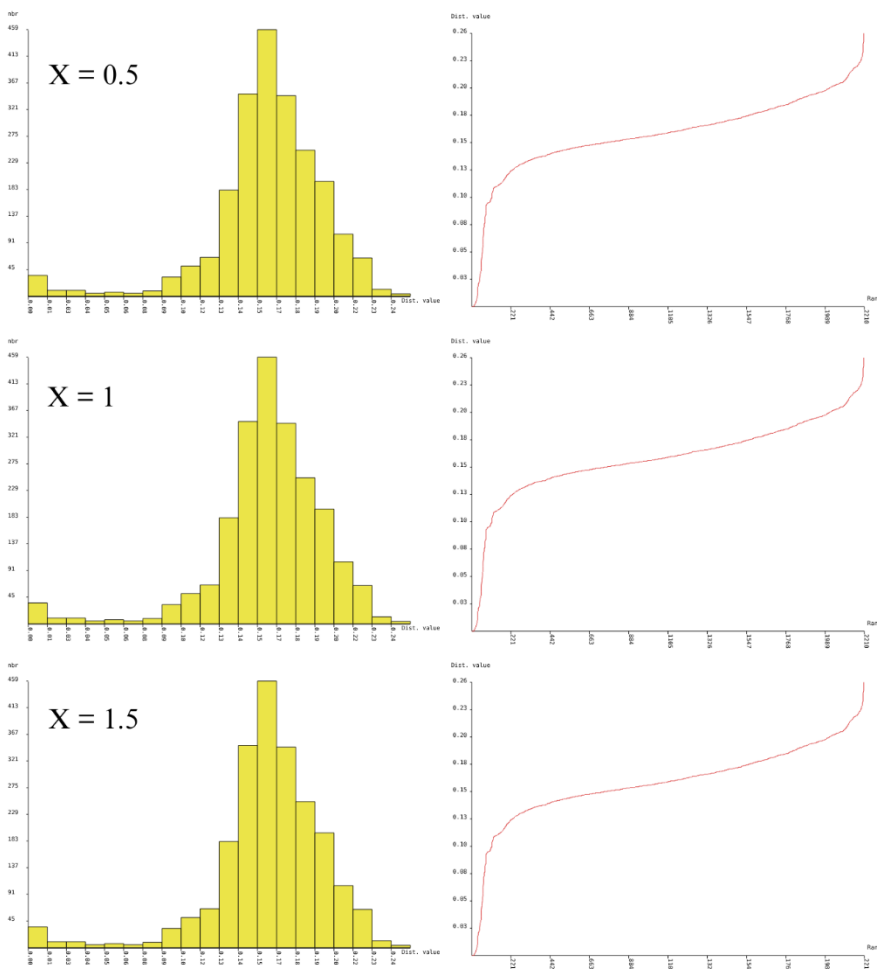


Рис. 3.9. Гістограма розподілу парних відстаней та кумулятивна крива, отримані методом ABGD (Automatic Barcode Gap Discovery)

Алгоритм ABGD формує два типи групувань: початкове та рекурсивне (рис. 3.10). Перше (початкове) угруповання є базовим розбиттям даних на основі групи, де наявний *barcode gap*. Тоді як рекурсивне угруповання є додатковим розбиттям даних на «додаткові» групи знаходячи внутрішні *barcode gaps*. У нашому випадку початкове групування виділило 33 групи, тоді як рекурсивне групування виявило 34 групи (рис. 3.10). Варто зазначити, що результати виявилися стабільними незалежно від моделі відстаней (K80, p-distance, JK69) та від значень

параметра X . Якщо звернути увагу на кластеризацію зразків, можна помітити, що досліджувані зразки не утворили єдиної групи. Послідовність, що відповідає зразку з верхів'я Дністра, відокремилась в окрему групу від послідовностей, що відповідають зразку зі струмка Ріг. Дана кластеризація спостерігається при використанні всіх моделей та всіх параметрів відносної ширини розриву

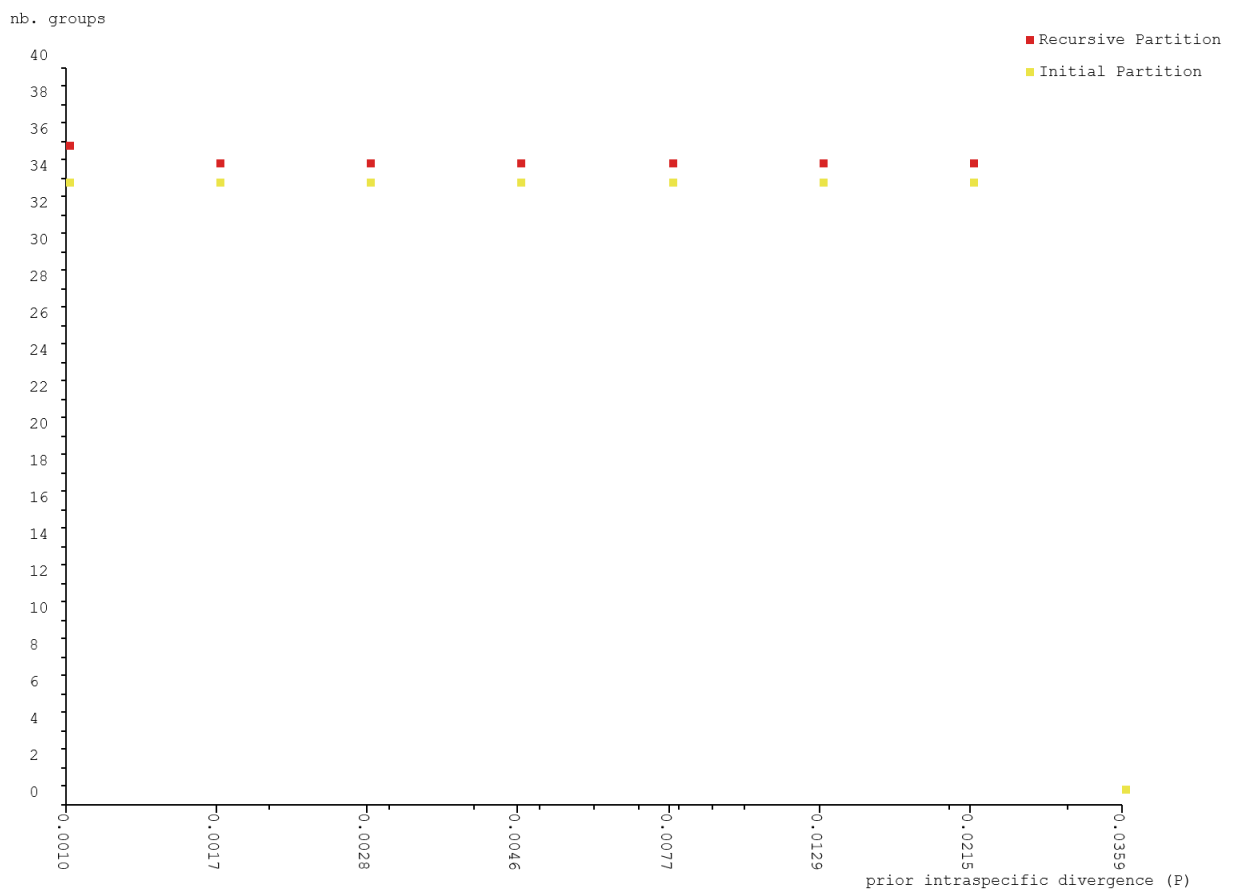


Рис. 3.10. Результати делімітації видів методом ABGD: початкове та рекурсивне групування послідовностей.

Наступним методом делімітації видів було використано алгоритм ASAP (Assemble Species by Automatic Partitioning). У результаті отримано гістограми розподілу парних відстаней та кумулятивні криві (рис. 3.11), які демонструють подібний патерн до результатів методу ABGD (рис. 3.9).

Зокрема, гістограма характеризувалася наявністю одного вираженого піку на відстані приблизно 0,15–0,16, що відповідає міжвидовій дивергенції, тоді як кумулятивна крива зростала плавно, із невеликими «зламами» у ділянках, що відповідають можливому barcode gap (рис. 3.11). Виявлений подібний патерн, який повністю узгоджується з результатами, отриманими методом ABGD, додатково підтверджує стабільність спостережуваних результатів.

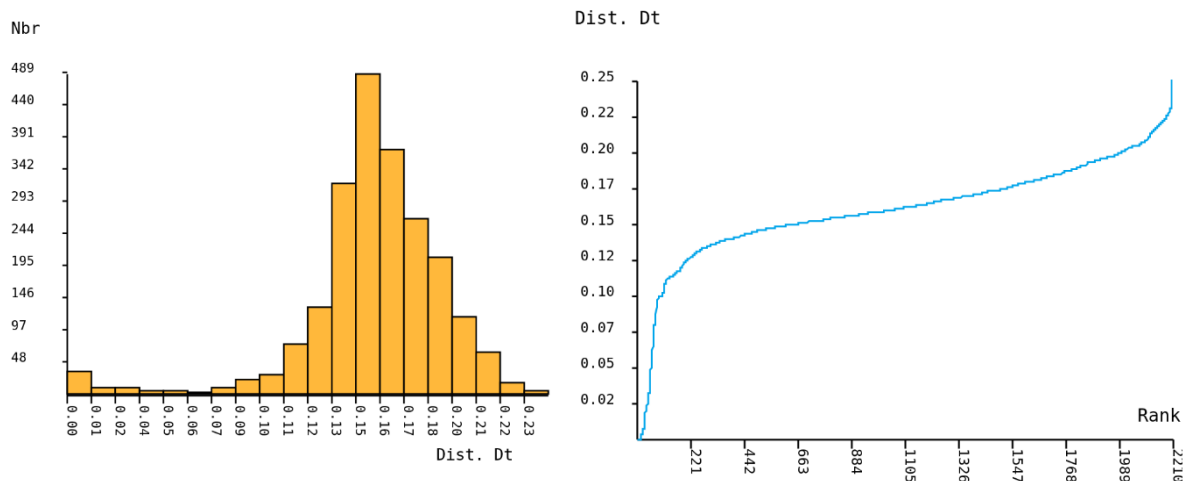


Рис. 3.11. Гістограма розподілу парних відстаней та кумулятивна крива, отримані методом ASAP (Assemble Species by Automatic Partitioning).

ASAP-алгоритм згенерував кілька альтернативних варіантів групування зразків (рис. 3.12). Варіант із найнижчим показником ASAP-score (ASAP-score = 7) передбачає поділ на 30 груп, тоді як інший варіант (ASAP-score = 8,5) — на 37 груп (рис. 3.12). Алгоритм також сформував інші рішення, що поділяють зразки на 27–45 груп (рис. 3.12). Незважаючи на певні відмінності у числі кластерів між різними

ранжованими рішеннями, загальна структура угруповань залишалася подібною (рис. 3.12).

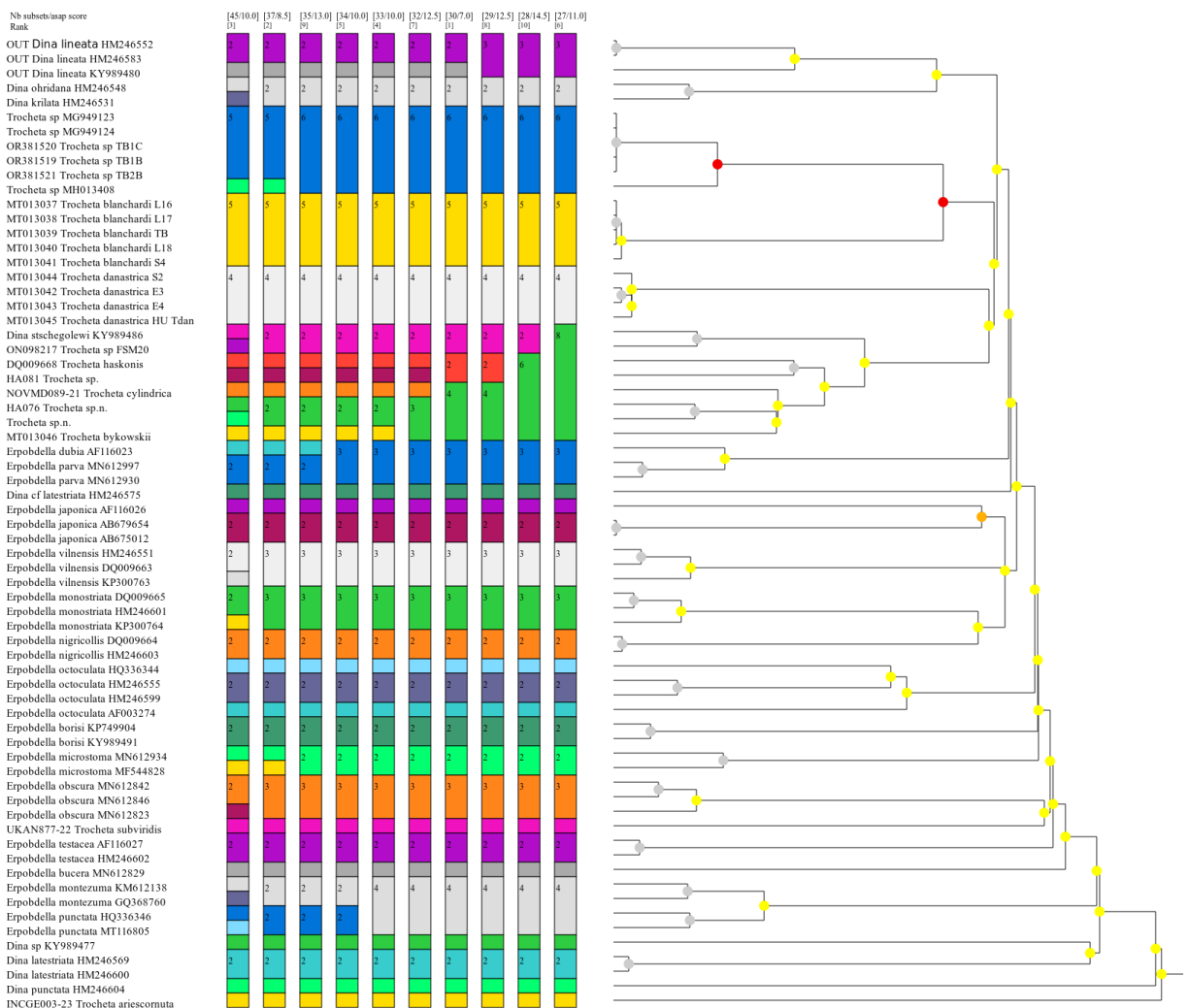


Рис. 3.12. Варіанти кластеризації послідовностей та графік ASAP-score, отримані методом ASAP (Assemble Species by Automatic Partitioning).

Отримані результати демонструють структуру взаємозв'язків між досліджуваними зразками та дозволяють простежити їхнє генетичне розмежування. Зокрема, зразок зі струмка Ріг (HA076 *Trocheta* sp.n. from Rih Stream) та зразок із верхів'я Дністра (MT013046 *Trocheta bykowskii* from Dniester River) формують групи, що чітко виокремлюються у межах

аналізу (рис. 3.12). Така картина свідчить про наявність значної генетичної відмінності між цими зразками, яка виходить за межі внутрішньовидової мінливості.

Розподіли, згенеровані алгоритмом PTP із використанням критерію максимальної правдоподібності (ML) та критерію Баєса (Bayes), виявили відповідно 34 та 35 кластерів (рис. 3.13). Загалом обидва підходи продемонстрували подібну структуру угруповань, що добре узгоджується з результатами інших методів делімітації, зокрема ABGD та ASAP.

Досліджувані зразки HA076 *Trocheta* sp.n. from Rih Stream та MT013046 *Trocheta bykowskii* from Dniester River виділились у різні кластери: зразки HA076 *Trocheta* sp.n. from Rih Stream та *Trocheta* sp.n. увійшли до 31 кластеру (support = 0,725), тоді як MT013046 *Trocheta bykowskii* from Dniester River сформував окремий 29 кластер (support = 0,919) (рис. 3.13). Така структура демонструє чітке генетичне розмежування між досліджуваними зразками, підкреслюючи наявність значної генетичної відмінності та потенційний видовий статус окремих груп. Високі значення support для цих кластерів підтверджують надійність виділення груп та стабільність отриманих результатів.

Аналіз GMYC (General Mixed Yule-Coalescent), виконаний на основі ультратрихного дерева (рис. 3.14), виявив чітку структуру генетичного різноманіття серед досліджуваних зразків. Згідно з результатами, було визначено 21 ML-кластер (95% CI: 5–22) та 33 генетичні лінії всередині кластерів (95% CI: 29–61). Такий поділ відображає високу ступінь генетичної диференціації та вказує на потенційну складність видового складу досліджуваної групи.

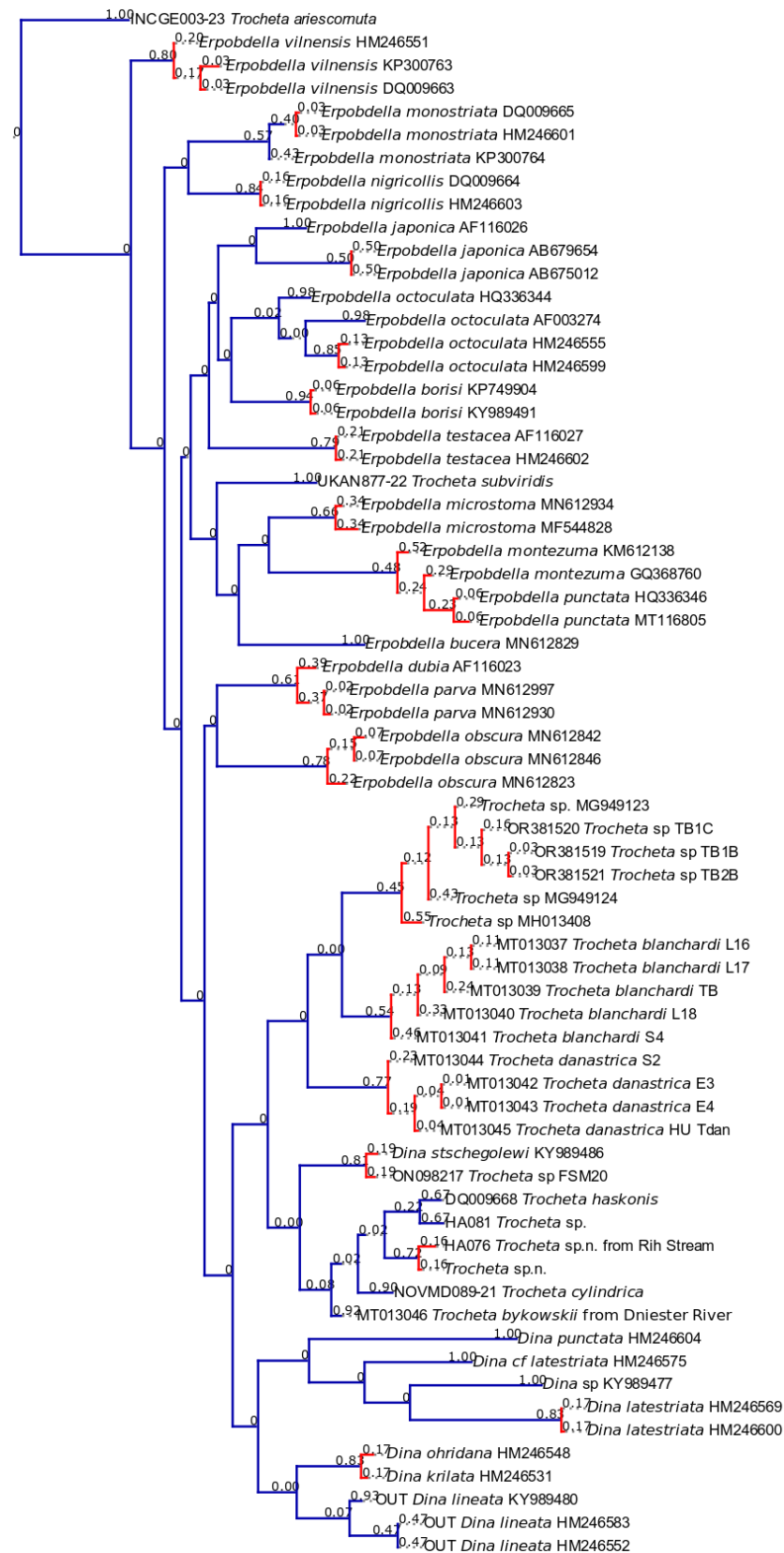


Рис. 3.13. Розподіл кластерів, виявлений методом РТР (Poisson Tree Processes) із використанням критеріїв максимальної правдоподібності (ML) та Баєса.

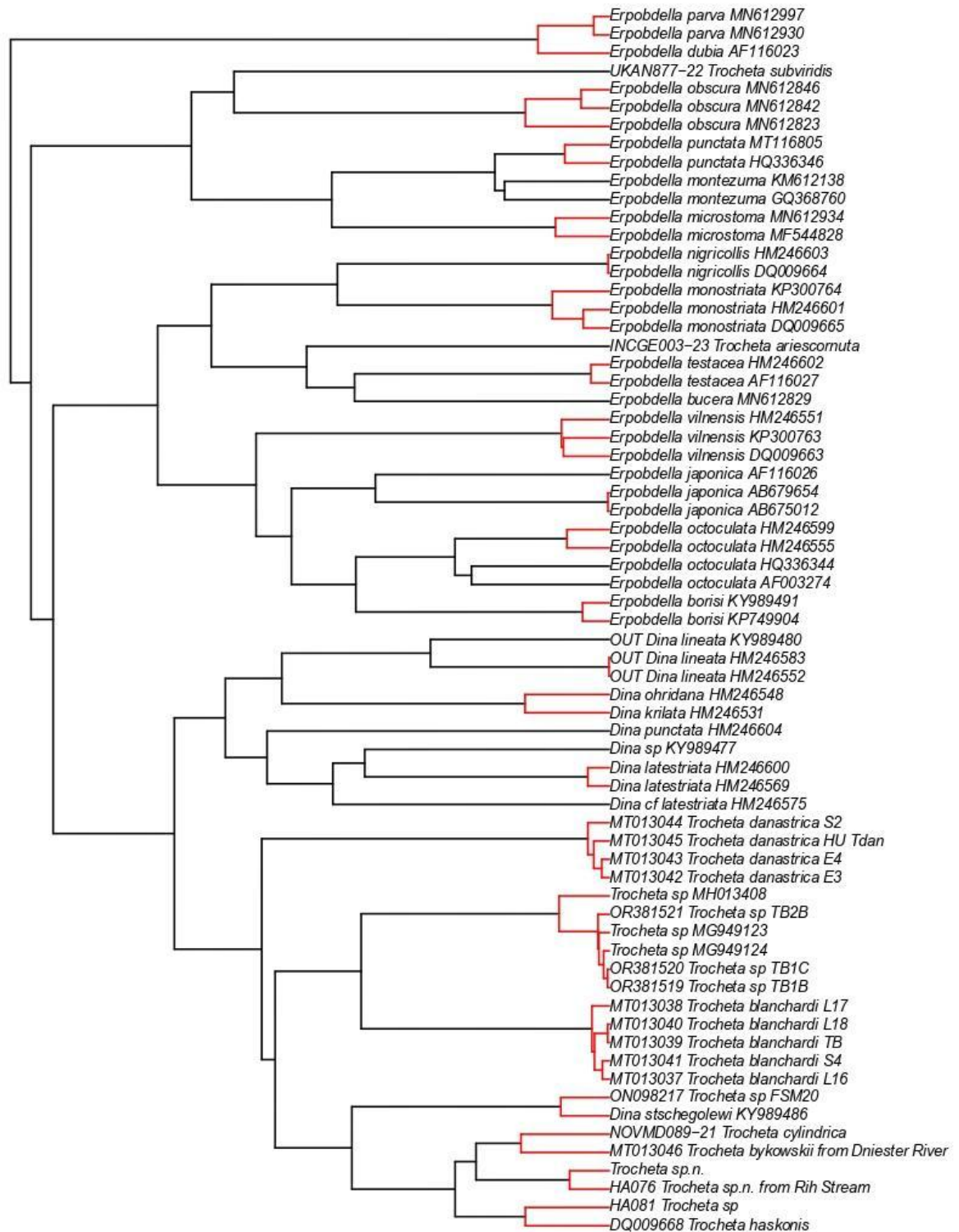


Рис. 3.14. Результати аналізу GMYC (General Mixed Yule-Coalescent), виконаного на основі ультратрихного дерева.

Серед проаналізованих зразків HA076 *Trocheta sp.n.* from Rih Stream та *Trocheta sp.n.* були об'єднані в один кластер GMYC, що свідчить про їхню близьку генетичну спорідненість (рис. 3.14). Натомість MT013046 *Trocheta bykowskii* from Dniester River утворив окремий кластер разом із NOVMD089-21 *Trocheta cylindrica*, що вказує на наявність відмінностей від HA076 *Trocheta sp.n.* from Rih Stream (рис. 3.14). Подібні результати підкреслюють генетичне розмежування між зразками та можуть свідчити про можливі відмінності у видовому статусі.

3.2 ОБГОВОРЕННЯ

Упродовж нашого дослідження було комплексно проаналізовано морфологічні та генетичні особливості обох зразків глоткових п'явок роду *Trocheta* (Hirudinea: Erpobdellidae). Морфологічний аналіз виявив, що зразки характеризуються значними розмірами тіла. Особина зі струмка Ріг досягає довжини 104 мм, тоді як п'явка з верхів'я Дністра – 65 мм. Незважаючи на різницю у довжині, зразки можна віднести до великих за розміром представників. Спільною ознакою є гладка поверхня тіла без наявних сосочків (рис. 3.2 А, 3.4). Крім того, обидва зразки мають однакову формулу соміту:

$b1(c1+c2)+b2(c3+c4)+a2(b3+b4)+b5(c9+c10)+c11+d23+d24$ (рис. 3.2 С, 3.5)

Основні відмінності проявляються у локалізації жіночого гонопору та, відповідно, у відстані між статевими отворами. У зразка зі струмка Ріг чоловічий гонопор розташований між кільцями c4 і b3 XII соміту, а жіночий — між кільцями b5 і c11, що визначає відстань між ними у чотири кільця (два подвійні кільця) (рис. 3.2 С). У зразка з верхів'я Дністра

чоловічий гонопор має аналогічне розташування (між c4 і b3), проте жіночий знаходиться дистальніше — між кільцями c11 і d23 (рис. 3.5 В). У цьому випадку відстань між гонопорами становить п'ять кілець (два подвійні та одне потрійного кільця) (рис. 3.5).

При порівнянні отриманих результатів із літературними даними необхідно враховувати наявні таксономічні відмінності. Павловський, описуючи *Trocheta bykowskii* [1], ймовірно припустився помилки, оскільки його опис не відповідає оригінальному опису, зробленому Гедройцем. Варто зауважити, що Гедройць у своїй роботі надав лише поверхневий опис *T. bykowskii*, обмежившись зовнішніми ознаками та не розглянувши внутрішню морфологію [9]. Ця неповнота опису призвела до подальших неточностей та хибних висновків інших дослідників, які спиралися на роботи Павловського. Як результат на сьогодні немає впевненості, що Павловський працював із тим самим видом, який описав Гедройць. Виходячи з цього, можна припустити, що висновки Кошеля про необхідність синонімізації *Trocheta bykowskii* та *Trocheta cylindrica* можуть бути помилковими через початкову помилку Павловського [18]. Це питання, безумовно, потребує додаткових досліджень і ретельного перегляду таксономічних інтерпретацій.

Таким чином, отримані нами результати морфологічного аналізу демонструють чіткі відмінності, що не узгоджуються ні з описом Гедройця, ні з роботами Павловського, ні з доповненнями Кошеля. Досліджувані нами види морфологічно не являються *Trocheta cylindrica* у розумінні Кошеля [18], і не являються *Trocheta bykowskii* в розуміннях Гедройця та Павловського [1, 9]. Спираючись на морфологічний аналіз, можемо дійти до висновку, що досліджувані об'єкти є неописаними видами і наразі немає підстав вважати інакше.

Генетичний аналіз на основі послідовностей мітохондріального гена *cox1* дозволив виявити еволюційні зв'язки між досліджуваними зразками *Trocheta* sp. та іншими представниками родини *Erpobdellidae*. Побудовані філогенетичні дерева із використанням методу максимальної правдоподібності (Maximum Likelihood) та баєсівської методології (рис. 3.7, 3.8) продемонстрували стабільну топологію та високі значення підтримки (posterior probability / bootstrap ≈ 0.99), що підтверджує надійність отриманих результатів. Усі варіанти дерев виділили монофілетичну гілку, в яку увійшли обидві досліджувані послідовності, що свідчить про їхню близьку спорідненість (рис. 3.7, 3.8). Проте вже всередині цієї гілки спостерігається чітке розділення: зразок зі струмка Ріг групується з іншими послідовностями, що були зібрані на території українських Карпат, тоді як зразок із верхів'я Дністра об'єднується з іншим зразком із Козари, Боснія і Герцеговина (рис. 3.7, 3.8). Таким чином, хоча обидва зразки й формують спільну кладу, вони розташовуються у різних її відгалуженнях, що свідчить про їхню генетичну диференціацію.

Для уточнення таксономічного статусу досліджуваних зразків було застосовано декілька незалежних методів делімітації видів, а саме ABGD, ASAP, PTP та GMYC. Всі вони узгоджено підтвердили, що досліджувані послідовності не утворюють єдиної класи, а відокремлюються у різні групи. Зокрема, метод ABGD показав виразне відокремлення послідовності зі струмка Ріг від послідовності з верхів'я Дністра: перша групується з послідовностями *Trocheta cylindrica* з Карпат, тоді як друга формує окремий кластер. Аналогічний результат продемонстрував і алгоритм ASAP, який незалежно від варіацій ASAP-score виявляв наявність відокремлених кластерів, що свідчить про стабільність спостережуваного розподілу (рис. 3.11, 3.12). Подібні тенденції підтверджує і метод PTP, який виділив обидва зразки у різні кластери з високими значеннями підтримки (support > 0,7), що робить результат статистично достовірним (рис. 3.13).

Безпосередньо аналіз GMYC виявив складну внутрішню структуру генетичного різноманіття та показав, що обидва зразки належать до різних кластерів, кожен із яких може розглядатися як окремий вид (3.14).

І морфологічний, і генетичний аналізи узгоджено вказують на те, що досліджувані зразки не належать до вже відомих таксонів роду *Trocheta*, а представляють собою різні, раніше неописані види. Морфологічні особливості, зокрема відмінності у положенні жіночого гонопора та відстані між статевими отворами, підтверджують їхню видову відмінність. У свою чергу, генетичний аналіз демонструє чітке розділення досліджуваних послідовностей у межах спільної монофілетичної клади та підтверджує їхнє відокремлення різними методами делімітації видів. Узгодженість результатів обох підходів дозволяє з високою впевненістю зробити висновок, що кожен із досліджуваних зразків є окремим видом.

ВИСНОВКИ

Проведене дослідження п'явок роду *Trocheta* (Hirudinea: Erpobdellidae) з басейнів Тиси та верхів'я Дністра дозволило отримати нові дані про морфологічні особливості, генетичну структуру та систематичне положення досліджуваних об'єктів. На основі проведених морфологічних та молекулярно-генетичних аналізів сформульовано такі основні висновки:

1. Поширення п'явок роду *Trocheta* у Західній частині України простежено в межах басейну річки Тиси, де виявлено *Trocheta* sp. n., та верхів'я Дністра, де живе *Trocheta bykowskii* Gedroyc, 1913.
2. Представники роду *Trocheta* віддають перевагу холодним джерелам, гірським струмкам та вологим прибережним ґрунтам
3. За результатами аналізу морфологічних ознак встановлено, що зразок *Trocheta* sp. n. (зі струмка Піг) відповідає "*Trocheta bykowskii*" sensu Л. Павловського, тоді як *T. bykowskii* (з верхів'я Дністра) відповідає *T. bykowskii* sensu М. Гедройця.
4. Молекулярно-генетичний аналіз гена COI підтвердив морфологічні результати та продемонстрував високу підтримку монофілетичної групи досліджуваних зразків. Делімітація видів виявила дві незалежні еволюційні лінії в межах цієї групи, які належать до неописаного виду *Trocheta* та *T. bykowskii*.
5. Таксономічна ревізія карпатських трохет в Львівській та Закарпатській областях показала наявність двох видів: *Trocheta bykowskii* Gedroyc, 1913, який помилково синонімізували з *T. cylindrica* Örley, 1886, та *Trocheta* sp. n., який раніше

досліджував Л. Павловський, помилково вважаючи його *T. bykowski*.

Отримані результати комплексного морфологічно-філогенетичного дослідження доводять, що виявлені види *Trocheta* є потенційно новими для фауни України та заслуговують на офіційний опис. З огляду на їхню локальність поширення, потенційну вразливість і обмежені ареали, ці види рекомендовано включити до Червоної книги України.

ПЕРЕЛІК ПОСИЛАНЬ

1. Лукін Є. І. Фауна України. Том 30. П'явки: Зовнішня і внутрішня будова, екологія, систематика, поширення та практичне значення п'явок. Київ: Видавництво АН УРСР, 1962. 196 с.
2. Українська радянська енциклопедія : у 12 т. / гол. ред. М. П. Бажан ; редкол.: О. К. Антонов та ін. — 2-ге вид. — К. : Головна редакція УРЕ, 1982. — Т. 8 : Олєфіни — Поплін. — 528 с., [22] арк. іл. : іл., портр., карти.
3. Хоменко А. М., Утєвський С. Ю. Рідкісні види п'явок (*Hirudinida*) України // Матеріали до 4-го видання Червоної книги України. Тваринний світ. – Серія: «Conservation Biology in Ukraine». – 2018. – Вип. 7, Т. 2. – С. 437–440.
4. A general species delimitation method with applications to phylogenetic placements / J. Zhang et al. *Bioinformatics*. 2013. Vol. 29, no. 22. P. 2869–2876. URL: <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt499>
5. ABGD, Automatic Barcode Gap Discovery for primary species delimitation / N. PUILLANDRE et al. *Molecular Ecology*. 2011. Vol. 21, no. 8. P. 1864–1877. URL: <https://doi.org/10.1111/j.1365-294x.2011.05239.x>
6. Bielecki A., Cichocka J. M., Jeleń I., Świątek P., Adamiak-Brud Ź. A checklist of leech species from Poland. *Wiadomości Parazytologiczne*. 2011. Vol. 57, no. 1, pp. 11–20.
7. Freshwater leeches (Annelida: Clitellata: Hirudinida) of the Czech Republic (Central Europe): check-list, new records, and remarks on species distributions / J. SCHENKOVÁ et al. *Zootaxa*. 2009. Vol. 2227, no. 1. P. 32–52. URL: <https://doi.org/10.11646/zootaxa.2227.1.2>

8. Fujisawa T., Barraclough T. G. Delimiting Species Using Single-Locus Data and the Generalized Mixed Yule Coalescent Approach: A Revised Method and Evaluation on Simulated Data Sets. *Systematic Biology*. 2013. Vol. 62, no. 5. P. 707–724. URL: <https://doi.org/10.1093/sysbio/syt033>
9. Gedroyć M. de. Zur Kenntnis der europäischen Hirudineenarten. *Bulletin International de l'Académie des Sciences de Cracovie. Classe des Sciences Mathématiques et Naturelles. Série B: Sciences Naturelles*. 1913. No. 2, pp. 32–46.
10. Gedroyć M. Pijawki (Hirudinea) Polski. Studium monograficzne. II. *Rozprawy i Wiadomości z Muzeum im. Dzieduszyckich*. 1916. Vol. 2, no. 1–2, pp. 1–101.
11. GenBank / D. A. Benson et al. *Nucleic Acids Research*. 2013. Vol. 42, no. D1. P. D32–D37. URL: <https://doi.org/10.1093/nar/gkt1030>
12. Grosser C. Differentiation of some similar species of the subfamily trochetinae (hirudinida: erpobdellidae). *Ecologica Montenegrina*. 2015. Vol. 2, no. 1. P. 29–41. URL: <https://doi.org/10.37828/em.2015.2.3>
13. Grosser C. Erstnachweis von *Trocheta cylindrica* (Hirudinea: Erpobdellidae) im Elbegebiet Sachsen-Anhalts. *Lauterbornia*. 1999. Vol. 36, pp. 29–31.
14. Grosser C. First record of *Trocheta haskonis* Grosser, 2000 (Hirudinea: Erpobdellidae) in Serbia. *Lauterbornia*. 2013. Vol. 76, pp. 111–113.
15. Grosser C., Epshtein V. M. Zum Artstatus des Egels *Trocheta danastrica* Stschegolew, 1938 (Annelida, Hirudinea: Erpobdellidae). *Lauterbornia*. 2009. Vol. 67, pp. 77–91.
16. Grosser C., Šukalo G., Pešić V. Monster from the vault: a new finding of one of the largest european leech *trocheta haskonis*

grosser, 2000 from bosnia and herzegovina. *Ecologica Montenegrina*. 2018. Vol. 19. P. 69–72. URL: <https://doi.org/10.37828/em.2018.19.8>

17. Katoh K., Standley D. M. MAFFT Multiple Sequence Alignment Software Version 7: Improvements in Performance and Usability. *Molecular Biology and Evolution*. 2013. Vol. 30, no. 4. P. 772–780. URL: <https://doi.org/10.1093/molbev/mst010>

18. Košel V. Taxonomical position of two species of Trocheta (Hirudinea) described from Central Europe. *Biologia*. 2004. Vol. 59, pp. 25–28.

19. MEGA12: Molecular Evolutionary Genetic Analysis version 12 for adaptive and green computing / S. Kumar et al. *Molecular Biology and Evolution*. 2024. URL: <https://doi.org/10.1093/molbev/msae263>

20. MrBayes 3.2: Efficient Bayesian Phylogenetic Inference and Model Choice Across a Large Model Space / F. Ronquist et al. *Systematic Biology*. 2012. Vol. 61, no. 3. P. 539–542. URL: <https://doi.org/10.1093/sysbio/sys029>

21. Nesemann H. Identification key to the Hungarian leeches of the subfamily *Trochetinae* Pawlowski, 1954, with notes on systematics of the subfamily *Erpobdellinae* Blanchard, 1894 (Hirudinea). *Annales historico-naturales Musei Nationalis Hungarici*. 1993. Vol. 85. P. 19–35.

22. Nesemann H., Neubert E. Annelida, Clitellata: Branchiobdellida, Acanthobdellea, Hirudinida. In: Schwoerbel J., Zwick P. (eds.) *Süßwasserfauna von Mitteleuropa*. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag, 1999. P. 135–140.

23. Paradis E., Claude J., Strimmer K. APE: Analyses of Phylogenetics and Evolution in R language. *Bioinformatics*. 2004. Vol. 20, no. 2. P. 289–290. URL: <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btg412>

24. Pawłowski L. K. Aperçu sur la faune des Hirudinées des Carpathes. *Prace Wydziału III Nauk Matematyczno-Przyrodniczych, Łódzkie Towarzystwo Naukowe*. Łódź, 1959. Vol. 55. P. 1–45.
25. Pawłowski L. K. Pijawki (Hirudinea). *Fauna słodkowodna Polski*. Vol. 26. Warszawa, 1936. 476 p.
26. Pawłowski L. K. Über äussere Morphologie und systematische Stellung des Egels *Blanchardia bykowskii* (Gedroyć), nebst Bemerkungen über einige Arten der Gattung *Herpobdella* Blainv. *Annales Musei Zoologici Polonici*. 1936. Vol. 11, no. 19. P. 347–358.
27. Pawłowski L. K. Zur Ökologie der Hirudineenfauna der Wigryseen. *Archiv für Hydrobiologie und Rybactwo*. Suwałki, 1936. Vol. 10. P. 1–47.
28. Puillandre N., Brouillet S., Achaz G. ASAP: assemble species by automatic partitioning. *Molecular Ecology Resources*. 2020. URL: <https://doi.org/10.1111/1755-0998.13281>
29. Ratnasingham S., Hebert P. D. N. BOLD: The Barcode of Life Data System (www.barcodinglife.org). *Molecular Ecology Notes*. 2007. Vol. 7. P. 355–364. DOI: 10.1111/j.1471-8286.2006.01678.x
30. RStudio Team (2023). RStudio: Integrated Development Environment for R. RStudio, PBC, Boston, MA.
31. TANABE A. S. Kakusan4 and Aminosan: two programs for comparing nonpartitioned, proportional and separate models for combined molecular phylogenetic analyses of multilocus sequence data. *Molecular Ecology Resources*. 2011. Vol. 11, no. 5. P. 914–921. URL: <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2011.03021.x>

ABSTRACT

Kazakova A. A. Taxonomy and phylogenetic relationships of leeches of the genus *Trocheta* (Hirudinea: Erpobdellidae) from the Tysa Basin and the Upper Dniester. – Master's Thesis. – V. N. Karazin Kharkiv National University, Department of Zoology and Animal Ecology, Kharkiv, 2025.

The Master's thesis consists of 46 pages and includes the following sections: table of contents, introduction, main part, conclusions, and references. The thesis contains 2 tables, 15 figures, 31 references, and 2 appendices.

This work is devoted to the study of the taxonomic position of representatives of the genus *Trocheta* (Hirudinea: Erpobdellidae) from the Tysa River basin and the upper Dniester. This genus is one of the least studied groups of jawless leeches, and there are still certain contradictions and inaccuracies concerning its species composition. The combination of morphological and molecular-genetic methods in this research made it possible to clarify the taxonomic status of individual specimens and to identify new evolutionary lineages within the genus.

The research material was taken from the collection of the Department of Zoology and Animal Ecology, V. N. Karazin Kharkiv National University. The specimens were preserved in 96% ethanol, which ensured good conservation of both morphological and molecular-genetic features.

The morphological analysis included a detailed description of external and internal morphology: color, size, and shape of the specimen, annulation of somites, structure of the reproductive system, position of gonopores, and the shape and size of the atrium. Morphological characteristics were compared with descriptions and drawings of already known species such as *Trocheta cylindrica* Örley, 1886 and *Trocheta bykowskii* Gedroyc, 1913. As a result, specimens from the Carpathian region differ from previously known species by a set of

morphological features, particularly in the gonopores position, and the atrium structure.

The molecular-genetic analysis was based on the mitochondrial COI gene (cytochrome *c* oxidase subunit I). The sequenced data were compared with published sequences in the GenBank and BOLD Systems databases. Phylogenetic trees were built using Bayesian Inference (MrBayes) and Maximum Likelihood (MEGA12) methods. Species delimitation was carried out using the ABGD (Automatic Barcode Gap Discovery), ASAP (Assemble Species by Automatic Partitioning), PTP (Poisson Tree Processes), and GMYC (Generalized Mixed Yule Coalescent) algorithms.

According to the results, morphological features are consistent with molecular data. The studied specimens form a separate monophyletic group with high statistical support, having the status of a distinct species. The genetic distance between the studied objects exceeds the limits of intraspecific variation of known *Trocheta* species, which may indicate separate evolutionary lineages within the genus. This material can be considered as representing a potentially new species for science.

Thus, potentially new taxa of the genus *Trocheta* were found in the Carpathian region of Ukraine. They may have a limited distribution and be endemic species. We recommend continuing studies on *Trocheta* using a broader geographic range, additional molecular markers, and ecological data. Implementing these recommendations will make it possible to better understand interspecific relationships, levels of cryptic diversity, and the evolutionary history of the group.

The scientific novelty of the thesis lies in conducting a morphological-phylogenetic study of representatives of the genus *Trocheta* from the Carpathian region of Ukraine, which clarified their taxonomic status and evolutionary relationships. The scientific significance of the research consists in

describing a potentially new species and studying a distinct evolutionary lineage. The practical value of the obtained results lies in their use for revising the systematics of the family Erpobdellidae, improving leech identification keys, and supporting conservation research in Ukraine, particularly for preparing materials for the updated Red list of Ukraine.

Keywords: annelids, Erpobdellidae, *Trocheta*, morphological description, systematics, molecular phylogenetics, taxonomy, species delimitation, Carpathians.

ДОДАТКИ

Додаток 1. Послідовності генів COI, використані в цьому дослідженні

№	Вид	Номер послідовності в базах даних
1	<i>Dina cf latestriata</i>	HM246575
2	<i>Dina krilata</i>	HM246531
3	<i>Dina latestriata</i>	HM246569
4	<i>Dina latestriata</i>	HM246600
5	<i>Dina lineata</i>	HM246552
6	<i>Dina lineata</i>	HM246583
7	<i>Dina lineata</i>	KY989480
8	<i>Dina ohridana</i>	HM246548
9	<i>Dina punctata</i>	HM246604
10	<i>Dina</i> sp.	KY989477
11	<i>Dina stschegolewi</i>	KY989486
12	<i>Erpobdella borisi</i>	KP749904
13	<i>Erpobdella borisi</i>	KY989491
14	<i>Erpobdella bucera</i>	MN612829
15	<i>Erpobdella dubia</i>	AF116023
16	<i>Erpobdella japonica</i>	AF116026
17	<i>Erpobdella japonica</i>	AB679654
18	<i>Erpobdella japonica</i>	AB675012
19	<i>Erpobdella microstoma</i>	MN612934
20	<i>Erpobdella microstoma</i>	MF544828
21	<i>Erpobdella monostriata</i>	DQ009665
22	<i>Erpobdella monostriata</i>	HM246601
23	<i>Erpobdella monostriata</i>	KP300764
24	<i>Erpobdella montezuma</i>	KM612138

25	<i>Erpobdella montezuma</i>	GQ368760
26	<i>Erpobdella nigricollis</i>	DQ009664
27	<i>Erpobdella nigricollis</i>	HM246603
28	<i>Erpobdella obscura</i>	MN612842
29	<i>Erpobdella obscura</i>	MN612846
30	<i>Erpobdella obscura</i>	MN612823
31	<i>Erpobdella octoculata</i>	HQ336344
32	<i>Erpobdella octoculata</i>	AF003274
33	<i>Erpobdella octoculata</i>	HM246555
34	<i>Erpobdella octoculata</i>	HM246599
35	<i>Erpobdella parva</i>	MN612997
36	<i>Erpobdella parva</i>	MN612930
37	<i>Erpobdella punctata</i>	HQ336346
38	<i>Erpobdella punctata</i>	MT116805
39	<i>Erpobdella testacea</i>	AF116027
40	<i>Erpobdella testacea</i>	HM246602
41	<i>Erpobdella vilnensis</i>	HM246551
42	<i>Erpobdella vilnensis</i>	KP300763
43	<i>Erpobdella vilnensis</i>	DQ009663
44	<i>HA076 Trocheta sp.n. from Rih Stream</i>	
45	<i>HA081 Trocheta sp.*</i>	
46	<i>Trocheta ariescornuta</i>	INCGE003-23
47	<i>Trocheta blanchardi</i>	MT013037
48	<i>Trocheta blanchardi</i>	MT013038
49	<i>Trocheta blanchardi</i>	MT013040
50	<i>Trocheta blanchardi</i>	MT013041
51	<i>Trocheta blanchardi</i>	MT013039
52	<i>Trocheta cylindrica</i>	NOVMD089-21
53	<i>Trocheta cylindrica</i>	MT013046

54	<i>Trocheta sp.n.</i> **	
55	<i>Trocheta danastrica</i>	MT013042
56	<i>Trocheta danastrica</i>	MT013043
57	<i>Trocheta danastrica</i>	MT013045
58	<i>Trocheta danastrica</i>	MT013044
59	<i>Trocheta haskonis</i>	DQ009668
60	<i>Trocheta sp.</i>	MG949123
61	<i>Trocheta sp.</i>	MG949124
62	<i>Trocheta sp.</i>	OR381520
63	<i>Trocheta sp.</i>	OR381519
64	<i>Trocheta sp.</i>	OR381521
65	<i>Trocheta sp.</i>	MH013408
66	<i>Trocheta sp.</i>	ON098217
67	<i>Trocheta subviridis</i>	UKAN877-22
68	<i>Barbronia arcana</i> ***	DQ235598

* Послідовність секвеновано у Словенії

** Послідовності, секвеновані зі зразка, зберігаються в колекції безхребетних кафедри зоології та екології тварин Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна

*** Зовнішня група

Додаток 2. Скрипт для делімітації видів із використанням алгоритму GMYC

```
# Встановлення та завантаження бібліотек

options(repos = c(CRAN = "https://cloud.r-project.org"))

if (!require(splits)) install.packages("splits")

library(splits)

library(ape)

# 1. Завантаження дерев

trees <- read.nexus("alig-alig P.trees")

# 2. Вибір одного дерева для аналізу

tr <- trees[[500]]

# 3. Перевірка на ультраметричність

is.ultrametric(tr)

# 4. Проведення аналізу GMYC

res <- gmyc(tr)

# 5. Отримання зведеної статистики

summary(res)

# 6. Візуалізація результатів із кольоровими кластерами

pdf("gmyc plots.pdf", width = 8, height = 9)

gmyc.plot(res,

          cex = 1.3, # розмір підписів

          lwd = 1.2) # товщина ліній

dev.off()
```