

БЪЛГАРСКА АКАДЕМИЯ НА НАУКИТЕ
ИНСТИТУТ ПО БИОРАЗНООБРАЗИЕ И ЕКОСИСТЕМНИ ИЗСЛЕДВАНИЯ

АВТОРЕФЕРЕТ

ХЕЛИАНА ИРЖИ ДУНДАРОВА

**МОЛЕКУЛЯРНА ФИЛОГЕНИЯ НА МОРФО-ГРУПАТА: *MYOTIS MYSTACINUS*
(CHIROPTERA: VESPERTILIONIDAE) НА БАЛКАНСКИЯ ПОЛУОСТРОВ**

ДИСЕРТАЦИЯ

за присъждане на образователна и научна степен “доктор”

научна специалност 01.06.02

„Зоология“

Научен ръководител: проф. д-р Вълко Бисерков

Научни консултанти: д-р Кристиан Диц и

доц. д-р Фридер Майер (Германия)

София

2018 г.

Дисертацията е разработена в рамките на докторантура, редовна форма на обучение, в Институт по биоразнообразие и екосистемни изследвания при Българската академия на науките.

Дисертационният труд е обсъден и насочен за защита на заседание на разширения състав на научния колегиум на отдел „Екосистемни изследвания, екологичен риск и консервационна биология“, състоял се на 02 май 2018 година.

Дисертационният труд има общ обем 89 страници и съдържа 10 раздела, включително 14 таблици и 21 фигури. Списъка на цитираната литература съдържа 120 заглавия на латиница.

Защитата ще се състои от ч., на 2018 година в Заседателната зала на ИБЕИ-БАН, База 1, ул. Майор Гагарин 2.

НАУЧНО ЖУРИ

Назначено със заповед на Директора на ИБЕИ-БАН №, в състав:

Вътрешни членове:

проф. д-р Васил Попов (ИБЕИ-БАН)

проф. д-р Вълко Бисерков (ИБЕИ-БАН)

Външни членове:

проф. д-р Севдалин Георгиев (БФ на СУ)

доц. д-р Светослав Димов (БФ на СУ)

проф. д-р Румяна Миронова (ИМБ-БАН)

Резерви:

проф. д-р Павел Зехтинджиев (ИБЕИ-БАН) – за вътрешен член

доц. д-р Любен Загорчев, БФ-СУ – за външен член

*Настоящият дисертационен труд посвещавам
на Боян Петров и Славя Стойчева, чиито слова
ще долавяме в звуците на прилепите,
а блясъка им, отразен високо от звездите
ще ни води към нови и вълнуващи открития.*

БЛАГОДАРНОСТИ

Благодаря на ръководството на ИБЕИ-БАН, за предоставената възможност за подготовката на настоящия дисертационен труд.

Сърдечна благодарност към проф. д-р Вълко Бисерков, който ме подкрепи безрезервно в това начинание, даде ми свободата сама да търся и да решавам и ми оказва съдействие в критични моменти.

Изказвам своята сърдечна благодарност към проф. д-р Румяна Мечева и доц. д-р Николай Симов, които ми дадоха най-ценния урок, а именно, че научната дейност е трудно начинание, за което си струва да се бориш с всички сили.

Настоящият докторат е спонсориран и от проект BG051PO001-3.3.05-0001 „Наука и бизнес“; Оперативна програма „Развитие на човешките ресурси“, съфинансирана от Европейския социален фонд на Европейския съюз и стипендия DAAD (Германската служба за академичен обмен).

I am sincerely grateful to Dr. Christian Diezt for giving me the strength, knowledge, ability and opportunity to undertake this research study and to persevere and complete it satisfactorily.

During the adventure towards this degree, I have found a teacher, a friend, an inspiration, a role model and a pillar of support in my Guide, PD Dr. Frieder Mayer. Thank you for the chance to be a part of your working group, the help for the data processing, result interpretation and priceless discussions during the thesis duration. Thank you to the both for believing in me!

I have great pleasure in acknowledging all researchers which provided samples for this study (all are listed in Appendix I). Without you, this achievement would not have been possible.

1. УВОД

Прилепите (Разред: Chiroptera) съставляват над 20% от съвременните бозайници (Simmons 2005). Те се характеризират със способност за активен полет и ориентация чрез ехолокация. Имат тясна специализация към предпочитаните трофични ресурси, като тя може да се проявява и на видово ниво. Поради наличието на видове двойници с припокриващи се екоморфологични белези, видовото разнообразие в разреда продължава да е обект на генетично проучване с молекулярни методи.

ДНК баркодингът (Hebert et al. 2003) се утвърди като ефективен метод за молекулярна идентификация на видовете двойници. Чрез прилагането на този метод от началото на века, само в Европа, бяха установени редица нови видове прилепи (Mayer & von Helversen 2001, Ruedi & Mayer 2001, Hulva et al. 2004, Mayer et al. 2007, Boston et al. 2010).

В основата на метода са заложили консервативни митохондриални маркери, от които най-популярен е *col* следван от *nd1* и *cytb*. Митохондриалната ДНК се унаследява по майчина линия и е изключително податлива на замяна (Petit & Excoffier 2009). Това прави ДНК баркодингът сам по себе си недостатъчен за установяването на филогенетичните и еволюционните връзки (Moritz & Cicero 2004).

От друга страна, ядрената ДНК е подложена на комбинативна изменчивост в резултат на съчетаване от двамата родители. В изследваната от нас група прилепи, яДНК се характеризира с разпространение на генния поток предимно от мъжките индивиди. Следователно, двата вида ДНК^н показват различни аспекти от еволюционното развитие на вида и често води до проблеми при интерпретация на получените от двата анализа резултати (Тоews & Brelsford 2012). В днешно време ДНК баркодинга често се комбинира с мултилокусни анализи и тази комбинация се превърна в най-използвания инструмент за решаване на филогенетичните и еволюционните връзки при разред Chiroptera (Salicini et al. 2011, Dool et al. 2016).

Морфо-групата на *Myotis mystacinus* (в превод: *група на мустакатите нощници*) се характеризира с голяма морфологична изменчивост. На Балканския полуостров са описани четири вида мустакати нощници: *M. brandtii*, *M. mystacinus*, *M. davidii* и *M. alcathoe* (von Helversen et al. 2001, Mayer & von Helversen 2001, Tsytsulina et al. 2012, Benda et al. 2016).

На базата на морфологични изследвания са били обособени подвидове за:

- *M. brandtii* (Eversmann 1845) (*sibiricus* Kašenko 1905, *gracilis* Ognev 1927, *coluotus* Kostroň 1943);
- *M. mystacinus* (Kuhl 1817) (*nigricans* Fatio 1869, *lugubris* Fatio 1869, *occidentalis* Benda 2000, *caucasicus* Tsytsulina 2000);
- *M. davidii* Peters 1869 (*aurascens* Kuzâkin 1935, *bulgaricus* Heinrich 1936, *nipalensis* Dobson 1871, *popovi* Strelkov 1983, *Myotis* sp. A sensu Volleth 1987, *przewalskii* sensu von Helversen 1989a, 1989b);
- *M. alcathoe* (*Myotis* sp. B sensu Volleth 1987).

Ареалът на разпространение на *M. brandtii* обхваща горите в Палеарктика: от Европа до Близкия изток. *M. mystacinus* е разпространен в горския пояс от Мароко през Европа до Урал. Ареалът на *M. davidii* включва лесостепите на Средиземноморската област, Близкия изток, Източна Европа и Монголия. *M.*

mystacinus и *M. davidii* се срещат и в Кавказ (Benda & Karataş 2005). *M. alcathoe* е описан за първи път от Гърция и Унгария (Helvesen et al. 2001), след което е установен в по-голямата част на Европа.

Mayer & von Helvesen (2001) установяват генетична прилика между *M. davidii* от Балканския полуостров и *M. mystacinus* от Централна Европа. Те доказват, че повечето от балканските *M. davidii* споделят митохондриалния геном на *M. mystacinus*, което предполага протекла замяна в следствие на хибридизация. Поради екоморфологичната прилика между двата вида и белезите на замяна на митондриалния геном, все още много таксономични и филогенетични въпроси остават отворени.

За доизясняване таксономичния статус на *Myotis mystacinus*, в настоящия докторат са използвани ново получени данни от баркодинг, както и анализ на три интрона като ядрени маркери - за първи път прилагани за целевата група. Резултатите от анализа на ядрените интрони може да покажат дали е имало хибридизация между двата вида на територията на Балканския полуостров, която е довела до замяна на митондриалния геном. Също така могат да имат съществено значение при взимане на таксономични решения за видовата или подвидова самостоятелност на съответните популации.

2. ЛИТЕРАТУРЕН ОБЗОР

Позицията на разред Chiroptera сред класа на бозайниците и неговата монофилия са били обект на множество изследвания, въз основа на голям набор морфологични, анатомични, имунологични и поведенчески анализи. Години наред се е приемала така наречената *парафилетична хипотеза за произхода на прилепите*, в която плодоядните прилепи (Pteropodidae) са били считани за по-близкородствени до приматите отколкото със самите прилепи (Pettigrew 1986). Тази хипотеза е отхвърлена на базата на широк спектър молекулярни анализи. Според последните филогенетични изследвания разред Chiroptera е монофилетичен и включва два подразреда (Teeling et al. 2005).

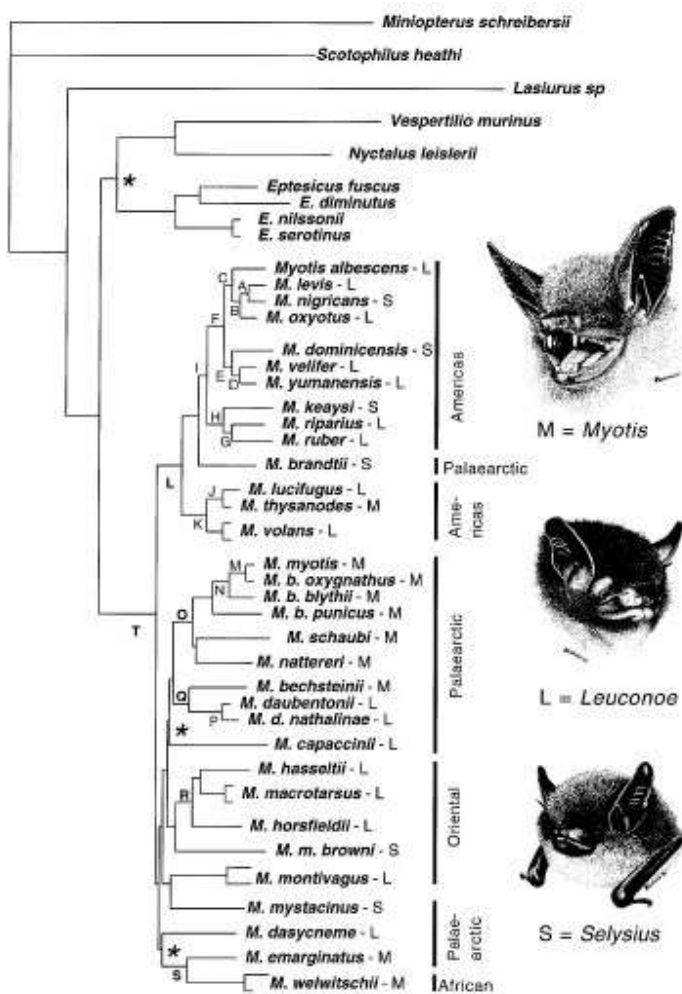
Към подразред Yinpterochiroptera се отнасят семействата: плодоядните прилепи (Pteropodidae), подковносите прилепи (Rhinolophidae), фалшивите прилепи вампири (Megadermatidae), свиненосите прилепи (Craseonycteridae), мишеопашатите прилепи (Rhinopomatidae).

Към подразред Yangochiroptera, се отнасят всички останали семейства групирани в три надсемейства: прилепи със сакчета на крилата (Emballonuroidea), рибоядни прилепи (Noctilionidea), гладконоси прилепи (Vespertilionidae).

2.1. РОД MYOTIS

Родът *Myotis* наброява около 100 вида (Coorman 1994, Simmons 2005) включени в рамките на най-голямото семейство прилепи Vespertilionidae. Ареалът на рода се простира от бореалните до субантарктическите зони, като е разпространен в различните наземни екологични зони – от тропическите дъждовни гори до полупустините местообитания.

В продължение на дълъг период от време филогенетичните взаимоотношения в род *Myotis* бяха интерпретирани по различен начин от представителите на традиционната таксономия (Findley 1972, Coorman 1994) и на молекулярните изследвания (Hooper & Van Den Bussche, 2003).



Фиг. 1. Филогенетична реконструкция на род *Myotis*, направена на базата на утвърдените морфотипове и митохондриалните маркери *nd1* и *cytb* (Ruedi & Mayer 2001).

Ruedi & Mayer (2001) чрез анализи направени на базата на митохондриалните маркери *cytb* и *nd1* (фиг. 1) демонстрират, че морфологичните прилики рядко са резултат от близки филогенетични връзки. Така например *M. bechsteinii*, вид характерен за подрод *Myotis* се групира заедно с *M. daubentonii*, който е типичен представител на подрод *Leuconoe*. Видовете *M. brandtii* и *M. mystacinus* от подрод *Selysius* са двойници и са широко разпространени в Евразия. При тях се наблюдава конвергенцията по отношение на морфологични и етологични признаци. От филогенетична гледна точка те не са близко родствени видове. *M. brandtii* се групира редом до американските видове от рода, а *M. mystacinus* се групира с останалите евразийски представители (фиг. 1). Преминаването от един екоморфен тип към друг е често срещан при еволюцията на видове от рода. Морфологично подобни видове се групират в различни генетични линии, като например *M. mystacinus* и *M. brandtii* (Ruedi & Mayer 2001). Следователно биогеографският произход на видовете от род *Myotis* се характеризира по-добре на базата на тяхната филогенетична позиция отколкото на тяхната морфология (Ruedi & Mayer 2001).

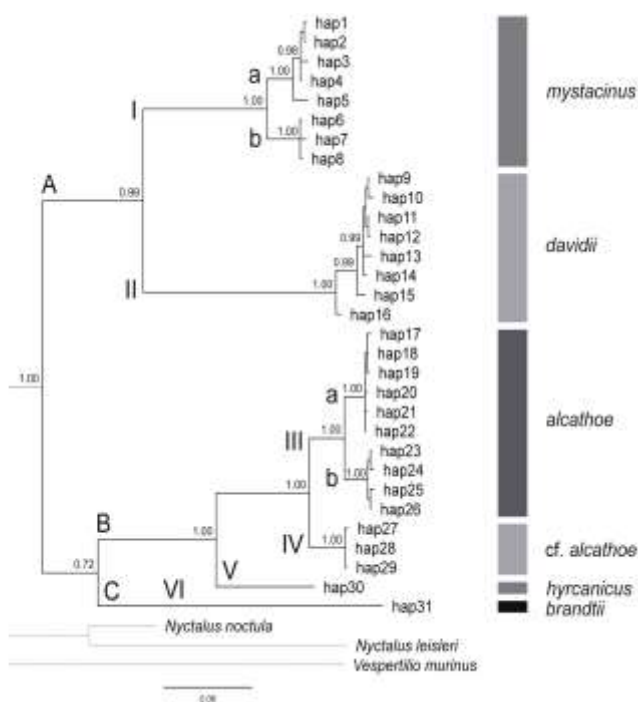
На базата на широк спектър от морфометрични анализи върху евразийските и американските представители на рода, Tate (1941) описва седем подрода (*Selysius*, *Isotus*, *Paramyotis*, *Myotis*, *Chrysopteron*, *Leuconoe* и *Rickettia*), от които само три (*Leuconoe*, *Selysius*, и *Myotis*) са запазени до днес (Findley 1972). Според Findley (1972) тези три подрода притежават набор от морфологични белези съответстващи на три основни типа полет и улов на насекоми. Подрод *Leuconoe* (типов вид *M. daubentonii*) включва прилепи с относително големи крака покрити с космици и малък плагнопатагиум, който е типичен за улов на насекоми от водната повърхност. Видовете от подрод *Selysius* (типов вид *M. mystacinus*), обикновено са с малки крака и разширен уропатагиум, характерен белег за улов на храна от въздушния „планктон“. Представителите на подрод *Myotis* (типов вид *M. myotis*) са сравнително големи животни с дълги уши, широки крила и по-примитивен тип зъбна система. Приспособени за улов на насекоми директно от земята. Това подразделение все още е добре прието, но се основава изцяло на морфологични характеристики.

Най-старият фосил от представител на род *Myotis* датира от ранния Олигоцен и е намерен в Европа (Agiagno 1984). Макар че фосилът е европейски, изследванията показват, че рода е с азиатски произход и неговите представители постепенно мигрират към Европа, Африка и Америка (Findley 1972).

2.2. ХАРАКТЕРИСТИКА НА МОРФО-ГРУПАТА НА *MYOTIS MYSTACINUS*

Морфо-групата на *Myotis mystacinus* или групата на мустакатите нощници, включва едни от най-малките представители на род *Myotis*, които се характеризират със сходни морфологични белези. Дължината на совалката (FA) е около < 36 mm. При тези прилепи цветът на космената покривка на муцуната е тъмна, трагусът достига над изрезката на външния ръб на ушната мида, а тибията с дисталната си част е прикрепена за летателната мембрана (Dietz & von Helversen 2004). Ареалът им включва Палеарктичната зоогеографска област.

Морфо-групата е смятана за политипна, включваща голям брой подвидове (Benda & Tsytsulina 2000). През 60-те години на XX-ти век в Палеарктика биват разпознати три морфотипа: *brandtii*, *mystacinus* и *przewalskii* (Hanák 1965, Stubbe & Chotolchu 1968). През 80-те години на миналия век Volleth (1987) описва четири кариотипа на групата в Европа и Турция: *M. mystacinus*, *M. brandtii*, *Myotis* sp. A и *Myotis* sp. B. При ревизията направена от Strelkov & Buntova (1982), Strelkov (1983a, 1983b) се установяват само два вида: *M. brandtii* и *M. mystacinus* в които биват припознати още четири подвида *mystacinus*, *popovi*, *aurascens*, *przewalskii*. Benda & Tsytsulina (2000) откриват, че няколко морфотипа живеят в симпатрия в



Фиг. 2. Филогенетичните връзки на морфо-групата на *Myotis mystacinus* от Западна Палеарктика и Кавказ, направени на базата на *cytb* (Benda et al. 2016).

Средиземноморската област и южна Русия. За затова те предлагат западна Палеарктика следните таксони: *M. brandtii*, *M. mystacinus*, *M. aurascens*, *M. hajastanicus* и *M. nipalensis*. По-късно Mayer & von Helversen (2001) доказват генетично сходство на базата на митохондриалния маркер *nd1* между *aurascens* и *przewalskii* (sensu von Helversen 1989b), *mystacinus* и *Myotis* sp. A (sensu Volleth, 1987) както и между *mystacinus* и *aurascens* (sensu Benda and Tsytsulina, 2000). Въз основа на морфологични и генетични сравнения Benda et al. (2012, 2016) преразглеждат таксономичния статус на *M. aurascens* и го синонимизират с *M. davidii* Peters 1869.

Mayer & von Helversen (2001) и Mayer et al. (2007) анализират *nd1* участъка от мтДНК и констатираат генетично сходство между *M. davidii* от Балканския полуостров и *M. mystacinus* от Централна Европа.

Става ясно, че повечето от анализираните индивиди имат митохондриалния хаплотип характерен за *M. mystacinus*. Само при два индивида от България се установява типичния за *M. davidii* хаплотип. По-късно е откритата дивергенция на базата на *col1*, *cytb* и *nd1* между европейските *M. mystacinus* и кавказките *M.*

aurascens (Kruskop et al. 2012, Tsytsulina et al. 2012). Това повдига въпроса за възможна митохондриална замяна между тези два вида на Балканския полуостров. Mayer & von Helversen (2001) демонстрират генетично различие между клада на *mystacinus/aurascens/nipalensis/przewalskii* и *Myotis sp. B* (sensu Volleth, 1987). Тази генетично различна форма от морфо-групата на мустакатите нощници се описва от von Helversen et al. (2001) като нов вид *M. alcaethoe* von Helversen & Heller, 2001. По-късно вида се потвърждава от множество автори в цяла Централна и Южна Европа (Benda et al. 2003, Agirre-Mendi et al. 2004, Schunger et al. 2004, Lučan et al. 2009, Jan et al. 2010, etc.).

От всички гореспоменати форми на морфо-групата на *Myotis mystacinus*, четири вида *M. brandtii*, *M. mystacinus*, *M. davidii* и *M. alcaethoe* (фиг. 2) са разпространени на Балканския полуостров (Benda & Karataş 2005, Dietz et al., 2009)

2.2.1. MYOTIS BRANDTII

M. brandtii (Eversmann, 1845) е дребен вид със сравнително дълги уши за размера си. Долната част на трагуса, която е разположена в основата на ухото е относително светла (фиг. 3а-б, в доктората). Космената покривка при възрастните индивиди е светло кафява с златисти краища, вентралната част е ясно разграничена от дорзалната и е светло кафява. Ноздрите имат сърцевидна форма. Формата на пенисът при мъжките в дисталната част е с бухалковидна форма (фиг. 3 в-г, в доктората). Горният премолар (P⁴) има добре оформен протокон, който често достига височината на по-малкия премолар (P³). Двата горни малки премолара (P²⁺³) са с еднакви форми, за разлика от долните, където втория достига 2/3 от височината на първия. Горните молари (M¹⁻³) имат малки, но добре видими параконули (Dietz et al. 2009). Видът е разпространен в горите на Палеарктика от Западна Европа до Далечния изток (фиг. 4, в доктората) (Benda et al. 2016). *M. brandtii* се определя като синоним за следните подвидове: *sibiricus* Kaşenko 1905, *gracilis* Ognev 1927, *coluotus* Kostroň 1943.

2.2.2. MYOTIS MYSTACINUS

M. mystacinus (Kuhl 1817), има почти черна на цвят муцуна, ушите са с дълги трагуси, без бяло петно в основата, (фиг. 5 а-б, в доктората). Ноздрите са със сърцевидна форма, като латералните им части са стеснени. На гърба космената покривка е леко къдрава с тъмно кафяв цвят и червеникаво-златисти краища. Вентралната част варира в различни нюанси на сивото. При ювенилните индивиди дорзалната част е тъмно кафява или тъмно сива. Пенисът е тесен, с еднаква форма по цялата си дължина (фиг. 5 в-г, в доктората) (Dietz et al. 2009). Видът обитава смесените гори от Мароко, през Европа до Урал, включително и Средиземноморската област (фиг. 6, в доктората) (Benda et al. 2016). В него се синонимизират следните подвидове: *nigricans* Fatio 1869, *lugubris* Fatio 1869, *occidentalis* Benda 2000, *caucasicus* Tsytsulina 2000.

2.2.3. MYOTIS DAVIDII

M. davidii Peters 1869 до голяма степен се оприличава с *M. mystacinus*. Характеризира се с по-къса муцуна и по-остри краищата на ушите. Цветът на ушната мида е кафяв, отвътре ушите и трагуса са светло кафяви (фиг. 7 а-б, в доктората). Ноздрите са със сърцевидна форма и латералните им части са добре развити.

Пенисът е малко по-голям и относително по-широк (*фиг. 7 в-г, в доктората*). При ювенилните индивиди космената покривка на гърба има златист оттенък, който при възрастните индивиди се загубва. При тях оцветяването на дорзалната и вентралната част на тялото са видимо разграничени (Dietz et al. 2009).

M. davidii обитава палеарктичните лесостепи на Средиземноморската област и от Източна Европа до Монголия (*фиг. 8, в доктората*) (Benda et al. 2016). Включва следните подвидове: *bulgaricus* Heinrich 1936, *nipalensis* Dobson 1871, *popovi* Strelkov 1983, *Myotis* sp. A sensu Volleth 1987 и *przewalskii* sensu von Helversen, 1989a,b.

2.2.4. *MYOTIS ALCATHOE*

M. alcaethoe von Helversen & Heller 2001 е най-дребният представител от морфо-групата на мустакатите нощници. Космената покривка при възрастните индивиди е кафеникава с червеникав блясък на дорзалната страна. Вентралната е със светло сивкаво оцветяване. При ювенилните космената покривка е изцяло сива. В сравнение с останалите видове от групата долните крайници са малки по размери, палците са по-къси и ушната мида е къса и относително светла (Dietz et al. 2009). Трагусът е къс и не достига до външния ръб на ухото (при първите три вида трагуса обикновено достига над тази гънка) (*фиг. 9 а-б, в доктората*). Носът е с по-широка сърцевидна форма в сравнение с *M. brandtii*. Пенисът е много тънък, понякога удебелен в края (*фиг. 9 в-г, в доктората*). Големият горен премолар (P4) има добре изразен параконул, който е по-висок от малкия премолар (P3). Горните молари (M1-3) имат малки параконули (Dietz et al. 2009).

M. alcaethoe е разпространен в цяла Европа и Великобритания и става синоним за *Myotis* sp. B (sensu Volleth, 1987) (Benda et al. 2016) (*фиг. 10, в доктората*).

2.3. **ВЛИЯНИЕ НА ЛЕДНИКОВИТЕ ПЕРИОДИ ВЪРХУ СЪВРЕМЕННОТО ВИДОВО РАЗНООБРАЗИЕ**

Зя късния Плиоцен и Плейстоцен е характерно редуването на ледникови (гласиални) и между ледникови (интергласиални) периоди. При тези резки промени в климата, относителна климатична стабилност се запазва само в рефугиумите, благодарение на тяхната специфична физикогеографска характеристика. Рефугиумите са изиграли важна роля за запазване на биоразнообразието на между ледниковите периоди (Hewitt 1999, Tzedakis et al. 2002, Médail & Diadema 2009). Това се отнася до голяма степен и за Средиземноморската област, една от важните „горещи точки“ при формирането на биоразнообразие в света (Médail & Myers 2004). Тя е и биогеографски кръстопът за видовете от европейските, сахарските и иранско-туранските райони (Quézel 1985). Климатичните промени по време на късния Плиоцен и Плейстоцен в Средиземноморската област са съпроводени с резки изменения, които обхващат период от един до няколко века (e.g. de Beaulieu et al. 2005, Martrat et al. 2007). Средиземноморският рефугиум се разделя на три части, разположени съответно на Иберийския, Апенинския и Балканския полуострови (Taberlet et al. 1998, Hewitt 1999). През втората половина на Плиоцена настъпва захлаждането и засушаване, което води до изместване на горската фауна от степна, която навлиза основно от Централна Азия (Popov et al. 2007). Този период бележи началото на формирането на съвременната бозайникова

фауна на Балканите и приключва към средата на Плейстоцена (Peshev et al. 2004, Popov et al. 2007). По време на Плейстоцена редуването на глациали и интерглациали стават значими и тяхната амплитуда се увеличава във времето (Peshev et al. 2004). Тези изменения се свързват с промените в наклона на земната ос спрямо земната орбита около слънцето, разпределението на континентите и океаните по повърхността на Земята, вулканичната активност и други въздействия от космически произход (Tzedakis 2009). Последният ледников период е бил в периода преди около 110-12 хил. години, с максимум преди 18 хил. години (Hewitt 2000).

Разширяването на ареала на съхранените в рефугиумите видове през интерглациалите води и до промени в техния геном (Hewitt 1989). При повтарящи се реколонизации на даден район в няколко последователни интерглациали, ако колонистите са съставени от индивиди принадлежащи към един рефугиум, може да се стигне до загуба на алелното разнообразие и хомогенизация на генома (Hewitt 1993). Явлението е познато като *ефект на откривателя* (Hewitt 1996). След ледниковата реколонизация на Западна Европа е станала от колонисти от Северна Африка, Иберийския и Апенинския полуостров (Hewitt 1999, Lenk et al. 1999, Carranza & Arnold 2004, Carranza et al. 2004). Алпите и Пиренеите се явяват бариера за някои видове, което е причина там да се срещат много ендемити (Taberlet et al. 1998). За източната част на Западна Европа, Балканите са основен източник на колонисти при редица групи: скакалци, таралежи и широколистни дървесни видове като елша и дъб (Hewitt 2000). При прилепите динамиката в ареалите и изменението на видовия състав през плиоцена и плейстоцена се обуславя от голямата им способност за разпространение чрез активен полет. Поради тази причина плиоценските прилепни асоциации на Балканите и в частност в България показват значително сходство със съвременното разнообразие и/или са близко родствени със съвременни видове разпространени в Европа (Peshev et al. 2004). Въпреки това субфосилни материали от пещера в западна Стара планина датирани от Холоцен (8 хил. години) показват наличието на студенолюбиви видове характерни за късния Плейстоцен, които по настоящем са изчезнали от Балканите и/или са реликтни видове (Popov et al. 2007). Такъв пример е *Eptesicus nilssonii*. Експанзията на тези групи организми е станала сравнително бързо, което се потвърждава от генетичното сходство и ниското хаплотипно разнообразие (Artyushin et al. 2009, Kruskop et al. 2012). Бързото разпространение към Централна Европа на видове от Балканите е ограничило навлизането на такива видове от популациите в южните Карпати, Кавказ и района на Каспийско море (Hewitt 1999).

Начинът по който е била реколонизирана Европа е довел до възникването на хибридни/контактни зони. В хибридните зони се срещат подвидове и/или видове двойници, които се разглеждат като етап от процеса на видообразуване (Hewitt 1999). За анализ на подобни видове и тяхното филогенетичното разпространение се използват основно генетични маркери - консервативни митохондриални маркери при баркодинга (Moritz & Cicero 2004) и интроните при мултилокусни анализи на участъци от ядрена ДНК (Igea et al. 2010). Интроните се характеризират с голяма нуклеотидна вариабилност и в същото време могат лесно да се амплифицират с праймери поставени в съседните екзони, което ги прави подходящи кандидати за мултилокусни анализи при близкородствени видове (Hellborg & Ellegren 2003, Aitken et al. 2009, Igea et al. 2010).

3. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

Целта на настоящият дисертационен труд е да се изясни филогенията в морфо-групата на *Myotis mystacinus* на Балканския полуостров, както и да се характеризират *Myotis mystacinus bulgaricus* и *M. davidii* от България чрез молекулярно-генетични маркери, които заедно с бъдещи данни от други райони да послужат за таксономични решения.

За постигане на определената цел са формулирани следните задачи:

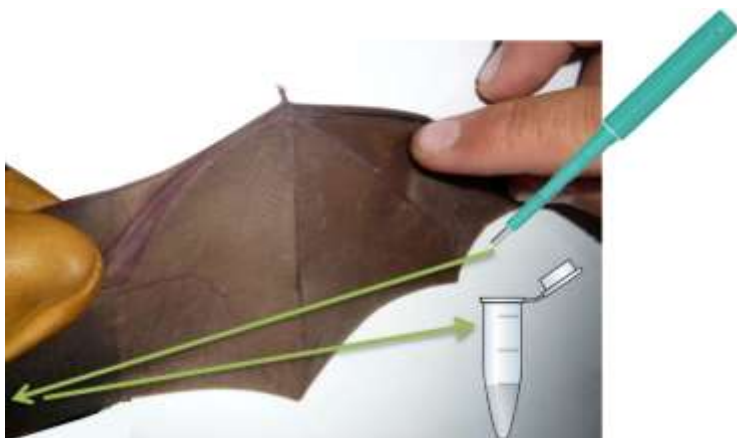
1. Провеждане на теренна работа за събиране на тъканни проби от мустакати нощници от България и други части на Балканския полуостров. Набавяне на допълнителни проби от Европа и находища в Кавказ, чрез обмен с други изследователи.
2. Характеризиране на проби чрез молекулярно-генетични маркери от мтДНК и от яДНК.
3. Анализ на получените резултати в контекста на съвременното познание за групата.
4. Филогеографски анализ на групата на мустакатите нощници на Балканите.
5. Филогенетична реконструкция на еволюционния произход на групата.

4. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

4.1. МАТЕРИАЛ

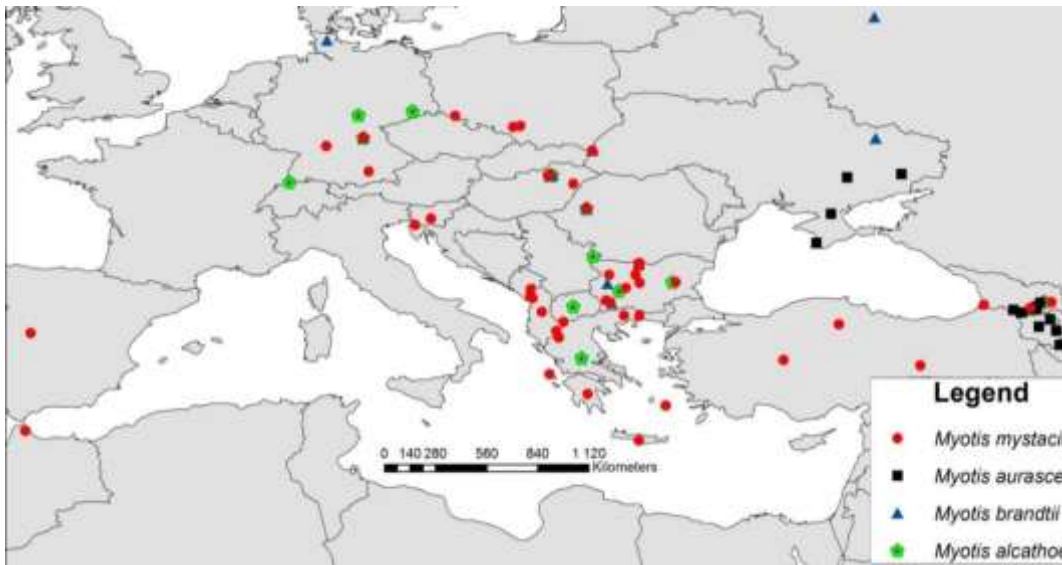
За събиране на тъканни проби от мустакати нощници на територията на страната беше проведена полева работа през четири последователни години (2012, 2013, 2014, 2015). През този период получихме проби и от други части на Европа, в частност от Балканите и Кавказ. Прилепите бяха улавяни, чрез залагане на орнитологични мрежи (*фиг. 11*). За тяхното видово идентифициране беше използван определителя на Dietz & von Helvesen (2004). Тъканни проби от крилната мембрана на животните бяха взети с помощта на „Biospy Punch 3mm“, фиксирани в 96% етанол (*фиг. 12*) и съхранени на -20 °С.

Всички проби бяха анализирани в Природонаучния музей в Берлин, Германия под ръководството доц. д-р Фридер Майер.



Фиг. 12. Вземане на тъканна проба от крилна мембрана и фиксиране на пробата в етанол.

В настоящият труд са идентифицирани молекулярно проби от: 56 *M. brandtii*, 65 *M. alcaethoe*, 118 *M. mystacinus* от Западна и Централна Европа; 8 *M. brandtii*, 42 *M. alcaethoe*, 126 *M. mystacinus*, 2 *M. davidii* от Балканския полуостров; 36 *M. brandtii*, 11 *M. alcaethoe*, 14 *M. mystacinus*, 47 *M. davidii* от Кавказ; 25 *M. davidii* от Монголия (*фиг. 13*).



Фиг. 13. Карта на идентифицираните видове и районите на пробовземане.

Приложения I и II (в доктората) съдържат информацията за всичките хаплотипове, места, държави и координати от които са били взети проби за анализ.

4.2. МЕТОДИ ЗА ИЗОЛАЦИЯ И АМПЛИФИЦИРАНЕ НА ДНК

4.2.1. ИЗОЛАЦИЯ НА ДНК

Изолирането на ДНК от тъканни проби на мустакати нощници, беше направена според метода чрез изсолване и хлороформна екстракция на Müllenbach et al. (1989), в рамките на 3 последователни дни.

Ден 1: Тъканните проби бяха поставени в 1,5 ml епендорфки, отворени за няколко минути, за да се изпари етанола, в който са били консервирани. След това беше добавен последователно TNE-Buffer (100mM NaCl, 100mM Tris-HCl, 2mM EDTA; pH 8,0), 20 mg/ml Proteinase K (20mg/ml), 10% SDS и 1M DTT. Пробите бяха поставени за 12 часа на 37°C/450rpm.

Ден 2: Към пробите беше добавен 4,5M NaCl и CIA (хлороформ:изоамилов алкохол 24:1; 1 обем) и бяха центрофугирани за 10 мин на 7500 rpm. След центрофугирането се наблюдаваха две фракции на разтвора. В горната фракция се намира ДНК, която беше изтеглена последователно от всяка епендорфка и прехвърлена в нови. Беше добавен по 1 обем изопропанол и пробите бяха сложени на -20 °C през нощта за да се утаят.

Ден 3: Пробите бяха центрофугирани за 25 мин. на 13000 rpm, по този начин ДНК „залепва“ за дъното на епендорфките. След това супернатантата беше изсипана и беше добавен 80% етанол. Всички проби бяха центрофугирани за 10 мин. на 13000 rpm, а супернатантата беше изсипана. Епендорфките бяха оставени да се сушат на стайна температура. След няколко часа беше добавена dH₂O или подходящ буфер. Изолираните проби бяха съхранявани на -20 °C.

4.2.2. PCR НА МИТОХОНДРИАЛНИЯ ND1 УЧАСТЪК

Поради нуждата от ДНК-баркондинг за идентификация на видовата принадлежност на прилепите от групата на мустакатите нощници, беше избран консервативния *nd1* участък. Маркерът се намира в мтДНК

от базова двойка 3,307 до 4,262, представлява една от седемте митохондриално кодирани субединици на ензима NADH дехидрогеназа (убихинон) и е успешно прилаган за целите на ДНК-баркондинг при представителите на семейство Vespertilionidae от което са част мустакатите ношници (Mayer & Ruedi 2001, Mayer & von Helversen 2001, Mayer et al. 2007, Çoraman et al. 2013).

За амплификацията на *nd1* бяха използвани праймерите: ER65 (5'-CCTCGATGTTGGATCAGG-3') и ER66 (5'-GTATGGGCCCGATAGCTT-3'), които хибридизират за 16s rRNA и tRNAMet гените (Petit et al. 1999).

Съставът, концентрацията и програмата на PCR за протичане на реакциите са въведени в **табл. 1** и **2**.

Ревизията на PCR беше проверявана, чрез използване на електрофореза (1% агаров гел в TBE буфер).

Таблица 1. Концентрация и състав на реакционната смес за PCR.

Скрайна концентрация		V _{краен обем} (µl)
ddH ₂ O		17,9
buffer	1x	2,5
dNTP	200 µM	0,5
forward primer	0,4 µM	1
reverse primer	0,4 µM	1
Taq DNA polymerase	0,5 U	0,1
DNA	10 ng	2
Total		25

Таблица 2. Програма за протичане на PCR.

Цикли	Стъпки	T (°C)	t (min)
1 (1x)	1	94	4
2 (40x)	1	94	0:30
	2	55	0:40
	3	72	0:90
3 (1x)	1	72	10
4 (1x)	1	4	for ever

4.2.2.1 СЕКВЕНИРАНЕ

Секвенирането беше извършено по Сангеров метод, чрез използването на вътрешен секвенционен праймер ER70 (5'-CAGACCGGAGTAATCCAGGTCGGT-3'; Petit et al. 1999) и BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit version 2, следвайки протокола на производителя (Applied Biosystems).

Електрофорезата беше направена на ABI's 3130xl Sequencer (Applied Biosystems). Обработването на хроматограмите беше извършено в CodonCode Aligner 6.0.2 (CodonCode Corporation, MA, USA).

4.2.3. PCR НА ЯДРЕНИТЕ ИНТРОНИ *ABHD11*, *ACOX2* И *ROGDI*

В настоящето изследване са използвани три ядрени интрона с оптимални характеристики за решаване на филогенетичните връзки при бозайниците (Igea et al. 2010). Тези маркери се унаследяват от двамата родителя, което е важно допълнение към резултатите получени от мтДНК, която се унаследява само по майчина линия. Интроните са разположени в автозомните хромозоми както следва: *ABHD11* – в №7, *ACOX2* – в №3 и *ROGDI* – в №16 (Igea et al. 2010).

За PCR реакциите бяха използвани праймери развити от Igea et al. (2010) и приложени от Salicini et al. (2011) за мултилокусни анализи при *M. nattereri*:

Праймери	Последователност (5' - 3')
ABHD11-F1	CTGCTACCAACCTGGTGGAGGT
ABHD11-R1	TTVGGCACRGTCTGCATCTGGGC
ACOX2-F1	CCTSGGCTCDGAGGAGCAGAT
ACOX2-R1	GGGCTGTGHAYCACAAACTCCT
ROGDI-F1	CTGATGGAYGCGTGTGCTGCA
ROGDI-R1	CACGGTGAGGCASAGCTTGTGA

Съставът на реакционната смес и програмата на PCR-а са представени в *табл. 3* и *табл. 4*.

Ефективността на PCR беше проверена, чрез използване на електрофореза (1% агаров гел в TBE буфер).

Таблица 3. Концентрация и състав на реакционната смес за PCR на интрони *ABHD11*, *ACOX2* и *ROGDI*.

С _{крайна} концентрация		V _{краен} обем (μl)
ddH ₂ O		16,8
buffer	1x	2,5
dNTP	200 μM	0,5
forward primer	0,4 μM	1
reverse primer	0,4 μM	1
Taq DNA polymerase	1 U	0,2
DNA	10 ng	3
Total		25

Таблица 4. Програма за протичане на PCR.

Цикли	Стъпки	T (°C)	t (min)
1 (1x)	1	94	4
2 (30x)	1	94	0:30
	2	62	0:40
	3	72	0:60
3 (1x)	1	72	8
4 (1x)	1	4	for ever

4.2.3.1 СЕКВЕНИРАНЕ

Получените продукти се секвенираха според метода на Сангер двустранно използвайки горепосочените праймери за PCR и BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit version 2, следвайки протокола на производителя (Applied Biosystems).

Електрофорезата беше направена на ABI's 3130xl Sequencer (Applied Biosystems). Хроматограмите бяха обработени в CodonCode Aligner 6.0.2.

4.3. МЕТОДИ ЗА АНАЛИЗ НА ДАННИТЕ

4.3.1. ОБРАБОТКА НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТИТЕ ПОЛУЧЕНИ ОТ МИТОХОНДРИАЛНАТА ОБЛАСТ *ND1* И ЯДРЕНИТЕ ИНТРОНИ *ABHD11*, *ACOX2* И *ROGDI*

От *nd1* участъкът бяха анализирани общо 333 проби от които 258 на *M. mystacinus*, 74 на *M. davidii* и 83 изтеглени GenBank. Освен това бяха анализирани 95 проби от *ABHD11*, 93 от *ACOX2* и 86 от *ROGDI* общо и за двата вида. В допълнение за поясняване филогенетичната позиция на *M. mystacinus* и *M. davidii* бяха анализирани 101 последователности принадлежащи на *M. brandtii* и 118 на *M. alcaethoe*. Получените митохондриални и ядрени последователности бяха редактирани в CodonCode Aligner 6.0.2 (CodonCode Corporation, MA, USA). След което подравнени в програмата MEGA 6 (Tamura et al. 2013) с помощта на алгоритъма MUSCLE (Edgar & Robert 2004). След извършеното подравняване *ABHD11* остана с дължина 330 bp, *ACOX2* 142 bp и *ROGDI* 307 bp. Всички секвентциите от *nd1* започват със старт кодона ATG и са с дължина 450bp.

За генотипирането на хетерозиготните позиции при ядрените интроните беше използван IUPAC кода на нуклеотиди, след което бяха генотипирани в програмата DNAsp 5.10 (Librado & Rozas 2009) и беше извлечена абсолютната честота на техните алели.

4.3.2. АНАЛИЗИ НА ГЕНЕТИЧНАТА СТРУКТУРА ПРИ *ND1*

Връзката между отделните митохондриални хаплотипове е представена чрез мрежа, за конструкцията на която беше използвана програмата Arlequin 3.5 (Excoffier 2010) и онагледена с Harpstar 0.7 (Teacher &

Griffiths 2011). Хаплотипната мрежа е конструирана, за да се идентифицират „анцестралните“ и „рецентните“ връзки между популациите. Филогенетичните връзки в морфо-групата са представени чрез “distance-based tree” построено с алгоритъма “Neighbor-Joining”, използващ модела за максимална комбинирана вероятност (Tamura et al. 2013).

Дивергенцията между хаплотиповете беше изчислена на базата на p-distance (Nei & Kumar 2000) в програмата MEGA 6.

4.3.3. ОЦЕНКА НА ГЕНЕТИЧНИТЕ РАЗЛИЧИЯ ПРИ *ND1*, *ABHD11*, *ACOX2* И *ROGD1*

За оценка на генетичните различия между отделните популациите и при двата вида молекулярни маркери беше използван анализ за определяне на молекулярната разлика Amova (Excoffier et al. 2010). Анализът е базиран на Wright’s F-statistic (Wright 1951), по-известен като F_{ST} и оценява нивата на генотипните разлики между популациите сравнени с общите различия. Amova е пакет в програмата Arlequin 3.5. Статистическата достоверност беше тествана използвайки 10000 случайни пермутации.

Таблица 5. Степен на полиморфизъм и демографски характеристики на шесте популациите, определени в зависимост от географския си произход и генетичната принадлежност въз основа на митохондриалния *nd1* участък. С ** са означени значимите стойности отговарящи на $P < 0.02$, а с * значимите стойности при $P < 0.05$.

Популация	Бр. генни копия (N_s)	Бр. полиморф. места (S)	Бр. хаплотипове (Nh)	Хаплотипово разнообразие (Hd)	Нуклеотидно разнообразие (π)	Fu and Li’s D* D	Fu and Li’s F* F	Fu’s Fs F’s	Tajima’s D TD
Митохондриален клад на <i>M. mystacinus</i>									
Ц. Европа	118	39	42	0.858	0.0220	-5.027**	-4.551**	-43.336	-1.100*
Балкани	108	25	16	0.827	0.0232	-1.625	-1.787	-3.205	-1.281
Турция	18	17	10	0.882	0.0342	0.069	-0.203	-2.119	-0.783
Кавказ	14	20	7	0.879	0.0676	0.407	0.646	1.823	0.984
Митохондриален клад на <i>M. davidii</i>									
Кавказ	49	15	10	0.564	0.0157	-2.762*	-2.778*	-2.417	-1.539
Монголия	25	14	8	0.663	0.0171	-2.794*	-2.850*	-1.721	-1.630

4.3.4. АНАЛИЗИ НА ДЕМОГРАФСКИТЕ ПРОЦЕСИ ПРИ *ND1*, *ABHD11*, *ACOX2* И *ROGD1*

Демографските процеси, които са претърпели популациите в миналото, могат да бъдат реконструирани с помощта на различни методи. Основната представа може да бъде получена чрез обобщена статистика, описваща генетичната изменчивост на данните. Например, високи стойности на хаплотиповото (h) и нуклеотидното (π) разнообразие показват стабилна популация в дългосрочен план, докато високи стойности на хаплотиповото (h) и ниски на нуклеотидното (π) разнообразие по-скоро съответстват на рецентна експанзия.

Направена е прогноза за промените в размера на популациите в миналото, чрез метода mismatch distribution (Schneider & Excoffier 1999), който сравнява наблюдаваните честоти на сдвояване с очакваните от демографския модел. Моделът на експоненциален растеж на една популация се очаква да бъде с унимодално разпределение. Докато мултимодално разпространение се очаква в популация, която е близка до баланса между генетичния дрейф и мутациите. Беше приложена т.нар. raggedness (r) статистика, при която се пресмятат отклонения около кривата на mismatch distribution модела. Ако резултатът е не сигнификантен, това означава, че не се поддържат стабилен размер на популацията.

Тестовите за неутралност (Ramos-Onsins & Rozas 2002) са подходящ метод за откриване на популационен растеж. При сравнението на тестовите, може да се разграничи експанзията от т. нар. hitchhiking (Fu 1997). Отрицателни стойности на Tajima's D и Fu's Fs показва доминиране на сегрегационни места в алелите с ниска честота, което е знак за популационна експанзия и/или негативна селекция. Положителните стойности означават ниско ниво на полиморфизъм с висока и ниска честота, знак за намаляване на размера на популацията и/или балансирана селекция, напр. популации след "bottleneck". Всички тези параметри: брой на генните копия (N_s), брой полиморфни места (S), брой хаплотипове (N_h), хаплотипово разнообразие (H_d), нуклеотидно разнообразие (π), тестове за неутралност (Fu and Li's D^* , Fu and Li's F^* , Fu's F_s и Tajima's D) и mismatch distribution бяха изчислени в DNAsp 5.10 и Arlequin 3.5.

4.3.5. ПОПУЛАЦИОННА СТРУКТУРА ПРИ *ABHD11*, *ACOX2* И *ROGDI*

Програмата Structure 2.3.4 (Pritchard et al. 2000) беше използвана за изясняване на принадлежността на отделните индивиди към определена популация. За целта беше използван смесен модел (admixture model) на корелация на алелните честоти (Falush et al. 2003) по Баясианския клъстерен модел. Броят на клъстерите (K) беше зададен *a priori* от 2 до 5 и бяха пуснати по пет симулации за всяка стойност на K (50 000 МСМС стъпки за всеки 10 000 стъпки от burn-in периода). Най-доброто K беше определено, чрез изчисляване на ΔK според Evanno et al. (2005).

Най-напред бяха изчислени стойности $L'(K) = L(K) - L(K - 1)$,
 после $L''(K) = |L'(K + 1) - L'(K)|$
 и най-накрая $DK = |L''(K)| / L(K)$.

Обобщените резултати за всяко K бяха графично представени с помощта на програмата Distruct 1.1 (Rosenberg 2004).

5. РЕЗУЛТАТИ

5.1. ГЕНЕТИЧНО РАЗНООБРАЗИЕ И ГРУПИРАНЕ НА БАЗАТА НА МИТОХОНДРИАЛНИЯ *ND1* МАРКЕР

Филогенетичните връзки на Балканският полуостров в морфо-групата на *M. mystacinus* са на **фиг. 14** в доктората. На нея е представено Neighbor-Join-ing tree, получено за *nd1* (450bp). То онаглеждава филогенетичните връзки в морфо-групата на *Myotis mystacinus* на Балканите. Подкрепата на отделни клонове бяха оценени чрез 1000 bootstrap повторения. Клед А показва филогенетичните връзки при *M. mystacinus* и *M. davidii*, а клед Б при *M. alcahloe* и *M. brandtii*.

Установена е дълбока дивергенция (12% - 15,3%) между двата основни клада А и Б. Клед А включва митохондриалните линии на *M. mystacinus* и *M. davidii*, а клед Б съдържа ясно обособените линии на *M. alcahloe* и *M. brandtii* (1,6% - 0,4%).

От анализираниите последователности при *M. mystacinus* и *M. davidii* на *nd1* участъка в Палеарктичната област, 116 са полиморфните сайтове (26%) и 87 хаплотипове. Ясно се отделят две групи в рамките на хаплотиповата мрежа (**фиг. 15 а**). Двата клада се различават с 10% или 44 субституции. Кладът на *M. mystacinus* (**фиг. 15 б**) включва индивиди от Мароко и Европа, включително Балканския полуостров,

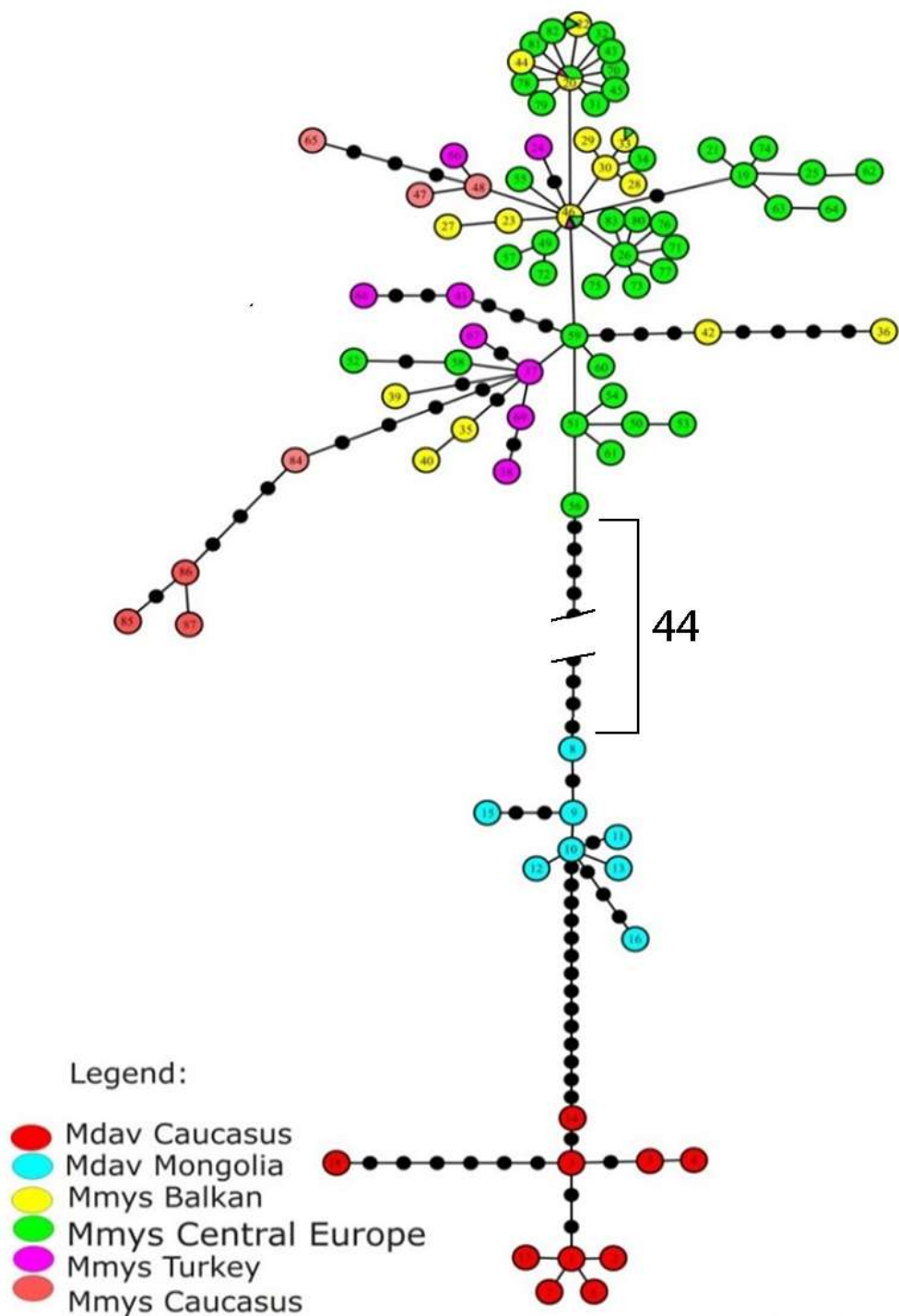
Турция, Русия и Кавказкия регион. Кладът на *M. davidii* (**фиг. 15 в**) се разделя на две подгрупи, първата включва индивиди от източна Украйна, Армения, Грузия, Русия (Кавказки регион), Турция, Иран и два индивида от България, а втория индивиди от Монголия, Русия (Северен Сибир) и Южна Корея. Двете групи се различават с 3,1 % или 14 субституции. Беше направен допълнителен анализ на първата подгрупа от клада на *M. davidii* (**фиг.16 а, б**), за изясняване на консервационния статус на индивидите от района на езерото Севан в Армения. Хаплотиповете отново се групираха в два клада различаващи се с 3,3% (15 субституции). Индивидите от района на езерото Севан споделят общ хаплотип 9 (виж **Приложение II**), заедно с екземпляри от Турция и са междинен клад при който дивергенцията с останалите индивиди от Кавказ, Турция, Русия и Иран е едва 2%.

При последователностите на *M. alcathoe* бяха установени 25 полиморфни сайта (6%) и 14 хаплотипове. Кавказкият клад е ясно отдиференциран от Балканско-Европейските хаплотипови групи с 12 субституции или 2,6 % (**фиг. 17**). При *M. brandtii* полиморфните сайтове е 23 (5%), а броя на хаплотиповете е 17. При видът няма ясно разграничаване на отделни географски групи, както при останалите три вида (**фиг. 18**).

5.2. ГЕОГРАФСКИ МОДЕЛ НА ГЕНЕТИЧНОТО РАЗНООБРАЗИЕ

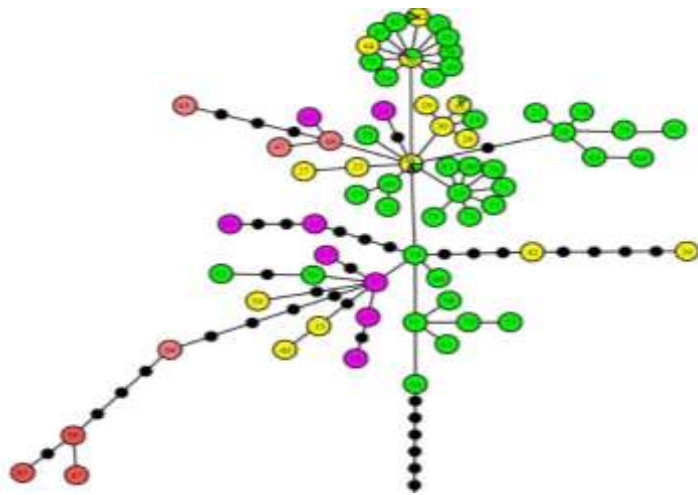
Генетичното разнообразие при *M. mystacinus* и *M. davidii* се различава съществено. Като цяло хаплотиповото и нуклеотидното разнообразие са по-високи в популациите на *M. mystacinus* отколкото при тези на *M. davidii* (**табл. 5**).

Най-високи са стойностите в балканската, турската и кавказката популации на *M. mystacinus*, а най-ниски в европейската популация на вида. Нуклеотидното разнообразие е най-малко два пъти по-високо в кавказката популация в сравнение с останалите.

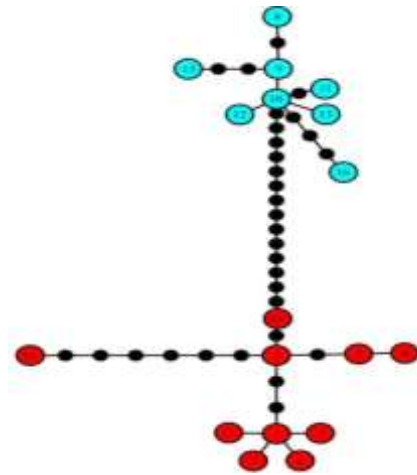


Фиг. 15. (а) Хаплотипова мрежа за *M. mystacinus* и *M. davidii*, изградена на базата на 450 bp фрагмент от *ndl*. Всеки кръг съдържа номера на хаплотипа и цвят отговарящ на един от анализиранияте райони. С жълт цвят са означени Балканите, със зелен Централна Европа, с червен Кавказ, със син Монголия и с розов Турция. Отделните хаплотипове са свързани с линия. Малките черни кръгчета по линиите свързващи хаплотиповете, отговарят на една субституция, като максималният им брой в една линия достига 44.

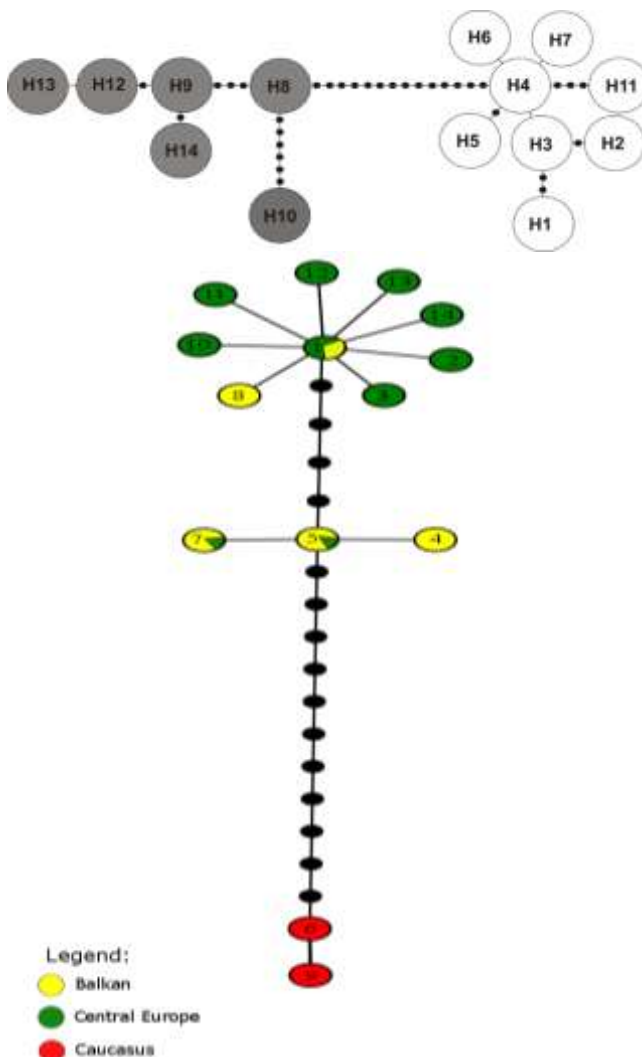
При европейската популация наблюдаваме няколко независими сигнала за популационна експанзия: в хаплотиповата мрежа е налице „star-like“ клъстериране (фиг. 15), при mismatch distribution (фиг. 19), имаме унимодално разпределение, високи стойности на raggedness (r) статистика, а тестовете за неутралност показва високи и значими стойности на F_u и L_i 's D^* , F_u и L_i 's F^* , и ниски, но значими при Tajima's D (табл. 5). F_{ST} резултатът (табл. 6) показва ниски стойности за географско близки популации (0.09-0.37 Европа/Балкани-Турция/Кавказ) и високи за географски отдалечените популации (0.59 Европа/Кавказ) при *M. mystacinus*.



Фиг. 15 (б). Хаплотипови връзки в клада на *M. mystacinus*

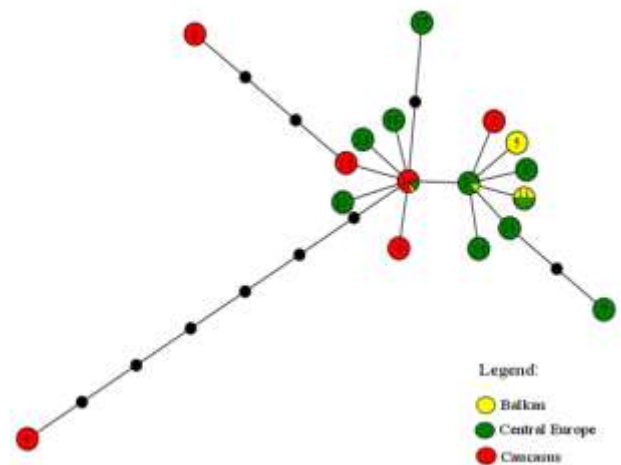


Фиг. 15 (в). Хаплотипови връзки в клада на *M. davidii*.



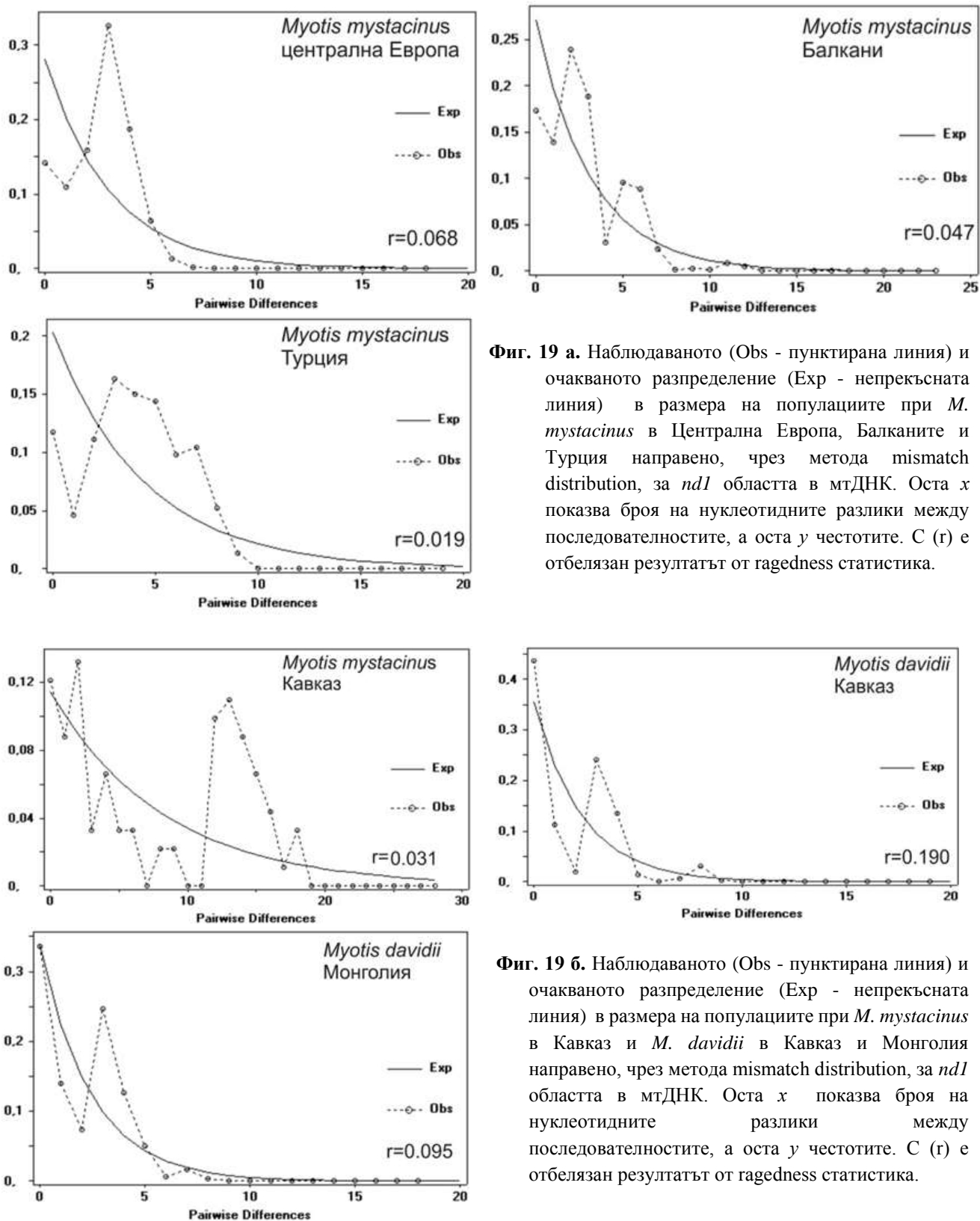
Фиг. 17. Хаплотипова мрежа, изградена на базата на 450 bp фрагмент от *nd1* за *M. alcahoe*. Всеки кръг съдържа номера на хаплотипа и цвят отговарящ на един от анализиранияте райони..

Фиг. 16. Хаплотипова мрежа изградена на базата на *nd1* участъка с дължина 450bp. Сивите кръгове включват хаплотипове от Кавказкия регион, а белите включват хаплотипове на индивиди от Източна Палеарктика.



Фиг. 18. Хаплотипова мрежа, изградена на базата на 450 bp фрагмент от *nd1* за *M. brandtii*. Всеки кръг съдържа номера на хаплотипова и цвят отговарящ на един от анализиранияте райони..

На *фиг. 17* и *18* С жълт цвят са означени Балканите, със зелен Централна Европа и с червен Кавказ. Отделните хаплотипове са свързани с линия. Малките черни кръгчета по линиите свързващи хаплотиповете, отговарят на една субституция



Фиг. 19 а. Наблюдаваното (Obs - пунктирана линия) и очакваното разпределение (Exp - непрекъсната линия) в размера на популациите при *M. mystacinus* в Централна Европа, Балканите и Турция направено, чрез метода mismatch distribution, за *nd1* областта в мтДНК. Оста *x* показва броя на нуклеотидните разлики между последователностите, а оста *y* честотите. С (*r*) е отбелязан резултатът от raggedness статистика.

Фиг. 19 б. Наблюдаваното (Obs - пунктирана линия) и очакваното разпределение (Exp - непрекъсната линия) в размера на популациите при *M. mystacinus* в Кавказ и *M. davidii* в Кавказ и Монголия направено, чрез метода mismatch distribution, за *nd1* областта в мтДНК. Оста *x* показва броя на нуклеотидните разлики между последователностите, а оста *y* честотите. С (*r*) е отбелязан резултатът от raggedness статистика.

Най-високи F_{ST} стойности (0.91-0.95) Кавказ/Монголия-Европа/Монголия) бяха отчетени между популациите от отделните митохондриални кладове *M. mystacinus* vs. *M. davidii*.

Таблица 6. F_{ST} разлики между шесте популациите при *nd1* участъка. Въз основа на анализ за намиране молекулярната разлика *Amova*.

Популация	Ц. Европа (<i>Mmys</i>)	Балкан (<i>Mmys</i>)	Турция (<i>Mmys</i>)	Кавказ (<i>Mmys</i>)	Кавказ (<i>Mdav</i>)
Балкан (<i>Mmys</i>)	0.09347				
Турция (<i>Mmys</i>)	0.28309	0.23959			
Кавказ (<i>Mmys</i>)	0.59387	0.55105	0.37969		
Кавказ (<i>Mdav</i>)	0.95531	0.95286	0.95283	0.93631	
Монголия (<i>Mdav</i>)	0.95108	0.94875	0.94199	0.91454	0.89326

5.3. ГЕНЕТИЧНО РАЗНООБРАЗИЕ И СТРУКТУРИРАНЕ ПРИ ТРИТЕ ЯДРЕНИ ИНТРОНИ (*ABHD11*, *ACOX2* И *ROGDI*)

В последователност *ABHD11*, *ACOX2* и *ROGDI* бяха установени 22, 33 и 27 алела, като дивергенцията между тях е 1,6%, 2,6% и 2,2% (*табл. 7*).

Общо 76 индивида бяха анализирани с програмата Structure (*фиг. 20*) и отнесени към пет групи $K=2-5$, с най-добро клъстериране за $K=3$ според стойностите на $L(K)$, $L'(K)$ и ΔK (*фиг.21 а-в, в доктората*). Само за $K = 3$ почти всички индивиди бяха причислени към една група с високи вероятности $> 90\%$ (*фиг. 20*). Този резултат показва, че анализа сравнява три генетични линии. Индивидите от Мароко, Централна Европа, северните части на Балканския полуостров, Турция, Западна Русия и Кавказ, образуват първата група на *M. mystacinus*. Втората група е на *M. davidii* и е съставена от индивиди от Балканите, Източна Украйна и отново Турция и Кавказ. Третата група е изградена само от индивиди на *M. davidii* от Монголия. В Кавказ всичките три митохондриални линии бяха открити в непосредствена близост. При представителите на втората група (group 2 - *M. davidii*) бяха установени няколко индивида принадлежащи към първата група (group 1 - *M. mystacinus*). От анализираните турски индивиди само един беше причислен към първата групата, а всички останали към втората група.

5.4. ГЕНЕТИЧНО РАЗНООБРАЗИЕ НА ПОПУЛАЦИИТЕ В РАМКИТЕ НА ГРУПИТЕ

При *ABHD11* е налице ниско разнообразие от алелни състояния и съответно допринася най-малко за видовото разнообразие в трите групи (*табл. 8, в доктората*). Най-голямо алелно разнообразие се наблюдава при *ACOX2* и *ROGDI*, което допринася за по-ясното отнасяне на отделните индивиди към трите групи (*табл. 9 и 10, в доктората*). В трите групи се наблюдаваха уникални и общи алели. Само при *ROGDI* (*табл. 10, в доктората*) всички индивиди от Централна Европа и Мароко бяха мономорфни по алел 9 с изключение на един индивид от Словения.

Според принадлежността на индивидите към една от трите групи и техния географски произход бяха определени шест популации. Генетичното разнообразие при *ABHD11* отново не беше голямо между отделните популации (*табл. 11*). При *ACOX2* и *ROGDI* хаплотиповото (Hd) и нуклеотидното (π)

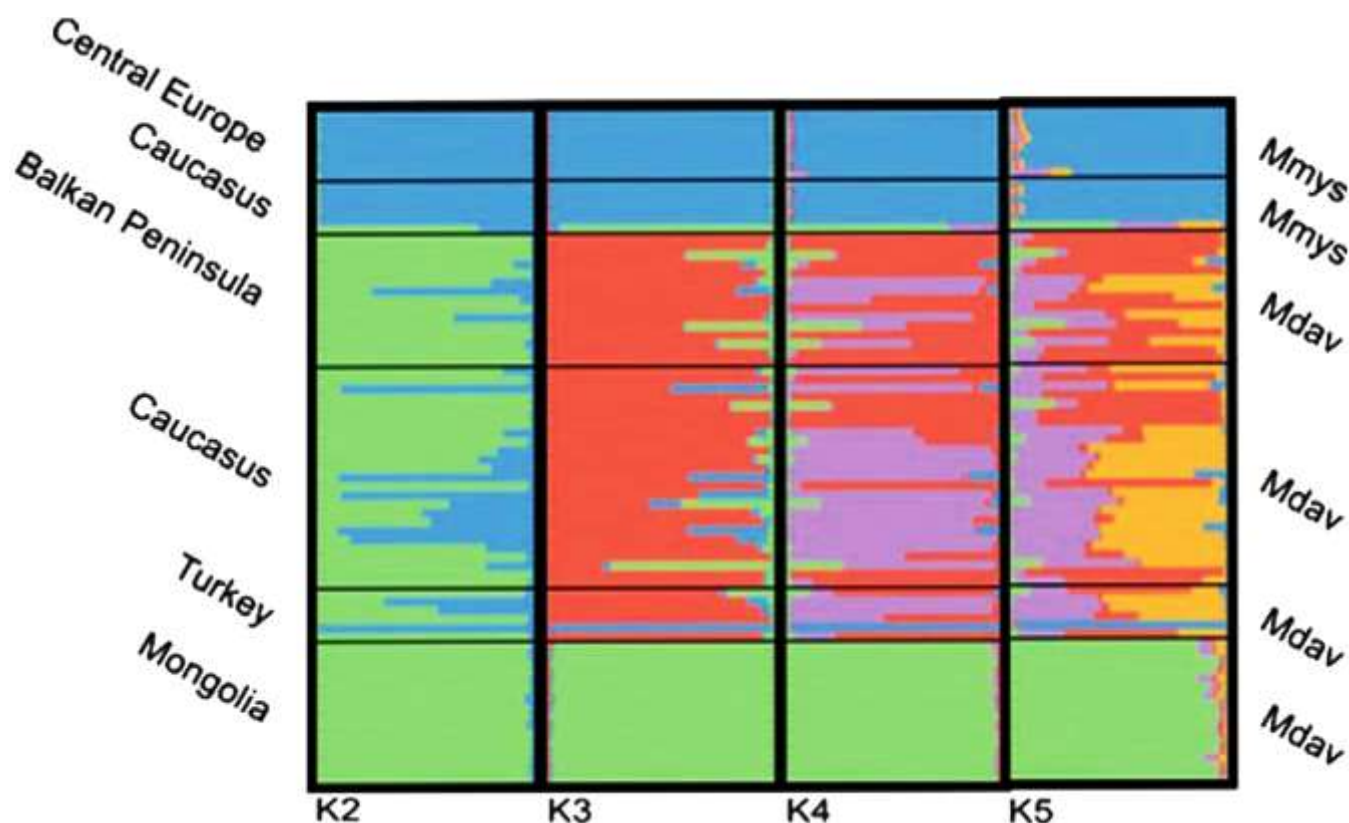
разнообразие бяха високи за популациите от втората група и значително по-ниски в популациите от първа и трета група (*табл. 11*).

В рамките на втората група (group 2 - *M. davidii*) стойностите на нуклеотидното разнообразие за Балканите, Турция и Кавказ са сходни ($\pi=0.019-0.080$) и по-високи, отколкото при популациите от първа група ($\pi=0-0.054$), виж табл. 11. Нуклеотидното разнообразие между индивидите от трета група е ниско при *ROGDI* ($\pi=0.006$).

5.5. ГЕОГРАФСКИ РАЗЛИЧИЯ МЕЖДУ ПОПУЛАЦИИТЕ (F_{ST})

F_{ST} резултатът (*табл. 12, 13* и *14*) покрепят резултата от Structure. Най-високи стойности бяха намерени между първа и трета група между популациите на Монголия и Централна Европа (0.61-0.85) за *ASOX2* и *ROGDI*. Това са и географски най-отдалечените популации. Освен това и за трите интрона се установиха високи стойности (0.14-0.20-0.39) за кавказката контактна зона при първа и втора група. В рамките на втора и трета група стойностите варираха от 0-0.35.

F_{ST} стойностите за трите интрона при европейската и балканската популации от група едно и две са високи (0.37-0.63-0.48) и ниски между балканската и кавказката популации от група две (0.13-0.09-0).



Фиг. 20. Бар графика, резултат от *admixture model* в програмата Structure, онагледяваща принадлежността на индивидите към определена популация за предварително определения брой кълстери, $K = 2-5$. Всеки индивид е представен с хоризонтална линия от цветни сегменти, като броя им съответства на K . Дължината на всеки сегмент съответства на стойността на изчисления коефициент на членство.

Таблица 7. Полиморфизъм на последователностите при трите ядрени интрона

Инtron	Дължина	Брой полиморфни места	% на полиморфните места	Брой алели	Максимална дивергенция на последователностите
ABDH11	330 bp	17	5.15	22	1.6
ACOX	142 bp	19	13.3	33	2.6
ROGDI	307 bp	21	6.8	27	2.2

Таблицы 11, 12 и 13 са в лендскейп формат и са показани след Таблица 14.

Таблица 14. F_{ST} разлики между шестте популациите при *ROGDI*, въз основа на анализ за намиране молекулярната разлика *Amova*.

Популация	Ц. Европа(<i>Mmys</i>)	Балкан (<i>Mmys</i>)	Турция(<i>Mmys</i>)	Кавказ (<i>Mmys</i>)	Кавказ (<i>Mdav</i>)
Балкан (<i>Mmys</i>)	0.48548				
Турция(<i>Mmys</i>)	0.38899	0.00962			
Кавказ (<i>Mmys</i>)	0.07689	0.43557	0.28453		
Кавказ (<i>Mdav</i>)	0.42014	-0.00899	0.04089	0.39712	
Монголи (<i>Mdav</i>)	0.85894	0.24287	0.18777	0.73398	0.24606

Таблица 11. Полиморфизъм при трите ядрени интрона.

Популация	Брой генни копия (N_s)			Брой алели (N_h)			Хаплотипово разнообразие (H_d)			Нуклеотидно разнообразие (π)		
	ABDH11	ACOX2	ROGDI	ABDH11	ACOX2	ROGDI	ABDH11	ACOX2	ROGDI	ABDH11	ACOX2	ROGDI
Group 1 (<i>M. mystacinus</i>)												
Ц. Европа	16	16	16	7	5	2	0.800	0.700	0.125	0.05467	0.03333	0.00431
Кавказ	12	12	12	1	3	5	0	0.440	0.576	0	0.03984	0.03240
Group 2 (<i>M. davidii</i>)												
Балкани	26	30	30	6	11	5	0.517	0.811	0.678	0.03323	0.07237	0.06001
Кавказ	46	50	50	8	19	14	0.750	0.934	0.830	0.04294	0.11374	0.08014
Турция	12	12	12	2	6	8	0.485	0.864	0.894	0.01940	0.10382	0.07315
Group 3 (<i>M. davidii</i>)												
Монголия	30	32	32	8	6	3	0.750	0.820	0.180	0.04634	0.04757	0.00633

Таблица 12. F_{ST} разлики между шестте популациите при *ABH11*, въз основа на анализ за намиране молекулярната разлика A_{mova} .

Популация	Ц. Европа (<i>Mmys</i>)	Балкан (<i>Mmys</i>)	Турция (<i>Mmys</i>)	Кавказ (<i>Mmys</i>)	Кавказ (<i>Mdav</i>)
Балкан (<i>Mmys</i>)	0.37515				
Турция (<i>Mmys</i>)	0.12967	0.16368			
Кавказ (<i>Mmys</i>)	0.06174	0.47739	0.27273		
Кавказ (<i>Mdav</i>)	0.18099	0.13223	0.00701	0.14193	
Mongolia (<i>Mdav</i>)	0.11331	0.35776	0.14193	0.06424	0.18494

Таблица 13. F_{ST} разлики между шестте популациите при *ACOX2*, въз основа на анализ за намиране молекулярната разлика A_{mova} .

Популация	Ц. Европа (<i>Mmys</i>)	Балкан (<i>Mmys</i>)	Турция (<i>Mmys</i>)	Кавказ (<i>Mmys</i>)	Кавказ (<i>Mdav</i>)
Балкан (<i>Mmys</i>)	0.63566				
Турция (<i>Mmys</i>)	0.43344	0.13752			
Кавказ (<i>Mmys</i>)	0.17866	0.52025	0.26507		
Кавказ (<i>Mdav</i>)	0.32748	0.09164	-0.02452	0.20534	
Монголия (<i>Mdav</i>)	0.61545	0.33747	0.19533	0.45658	0.17966

6. ОБСЪЖДАНЕ

6.1. ФИЛОГЕНЕТИЧЕН СТАТУС НА *M. ALCATHOE* И *M. BRANDTII* НА БАЛКАНСКИЯ ПОЛУОСТРОВ ВЪЗ ОСНОВА НА МИТОХОНДРИАЛНИЯ *ND1* УЧАСТЪК

Между европейско-балканската и кавказката популация на *M. alcatheae*, хаплотиповото структуриране показва определени разлики (фиг. 17). Ниската дивергенция (2,6%) между двете основни групи се обяснява с недостатъчния брой анализирани индивиди по местообитания. Структурираните балкански хаплотипове контрастират на фона на европейските, които образуват „star-like“ структура. Това показва, че именно от Балканския полуостров е станала реколонизацията на Европа след последния ледников максимум. Популацията на Апенините е останала изолирана поради бариерния ефект на Алпите пред разпространението на вида (Bogdanowicz et al. 2015). При това адриатическата популацията вероятно се е свързала през западните Балкани с източната част на полуострова. Тази хипотеза се подкрепя от общия хаплотип 1 (фиг. 17), който е общ за България, Турция, Румъния, Италия и някои западно европейски страни.

Резултатите от молекулярните анализи при *M. brandtii* (фиг. 14 и 18) показват генетична еднородност на вида. Интересното при него е, че е близкородствен с американските представители на род *Myotis* и в същото време няма близко родствени връзки с останалите представители на морфо-групата на *M. mystacinus* (Ruedi & Myer 2001, Kruskop et al. 2012). Това предполага сравнително рецентна експанзия в западните планински части на Палеарктика. Този сценарий се подкрепя от структурирането на хаплотиповете (фиг. 14), при които липсва дивергенция между европейско-балканските и кавказките индивиди. Наличието на кавказки структурирани хаплотипове и в двете „star-like“ структури и споделянето на общия хаплотип 1 с индивиди от България, Унгария и Полша предполагат, че един от вероятните пътища за колонизация на Западна Палеарктика е бил свързан с Кавказ. Във всички случаи е нужна по-голяма извадка, за потвърждаването или отхвърлянето на това допускане.

6.2. ГЕНЕТИЧНО РАЗНООБРАЗИЕ И СИГНАЛИ ЗА ЗАМЯНА НА МИТОХОНДРИАЛНИЯ ГЕНОМ

Анализите на митохондриалната и ядрената ДНК при *M. mystacinus* и *M. davidii* показват две генетични линии, от които едната е западна, а другата е източна (фиг. 15 и 20). Двете генетични линии дефинирани от трите интрона съвпадат с морфологично определените *M. mystacinus*, който е със западно разпространение и *M. davidii* с източно разпространение в Палеарктичната област (Benda et al. 2016). Такъв е и резултатът за митохондриалният участък при който наблюдаваме двете линии, с изключение на индивидите от Балканския полуостров, Турция и някои от кавказките екземпляри. На практика на базата на морфологичните си характеристики и резултата от анализирани интрони, гореспоменатите изключения представляват *M. davidii*, но в действителност те споделят митохондриалната ДНК на западно палеарктичния *M. mystacinus*. Потвърждаването на западната и източната линия морфологично и генетично показва, че е протекла алопатрична дивергенция в западната и източната част на Палеарктика, която е довела до еволюцията на *M. mystacinus* и *M. davidii*. Установяването на митохондриална ДНК от *M. mystacinus* в контактните зони, т.е. в най-западните популации на източните *M. davidii* е резултат на

замяна на митондриалния геном от *M. mystacinus* към *M. davidii*. Само два индивида от България имат оригиналния митондриален хаплотип на *davidii* (фиг. 14), докато останалите 56 индивида носят хаплотипове на *mystacinus*. Това е в резултат на почти пълна замяна на митондриалния геном на *M. davidii* с този на *M. mystacinus*.

Митондриалната замяна не е нетипичен феномен при прилепите разпространени в Палеарктичната област (Berthier et al. 2006, Artyushin et al. 2009, Furman et al. 2013, Furman et al. 2014). Процесът е асиметричен и е описан при бозайници, които са заселили даден регион след последния ледников период (Melo-Ferreira et al. 2005). Компютърни симулации базирани върху модела за неутралност показват, че популациите разположени далече от източника на междувидово кръстосване имат високи нива на замяна. Това е резултат от многобройни кръстосвания на „гребена на вълната“, по време на фазата на експанзия на тази популация (Currat et al. 2008) и би могло да обясни пълната замяна на митондриалния геном на *M. davidii* с този на *M. mystacinus*.

При обзора на разпространението и таксономията на морфо-групата на *M. mystacinus* в Кавказ Benda et al. (2016) установяват, че индивидите идентифицирани като *M. mystacinus* на базата на *cytb* (виж фиг. 2 клад Ia) споделят общ хаплотип с екземпляри определени морфологично като *M. mystacinus* и *M. aurascens* – днес синонимизиран с *davidii* (Benda & Tsytsulina 2000, Benda et al. 2012), което е още един пример за замяна на митондриалния геном от *M. mystacinus* към *M. davidii*.

6.3. СЛЕДИ ОТ ХИБРИДИЗАЦИЯ МЕЖДУ *M. MYSTACINUS* И *M. DAVIDII*

Установяването на замяна на митондриалния геном предполага случаен процес довел до хибридизация между двата таксона, който е оставил отпечатъци и върху ядрения геном (Vallo et al. 2012, Khan et al. 2014). Получените резултати от анализиранияте ядрени и митондриални данни показват, че не само можем да говорим за протекла хибридизация между двете генетични линии, но има вероятност процеса да е продължил и до неотдавнашното минало. Например алелите на екземплярите от Балканите, Турция и Кавказ (втора група) са разположени между две добре обособени алопатрични популации (табл. 9), а именно тези от първата и третата група. Освен това няколко индивида от втора група са хетерозиготни по алели характерни за двете линии от най-западната и източна част на Палеарктика (табл. 8, 9 и 10). В Кавказ бяха установени индивиди определени като *M. davidii* в съответствие със последователностите на ядрените интрони, но носещи митондриалния хаплотип на *M. mystacinus*. Обратният модел не беше установен, което демонстрира еднопосочен генен поток с преобладаваща хибридизация на женски *M. mystacinus* с мъжки *M. davidii* и последвало кръстосване с *M. davidii*.

6.4. ПОЛОЖЕНИЕТО НА БАЛКАНСКИЯ ПОЛУОСТРОВ

Доказателствата за хибридизация между *M. mystacinus* и *M. davidii* поставя въпроса за ефективността на репродуктивно изолационните им механизми. Остава и въпросът дали процеса е бил еднократен или не и доколко хибридизацията продължава и до днес в тази контактна зона. Структурираните хаплотипове (фиг. 15) и показателите за генетично разнообразие (табл. 5) показват, че хибридизацията и еднопосочния генен поток са станали не толкова отдавна. Например екземплярите от Словения, Хърватска, Сърбия, и

Гърция принадлежат към *M. davidii* по ядрени интрони и морфологични белези, но притежават митохондриални хаплотипове характерни за *M. mystacinus*. Такъв е и случаят на индивидите от България с изненадващ резултат, че споделят общ хаплотип с европейските индивиди, които както морфологично така и по двата вида ДНК са *M. mystacinus*. Този резултат за българските екземпляри *M. davidii* носещи *mystacinus* мтДНК може да представлява втори и по-скорошен случай на замяна на митондриалния геном. Основният еволюционен механизъм довел до този резултат вероятно е ядрената замяна на генома на *M. mystacinus* с този на *M. davidii*, чрез еднопосочен и обширен генен поток от към мъжките индивиди. Мъжкият генен поток води до по-бърза ядрена отколкото митондриална замяна (Chan & Levin 2005). Женските индивиди на повечето видове прилепи в умерения пояс се характеризират с филопатрично поведение. Те не напускат района на родното си място (Kunz 1982, Kerth & Petit 2005, Hulva et al. 2010, Bogdanowicz et al. 2015), което е бариера пред митондриалния генен поток (Castella et al. 2001, Ruedi & Castella 2003). Докато мъжките се разселват на значителни разстояния от родните места, презимуват в новите територии и се размножават близко до своите хибернакулуми (зимовища). Чрез тях ядреният генен поток преодолява значително разстояния (Turmelle et al. 2011, Petit et al. 1999, Veith et al. 2004). В България, в Западни Родопи, в пещерата Ледницата, през размножителния период са установени 11 вида прилепи, включително мустакати нощници (Dundarova 2018). Ледницата, освен място за размножаване, е и хибернакулум на голяма надморска височина (Petrov & von Helversen 2011, Dundarova 2018). Подобни хибернакулуми в южната периферия на ареала на *M. mystacinus* са предпоставка за контакт между *M. mystacinus* и *M. davidii*. Морфологично *M. davidii* е по-голям от *M. mystacinus* и по-този начин мъжките *M. davidii* могат да имат по-голям шанс при избора на партньор от женските индивиди. Според Wirtz (1999), избора на партньор ще бъде насочен към преобладаващо кръстосване между женските от редките видове с мъжките от доминиращия вид, което може да бъде породено и от екологични фактори. Асортативният модел на кръстосване предложен от Chan & Levin (2005) предполага, че женските предпочитат да се чифтосват с хетероспецифични мъжки дори и при наличието на конспецифични мъжки, при определени екологичните фактори. Вероятно поради тази причина женските *M. mystacinus* са се кръстосвали с мъжки *M. davidii*, а полученото хибридно поколение се кръстосва отново с *M. davidii*. Хетерогаметният хибриден пол е стерилен според правилото на Халдан, докато хомогаметният женски пол е жизнеспособен, според ефекта на Хъбс. Съгласно Roca et al. (2005), всяко обратно кръстосване ще разреши на половина алелите от единия родителски вид, докато популацията не придобие ядрения геном на единия вид и мтДНК на другия вид. Това се потвърждава и от получените F_{ST} разлики, където при мтДНК (**табл. 6**) балканската и европейските популации имат ниски стойности и високи при яДНК (**табл. 12, 13, 14**).

6.4.1. РОЛЯТА НА ПОСЛЕДНИЯТ ЛЕДНИКОВ ПЕРИОД ПРИ ОБОСОБЯВАНЕТО НА ДВЕТЕ ГЕНЕТИЧНИ ЛИНИИ

Стара планина разделя територията на България на две части, северната е равнина, а южната е планинска, с изключение на тракийската равнина. Въпреки, че южната част е географски малка зона в нея се намират климатично буферирани джобове в ландшафта, които изпълняват ролята на рефугиум за някои бореални видове (Schmit & Varga 2012). От друга страна през последният глациален максимум полупланинските

райони са били рефугиум за този тип организми (Popov et al. 2007). Тази географска особеност поставя страната ни сред частните случаи на рефугиумите по време на последния ледников период, а именно „рефугиум в рефугиума“. Терминът е предложен най-напред за Иберийският полуостров от Gómez et al. (2007). Имайки предвид тези географски особености и влиянието на екологичните фактори, България вероятно е била рефугиум за *M. mystacinus*, който изчезва след ледниковия период поради обширен еднопосочен ядрен поток от към *M. davidii* и днес българската популация е хибридна, доминирана от ядрения геном на *M. davidii* и митохондриалния на *M. mystacinus*. Този сценарий е най-правдоподобен, т.к. *M. davidii* обитава топли местообитания в умерените и субтропичните райони от Югозападна Европа до Централна Азия, докато *M. mystacinus* обитава бореалните и умерените гори на Северна Палеарктика (Benda & Karataş 2005). Следователно еднопосочният ядрен поток е бил благоприятстван от естествения подбор по време на след ледниковото затопляне в южните части.

От една страна митохондриалната замяна е маскирала уникалните хаплотипове от българските индивиди, което е довело до тяхната хомогенизация с тези на европейската популация (**фиг. 15**). От друга сигналите за реколониращите събития се проявяват в бърза експанзия, резултат на която е липсата на хаплотипово разнообразие и значителна хомозигодност (Hewitt 1996), което е случая на европейската популация (**табл. 5**). Пътят за реколонизация на *M. mystacinus* от България към Централна Европа е свързан с планинската верига на Карпатите. Доказателство за това е общия хаплотип 20 (**фиг. 15, Приложение I**), който е общ за България, Сърбия, Румъния, Унгария, Полша и Германия. Много фосилни материали на *M. mystacinus* и *E. nilssonii* от късния плиоцен са били установени в две пещери в Западна Стара планина (Peshev et al. 2004). Според Reed et al. (2004) планинската верига на Карпатите е разположена от Централна към Източна Европа и свършва на Балканите, като се извива покрай Румъния, после минава в Сърбия през прохода Железни врата и свършва в България в най-западната точка на Стара планина. Имайки предвид, че *M. mystacinus* и *E. nilssonii* обитава бореалните и умерените гори на северна Палеарктика, а в България *E. nilssonii* е открит във високите части на Рила (Popov et al. 2007), ако в България някога се установи чист *M. mystacinus* по ядрена ДНК то той ще е реликтен вид за Балканите.

Втората вълна на реколонизация от *M. mystacinus* към Централна Европа е била от Иберийския полуостров. По-късно балканската и иберийската реколонизационни вълни се срещат в Германия и Полша (**фиг. 15** и виж хаплотиповете в **Приложение I**).

Структурираните хаплотипове (**фиг. 15**) и високото хаплотипово разнообразие (**табл. 5**) показват, че е съществувал и рефугиум на *M. mystacinus* в Кавказ. Кавказки рефугиум е имало и за *M. davidii*, съдейки по структурираните хаплотипове и унимодалното разпределение на популацията (**фиг. 15** и **16**). Вторият рефугиум при *M. davidii* е бил от Анадола в Турция през югозападните Балкани до Апенините. Този резултат не е изненадващ имайки предвид факта, че Кавказ и Анадола са били важни центрове на генетично разнообразие при реколонизацията на Европа (Cooper et al. 1995, Hewitt 1999, Hampe et al. 2003, Rokas et al. 2003, Dubey et al. 2006, Rossiter et al. 2007).

Разликата между кавказката и балканската линия на *M. davidii* е, че кавказката носи оригиналната митохондриална ДНК на *davidii*, а балканските интрогресиралата на *mystacinus*.

6.4.2. ТАКСОНОМИЧНА ОБОСНОВКА ВЪЗ ОСНОВАНА НА ПОЛУЧЕНИТЕ РЕЗУЛТАТИ

Анализът на филогенетичните връзки при представителите на морфо-групата на *M. mystacinus* на Балканския полуостров показва голяма дивергенция между кладовете А и Б (фиг. 14) и ясно разграничиха *M. brandtii* и *M. alcahloe* от *M. mystacinus*. Въз основа на размерите на тялото, денталните характеристики и морфологията на пениса *M. brandtii* е отделен като самостоятелен вид от Gauckler & Kraus (1970) и Hanák (1970). С молекулярните методи бе потвърден на Балканите и друг вид от групата - *M. alcahloe* von Helversen et Heller, 2001, който е бе предсказан от кариологичните изследвания на Vollet (1987). Таксономичният статус на *M. brandtii* в Палеарктика е общо приет (Strelkov 1982, Strelkov 1983a, Benda et al. 2000, Benda 2004, Benda & Karataş 2005, Boston et al. 2010, Kruskop et al. 2012, Benda 2016). С установяването на *M. alcahloe*, той беше съобщаван в различни части на Европа (Benda et al. 2003, Spitzenberger 2008, Lučan et al. 2009, Jan et al. 2010, Presetnik et al. 2014, Schunger et al. 2004, Dundarova 2018). Таксономичният статус на вида в западна Палеарктика е ясен. В източната част и по специално в Иран обаче е анализиран екземпляр с по-малки от обичайните размери и е описан като *Myotis* aff. *alcahloe* (Benda et al. 2012). Този индивид отново възбужда полемиката около филогенията и вероятните сестрински таксони на *M. alcahloe* в Палеарктичната област.

В настоящият труд при *M. mystacinus* и *M. davidii* в западната част на Палеарктика беше установено съществуването на централно европейска линия споделяща морфологичните белези, яДНК и мтДНК на *M. mystacinus* и балканска линия, при която морфологичните особености са характерни за *M. davidii*, мтДНК е на *M. mystacinus*, а ядрения геном е хибриден. В западната част на Палеарктика и по специално в Кавказ бяха установени двете чисти линии на *M. mystacinus* и *M. davidii* от една страна, но от друга бяха установени и хибридни индивиди. Доказателствата за протекла хибридизация като пълна замяна на митохондриалния геном с този на *M. mystacinus* и не установяването на яДНК от *M. mystacinus* при индивидите от Балканите, показва че тази популация е различна и е дивергирала от тази в Кавказ. На базата на кариологични и молекулярни различия Volleth (1987), Volleth & Heller (2012), Mayer et al. (2007) определят екземплярите от Балканския полуостров като подвида *Myotis mystacinus bulgaricus*. По-късно Benda & Tsytsulina (2000) и Benda et al. (2016) първо синонимизират *M. mystacinus bulgaricus* с *M. aurascens* Kuzâkin, 1935, а после с *M. davidii* (Peters, 1869). Балканският рефугиум е бил изолиран от кавказкия рефугиум по време на последния ледников период. По време на междуледниковите периоди Анадола е била контактна зона. Поради тази причина индивидите от Турция показват структурирани хаплотипове (фиг. 15) и в същото време носят отпечатъка на хибридизацията (фиг. 20). Този резултат показва протеклата дивергенция между балканската и кавказката линия, от което става ясно, че *M. mystacinus bulgaricus* не може да се синонимизира нито с кавказките нито с централно европейските представителите. Въпреки това за обосновката на таксона и разграничаването му от *M. davidii* са необходими анализи на по-голям брой ядрени маркери.

6.4.3. ЧАСТНИЯТ СЛУЧАЙ НА *MYOTIS HAJASTANICUS* ОТ РАЙОНА НА ЕЗЕРОТО СЕВАН В АРМЕНИЯ

Myotis hajastanicus е представител на мустакатите ношници и е разпространен в Армения. След обзорец преглед на морфо-групата на *Myotis mystacinus* в западна Палеарктика от Benda & Tsytsulina (2000), става ясно, че индивидите от района на езерото Севан имат уникални морфологични характеристики и авторите ги определят като самостоятелен вид. Видът е потвърден и от Simmons (2005). От 2008 до днес, *M. hajastanicus* се счита за критично застрашен (IUCN 2008).

На базата на извършените генетични анализи на митохондриалния *nd1* участък (фиг. 16) беше установено, че дивергенцията между анализираниите от нас екземпляри от езерото Севан и тези от Кавказ, Турция, Русия и Иран е 2%, което е в рамките на вътревидовата изменчивост (Mayer et al. 2007). Установените от предишните автори морфологични различия (Benda & Tsytsulina 2000, Benda & Karatas 2005, Benda et al. 2016, Tsytsulina 2000, Tsytsulina et al. 2012) отразяват по-скоро адаптации към местообитанието, климата или историята на популацията и не могат да бъдат тълкувани като предпоставка за отделен вид (Dietz et al. 2016). Трябва да се има предвид също, че *M. davidii* е широко разпространен от Източна Европа през Централна Азия до Северен Китай (Benda et al. 2016). Следователно морфологичните и генетичните характеристики на *M. hajastanicus* го причисляват към *M. davidii* (Benda et al. 2016, Dietz et al. 2016) и валидността му на вид трябва да бъде преразгледана.

7. ИЗВОДИ

1. Получените резултати за трите ядрени интрона при 76 екземпляра, потвърждават за 8 екземпляра от Централна Европа определянето им по морфологични характеристики като *M. mystacinus*, а при 16 екземпляра от Монголия като *M. davidii*.
При балканските екземпляри: за 19 екземпляра беше установено, че по морфологични характеристики те се отнасят към *M. davidii*, ядрени им интрони са с хибриден характер, а мтДНК е от *M. mystacinus*; при 2 индивида от България определянето им като *M. davidii* бе потвърдено както по яДНК така и по мтДНК.
При кавказките екземпляри: за 6 от тях, определени по морфологични характеристики като *M. mystacinus*, се потвърди чрез яДНК, а останалите 25, отнесени към *M. davidii* имат ядрени интрони с хибриден характер.
2. Установяването на митохондриалният геном на *M. mystacinus* при балканската популация на *M. davidii* е в резултат на хибридизация, като най-вероятно тя е протекла през последния ледников максимум.
3. В Кавказ бяха установени чисти линии на *M. mystacinus* и *M. davidii*, както и хибридни индивиди. Отсъствието на чиста яДНК от *M. mystacinus* в балканските екземплярите показва, че тази популация се различава от кавказката и има собствена еволюционна съдба.
4. Предаваната по майчина линия мтДНК показва изходната популационна принадлежност на индивидите, поради по-голямата привързаност към родните места на женските екземпляри. Ядрената ДНК има по-голямо географско разпространение поради генния поток по мъжка линия. Чистите популации на *M. mystacinus* са свързани с планините, като Западните Родопи, докато тези на *M. davidii* са в по-топли и сухи местообитания. Балканската популация с митохондриален геном на *M. mystacinus* и ядрен на *M. davidii*, вероятно се формирала в районите на размножаване, които могат да включват и техните хибернакулуми.
5. Хомогенизацията на българските хаплотипове с тези на европейските *M. mystacinus*, показва вероятната роля на планински части от България като „рефугиум в рефугиума“ за Балканския полуостров. Това предполага, че след последния ледников период, именно от България е тръгнала реколонизацията към Европа. Общият хаплотип, характерен за България, Сърбия, Румъния, Унгария, Полша и Германия дава основание да се предположи, че реколонизацията е свързана с планинските вериги на Стара планина, на север и северозапад, а в последствие и с Карпатите, на запад от тях.
6. Резултатите, от проведените ДНК анализи показаха, че за уточняване таксономичния статус на *Myotis mystacinus bulgaricus* от Балканския полуостров са необходими допълнителни данни и за други ядрени гени. Получените до сега резултати подкрепят допускането, че митохондриалният геном е от *M. mystacinus*, а ядрения геном е с хибриден, между този на *M. mystacinus* и *M. davidii*.
7. Индивидите, свързани с *M. hajastanicus* от района на езерото Севан в Армения, не показват достоверни генетични различия спрямо екземпляри отнесени към *M. davidii* от Кавказ, Турция, Русия и Иран, а установените от предишните автори морфологични различия са в рамките на морфологичната пластичност на вида *M. davidii*.

8. ПРИНОСИ

ВСИЧКИ НАПРАВЕНИ ПРИНОСИ В ДОКТОРАТА СА С ОРИГИНАЛЕН ХАРАКТЕР:

1. За български екземпляри от *M. alcatloe*, *M. brandtii* и *M. mystacinus* е направена молекулярна идентификация с ДНК-баркодинг.
2. За изясняване на филогенията на *M. mystacinus* и *M. davidii* на Балканския полуостров е използван мултилокусов анализ за три ядрени интрона.
3. Установена е генетична разлика между кавказката и балканската линия на *M. davidii*: в Кавказ ядрената и митохондриална ДНК са на *davidii*, докато на Балканите всички индивиди споделят мтДНК на *mystacinus* и хибридна яДНК.
4. На базата на направените ДНК анализи за *M. mystacinus*, за реколонизацията му в Централна Европа е направено предположение за възможната роля на България като „рефугиум в рефугиума“ за Балканския полуостров през последния ледников период.
5. Направени са молекулярни анализи за изясняване на таксономичната позиция на *M. hajastanicus* в Армения.

ДЕКЛАРАЦИЯ ЗА ОРИГИНАЛНОСТ И ДОСТОВЕРНОСТ

от Хелиана Иржи Дундарова

Във връзка с провеждането на процедура за защита на дисертация за придобиване на образователна и научна степен „доктор” в Института по биоразнообразие и екосистемни изследвания при БАН, еднозначно декларирам:

1. Резултатите, обсъжданията и изводите в научната продукция, които предоставям в процедурата, са оригинални и не са заимствани без цитиране от изследвания и публикации, в които нямам участие.
2. Представената от мен информация във вид на копия на документи и публикации, както и лично съставените справки съответства на обективната истина.

Декларатор:

Хелиана Дундарова

24.05.2018 г.

гр. София

СПИСЪК НА НАУЧНИТЕ ТРУДОВЕ ПО ТЕМАТА НА ДИСЕРТАЦИЯТА

Dietz C, Gazaryan A, Papov G, **Dundarova H**, Mayer F. 2016. *Myotis hajastanicus* is a local vicariant of a widespread species rather than a critically endangered endemic of the Sevan lake basin (Armenia). *Mammalian Biology*. 81:518–522.

Dundarova H. 2018. Bat diversity in Lednitsata and Forgovskata dupka caves: two potentially important swarming sites in Western Rhodopes Mountains (Bulgaria). *Acta zoologica Bulgarica*. 70 (1): 139-142.

СПИСЪК НА ЦИТИРАНИЯТА ПО ТЕМАТА НА ДИСЕРТАЦИЯТА

Цитирана публикация:

Dietz C, Gazaryan A, Papov G, **Dundarova H**, Mayer F. 2016. *Myotis hajastanicus* is a local vicariant of a widespread species rather than a critically endangered endemic of the Sevan lake basin (Armenia). *Mammalian Biology*. 81:518–522. (doi.org/10.1016/j.mambio.2016.06.005).

Цитирана в:

1. Benda P., Said M.R.B., Jaoude I.B., Karanouh R., Lucan K.R., Sadek R., Sevcik M., Uhrin M., Horacek I. 2016. Bats (Mammalia: Chiroptera) of the Eastern Mediterranean and Middle East. Part 13. Review of distribution and ectoparasites of bats in Lebanon. *Acta Soc. Zool. Bohem.* 80, 207-316.

СПИСЪК НА УЧАСТИЯТА В НАУЧНИ ФОРУМИ

Dundarova H, Biserkov V, Dimitrov K. Bat diversity at Forgovskata dupka cave and Lednitzata cave in Western Rhodopes. "*Bioscience - development and new opportunities*" – *Kliment days*, 20 – 22 November, 2013, Sofia.

Dundarova H, Dietz C, Mayer F. Phylogeography of whiskered bats. *13th European bat research symposium*, 1 – 5 September 2014 Šibenik, Croatia.

Dundarova H, Dietz C, Gazaryan S, Çoraman E, Mayer F. The curious phylogenetic pattern of *Myotis mystacinus* and *Myotis davidii* in the Balkan Peninsula. *14th European bat research symposium*, 1-5 August 2017, Donostia (San Sebastian), The Basque Country (Spain).

MOLECULAR PHYLOGENY OF THE *MYOTIS MYSTACINUS* MORPHOGROUP (CHIROPTERA: VESPERTILIONIDAE) ON THE BALKAN PENINSULA

Heliana Dundarova

PhD Thesis, Sofia 2018

SUMMARY

The *Myotis mystacinus* morphogroup is characterized by high morphological variability across the Palearctic region and four taxa *M. brandtii*, *M. mystacinus*, *M. davidii* and *M. alcathoe* are recognized on the Balkan Peninsula. Previous studies revealed several subspecies in *M. mystacinus* (Kuhl, 1817) (*nigricans* Fatio, 1869, *lugubris* Fatio, 1869, *occidentalis* Benda, 2000, *caucasicus* Tsytsulina, 2000) and in *M. davidii* (Peters, 1869) (*aurascens* Kuzâkin, 1935, *bulgaricus* Heinrich, 1936, *popovi* Strelkov, 1983, *Myotis* sp. A sensu Volleth, 1987, *przewalskii* sensu von Helversen, 1989a, 1989b) based on their distribution and morphology.

This study is based on genetic data obtained in 258 specimens of *M. mystacinus* and 74 *M. davidii*. The sequence variation within 450 bp of the mitochondrial *nd1* was compared with the variation of three nuclear introns (330 bp of ABHD11, 142 bp of ACOX2, 307 bp of ROGDI). Different methods were used to reveal details of distributions, population structure, demographic history and assess the signs of hybridization between both species. Results demonstrate that *M. davidii* and *M. mystacinus* are separate genetic lineages in all sampled regions, except the Balkan Peninsula. All individuals across the Adriatic region and most Bulgarian animals, assigned to *M. davidii* by the nuclear genetic marker and morphology, carried mitochondria of *M. mystacinus*. *M. davidii* individuals from Bulgaria showed reduced level of mitochondrial variation and their haplotypes resembled those of typical *M. mystacinus* from central Europe. Overall, of 56 analyzed animals from Bulgaria only two carried mitochondrial *M. davidii* haplotype which indicate almost complete replacement of their mtDNA by the *M. mystacinus* mtDNA.

Ancient allopatric divergence followed by subsequent secondary contact in the Balkan Peninsula might be the cause for the discrepancy between mitochondrial and nuclear genes. Mitochondrial introgression is hence preceded by hybridization events which raises the question about the effectiveness of the reproductive isolation barriers between both lineages.