

**РЕЦЕНЗИЯ**

на дисертационен труд на тема:

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

за присъждане на образователна и научна степен “доктор”

Научна специалност 01.06.02 „Зоология“

Автор: Хелиана Иржи Дундарова

Научен ръководител: проф. д-р Вълко Бисерков

Научни консултанти: д-р Кристиан Диц и доц. д-р Фридер Майер (Германия)

Рецензент: проф. д-р Васил В. Попов

**1. Процедура по защитата**

Със заповед №62/20.06.2018 на Директора на Института по Биоразнообразие и Екосистемни Изследвания (ИБЕИ) съм определен за член научно жури по процедура за защита на дисертационния труд на Хелиана Иржи Дундарова, редовен докторант на ИБЕИ, за придобиване на образователната и научна степен „доктор” на тема: „Молекулярна филогения на морфогрупата *Myotis mystacinus* (Chiroptera: Vespertilionidae) на Балканския полуостров” по професионално направление 4.3. Биологически науки (Зоология). На заседание на журито съм избран за рецензент. Рецензията ми е съобразена с препоръките относно критериите за придобиване на научни степени и заемане на академични длъжности в Правилника за прилагане на Закона за Развитие на Научния Състав в Република България, Правилника за условията и реда на придобиване и заемане на академични длъжности в БАН и съответните критерии на ИБЕИ. Представените документи по защитата (Дисертация; Автореферат; Справка за приносите на дисертационния труд; Списък на публикациите по темата на дисертацията, както и копия от самите публикации; Списък на участията в научни форуми с доклади и постери, отразяващи изследванията по дисертацията; Списък на цитиранията на трудовете по темата на дисертацията; Научна автобиография, включваща и пълен списък на публикациите; Диплома за придобита магистърска степен (копие, заверено от Научния секретар след сверяване с оригинала); Диплома за придобита бакалавърска степен (копие, заверено от Научния секретар след сверяване с оригинала); Протокол от заседанието, насочило дисертацията за защита; Справка за проведения учебен процес и получените кредити, заверена от Научния секретар)) съответстват на изискванията и убеждават в законността на процедурата.

**2. Кратки биографични данни**

Х. Дундарова придобива степен бакалавър в Биологически факултет, СУ “Свети Климент Охридски“ през 2007 г., а през 2011 г. защитава магистратура по зоология в Природонаучния факултет на Карловия университет в Прага, Чехия с тема на дипломната работа: „Phylogeography of *Rousettus aegyptiacus* in the Mediterranean region“. През периода 2013 - 2016 г е редовен докторант в ИБЕИ, БАН. От 2017 г. е на щатна длъжност в същия институт. Била е на специализация в Берлинския музей, Германия, където извършва голяма част от генетичните и статистически анализи под ръководството на д-р Кристиан Диц и доц. д-р Фридер Майер.

### 3. Публикации и научна дейност

По темата на дисертационния труд досега са написани две публикации в списания с импакт фактор; едната е в съавторство, а другата самостоятелна. Те представят съществени аспекти на получените резултати. Едната засяга таксономичния статус на *M. hajastanicus* от Армения, а другата представя част от събраните оригинални материали, обект на генетичен анализ, а също илюстрира възможния модел на междувидова хибридизация. Една от публикациите е цитирана един път. Освен това са приложени три постера (в съавторство) от международни и национални форуми, съдържащи най-важните резултати от изследването - филогеография на групата на мустакатите ношници, генетична характеристика на *M. mystacinus* и *M. davidii* от Балканския полуостров и разнообразие на прилепите от две пещери в Родопите, откъдето е събрана част от материала, разглеждан в дисертацията. Две други публикации, макар и не пряко свързани с дисертацията, характеризират Х. Дундарова като активен изследовател на прилепите в България и околните райони.

### 4. Актуалност и значимост на дисертационния труд

Целта на рецензирания дисертационен труд е да изясни филогенията в морфо-групата на *Myotis mystacinus* на Балканския полуостров, както и да характеризира формите с неясен таксономичен статус - *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. Темата на дисертационния труд е актуална както за нашата страна, така и в световен мащаб. По същество това е изследване върху филогеографията на тази група видове в обширен географски район. Филогеографията е ново и бързо развиващо се интердисциплинарно направление обединяващо широк кръг от "класически" научни дисциплини, такива като генетика, биогеография, геология, екология и палеоекология и др. Терминът е въведен през 1987 г. (Avice et al., 1987) и представя научна дисциплина, която се занимава с пространственото оформяне на генетичните линии, особено в рамките на и между близкородствени видове. Филогеографията също така изследва хипотези за причинно-следствената връзка между географските явления, разпространението на видовете и механизмите, движещи видообразуването. Филогеографските анализи позволяват да се разбере как промени в климата и ландшафта са повлияли върху разпространението на видовете и демографските особености на популациите. Изследванията върху филогеографията се съсредоточават основно върху

географските модели на разпространение и механизма на видообразуване, за да се разкрият съвременните и исторически еволюционни процеси, такива като пространствено разпределение на генетичните линии, генния поток, генетичния ефект на измененията в популационната численост (намалване на генетичното разнообразие при снижаване на числеността), ролята на популационните експанзии и реколонизации. Тези еволюционни процеси влияят върху генетичната структура и географското разпределение на генетичното разнообразие и са важни за опазване на биологичното разнообразие. Филогеографията използва молекулярни и географски данни, за да изведе ролята на историческите фактори за съвременните пространствени тенденции на биоразнообразието.

Митохондриалната ДНК (mtDNA) се използва широко като инструмент за при този тип изследвания на гръбначни животни по редица причини: рекомбинацията е ниска или липсваща, тя се наследява строго майчински и хаплоидно, има къс период на коалесценция (времето на разделяне от общ предшественик), респ. относително висока еволюционна скорост и честотата на структурните генни модификации (gene arrangement) е относително ниска или отсъства. Най-често използваните митохондриални райони за изследване на филогеографските тенденции и историята на прилепите включват цитохром-b (cytb) и ND1. Микросателитите и ядрените интрони обикновено се използват за допълване на резултатите от mtDNA. Ползата от тези маркери, за разлика от mtDNA, е, че те се унаследяват диплоидно и по този начин е по-малко вероятно да бъдат повлияни от различия в разселването (пространствената подвижност) на половете. Чрез използване на комбинации от множество генетични маркери, може да бъде оценени и разбрани по-пълно структурата и историята на популациите. Тези подходи също така улесняват оценяването на ролята на интра- и интер-специфичната интрогресия на мъжки / женски и хибридационни събития, резултат от климатичните промени в течение на Кватернера.

## 5. Характеристика и оценка на дисертационния труд

Дисертационният труд е написан на 81 страници и включва: съдържание (2 стр.), списък на съкращения (1 стр.), увод (2 стр.), литературен обзор (11 стр.), цел и задачи (0.5 стр.), материал и методи (9 стр.), резултати (20 стр.), обсъждане (9 стр.), изводи (1 стр.), приноси (1 стр.), библиография (10 стр.) и приложения (18 стр.). Литературният обзор е направен компетентно и съдържа общо 120 източника. Той е структуриран съобразно направленията на изследване. Методите са актуални и кореспондират с естеството на данните и поставените задачи. Добро впечатление прави уместното използване на съвременни генетични и статистически методи. В хода на проучването са получени, успешно анализирани и систематизирани голям брой резултати, подходящо илюстрирани с таблици и фигури.

Молекулярно са идентифицирани проби от над 500 екземпляра: 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. Анализът на генетично разнообразие и групиране на базата на митохондриалния nd1 маркер разкрива дълбока

дивергенция между митохондриалните линии на *M. mystacinus* и *M. davidii* от една страна и ясно обособените линии на *M. alcaethoe* и *M. brandtii*, от друга. Подробно се анализират материалите от *M. davidii* от Монголия и Кавказ, а при *M. mystacinus* се разглеждат популации от Европа, Балканите, Турция и Кавказ. Анализът на генетично разнообразие и структуриране при трите ядрени интрони (*abhd11*, *ascox2* и *rogdi*), направено върху 76 индивида от митохондриалните линии на *M. mystacinus* и *M. davidii* показва статистически достоверно наличие на три генетични линии. Материалите от адриатическото крайбрежие и повечето български екземпляри, причислени към *M. davidii* чрез ядрени генетични маркери, имат митохондриален маркер, характерен за *M. mystacinus*. Освен това екземплярите от *M. davidii* от България имат ниска митохондриална изменчивост и техните хаплотипове наподобяват тези на типичния *M. mystacinus* от Централна Европа. От 56 анализирани прилепи от България само два носят митохондриален хаплотип на *M. davidii*. Този резултат показва почти пълна замяна mtDNA на *M. davidii* от тази на *M. mystacinus*. Този неочакван резултат е интерпретиран като следствие от някогашна алопатична дивергенция и последващ вторичен контакт и митохондриална интрогресия на Балканския полуостров. Залужава внимание анализът на механизмите на замяна на митохондриалната днк, който взема предвид както генетично-популационните закономерности така и физикогеографските и екологични особености на предполагаемите райони, в които е протекла хибридизацията. Хипотезата за ролята на асортативно кръстосване и стерилитет на мъжките хибриди, което води до разреждане на алелите на единия родителски вид, в резултат на което популацията придобива ядрения геном на единия вид и мтДНК на другия, изглежда добре аргументирана. Широкият географски обхват на изследването е позволил също така да се установи, че най-вероятно през последния глациален максимум балканският рефугиум е бил изолиран от кавказкия. През холоцена Мала Азия вероятно е била контактна зона. Поради тази причина индивидите от *M. davidii* от Турция показват структурирани хаплотипове и носят отпечатъка на хибридизация. Тези резултати са интерпретирани като свидетелство за дивергенция между балканската и кавказката линия, от което става ясно, че подвидовото наименование *bulgaricus* не може да се синонимизира нито с кавказките нито с централно европейските линии на комплекса *M. mystacinus* / *M. davidii*. Направен е съществен принос в изясняване на таксономията на форма от Армения със спорен таксономичен статус. Установено е, че смятаният доскоро за ендемичен и критично застрашен вид *M. hajastanicus* е локален вариант на *Myotis aurascens*. Дисертационният труд завършва с изводи и приноси, следвайки логическата последователност на цялата разработка. Те са добре мотивирани и показват, че целта е постигната, а задачите - изпълнени.

## Бележки и препоръки

Въпреки че е направен сравнително подробен преглед на литературата по отношение на таксономията на основните филетични линии, разглеждани в дисертацията, не е представен критичен анализ на съществуващите спорни възгледи. В резултат на това на места в дисертацията има очевидни несъответствия. Пример за това е синонимиката на филетичната линия "*aurascens*". В литературния обзор, глава 2.2., се казва, че "Въз основа на морфологични и генетични сравнения Venda et al. (2012, 2016) преразглеждат таксономичния статус на *M. aurascens* и го синонимизират с *M. davidii*." Този възглед по-нататък се възприема безкритично и навсякъде в дисертацията вместо *aurascens* се

използва  *davidii*, като не се отчита че това виждане е представено сравнително скоро (2012), а и все още не е общоприето. Например, в базата данни на IUCN (2008)  *aurascens* и  *davidii* се разглеждат като два различни вида. Това води до някои неточности при излагането на литературните данни. На фиг. 8 се твърди, че е представен ареалът на  *M. davidii* според файла на IUCN (2008), но в оригиналната база-данни на IUCN това е ареал на  *M. aurascens*, който, според представите от 2008 г., достига само до Каспийско море на изток. Така тази фигура съдържа противоречие доколкото изобразеният на нея ареал на " *davidii*" не съдържа типовото находище на този вид - той е описан от Пекин (тази бележка беше направена още на апробацията). Предложеното от Venda et al (2012) синонимизиране се основава на морфологично сравнение между 3 екземпляра от Иран, принадлежащи към генетичната линия " *aurascens*" и типовия екземпляр на  *M. davidii* от Пекин. Наистина, Tsytsulina et al. (2012), въз основа на митохондриални маркери установяват, че " *aurascens*" се среща от Южна Европа до Корея, но в проведения от авторите анализ не е включен типовият екземпляр на  *davidii* или екземпляри от типовия район; наименованието  *davidii* не се споменава в тази статия. От това следва, че е напълно възможно и двата вида,  *aurascens* и  *davidii*, да се срещат в Източна Азия. Морфологичното сходство не е основание за обединяване на тези две форми в един вид тъй като морфологичната конвергенция е широко застъпена в рамките на рода, както е отбелязано в литературния обзор. Според други генетични анализи (Kawai et al., 2003; Ruedi et al., 2013, липсващи в литературния преглед), екземпляри на  *M. davidii* от Китай, попадат във филогенетични групи, нямащи близко родство с групата " *mystacinus*". Накратко, докато не се представи убедителна генетична характеристика на екземпляри от  *Myotis davidii* от Китай, синонимизирането на  *Myotis davidii* и  *M. aurascens* е преждевременно.

Резултатите от анализа на трите ядрени интрона са представени неясно, което затруднява разбирането за това кои форми от групата " *mystacinus*" са установени у нас. На анализ са подложени 76 индивида, но не е казано на какъв принцип са подбрани те. Дефинират се 6 географски популации (Фиг. 20), които се сравняват и анализират по-нататък в текста (напр. Табл. 11): Гр.  *mystacinus*: 1. Ц. Европа, 2. Кавказ, Гр.  *davidii*: 3. Балкани, 4. Кавказ, 5. Турция; Гр.  *davidii*: 6. Монголия. След това, в таблици 12 - 14 се сравняват, според текста, същите 6 географски популации, но се вижда, че те са различни (Гр.  *mystacinus*: 1. Ц. Европа, 2. Балкан, 3. Турция, 4. Кавказ; Гр.  *davidii*: 5. Кавказ, 6. Монголия). Вероятно във втория случай са използвани определянията, направени на основата на митохондриалната днк.

От анализите и обсъждането не става ясен статусът на  *Myotis mystacinus* в България. Казва се, че екземплярите от Балканския полуостров, Турция и някои от района на Кавказ "...на базата на морфологичните си характеристики и резултата от анализирания интрон, [...] представляват  *M. davidii*, но в действителност те споделят митохондриалната ДНК на западно палеарктичния  *M. mystacinus*." Следва да се отбележи, че в дисертацията не са представени "морфологичните характеристики" на изследваните екземпляри (материалът, според Приложение 1, е определен на основата на митохондриална днк). В резултат на това не става ясно как се отнасят представените в дисертацията резултати към двете

морфологично различни форми от България, известни досега като *mystacinus* и *aurascenes* (Benda, Tsytsulina, 2000). Въпреки че генетичните анализи потвърждават, че формата "*aurascens/davidii*" е по-добре представена у нас, няма информация за *M. mystacinus*, известен по морфологични данни от някои райони - Чепеларе, с. Гела, Пампорово, с. Горна Брезница (Благоевградско), Бургас ( Benda, Tsytsulina, 2000).

Критични бележки към публикациите

В постер озаглавен "Филогеография на мустакатите нощници" има списък с литература, включващ най-съществените публикации по темата. Те обаче не са коментирани и цитирани в текста, на практика дискусия липсва, въпреки че има раздел Резултати и дискусия.

Направените бележки не омаловажават приносите на дисертацията, които приемам изцяло. Специално искам да подчертая, че в резултат на сравнителен мултилокусов анализ за три ядрени интрона на различни популации от Европа, Мала Азия и района на Кавказ се хвърля нова светлина върху филогенията на *M. mystacinus* и *M. davidii (aurascens)* на Балканския полуостров. Установена е генетична разлика между кавказката и балканската линия на *M. davidii (aurascens)* като в Кавказ ядрената и митохондриална ДНК са на *M. davidii (aurascens)*, а на Балканите всички индивиди споделят мтДНК на *M. mystacinus* и хибридна яДНК.

Представеният автореферат отговаря на съдържанието на дисертационния труд.

## 6. Заключение

Представените материали и резултати отговарят на изискванията на Закона за развитие на академичния състав в Република България (ЗРАСРБ), правилника за неговото прилагане. Дисертационният труд показва, че докторантката Хелиана Дундарова притежава задълбочени теоретични познания и професионални умения по научната специалност Зоология като демонстрира качества и умения за самостоятелно провеждане на научно изследване. На тази основа, убедено давам своята положителна оценка за проведените изследвания, представени от рецензираните по-горе дисертационен труд, автореферат, постигнати резултати и приноси и предлагам на почитаемото научно жури да присъди научната и образователна степен „Доктор“ на Хелиана Иржи Дундарова.

Цитирана литература в рецензията извън тази налична в литературния списък на дисертацията

Avise, J.C., Arnold, J., Ball, R.M., Bermingham, E., Lamb, T., Neigel, J.E., Reeb, C.A., Saunders, N.C., 1987. Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 18, 489–522.

Kawai, K., Nikaido, M., Harada, M., Matsumura, S., Lin, L.K., Wu, Y., Hasegawa, M., Okada, N., 2003. The status of the Japanese and East Asian bats of the genus *Myotis* (Vespertilionidae) based on mitochondrial sequences. *Mol. Phylogenet. Evol.* 28, 297–307.

Ruedi M., B. Stadelmann, Y. Gager, E. J.P. Douzery, Ch. M. Francis, Liang-Kong Lin, A. Guillén-Servent, A. Cibois. 2013. Molecular phylogenetic reconstructions identify East Asia as the cradle for the evolution of the cosmopolitan genus *Myotis* (Mammalia, Chiroptera). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 69 437–449.

09.09.2018 г.

Рецензент:

Проф. д-р Васил Попов