



БЪЛГАРСКА АКАДЕМИЯ НА НАУКИТЕ
ИНСТИТУТ ПО БИОРАЗНООБРАЗИЕ И ЕКОСИСТЕМНИ ИЗСЛЕДВАНИЯ

Бойко Стойков Неов

**Еволюционни процеси при формиране на разнообразието на хименолепидидните
цестоди по насекомоядните бозайници от семейство Soricidae**

Автореферат

на дисертация за присъждане на образователна и научна степен „ДОКТОР“

Научна специалност:

Паразитология и хелминтология

Научен ръководител:

проф. дбн Бойко Б. Георгиев

Научни консултанти:

проф. д-р Петър Христов

проф. д-р Тимъти Литълууд

София, 2021

Дисертационният труд е обсъден и насочен за защита на разширено заседание на колегиума на отдел „Животинско разнообразие и ресурси” към Института по биоразнообразие и екосистемни изследвания при БАН, състояло се на 15.04.2021 г.

Дисертационният труд е с общ обем от 61 страници, включва в себе си двете публикувани статии по темата на дисертацията, като заедно с тях съдържа 6 таблици и 8 фигури с обяснителен текст. Списъкът на цитираната литература (без цитираната литература в публикуваните статии) включва 59 заглавия, от тях 47 на латиница и 12 на кирилица.

Защитата ще се състои от ч., на 2021 година в

НАУЧНО ЖУРИ

Председател:

Членове:

Проф. дбн Параскева Михайлова (ИБЕИ-БАН)

проф. дбн Бойко Георгиев (ИБЕИ-БАН)

проф. д-р Анета Костадинова (ИБЕИ-БАН)

проф.д-р Маргарита Габрашанска (ИЕМПАМ-БАН)

Доц. Мариана Панайотова-Пенчева (ИЕМПАМ-БАН)

Благодарности

Искрено благодаря на научния си ръководител проф. дбн Бойко Георгиев за търпението, ценната помощ, разбирането и предадените знания и умения.

Сърдечно благодаря на научните си консултант проф. д-р Петър Христов и проф. Тимъти Литълууд за компетентните съвети, ценните идеи и съдействието, които допринесоха за това изследване.

Благодаря на проф. д-р Георги Радославов за наставленията и създадената творческа атмосфера в качеството му на ръководител на ИГ “Молекулярно-еволюционни изследвания”.

Благодаря на доц. д-р Гергана Василева за неоценимата помощ в разработването на събраните материали и изготвянето на анализите.

Благодаря на Директора на ИБЕИ-БАН доц. д-р Анна Ганева за осигурените условия за ползотворна изследователска работа.

Благодаря на колегите от ИБЕИ-БАН и конкретно на тези от отдел „Животинско разнообразие и ресурси” за добрата работна атмосфера, ползотворното сътрудничество и ползотворните дискусии при представянето на резултатите от научната работа.

Благодаря на персонала на БЕБ „Калимок“, които съдействаха за провеждането на теренните изследвания по дисертационния труд.

Благодаря много на моите близки и семейство за търпението, подкрепата и разбирането.

1. Увод

Един от основните елементи на международната изследователска програма DIVERSITAS (1996) е формулиран като “Произход, поддръжка и изменение на биологичното разнообразие”. Чрез опознаване на еволюционните процеси на възникване на разнообразието на видовете можем да прогнозираме еволюционното бъдеще на биосферата и на нейните компоненти (DIVERSITAS, 1996).

Основен съвременен подход за изучаване на видообразуването са филогенетичните изследвания, основани на методите на кладистиката (Hennig, 1966). При формирането на разнообразието на паразитните организми водещо значение имат два основни процеса – на съвместно видообразуване (често обозначавано като коеволюция) и на колонизиране на една група гостоприемници от паразити на друга група гостоприемници (host switching) (Brooks & McLennan, 1993). Досега са разкрити еволюционните процеси в относително малък брой паразит-гостоприемникови системи, поради което е трудно да се обобщава кой от двата процеса има по-голямо значение за диверсификацията на паразитните организми. Hoberg (1992), анализирайки сложните исторически и биогеографски взаимоотношения и зависимости между морските птици, перконогите и техните паразити в Арктика, прави заключението, че периодите на пространствена и екологична изолация благоприятстват коеволюционните процеси на видообразуване, а тези на разширяващи се географски ареали и навлизане в нови местообитания определят колонизацията на нови гостоприемници от страна на паразитите. Wickström et al. (2001) наблюдават дивергенция на цестода *Andrya arctica*, която протича успоредно с тази на неговия гостоприемник копитния леминг *Dicrostonyx torquatus* в Палеарктика. В същото време изследването демонстрира малки генетични разлики между палеарктичната и неарктичната популации на *A. arctica*, последната имаща различен краен гостоприемник – *D. groenlandicus*.

През последните две десетилетия използването на молекулярни подходи за реконструкция на филогенетичните отношения в различни групи организми позволява получаването на надеждна картина за еволюционните процеси. По отношение на цестодите, тези изследвания разкриват предимно родствените отношения между отделните разреди и основните филетични линии цестоди (Mariaux, 1998; Olson & Caira, 1999; Hoberg et al., 2001; Caira et al., 2001; Mariaux & Olson, 2001; Olson & Tkach, 2005; Waeschenbach & Littlewood, 2017).

Едно от най-представителните и същевременно най-богато на видове семейства в разред Cyclophyllidea е семейство Hymenolepididae Perrier, 1897. Понастоящем, семейството включва над 920 валидни вида, което е почти една трета от броя на валидните видове в разред Cyclophyllidea (Mariaux et al. 2017). Сред най-важните морфологични характеристики на семейството е наличието на ростелумен апарат, с ростелумно влагалище и мускулест ростелум, въоръжен с един ред (по изключение с повече на брой редове) ростелумни куки, чиято форма и размери имат голямо значение за определяне на родово и видово ниво. Изключения обаче са възможни – ростелумният апарат може да е закърнял в различна степен, като може да е заменен с жлезист апикален орган или въобще да липсва. Хименолепидидите имат стробили с краспедотни проглотици, обикновено малки по размери и многобройни. Мъжката полова система включва в повечето случаи малък брой тестиси, най-често 3, понякога 2 или 1, рядко повече от три. Мъжкият копулативен апарат е снабден с вътрешно и външно семенни мехурчета. Структурата на зрялата матка (обикновено торбовидна), както и формата и структурата на яйцата са адаптирани към разпространение в различна среда и са важни таксономични белези (Czapliński & Vaucher 1994). Крайни гостоприемници на хименолепидидите са птици и бозайници.

Настоящото изследване се фокусира върху механизмите на възникване на разнообразието на цестодите от семейство Hymenolepididae, паразитиращи по насекомоядните бозайници от семейство Soricidae (земеровки). В земеровките паразитира разнообразен комплекс от многобройни видове хименолепидидни цестоди (Vaucher, 1971; Генов, 1984; Georgiev et al., 2006). Последната цялостна таксономична концепция за тяхната класификация е предложена от Vaucher (в Czaplinski & Vaucher, 1994); предложените в тази разработка концепции за родовете цестоди от насекомоядните бозайници показват, че в различните подсемейства на семейство Soricidae се срещат близкородствени видове цестоди. Georgiev et al. (2006) обобщават, че цестодите на земеровките са обособени в 30 рода. Неотдавнашен анализ на разнообразието на цестодите на европейските представители на Soricidae (Binkienė et al., 2011) достига до заключението, че съвременната фауна на тази група е мозайка от относително древни и новообразувани видове, за която определящите фактори са свързани по-скоро с гостоприемникова колонизация и географска експанзия, отколкото с коеволюционни процеси (съвместно видообразуване). Това заключение се основава преди всичко на сравняване на фаунистичните комплекси и до момента не е подкрепено от филогенетични данни. В последното обобщение върху Hymenolepididae (Mariaux et al. 2017), родовете от бозайници са 52 (358 вида), докато общото разнообразие на семейството (паразити на птици и бозайници) са 923 вида и 130 рода.

Преди нашите изследвания, единственият опит да се разкрият филогенетичните отношения между хименолепидидите от бозайници на основата на генетични секвенции е представен от Haukioja et al. (2010). Авторите изследват 28S рДНК региона, като обхващат 31 таксона от Hymenolepididae от дребни бозайници. Получените резултати показват наличието на четири основни клада сред хименолепидидите от бозайници, които обозначават като: „клад на *Ditestolepis*“, „клад на *Arostrilepis*“, „клад на *Hymenolepis*“ и „клад на *Rodentolepis*“. Това пионерно изследване е основано на относително неголяма извадка от видове и само на един ген. По-късни изследвания за родствените връзки между цестодите препоръчват включването на по-голям брой таксони във филогенетичните анализи, както и използването на по-голям набор от гени (Waeschenbach & Littlewood 2017, Kornienko et al. 2019).

Недостатъчната степен на изученост на еволюционните процеси в паразит-гостоприемниковата система „хименолепидидни цестоди – земеровки от семейство Soricidae“ определи насоките и съдържанието на проучванията, включени в настоящия дисертационен труд.

2. Цел, задачи и изследователски подход

Целта на изследването е на основата на генни секвенции да се разработи хипотеза за филогенетичните връзки на хименолепидидни цестооди, паразитиращи по европейски представители на семейство Soricidae и на основата на нея да се оцени кои еволюционни процеси (съвместно видообразуване или колонизиране на гостоприемници) имат водещо значение за формирането на разнообразието на групата.

За достигането на тази цел са изпълнени следните **задачи**:

1. Събиране на цестооди от земеровки от родовете *Sorex*, *Neomys* и *Crocidura*. Определяне на събраните материали.
2. Секвенционен анализ на ядрени (18S рДНК и 28S рДНК) и митохондриални (*cox1*) генни региони.
3. Построяване на кладистична хипотеза за филогенетичните връзки на събраните цестооди от земеровки чрез анализ, основан както на новосеквенираните таксони, така и на публикуваните от други автори секвенции на цестооди от семейства Hymenolepididae от различни групи гостоприемници.
4. Анализ на получените данни от гледна точка на разкриване на еволюционните процеси, довели до формирането на разнообразието на групата.

Работната хипотеза на нашето изследване е, че съвременното разнообразие на цестодите, паразитиращи в насекомоядните бозайници от семейство Soricidae, е формирано както в резултат на коеволюционни процеси, така и с участие на процеси на колонизиране на нови гостоприемници.

Изследователският подход включва няколко стъпки:

На първо място, събиране на хименолепидидни цестооди от представители на родовете земеровки, срещащи се масово в България – *Sorex* (представител на подсемейство Soricinae и трибус Soricini, с холарктично разпространение), *Neomys* (също представител на подсемейство Soricinae, но адаптиран към воден начин на живот и отнасящ се към друг трибус – Nectogalini) и *Crocidura* (представител на подсемейство Crocidurinae, разпространено основно в тропиците на Стария свят, с единични видове, които достигат до умерените ширини). По данни на Генов (1984), Tkach et al. (2003), Vasileva et al. (2005) във фауната на България се срещат 23 вида цестооди от семейство Hymenolepididae, паразитиращи по земеровки. Основната идея на систематизираното набавяне на нов материал е да се увеличи броят на видовете, обхванати от молекулярни изследвания, за да бъдат включени във филогенетични анализи и да се получи по-представителна филогенетична хипотеза за групата.

Като втора стъпка, след определяне на събраните материали, да се секвенират 3 генни региона (18S рДНК, 28S рДНК и *cox1*) на всеки един от новосъбраните видове.

Като трети етап, новополучените данни да се използват за построяване на филогенетична хипотеза за взаимовръзките между тези цестооди, както и други видове хименолепидидни цестооди, които вече са секвенирани от други автори при предходни изследвания. Ако формирането на разнообразието на паразитите е резултат изцяло от коеволюция, се очаква паразитите на *Sorex*, *Neomys* и *Crocidura* да формират съответно три обособени клада. В противоположния случай (т.е. при преобладаване на процесите на колонизация на гостоприемници) се очаква специфични паразити на различни гостоприемници да показват близкородствени отношения помежду си.

Като четвърти етап, белезите на включените в анализите таксони (гостоприемников спектър, особености на жизнения цикъл, основни морфологични белези) да се съпоставят с получените кладограми и да се оцени доколко те отразяват родствените отношения между видовете или са резултат от паралелно възникване в различни филетични линии цестооди.

3. Материали и методи

Събиране на биологичен материал

Събирането на земеровки бе осъществено чрез живоловни капани (тип “Шърман”) основно през лятно-есенния полусезон в периода 2012–2014 г. от районите на Биологичната експериментална база „Калимок” (Силистренска област), с. Бояна (София), р. Планшица (Плана планина), резерват Парангалица (Благоевградска област) и Атанасовско езеро (Бургаска област). Събирането в защитени територии се извърши на основата на разрешителни от Министерство на околната среда и водите, номера НСЗП-153/11.05.2012 и НСЗП-350/11.09.2014.

След улавяне и морфологично определяне (по Попов и Седефчев, 2003), земеровките бяха евтаназирани с хлороформ и аутопсирани с цел намиране и изолиране на паразитни червеи. Общо бяха събрани и изследвани 21 екземпляра земеровки от 3 вида: 11 екземпляра *Crocidura suaveolens* (Pallas, 1811), 4 екземпляра *Neomys fodiens* (Pennant, 1771) и 6 екземпляра *Sorex araneus* Linnaeus, 1758 (Таблица 1). Изолираните от тънките черва цестоди бяха съхранявани в 70% етилов алкохол за последващо определяне и отделяне на тъкан за молекулярно-генетични изследвания.

Морфологично определяне на цестодите

От anteriornata част на цестодите бяха изготвени трайни микроскопски препарати за морфологично определяне чрез оцветяване с железен ацетокармин (Georgiev et al., 1986). За по-добра диагностика, в случаите когато от особено значение за правилното морфологично определяне бяха особеностите на въоръжението на сколекса, материалите бяха монтирани в трайни препарати в среда на Берлезе (Swan, 1936). Всички трайни микроскопски препарати са депозиращи в хелминтологичната колекция на ИБЕИ-БАН, номера от CO128.1.1 до CO131.4.16.

Изолиране на ДНК

Постериорната част на цестодите бе използвана за изолиране на тотална ДНК и молекуларен анализ. От 141 проби бе изолирана ДНК по метода Single worm (Williams et al. 1992). Методът се състои в разграждането на тъканния фрагмент от цестода с лизиращ буфер при температура 56 °C за 4-12 часа. Лизиращият буфер съдържа 48 µl PCR буфер и 2 µl протеиназа К. Следва деактивация на протеиназата при 72°C за 10 минути. Полученият лизат, съдържащ тотална ДНК от цестодите, бе използван за последващите PCR реакции.

Таблица 1. Изследвани видове и екземпляри земеровки за целите на изследването.

Вид	Екземпляр №	Дата	Находище	Установени видове цестоди
<i>Crocidura suaveolens</i>	BN2014.05.21-1	21.05.2014	Калимок	<i>Staphylocystis uncinata</i>
<i>Crocidura suaveolens</i>	BN2014.05.21-4	21.05.2014	Калимок	<i>Staphylocystis uncinata</i>
<i>Crocidura suaveolens</i>	BN2014.05.22-1	22.05.2014	Калимок	<i>Staphylocystis uncinata</i>
<i>Crocidura suaveolens</i>	BN2014.05.23-1	23.05.2014	Калимок	В лошо състояние
<i>Crocidura suaveolens</i>	BN2014.05.24-2	24.05.2014	Калимок	Без цестоди
<i>Crocidura suaveolens</i>	BN2014.05.24-3	24.05.2014	Калимок	<i>Staphylocystis uncinata</i>

<i>Crocidura suaveolens</i>	BN2014.05.24-4	24.05.2014	Калимок	<i>Staphylocystis uncinata</i>
<i>Crocidura suaveolens</i>	BN2014.05.25-1	25.05.2014	Калимок	<i>Staphylocystis tiara</i> , <i>Staphylocystis uncinata</i>
<i>Crocidura suaveolens</i>	BN2014.05.25-2	25.05.2014	Калимок	<i>Staphylocystis uncinata</i>
<i>Crocidura suaveolens</i>	BG2012.05.14.1	14.05.2012	Атанасовско езеро	В лошо състояние
<i>Crocidura suaveolens</i>	BG2012.05.16.1	16.05.2012	Атанасовско езеро	В лошо състояние
<i>Neomys fodiens</i>	BG2012.10.09	9.10.2012	Бояна	<i>Coronacanthus omissus</i> , <i>C. integrus</i> , <i>Vaucherilepis trichophorus</i>
<i>Neomys fodiens</i>	BG2012.10.10	10.10.2012	Бояна	<i>Coronacanthus omissus</i> , <i>C. vassilevi</i> , <i>C. magnihamatus</i> , <i>C. integrus</i> , <i>Vaucherilepis trichophorus</i>
<i>Neomys fodiens</i>	BG2012.10.11	11.10.2012	Бояна	<i>Spasskylepis ovaluteri</i>
<i>Neomys fodiens</i>	BN2014.09.09	09.09.2014	р. Планица	<i>Spasskylepis ovaluteri</i>
<i>Sorex araneus</i>	BN2014.05.20-1	20.05.2014	Калимок	<i>Ditestolepis diaphana</i>
<i>Sorex araneus</i>	BN2014.05.20-2	20.05.2014	Калимок	<i>Staphylocystis furcata</i>
<i>Sorex araneus</i>	BN2014.05.20-3	20.05.2014	Калимок	<i>Lineolepis scutigera</i>
<i>Sorex araneus</i>	BN2014.05.21-2	21.05.2014	Калимок	<i>Lineolepis scutigera</i>
<i>Sorex araneus</i>	BN2014.05.21-3	21.05.2014	Калимок	<i>Lineolepis scutigera</i>
<i>Sorex araneus</i>	BN2014.09.18	18.09.2014	Парангалица	<i>Neoskrjabinolepis</i> sp., <i>Ditestolepis diaphana</i>

PCR амплификация и секвенционен анализ

За изследването бяха избрани общо три участъка от два ядрени (28S рДНК и 18S рДНК) и един митохондриален ген (*cox1*). Беше приложен следният алгоритъм:

- Амплифициране на ДНК-фрагментите с три двойки праймери.
- Визуализиране на PCR продуктите на 1% агарозна гел-електрофореза.
- Пречистване на PCR продуктите чрез специализирани китове.
- Секвениране в двете посоки чрез използване на PCR-праймерите и два допълнителни вътрешни праймера за 18S рДНК региона. Всички секвенционни реакции бяха извършени от Eurofins Genomics (Германия).
- Секвенционен анализ чрез използване на специализиран софтуер MEGA v. 7 и MEGA v. X.

- Депозиране на секвенираните генни участъци в генетичната база данни Genbank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

От всеки от установените видове бяха секвенирани поне по 3 индивида, когато беше възможно. От идентичните секвенции са избрани и публикувани по една от вид със съответния отговарящ ваучер.

Филогенетична реконструкция

Успешно секвенираните участъци бяха използвани за филогенетична реконструкция, обхващаща наличните генетични данни за хименолепидидите. В анализите, освен получените в хода на настоящото изследване секвенции, бяха използвани и публикуваните в GenBank от други автори от други видове хименолепидиди. В анализите са използвани следният брой секвенции:

- 18S рДНК – 12 получени от нас и 7 от предходни автори;
- *cox1* – 12 получени от нас и 10 от предходни автори;
- 28S рДНК – 13 получени от нас и 50 от предходни автори;
- Комбиниран анализ – 36 получени от нас и 9 от предходни автори.

За конструиране на кладограмите е използван софтуерът Mr Bayes (Ronquist et al. 2012).

4. Резултати и обсъждане

Таксономично определяне на цестодите

Уловени са 24 екземпляра земеровки, от които – 14 екземпляра от вида *Crociodura suaveolens*, 6 от *Sorex araneus* и 4 екземпляра *Neomys fodiens* от районите на БЕБ „Калимок“ (Силистренска област), Боянска река (София), резерват „Атанасовско езеро“ (Бургаска област), резерват „Парангалица“ (Благоевградска област) и река Планщица (Плана планина). При паразитологичното аутопсиране при всички екземпляри беше установена паразитна инвазия.

Морфологично бяха идентифицирани 12 цестодни вида:

При род *Crociodura* бяха установени 2 вида хименолепидиди:

- *Staphylocystis uncinata* (Stieda, 1862)
- *Staphylocystis tiara* (Dujardin, 1845)

При род *Sorex* бяха установени 4 вида хименолепидиди:

- *Lineolepis scutigera* (Dujardin, 1845)
- *Ditestolepis diaphana* (Cholodkowski, 1906)
- *Staphylocystis furcata* (Stieda, 1862)
- *Neoskrjabinolepis* sp.

При род *Neomys* бяха установени 6 вида хименолепидиди:

- *Coronacanthus integrus* (Hamann, 1891)
- *Coronacanthus omissus* Baer and Joyeux, 1943
- *Coronacanthus magnihamatus* Vasileva, Tkach and Genov, 2005
- *Coronacanthus vassilevi* Genov, 1980
- *Vaucherilepis trichophorus* Tkach, Vasileva and Genov, 2003
- *Spasskylepis ovaluteri* Schaldybin, 1964

Прави впечатление, че цестодите на земеровките показват висока специфичност към крайния си гостоприемник, което е трудно да бъде обяснено само с хранителните им предпочитания.

Филогенетичен и секвенционен анализ на базата на 28S рРНК

Анализът демонстрира консистентно наличието на четири силно поддържани филогенетични клада, всеки от които се характеризира с постоянен състав на включените таксони. Тъй като тези кладове потвърдиха основните групи, разкрити от Naukisalmi et al. (2010), ние използвахме установените вече наименования на кладовете, предложени от тези автори. А именно:

Клад на *Ditestolepis* – Кладът се състои от цестоди принадлежащи към родовете *Ditestolepis*, 1952, *Spasskylepis* Schaldybin, 1964 и *Gulyaevilepis* Kornienko & Binkiene, 2014. Най-характерна обединяваща физиологична характеристика за цестодите от този клад е последователно узряване на стробилата. Филогенетичното дърво показва базално и дълбоко разклоняване между тази група таксони състоящ се от цестоди по земеровките и останалите хименолепидиди от бозайници, които се характеризират като правило с постепенно узряване на стробилата и включват паразити както по земеровките, така и по по-разнообразни групи бозайници (гризачи, прилепи, хора, таралежоподобни бозайници).

Клад на *Rodentolepis*. Този силно поддържан клад се състои от цестоди с крайни гостоприемници гризачи, прилепи и земеровки. В топологията на филогенетичното дърво се очертават няколко добре дефинирани подгрупи:

1. Подклад, състоящ се от родовете *Nomadolepis* Makarikov, Gulyaev and Krivopalov, 2010, *Pararodentolepis* Makarikov and Gulyaev, 2009 и видове от родовете *Rodentolepis* Spassky, 1954 и *Staphylocystis* Villot, 1877.

Други добре подкрепени монофилетични групи в този клад са следните:

2. Хименолепидидите на глиридни гризачи (*Armadolepis* spp. и неидентифицирани видове от същата група гостоприемници).

3. Видове от *Vampirolepis* Spassky, 1954, род паразитиращ в прилепи.

4. Групи таксони, паразитиращи по земеровките, цестодът по гризачи *Rodentolepis straminea* (Goeze, 1782); в последният подклад се наблюдава ясно отделяне на цестодите от *Sorex* spp. спрямо тези, изолирани от други гостоприемници. Първата последователност за *Staphylocystis tiara*, паразит по кроцидуричните земеровки, която е получена по време на настоящото проучване, постави този вид отделно и далеч от други видове, считани за негови роднини.

Клад на *Hymenolepis*. Този клад бе силно подкрепен от нашите анализи и се състои от видове от рода *Hymenolepis* Weinland, 1858 (паразитен при муридите и геомиидни гризачи, таралежиподобни и хора) плюс *Rodentolepis asymmetrica* (Janicki, 1904), паразит на крицетидни гризачи.

Клад на *Arostrilepis* – кладът се състои от цестоди по земеровки (трибусите Soricini и Nectogalini), с изключение на вид от род *Arostrilepis* Mas-Coma and Tenora, 1997 паразитиращ при крицетидни гризачи. "Гръбнакът" на това клад е слабо подкрепен от нашия анализ. Въпреки това, няколко монофилетични групи имат силна подкрепа. Те са следните:

1. *Neoskrjabinolepis* и *Lineolepis* Spassky, 1959;

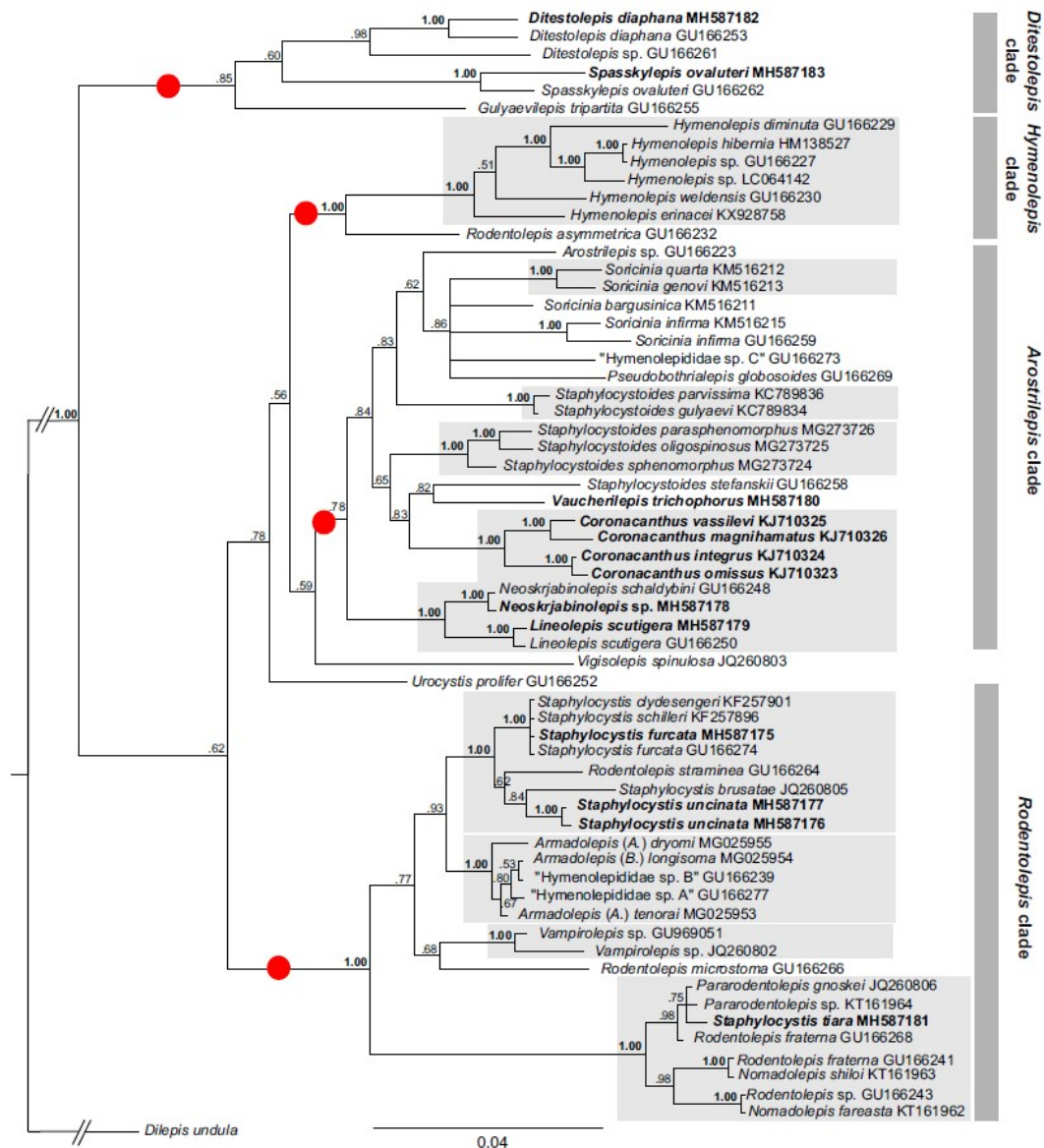
2. Видове от рода *Coronacanthus* Spassky, 1954;

3. и 4. Две силно поддържани групи, състоящи се от съответно три и два неарктически вида от род *Staphylocystoides* Yamaguti, 1952, които обаче, са отдалечени един от друг;

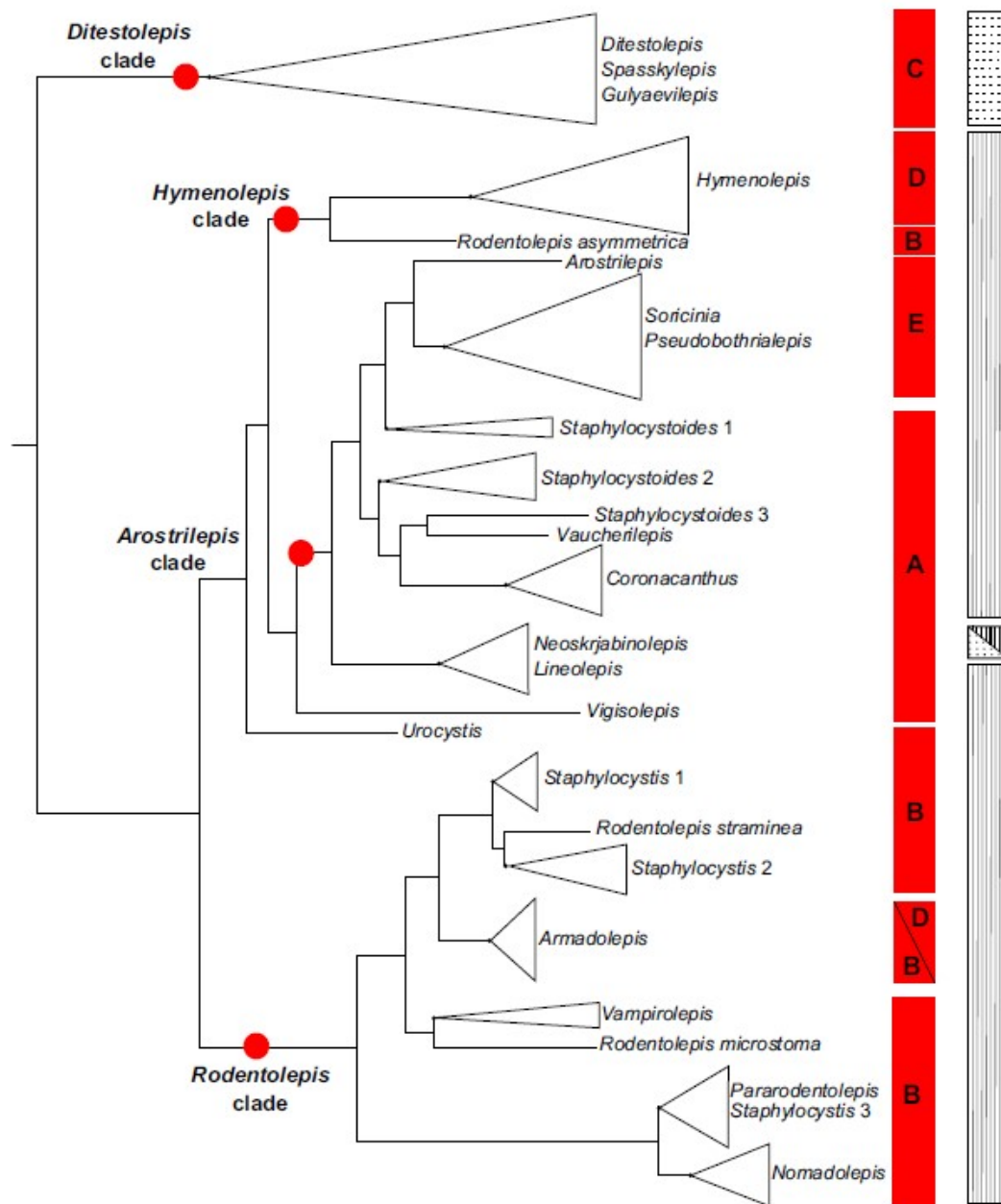
5. *Soricinia quarta* (Карпенко, 1983) и *Soricinia genovi* Binkiene, Kornienko and Tkach, 2015. Въпреки слабата подкрепа, клад, състоящ се от хименолепидидните родове *Arostrilepis*, *Soricinia* Spassky и Spasskaya, 1954 и *Pseudobothrialepis* Schaldybin, 1957, всички изброени характеризирани се с липса на ростелумен апарат или неговият рудимент.

Нито един от тези два вида, *Urocystis prolifer* Villot, 1880 и *Vigisolepis spinulosa* (Cholodkowsky, 1906), не може да бъде приписан към нито един от гореспоменатите кладове.

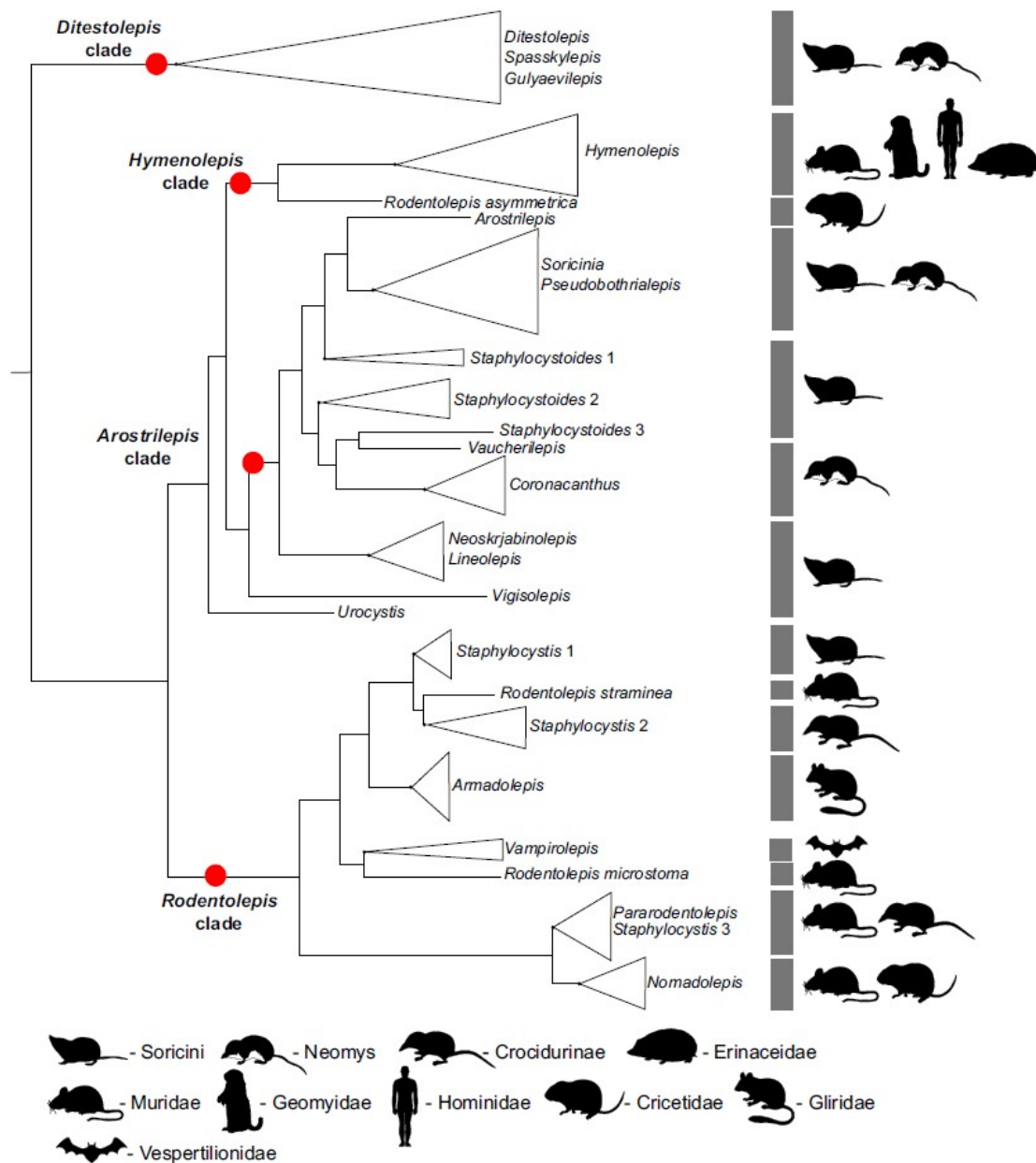
Констатирани са съвпадения между филогенетичната хипотеза, изградена на базата на 28S рДНК генен регион, и морфологичните особености на ростелумния апарат и стробиларното развитие. Конструирани са и съпоставяния между резултатите за 28S рДНК и крайните, а също и междинните гостоприемници на изследваните цестоди.



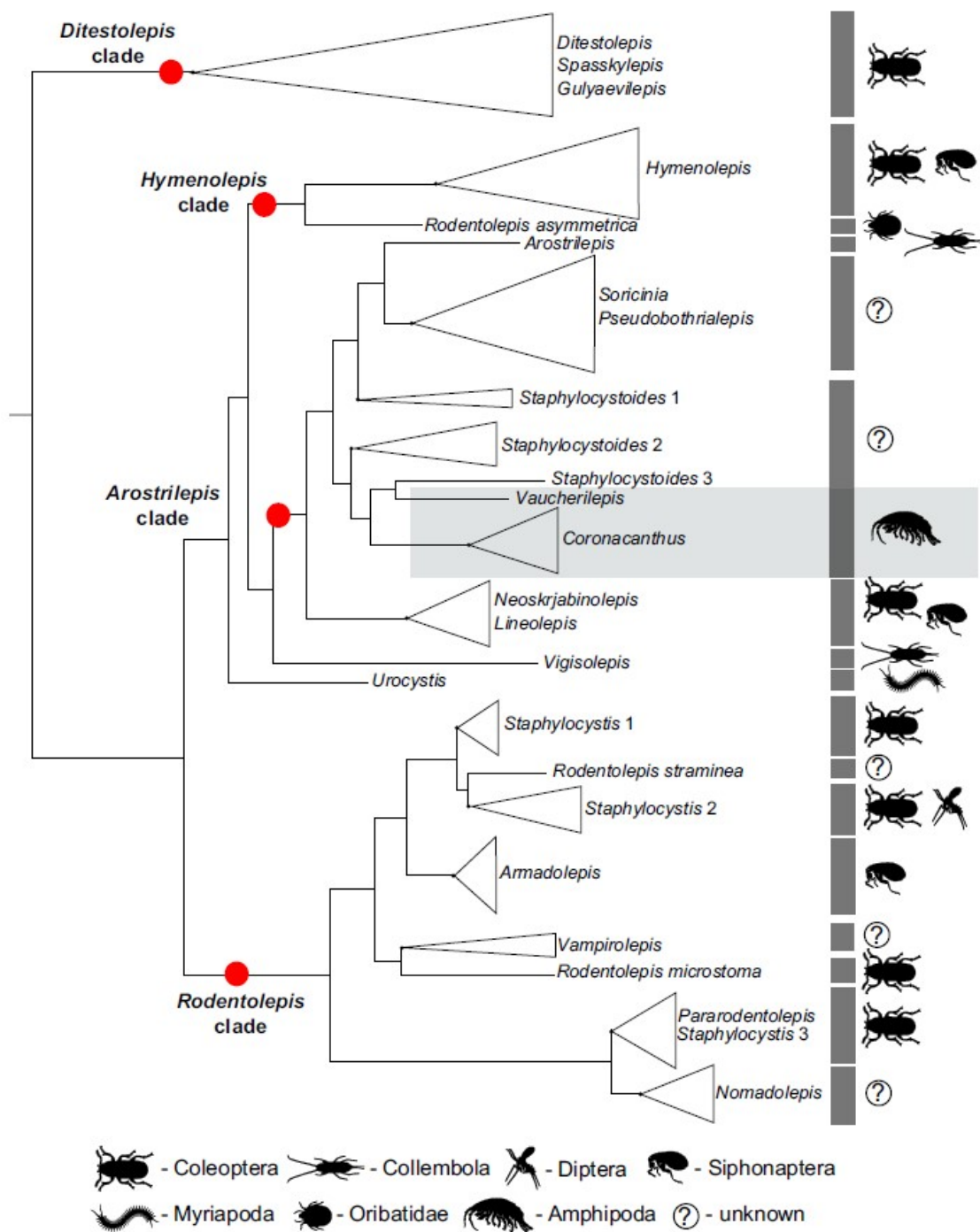
Фиг. 1. Филогенетичен анализ на взаимоотношенията между 56 вида хименолепидидни цестоди, базирани на анализът на 28S рДНК генен регион. *Dilepis undula* (семейство Dilepididae) е използван като външна група. Четирите основни клада цестоди са отбелязани с червени точки. След видовите наименования са представени и входящите номера на секвенциите в GenBank. Поддръжката на възлите е дадена като постериорна вероятност.



Фиг. 2. Разпределение на различните типове ростелумен апарат и развитие на стробилата на хименолепидидните цестоди от бозайници, съпоставено с филогенетичното дърво получено чрез анализ на 28S рДНК генен регион. Използваното означения отговарят на: А – инвагинабилен ростелум; В – ретрактабилен ростелум; С – ростелум редуциран до апикален орган; D – ростелум редуциран до anterioren канал; Е – напълно редуциран ростелум. Що се отнася до развитието на стробилата правоъгълниците с точковиден шрих представят кладове със серийно узряване на стробилата, а тези с вертикални линии – с постепенно узряване на стробилата.



Фиг. 3. Разпределение на крайните гостоприемници спрямо филогенетичната хипотеза за изследваните хименолепидидни цестоди основана на 28S рДНК генен регион.



Фиг. 4. Разпределение на междинните гостоприемници спрямо филогенетичният анализ на базата на 28S рДНК генен регион.

Филогенетичен анализ на базата на 18S рРНК

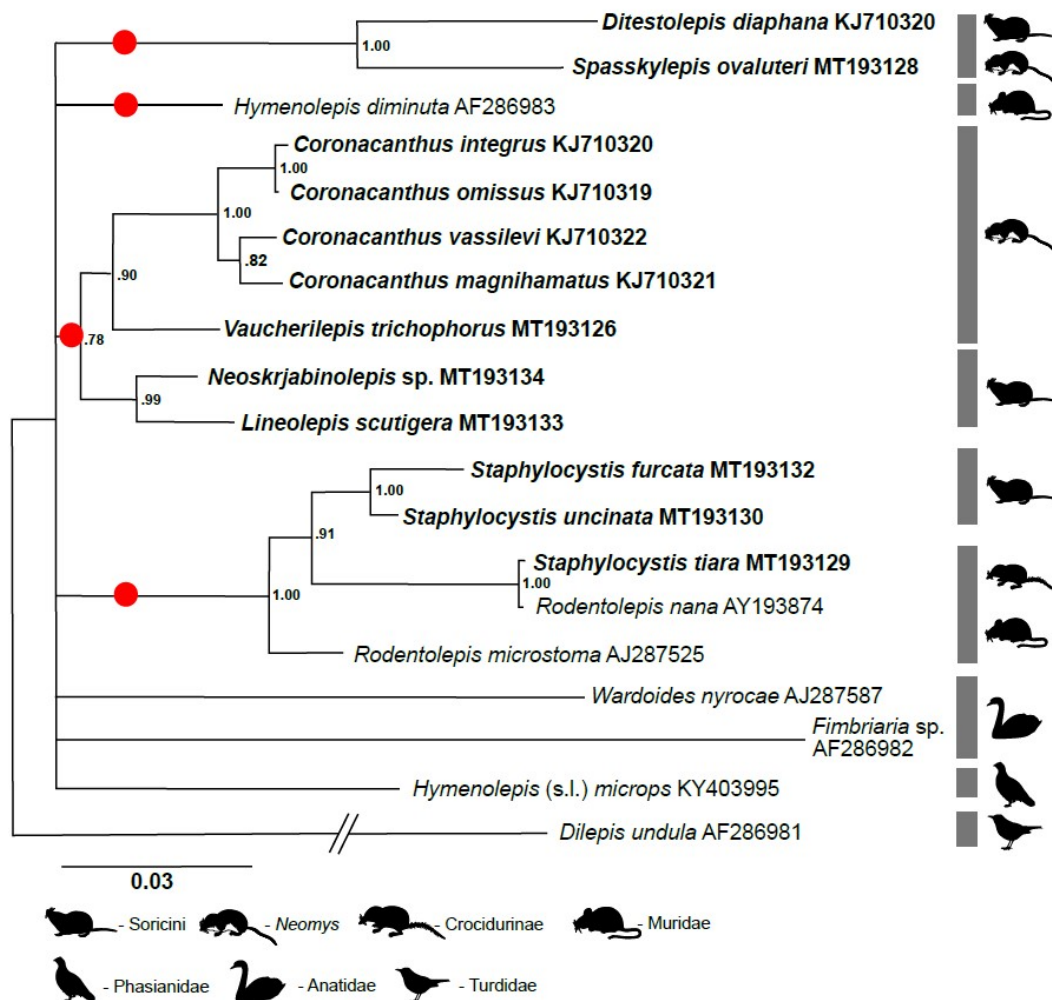
На базата филогенетичната реконструкция по 18S рРНК гена базалните взаимоотношения на основните филогенетични линии на хименолепидидите остават неизяснени като се наблюдава базална политомия между кладовете паразитиращи по бозайници и тези по птици. В същата политомия остава и единственият представител включени в анализа от клада на *Hymenolepis*. Два от членовете на клада на *Ditestolepis* (*Ditestolepis diaphana* и *Spasskylepis ovaluteri*), бяха разкрити като сестрински таксони. Монофилия на клада на *Arostrilepis* също бе добре подкрепена с включените в настоящия анализ родове *Neoskrjabinolepis*, *Lineolepis*, *Vaucherilepis* и *Coronacanthus*. Монофилията на самия род *Coronacanthus* също е силно подкрепена, като другият паразитен вид по водните земеровки (*Vaucherilepis*) се явява негов сестрински таксон. *Rodentolepis* кладът, представени в анализа с родовете *Staphylocystis* (паразитиращ по земеровките) и *Rodentolepis* (паразитиращ по гризачи), също е монофилетичен, а видът *Rodentolepis microstoma* се ситупира базално към останалата част от таксоните. *Rodentolepis nana* (от гризачи) и *Staphylocystis tiara* (от насекомоядни) се явяват като сестрински таксони.

Филогенетичен анализ на базата на *cox1*

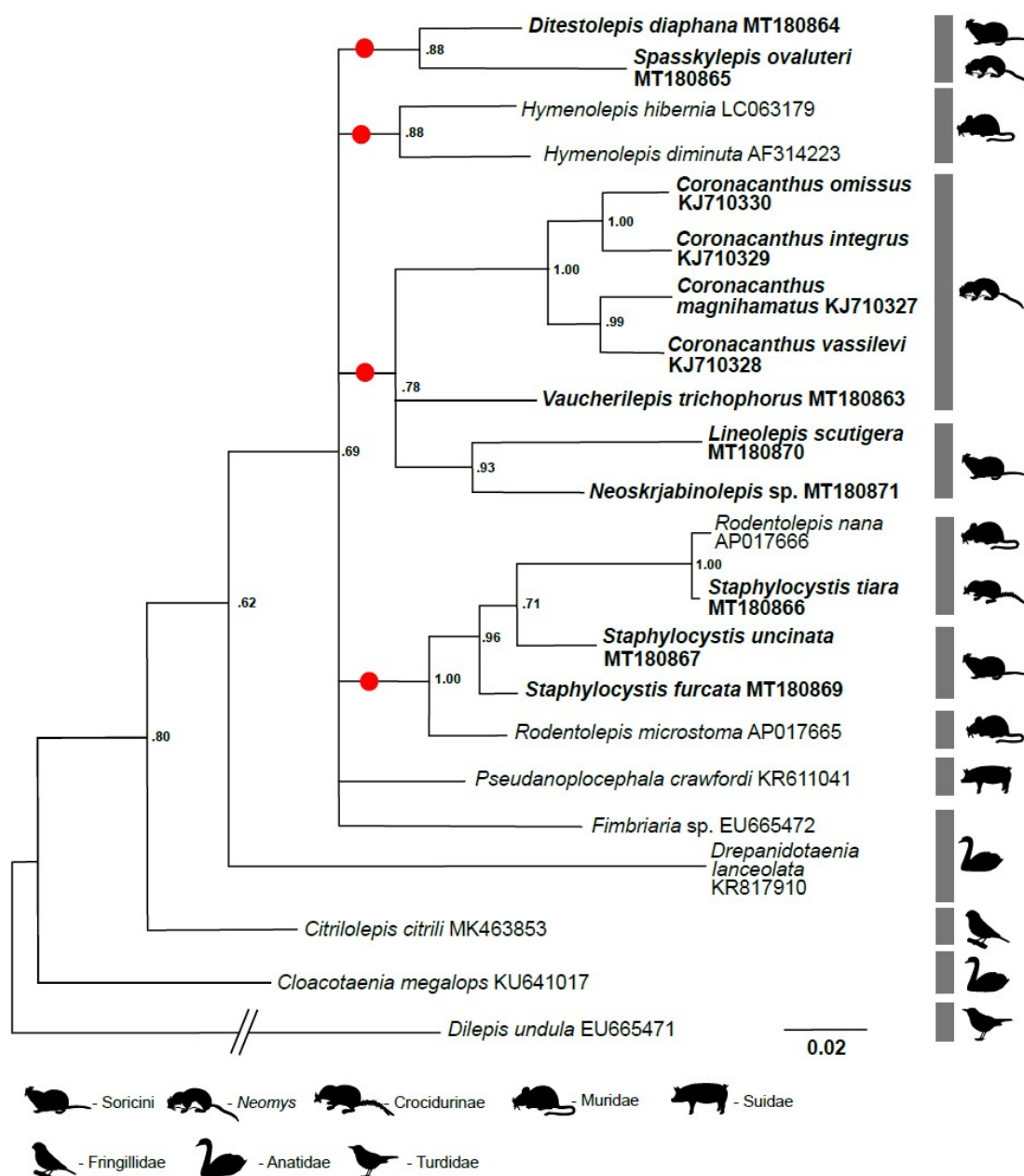
Филогенетичното дърво реконструирано с данните от *cox1* гена демонстрира валидността на всеки от четирите основни клада на хименолепидидите на бозайниците като монофилетична група. Въпреки това, базалното филогенетично разклоняване на цестодите паразитиращи по дребните бозайници остава неразрешено, образувайки политомия с хименолепидидните видове, паразитиращ по птици (*Fimbriaria* sp.), и единственият хименолепидиден вид, паразитиращ при прасета (*Pseudanoplocephala crawfordi*). Останалите хименолепидиди по птиците, включени в анализа, са базални за описаната по-горе политомия (включваща таксоните на бозайниците, както и *Fimbriaria* sp.) Кладът на *Ditestolepis* и кладът на *Hymenolepis* са добре подкрепени. Кладът на *Arostrilepis* също е добре подкрепен, но базалните взаимоотношения в него остават неразрешени, а цестодите от водни земеровки не формират монофилетична група. Родовете *Neoskrjabinolepis* и *Lineolepis* са потвърдени като сестрински таксони. В клада на *Rodentolepis*, *Rodentolepis microstoma* се явява базален таксон, а *Staphylocystis furcata* е базален на останалите видове от рода и *Rodentolepis nana*. Силната филогенетична връзка между *Rodentolepis nana* (от гризачи) и *Staphylocystis tiara* (от насекомоядни), която бе разкрита при анализа на 18S рДНК, бе потвърдена и тук.

Комбиниран филогенетичен анализ на базата на секвенциите за 28S rDNA, 18S рДНК и *cox1* гените и обобщение

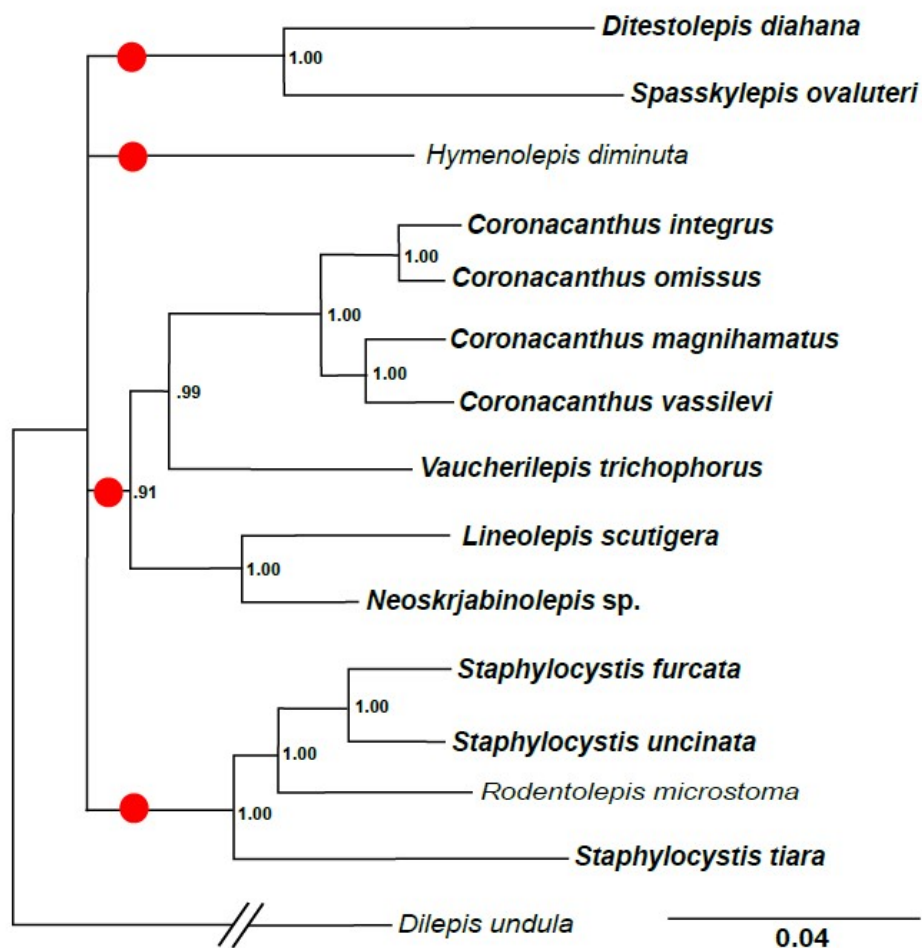
Комбинирания анализ, базиран на секвенциите от 28S rDNA, 18S рДНК и *cox1*, се характеризира се с наличието на базална политомия. Въпреки това, кладовете на *Ditestolepis*, *Arostrilepis* и *Rodentolepis* са силно подкрепени. Местоположението на таксоните в клада *Arostrilepis* е идентично с това, разкрито при анализа на 18S на рДНК. В клада на *Rodentolepis*, *Staphylocystis tiara* е базален за останалите таксони, които включват както *Staphylocystis* spp., така и *Rodentolepis microstoma*.



Фиг. 5. Филогенетичен анализ на взаимоотношенията между 18 вида хименолепидидни цестоди (15 от бозайници и 3 от птици), базирани на анализът на 18S рДНК генен регион. *Dilepis undula* (семейство Dilepididae) е използван като външна група. Четирите основни клада цестоди са отбелязани с червени точки. Представени са схематично и крайните гостоприемници на съответните цестоди. След видовите наименования са представени и входящите номера на секвенциите в GenBank. Поддръжката на възлите е дадена като постериорна вероятност.



Фиг. 6. Филогенетичен анализ на взаимоотношенията между 21 вида хименолепидидни цестоди (17 вида от бозайници и 4 от птици), базиран на цитохром оксидаза 1 гена (*cox1*). *Dilepis undula* (семейство Dilepididae) е използван като външна група. Четирите основни клади цестоди са отбелязани с червени точки. Представени са схематично и крайните гостоприемници на съответните цестоди. След видовете наименования са представени и входящите номера на секвенциите в GenBank. Поддръжката на възлите е дадена като постериорна вероятност.



Фиг. 7 Филогенетичен анализ на взаимоотношенията между 14 вида хименолепидидни цестоди от бозайници, базиран на комбинираните секвенции от *cox1*, 18S рРНК and 28S рРНК гените. *Dilepis undula* (семейство Dilepididae) е използван като външна група. Четирите основни клада цестоди са отбелязани с червени точки. Представени са схематично и крайните гостоприемници на съответните цестоди. След видовите наименования са представени и входящите номера на секвенциите в GenBank. Поддръжката на възлите е дадена като постериорна вероятност.

5. Обобщение и изводи

5.1. Видове и генни секвенции

Настоящото изследване добавя генни секвенции от България на **12 вида хименолепидидни цестоди**, паразитиращи по насекомоядните бозайници от семейство Soricidae. Те са: *Ditestolepis diaphana* (Cholodkowski, 1906), *Coronacanthus integrus* (Hamann, 1891), *Coronacanthus magnihamatus* Vasileva, Tkach & Genov, 2005, *Coronacanthus omissus* Baer & Joyeux, 1943, *Coronacanthus vassilevi* Genov, 1980, *Lineolepis scutigera* (Dujardin, 1845), *Neoskrjabinolepis* sp. (вероятно нов за науката вид), *Spasskylepis ovaluteri* Schaldybin, 1964, *Staphylocystis tiara* (Dujardin, 1845), *Staphylocystis furcata* (Stieda, 1862), *Staphylocystis uncinata* (Stieda, 1862) и *Vaucherilepis trichophorus* Tkach, Vasileva & Genov, 2003. За тях са получени генни секвенции за 18S рДНК, 28S рДНК и *cox1*.

По отношение на **28S рДНК** генен регион, за 7 вида (*C. integrus*, *C. magnihamatus*, *C. omissus*, *C. vassilevi*, *V. trichophorus*, *S. tiara* и *S. uncinata*) публикуваните от нас секвенции са първите генетични данни за тези видове. За същия ген, получихме също секвенция за вид от род *Neoskrjabinolepis*, който вероятно е нов за науката. Тя се различава по едно нуклеотидно заместване от секвенцията на *N. schaladybini* Spassky, 1947, съобщена от Haukisalmi et al. (2010).

За 4 вида, за които секвенции са публикувани от други географски райони – *S. furcata*, *L. scutigera*, *D. diaphana* и *S. ovaluteri*, ние получихме нови секвенции, основани на материали от България. За вида *S. ovaluteri* това е първа находка в *Neomys fodiens* и първата му депозирана секвенция от този вид гостоприемник.

По отношение на **18S рДНК**, за 11 таксона (*C. integrus*, *C. magnihamatus*, *C. omissus*, *C. vassilevi*, *D. diaphana*, *L. scutigera*, *Neoskrjabinolepis* sp. (вероятно нов за науката вид), *S. tiara*, *S. uncinata*, *S. ovaluteri* и *V. trichophorus*) публикуваните от нас секвенции представляват първите генетични данни за тези видове. По отношение на същия генен регион, за 1 вид (*S. furcata*), за който са известни секвенции от друг географски регион, публикуваните от нас данни са нова секвенция, основана на материали от България.

Относно *cox1* гена, всички получени от нас секвенции за 12 вида (*D. diaphana*, *C. integrus*, *C. magnihamatus*, *C. omissus*, *C. vassilevi*, *L. scutigera*, *Neoskrjabinolepis* sp. (вероятно нов за науката вид), *S. ovaluteri*, *S. tiara*, *S. furcata*, *S. uncinata* и *V. trichophorus*) представляват първите данни за този ген от изследваните таксони.

5.2. Филогенетични хипотези

Разработената от нас **филогенетична хипотеза, основана на 28S рДНК** (Публикация 1), включва данни за 56 вида от семейство Hymenolepididae, докато предходната хипотеза (Haukisalmi et al. 2010) включва данни за 31 вида. Нашите изследвания потвърждават наличието на четирите основни монофилетични групи, разкрити от Haukisalmi et al. (2010): клад на *Ditestolepis*, клад на *Hymenolepis*, клад на *Rodentolepis* и клад на *Arostrilepis*. Анализът показва ниска степен на поддръжка на базалната позиция на клада на *Ditestolepis* спрямо останалите три клада, а също и слаба поддръжка на клада на *Arostrilepis*. Като нови данни за филогенетичните връзки между хименолепидидите от бозайници са монофилията на род *Coronacanthus* и полифилията на родовете *Staphylocystis* и *Staphylocystoides*. Анализите потвърждават монофилията на род *Hymenolepis*, монофилията на групата видове, паразитиращи по сънливци (Gliridae), положението на родовете *Pararodentolepis* и *Nomadolepis* като сестрински групи, полифилията на *Rodentolepis*, положението на *Neoskrjabinolepis* и *Lineolepis* като сестрински таксони, както и близките филогенетични връзки между родовете с пълна

редукция на ростелумния апарат.

Филогенетичната реконструкция на основата на 18S рДНК (Публикация 2) показва, че базалните взаимоотношения на основните филогенетични линии на хименолепидидите остават неизяснени, като се наблюдава базална политомия между кладовете, паразитиращи по бозайници и тези по птици. В същата политомия е поместен и единственият представител от клада на *Hymenolepis*, включен в анализа – *Hymenolepis diminuta*. Два от членовете на клада на *Ditestolepis* (*Ditestolepis diaphana* и *Spasskylepis ovaluteri*) бяха установени като сестрински таксони. Монофилия на клада на *Arostrilepis* също бе добре подкрепена с включените в настоящия анализ родове *Neoskrjabinolepis*, *Lineolepis*, *Vaucherilepis* и *Coronacanthus*. Монофилията на самия род *Coronacanthus* също е силно подкрепена, като другият паразитен вид по водните земеровки (от род *Vaucherilepis*) е негов сестрински таксон. Кладът на *Rodentolepis*, представен в анализа с родовете *Staphylocystis* (паразитиращ по земеровките) и *Rodentolepis* (паразитиращ по гризачи), също е монофилетичен, а видът *Rodentolepis microstoma* се разполага базално спрямо останалата част от таксоните. *Rodentolepis nana* (от гризачи) и *Staphylocystis tiara* (от насекомоядни) са сестрински таксони.

Филогенетичната дендрограма на основата на *cox1* гена (Публикация 2) демонстрира валидността на всеки от четирите основни клада на хименолепидидите на бозайниците като монофилетична група. Въпреки това, базалното филогенетично разклоняване на цестодите от бозайниците е неразрешено, образувайки политомия с хименолепидидните видове, паразитиращ по птици (*Fimbriaria* sp.), и единственият хименолепидиден вид, паразитиращ по свине (*Pseudanoplocephala crawfordi*). Останалите хименолепидиди от птици, включени в анализа, са базални за описаната по-горе политомия (включваща таксоните на бозайниците, както и *Fimbriaria* sp.) Кладът на *Ditestolepis* и кладът на *Hymenolepis* са добре подкрепени. Кладът на *Arostrilepis* също е добре подкрепен, но базалните взаимоотношения в него остават неразрешени. В него цестодите от водни земеровки не формират самостоятелно монофилетична група, а се групират заедно в политомия с други родове от земеровки. Въпреки това, родовете *Neoskrjabinolepis* и *Lineolepis* са потвърдени като сестрински таксони. В клада на *Rodentolepis*, *R. microstoma* е базален таксон, а *Staphylocystis furcata* е базален на други видове от този род и *Rodentolepis nana*. Силната филогенетична връзка между *Rodentolepis nana* (от гризачи) и *Staphylocystis tiara* (от насекомоядни), която бе разкрита чрез анализа на 18S рДНК, бе потвърдена и от този анализ.

Комбинираният анализ, базиран на секвенциите от 28S рДНК, 18S рДНК и *cox1* (Публикация 2), показва наличието на базална политомия. Въпреки това, кладовете на *Ditestolepis*, *Arostrilepis* и *Rodentolepis* са силно подкрепени. Местоположението на таксоните в клада на *Arostrilepis* е идентично с това, разкрито при анализа на 18S рДНК. В клада на *Rodentolepis*, *Staphylocystis tiara* е базален за останалите таксони, които включват както *Staphylocystis* spp., така и *Rodentolepis microstoma*.

Както се вижда, проведените анализи, основани на секвенциите, получени за целите на настоящото изследване и на публикувани секвенции от предходни автори, показват наличие на 4 основни клада в групата на хименолепидидите от дребни бозайници. Тези кладове са разкрити при първите филогенетични, молекулярно-генетични изследвания върху хименолепидиди от бозайници (Haukisalmi et al., 2010), като представите за техния състав и конфигурация са допълнени от нашите анализи. Докато кладът на *Ditestolepis* е свързан изцяло с гостоприемници от семейство Soricidae, структурата на останалите три клада предполага множество еволюционни епизоди на колонизиране на гостоприемници (прехвърляне на паразити от земеровки на гризачи или в обратна посока).

Два от нашите филогенетични анализи (основани на 18S рДНК и *cox1*) показват, че базалните взаимоотношения на четирите обособени клада остават неразрешени – тези кладове водят началото си от обща политомия, в която участват и няколко таксона хименолепидидни цестоди, паразитиращи по птици (както водни, така и наземни). Тази топология на филогенетичното дърво би могла да се интерпретира като проява на бърза диверсификация на хименолепидидите, съпроводена от множество епизоди на колонизация на бозайници от паразити, първоначално еволюирали в птичи гостоприемници. Поради тази причина по-нататъшното изследване на произхода и еволюцията на бозайниковите хименолепидиди би трябвало да се основава на анализи, в които да се включат и представители на основните филетични линии хименолепидиди, паразитиращи по птици.

Разработените от нас филогенетични анализи, основани на секвенциите на три гена, както и комбинираният анализ, като цяло не си противоречат. Те разкриват сходно групиране на видовете и подкрепят наличието на четири монофилетични групи в рамките на хименолепидидите на бозайниците.

5.3. Еволюционни особености на асоциациите паразит – краен гостоприемник

Представените хипотези за филогенетичните връзки между хименолепидидите от бозайници позволяват да се интерпретират по-пълно еволюционната история на паразит-гостоприемниковите асоциации.

Както се вижда от Фиг. 4 от Публикация 1, от четирите основни филетични групи сред хименолепидидите на бозайниците, единствено кладът на *Ditestolepis* е изцяло свързан с насекомоядните бозайници от семейство Soricidae. Всеки от останалите три основни клада включва паразити на два или повече разряда бозайници. Видовете от клада на *Arostrilepis* са паразити на гризачи и земеровки от Soricidae. Кладът на *Hymenolepis* обединява паразити на гризачи, примати и таралежи, като последната група по най-широко разпространените представи са родствени на семейство Soricidae (разред Eulipotyphla). Кладът на *Rodentolepis* включва паразити на гризачи, ръкокрили и земеровки (т.е. представители на три разряда бозайници). Такова разпределение на дефинитивните гостоприемници насочва към възможни еволюционни епизоди на колонизиране на нови групи гостоприемници, включително между разредите бозайници.

Въпреки това, нашите анализи разкриват няколко линии паразити, които са в близка асоциация с определени групи гостоприемници, чието съвременно разнообразие вероятно отразява гостоприемниково-паразитна коеволюция или процеси на колонизиране на гостоприемници в рамките на същата група бозайници. Примери за такива групи паразити в нашите анализи са:

- кладът на *Ditestolepis*, който е тясно асоцииран със семейство Soricidae;
- подкладът на цестодите с изцяло редуциран ростелумен апарат (*Soricinia* и *Pseudobothrialepis*), които са също паразити на земеровки;
- видовете от род *Coronacanthus*, чиито гостоприемници са водни земеровки от род *Neomys*;
- видовете от род *Armadolepis*, които са диверсифицирали в рамките на гостоприемниковата група на сънливците (гризачи от семейство Gliridae).

Получените данни показват сложна еволюционна история на паразит-гостоприемниковите асоциации на хименолепидидите и техните гостоприемници – бозайници, в която важно значение могат да имат както процесите на съвместно видообразуване, така и колонизирането на гостоприемници от паразити, които са еволюирали по-рано в друга група гостоприемници. Получаването на по-пълна и по-

надеждна представа за еволюционната история на паразит-гостоприемниковите асоциации „цестоди – дребни бозайници“ би могло да се постигне с по-пълно обхващане на както на видовия състав на цестодите, така и този на земеровките, като се включат повече таксони както от Евразия и Северна Америка, така и от тропиците на Стария свят, където разнообразието на Soricidae е значително, а хелминтологичните проучвания върху тях са относително малко.

5.4. Данни за еволюцията на жизнените цикли на хименолепидидите в светлината на новополучените филогенетични хипотези

Малка част от включените в настоящите филогенетични анализи видове цестоди са с известни междинни гостоприемници (Фиг. 5 на Публикация 1). Твърдокрили насекоми са междинни гостоприемници на *Ditestolepis diaphana*, *Hymenolepis diminuta*, *H. weldensis*, *H. hibernia*, *H. erinacei*, *Neoskrjabinolepis schaldybini*, *Staphylocystis furcata*, *S. uncinata*, *Rodentolepis microstoma* и *R. fraterna* (Prokopic, 1971, Генов, 1984, Sulgostowska et al., 2015). Бълхи (разред Siphonaptera) са гостоприемници на *Hymenolepis diminuta* и *Lineolepis scutigera* (Генов, 1984) и на видове от *Armadolepis* (Vaucher & Quentin, 1975). Ларвите на *Urocystis prolifer* са описани от многоножки (Baer & Della Santa, 1960; Kisieleska, 1960). Почвени кърлежи са междинни гостоприемници на *Rodentolepis asymmetrica* (Prokopic & Mauer, 1969), колемболи на видове от род *Arostrilepis* spp. (Ishigenova et al., 2018) и *Vigisolepis spinulosa* (Прокопич, 1968), а двукрили са гостоприемници на *Staphylocystis brusatae* Vaucher, 1971 (Quentin et al. 1971). Разпределението на таксономичната принадлежност на междинните гостоприемници върху дендрограмите, получени в резултат на настоящото изследване, не показва наличие на закономерност. Установените монофилетични групи цестоди не изглежда да са свързани с адаптиране към определени групи безгръбначни животни, които да служат като междинни гостоприемници в жизнените цикли. Повечето от жизнените цикли на изследваните цестоди от насекомоядни бозайници са свързани с наземни местообитания. Обаче, родовете *Vaucherilepis* и *Coronacanthus* (паразити на *Neomys*), които използват в жизнените си цикли амфиподи като междинни гостоприемници (Прокопич и др., 1970; Tkach 1994; Tkach et al. 2003), на кладограмите са разположени между паразити с наземен жизнен цикъл (Фиг. 5 на Публикация 1). Това предполага вторично придобиване на воден жизнен цикъл от паразитиращите в *Neomys* цестоди, което е в съответствие с хипотеза за вторична адаптация на земеровките от трибус Nectogalini към водна среда (He et al. 2010).

5.5. Морфологична поддръжка на идентифицираните монофилетични групи

Hoberg et al. (1999) разглеждат растелумния апарат на хименолепидидите като състоящ се от торбовиден растелум, обикновено в комбинация с растелумно влагалище; те са на мнение, че загубата на растелума е вторично еволюционно събитие, което е настъпило независимо в различни филетични линии циклофилидейни цестоди. Ние приемаме, че наличието на торбовиден растелумен апарат е плезиоморфно състояние за това семейство, доколкото той се среща в няколко семейства от разреда, които се отделят на по-ниско равнище от Hymenolepididae в еволюционното дърво на Cyclophyllidea (Hoberg et al. 1999). Този тип растелумен апарат се състои от растелум, издаваща се напред апикална част на сколекса, наречена ринхус (често носещ корона растелумни куки) и растелумно влагалище (Фиг 2а и 2б в Публикация 1). Почти половината видове, включени в нашия основан на 28S рДНК анализ (23 от 56), се характеризират с тази обща (плезиоморфна) структура на растелумния апарат.

Трябва да се обърне внимание, че основните кладове и субкладове, очертани от нашия анализ, демонстрират различни степени на редукция или модификация на общия модел на ростелумния апарат. Видовете от клада на *Ditestolepis* се характеризират с пълна редукция на ростелумното влагалище и частична редукция на ростелума – последният се превръща в малък "жлезист апикален орган" (термин, въведен от Гуляев и Карпенко, 1998), с почти напълно редуцирана мускулатура. В клада на *Hymenolepis*, където се срещат, както цестоди с въоръжен ростелум (*Rodentolepis asymmetrica*), така и невъоръжени видове (*Hymenolepis* s. str.), ростелумът на последните е напълно редуциран и ринхусът (наречен "антериорен канал" от Specian & Lumsden 1980) се инвагинира в ростелумно влагалище (Фиг. 2d в Публикация 1). По подобен начин пълна редукция на ростелума може да се наблюдава и в клада на *Rodentolepis*, сред подклада, състоящ се от цестоди на сънливци (Gliridae), където подрод *Bremserilepis* Makarikov, 2017 се характеризира с наличието на невъоръжен ринхус, инвагиниран в ростелумно влагалище (Makarikov 2017; Makarikov et al. 2018). В клада на *Arostrilepis* се съдържа подклад, състоящ се от родовете *Arostrilepis*, *Soricinia* и *Pseudobothrialepis*, който демонстрира пълна редукция на ростелумния апарат – т.е. не се наблюдават никакви рудиментарни структури от ростелумния апарат. По този начин потвърждаваме, че частичната или пълна редукция на ростелумния апарат е апоморфно състояние (Hoberg et al. 1999), което е възникнало независимо във всички основни филетични линии (кладове) на хименолепидидите на дребните бозайници.

Сред родовете на хименолепидидите с общия (плезиоморфен) модел на ростелумния апарат бяха разграничени два типа ростелумни апарати (Czaplinski & Vaucher 1994). "Инвагинабилен ростелум" е този, при който апикалната му част е способна да се инвагинира и като резултат на това, при прибиране на ростелума в ростелумното влагалище, остриетата на ростелумните куки се насочват антериорно (Фиг. 2a). Обратно на това, при „ретрактилния ростелум“, куките са с насочени постериорно остриета при неговото прибиране в ростелумното влагалище (Фиг. 2b). Тези два вида въоръжени ростелумни апарати съответстват на "тип А" и "тип С", според описанието на Vaucher (1971), който обяснява техните морфологични и функционални различия въз основа на проучване на хистологични прерези от чревни стени със сколекси, прикрепени *in situ*. В нашето филогенетично дърво (Фиг. 1), ретрактилният тип ростелум е характерен за таксоните, принадлежащи към кладовете на *Rodentolepis* и *Hymenolepis*, докато инвагинабилният тип ростелум се среща само в клада на *Arostrilepis* (Фиг. 3).

В допълнение към гореспоменатите особености на ростелумния апарат, установихме и други морфологични характеристики, които също подкрепят кладовете, разкрити в този анализ. В клада на *Ditestolepis* всички представители се характеризират със серийно (групово) развитие на стробилата, при което в нея се наблюдават серии (или групи) от проглотици на еднакъв етап от своето развитие. Този признак, обаче, е проява на хомоплазия, тъй като подобно развитие на стробилата се наблюдава и в род *Neoskrjabinolepis* от клада на *Arostrilepis* (Корниенко и др., 2006, Kornienko et al., 2008). Преобладаващата част от хименолепидидите от бозайници се характеризират с постепенно съзряване на стробилата, при което не се наблюдават такива серии от проглотици, а съзряването протича постепенно, с всеки следващ проглотид (Фиг. 3).

Подкладът, състоящ се от родовете *Nomadolepis* Makarikov, Gulyaev & Krivopalov, 2010 и *Pararodentolepis* Makarikov & Gulyaev, 2009 (в рамките на клада на *Rodentolepis*) се характеризират с фратерноидна форма на ростелумните куки, медианно разположен вителариум, двуделна матка, която не се простира извън рамките на осморегулаторните канали, а също и ембриофори с полярни филаменти (Макариков и

Гуляев, 2009; Макариков и др., 2010; Makarikov et al., 2015; Greiman & Tkach, 2012). Някои от тези белези съвпадат добре с предварителните данни за морфологията на *Staphylocystis tiara* – вид, попадащ при нашия анализ в този клад и отдалечен от видовете от същия род. Това демонстрира необходимостта от преописание на гореспоменатия вид и неговата възможна принадлежност към друг род от същия клад, вероятно към род *Pararodentolepis*.

Останалите видове от род *Staphylocystis* се групират в два клада – един, който се състои от видове, паразитиращи по земеровки от подсемейство Soricinae, а другият – от видове, паразитиращи в представители от подсемейство Crocidurinae (Фиг. 1 на Публикация 1). Тези два клада също са подкрепени от специфични морфологични особености на техните ростелумни куки – куките са фратерноидни при първия и крицетоидни при втория клад. Необходими са допълнителни морфологични изследвания, за да се потвърди необходимостта от обособяването на нов род на базата на някоя от тези две групи.

Подкладът, състоящ се от родове *Neoskrjabinoilepis* и *Lineolepis* (в рамките на клада на *Arostrilepis*), морфологично се отличава с наличие на еднакъв брой куки (10) и трансформацията на гравидните проглотици в оофори, отговарящи за груповото разпространение на яйцата (Kornienko et al., 2008; Korneva & Kornienko, 2013).

Подклад, състоящ се от родовете *Arostrilepis*, *Soricinia* и *Pseudobothrialepis* (принадлежащи към клада на *Arostrilepis*), в допълнение към цялостната редукция на ростелумния апарат, също така се отличава с наличие на удължени вретеновидни ембриофори с полярни израстъци, описани от Карпенко и Гуляев (1990), Makarikov et al. (2011) и Binkienė et al. (2015).

Настоящия анализ на основата на молекулярни данни поставя видовете от род *Staphylocystoides* в три подклада, потвърждавайки полифилията на рода. Морфологично, полифилията е потвърдена от няколко белега. Типовият вид *S. sphenomorphus* (Locker & Rausch, 1952), заедно с *S. oligospinosus* Tkach, Kinsella & Greiman, 2018 и *S. parasphenomorphus* Tkach, Kinsella & Greiman, 2018, формират добре подкрепена монофилетична група. Тези неарктични видове се характеризират с тънки, по-удължени стробили (Tkach et al., 2018). Типовият вид има ростелумни куки, образуващи сигмоидна кривина в дорзо-вентралната равнина (Гуляев и др., 2007); този белег обаче не се споменава в описанието на двата наскоро описани вида (Tkach et al., 2018). За разлика от тази група, останалите два неарктични вида, включени в нашия анализ – *S. parvissima* (Voge, 1953) и *S. gulyaevi* Greiman, Tkach & Cook, 2013 – се характеризират с много къса стробила, с малко на брой проглотици, а формата на куките, както е представена от Greiman et al. (2013) е по-скоро крицетоидна, отколкото фратерноидна, като по този начин се различава значително от формата на куките в другия неарктичен подклад. Палеарктичният вид *S. stefanskii* (Zarnowski, 1954) също се характеризира с ростелумни куки със сигмоидна конфигурация в дорзо-вентралната плоскост (Гуляев и др. 2007); освен това, притежава медиално разположен вителариум за разлика от неарктичните видове, които имат вителариум, разположен антипорално, на нивото между антипоралния тестис и медиалния тестис. По този начин нашите резултати свидетелстват за хетерогенността на род *Staphylocystoides* в неговата съвременна таксономична концепция (Czapinski & Vaucher 1994; Гуляев и др., 2007; Greiman et al. 2013; Tkach et al. 2018) и доказват необходимостта от цялостна таксономична ревизия на рода на базата на допълнителни морфологични и молекулярни данни.

Нашият анализ демонстрира, че два признака, които са били считани за важни от таксономична гледна точка, са всъщност хомоплазни. Първият е наличието на полярни израстъци (филаменти) на ембриофората. Този признак се среща при видове в два подклада на клада на *Rodentolepis*, видовете в подклада *Pararodentolepis*–*Nomadolepis* (Макариков и Гуляев, 2009; Greiman & Tkach, 2012; Makarikov et al., 2015) и при *Rodentolepis microstoma* (виж Cunningham & Olson, 2010), разположен в другия основен подклад на същия клад (Фиг. 1 на Публикация 1).

Зрялата матка е ограничена напълно в средното поле на гравидния проглотид при всички представители на клада на *Ditestolepis* (Гуляев, 1991; Гуляев и др., 2004; Kornienko и Binkienė, 2014), подклада на *Pararodentolepis* – *Nomadolepis* (Макариков & Гуляев, 2009; Makarikov et al., 2015) и подклада на *Armadolepis* (Makarikov, 2017; Makarikov et al., 2018) от клада на *Rodentolepis*, както и в подклада на *Lineolepis*–*Neoskrjabinolepis* (Kornienko et al., 2008; Korneva & Kornienko, 2014) от клада на *Arostrilepis*. Тъй като тези белези са често игнорирани в предишните таксономични описания, необходими са по-подробни морфологични изследвания, за да се установи по-ясно възможният независим произход на тези структури в различните групи. Разпределението на видовете, признати в момента като принадлежащи към род *Rodentolepis*, в четири отделни монофилетични групи (кладове и подкладове) свидетелства за изкуствения характер на обособяване на този род и изисква задълбочено морфологично и таксономично проучване с евентуални предложения за обосноваване на нови родове.

5.6 Изводи

На основата на проведените изследвания могат да се направят следните по-важни изводи:

1. Филогенетичната хипотеза, основана на 28S рДНК на 56 вида от семейство Hymenolepididae, потвърждава наличието на 4 основни монофилетични групи сред хименолепидидите от бозайници, разкрити от Haukisalmi et al. (2010) на основата на анализ на същия ген от 31 вида. Тези монофилетични групи са обозначени като клад на *Ditestolepis*, клад на *Hymenolepis*, клад на *Rodentolepis* и клад на *Arostrilepis*.
2. Нови елементи на филогенетичната хипотеза на основата на 28S рДНК са: ниска степен на поддръжка на базалната позиция на клада на *Ditestolepis* спрямо останалите три клада; по-слаба поддръжка на клада на *Arostrilepis*; монофилия на род *Coronacanthus*; полифилия на родовете *Staphylocystis* и *Staphylocystoides*; монофилия на род *Hymenolepis*; монофилия на групата видове, паразитиращи по сънливци (Gliridae); положението на родовете *Pararodentolepis* и *Nomadolepis* като сестрински групи; полифилия на *Rodentolepis*; положението на *Neoskrjabinolepis* и *Lineolepis* като сестрински таксони; близки филогенетични връзки между родовете с пълна редукция на ростелумния апарат.
3. Филогенетичните анализи, основани на 18S рДНК и *cox1*, а също и комбинираният анализ (28S рДНК, 18S рДНК и *cox1*), подкрепят наличието на четирите основни клада, разкрити чрез анализа на 28S рДНК, но не осигуряват допълнителна разрешителна способност за изясняване на филогенетичните връзки между тях.
4. От четирите основни филетични групи, единствено кладът на *Ditestolepis* е изцяло свързан със семейство Soricidae. Всеки от останалите три клада включва паразити на два или повече разряда бозайници: клад на *Arostrilepis* – гризачи и земеровки; клад на *Hymenolepis* – паразити на гризачи, примати и таралежи;

- клад на *Rodentolepis* – паразити на гризачи, ръкокрили и земеровки. Това насочва към възможна водеща роля на еволюционни епизоди на колонизиране на нови групи гостоприемници, включително между различни разреди бозайници.
5. Разкрити са няколко линии паразити, които са в близка асоциация с определени групи гостоприемници; тяхното съвременно разнообразие най-вероятно отразява гостоприемниково-паразитна коеволуция или процеси на колонизиране в рамките на една група гостоприемници. Примери за такива групи паразити в нашите анализи са кладът на *Ditestolepis* (тясно асоцииран със *Soricidae*); подкладът на цестодите с изцяло редуциран ростелумен апарат (*Soricinia* и *Pseudobothrialepis*) – паразити на земеровки; род *Coronacanthus* – паразити на водни земеровки от род *Neomys*; род *Armadolepis*, диверсифицирал в рамките на гризачите от семейство *Gliridae*.
 6. Получените данни показват сложна еволюционна история на паразит-гостоприемниковите асоциации на хименолепидидите и техните гостоприемници – бозайници, в която важно значение могат да имат както процесите на съвместно видообразуване, така и колонизирането на гостоприемници от паразити, които са еволюирали по-рано в друга група гостоприемници.
 7. Два от нашите анализи (18S рДНК и *cox1*) показват, че базалните взаимоотношения на четирите обособени клада остават неразрешени – тези кладове водят началото си от обща политомиа, в която участват и няколко таксона хименолепидидни цестоди, паразитиращи по птици. Такава топология на кладограмата би могла да се интерпретира като проява на бърза диверсификация на хименолепидидите, съпроводена от множество епизоди на колонизация на бозайници от паразити, първоначално еволюирали в птици. Поради тази причина по-нататъшното изследване на произхода и еволюцията на бозайниковите хименолепидиди би трябвало да се основава на анализи, в които да се включат и представители на основните филетични линии хименолепидиди, паразитиращи по птици.
 8. Разпределението на таксономичната принадлежност на междинните гостоприемници върху дендрограмите, получени в при настоящото изследване, не показва наличие на закономерност. Установените монофилетични групи цестоди не са свързани с адаптиране към определени междинни гостоприемници.
 9. Повечето от жизнените цикли на изследваните цестоди от насекомоядни бозайници са свързани с наземни местообитания, като само родовете *Vaucherilepis* и *Coronacanthus* (паразити на *Neomys*) използват амфиподи като междинни гостоприемници. Разположението им между паразити с наземен жизнен цикъл предполага вторично колонизиране на водна среда от паразитиращите в *Neomys* цестоди, което е в съответствие с хипотезата за вторична адаптация на земеровки от трибус *Nectogalini* към водна среда.
 10. Съпоставянето на морфологичните особености на изследваните видове и разкритите филогенетични връзки между тях потвърждава, че редукция на ростелумния апарат е възникнала независимо във всички основни филетични линии хименолепидиди на бозайници. Хомоплазия е установена също и по отношение на съзряването на стробилата (серийна или последователна), наличието на филаменти на ембриофорите и разположението на матката изцяло в средното поле или в средното поле и страничните полета на проглотида.

5.7 Приноси

В резултат на проведените изследвания могат да се формулират следните по-важни научни приноси:

1. На базата на секвенционен анализ на 18S рДНК, 28S рДНК и *cox1* генни региони са получени 36 генетични секвенции от 12 вида хименолепидидни цестоди, паразитиращи по насекомоядните бозайници от семейство Soricidae.
2. За 7 вида (*C. integrus*, *C. magnihamatus*, *C. omissus*, *C. vassilevi*, *V. trichophorus*, *S. tiara* и *S. uncinata*), публикуваните от нас данни за 28S рДНК представляват първите секвенционни данни за съответния вид.
3. За 11 вида (*C. integrus*, *C. magnihamatus*, *C. omissus*, *C. vassilevi*, *D. diaphana*, *L. scutigera*, *Neoskrjabinolepis* sp., *S. tiara*, *S. uncinata*, *S. ovaluteri* и *V. trichophorus*) са получени за първи път секвенционни данни за 18S рДНК генен регион.
4. За 12 вида (*D. diaphana*, *C. integrus*, *C. magnihamatus*, *C. omissus*, *C. vassilevi*, *L. scutigera*, *Neoskrjabinolepis* sp., *S. ovaluteri*, *S. tiara*, *S. furcata*, *S. uncinata* и *V. trichophorus*) са получени за първи път секвенционни данни за гена *cox1*.
5. Разработена е филогенетична хипотеза за взаимоотношенията между хименолепидидите от бозайници на основата на фрагмент от 28S рДНК генния регион, основана на данни за 56 вида, в това число и 12 вида, секвенирани в хода на това изследване. Единственият предходен анализ включва данни за 31 вида.
6. За първи път са разработени филогенетични хипотези за хименолепидиди на бозайници, основани на секвенционен анализ на фрагменти от 18S ДНК и *cox1*.
7. За първи път е разработена филогенетична хипотеза за хименолепидидите от насекомоядни бозайници, основана на комбиниран анализ на три генни региона (18S рДНК, 28S рДНК и *cox1*). Тя потвърждава наличието на 4 основни монофилетични групи (клад на *Ditestolepis*, клад на *Hymenolepis*, клад на *Arostrilepis* и клад на *Rodentolepis*) сред хименолепидидите на бозайниците, които са разкрити по-рано (Haukisalmi et al. 2010) на основата на анализ на по-малък брой таксони и само на един генен участък (28S рДНК).
8. В светлината на разработените филогенетични отношения са анализирани морфологични белези (ростелумен апарат, характер на съзряване на стробилата, филаменти на ембриофората, разположение на матката), като установените хомоплазии насочват към повишено внимание при използване на тези белези като основа на таксономични решения.

SUMMARY

Evolutionary processes in the formation of the diversity of hymenolepidid cestodes parasitizing on insectivore mammals of the family Soricidae

Shrews were collected by trapping in several localities in Bulgaria. After parasitological autopsy adult hymenolepidid cestodes were isolated from the shrew intestines. Each cestode included in the analysis was divided into two parts. The anterior part was stained and mounted in Canada balsam. The posterior parts of the specimens included in the analysis were used as tissue samples for DNA extraction. PCR reactions were carried out resulting in the amplification of several fragments from the nuclear genes for 28S and 18S rRNA and the mitochondrial gene *cox1*. The obtained fragments were sequenced and later used for phylogenetic reconstruction using also data published by previous researchers. Phylogenetic analyses were performed for each of the three gene fragments and also a combined analyses with all the data was done.

The general configuration of 28S phylogenetic tree is similar to the previous phylogenetic hypothesis for relationships among hymenolepidids from mammals. However, our study includes 56 taxa of the family Hymenolepididae (versus 31 taxa in the only previously published major analysis of the group). Our analysis confirmed the existence of 4 major monophyletic clades of mammalian hymenolepid cestodes (“*Ditestolepis* clade”, “*Hymenolepis* clade”, “*Arostrilepis* clade” and *Rodentolepis* clade). The *Ditestolepis* clade position was revealed as basal to the other three clades, however the support for this topology was weak. The data confirmed the monophyly of several hymenolepidid genera, like *Hymenolepis* and *Coronacanthus* and also the monophyly of the hymenolepidids from glirid rodents. This study also revealed the non-monophyletic status of several other genera like *Staphylocystis* and *Staphylocystoides*. Close phylogenetic relationships among other groups was also demonstrated – e.g. between the hymenolepidids with unarmed rostellum – the genera *Arostrilepis*, *Soricinia* and *Pseudobothrialepis*; also the position as sister taxa of *Pararodentolepis* and *Nomadolepis*.

Mapping of morphological and anatomical characters to the phylogenetic analysis revealed that several characters, considered important from taxonomic point of view are homoplasious, since they occur in distant groups – the type of strobilar maturation, the general reduction of rostellar apparatus (although the cestodes with full reduction of the rostellum are closely related), presence of polar filaments in the embryophore.

From the four main phyletic groups of mammalian hymenolepidids, only the *Ditestolepis* clade is closely associated with insectivore mammals of the family Soricidae. All of the other three clades are associated with definitive hosts of two or more mammalian orders. There is no strong association between the studied cestode clades and their intermediate hosts.

The analyses of the 18S rRNA and *cox1* genes as well as the combined analysis confirm the validity of the four main mammalian hymenolepidid clades but the basal relationship among them remains unresolved.

Revealed data demonstrates that in the formation of the diversity of the mammalian hymenolepidid species both the processes of colonization of new hosts and coevolution have played an important role.