

БЪЛГАРСКА АКАДЕМИЯ НА НАУКИТЕ
ИНСТИТУТ ПО БИОРАЗНООБРАЗИЕ И ЕКОСИСТЕМНИ ИЗСЛЕДВАНИЯ

Костадин Иванов Андонов

**ФЕРОМОННА КОМУНИКАЦИЯ, ФУНКЦИОНАЛНА
МОРФОЛОГИЯ НА ПОЛОВИТЕ ОРГАНИ И БРАЧНО ПОВЕДЕНИЕ
ПРИ ЗМИИТЕ ОТ СЕМЕЙСТВО VIPERIDAE В БЪЛГАРИЯ**

АТОРЕФЕРАТ

за придобиване на научна и образователна степен “доктор”

Докторска програма “Екология и опазване на екосистемите”

Научен ръководител: проф. д-р Борислав Наумов

София, септември 2025 г.

Състав на научното жури:

Вътрешни членове:

1. проф. дбн Бойко Божидаров Георгиев, ИБЕИ-БАН
2. доц. д-р Ценка Георгиева Часовникарова, ИБЕИ-БАН

Външни членове:

3. проф. д-р Николай Добринов Начев, Шуменски университет (ШУ) „Епископ Константин Преславски“
4. доц. д-р Теодора Веселинова Цветкова, ШУ „Епископ Константин Преславски“
5. доц. д-р Ивелин Алдинов Моллов, Биологически факултет, Пловдивски университет „Паисий Хилендарски“

Резервни членове:

1. доц. д-р Михаела Николова Недялкова, ИБЕИ-БАН – вътрешен член
2. проф. д-р Павел Енчев Стоев, Национален природонаучен музей, БАН – външен член

Технически секретар на Научното жури: биолог Невена Илиева Пеева, ИБЕИ-БАН.

Дата и място на защитата:

1. Увод

Много видове от семейство Viperidae са обект на интензивни изследвания в различни аспекти. Въпреки това, твърде малко се знае за редица особености, свързани с размножаването им, например за феромонната комуникация и връзката ѝ с брачното поведение. Оскъдна е информацията и за еволюцията и функционалността на отделните структури при мъжките и женските гениталии. Изследвания върху феромоните на змиите в България досега не са правени, а малкото подобни проучвания в Европа засягат само видове от род *Vipera* Laurenti, 1768, поради което (с оглед възможността за сравнения) за обект на настоящата работа са избрани българските представители на същия род – *Vipera ammodytes* (Linnaeus, 1758) и *Vipera berus* (Linnaeus, 1758).

Изследванията върху химичната комуникация при змиите са географски ограничени – повечето данни идват от Северна Америка и са концентрирани върху представители на род *Thamnophis* Fitzinger, 1843, докато за Стария свят информацията е оскъдна. За европейските видове от род *Vipera* има данни за брачно поведение и вътревидова комуникация, но не и за конкретни химични съставки на феромонните комплекси. Тези видове се отличават със специфично поведение по време на размножителния период, включващо съперничество между мъжките и последващо ухажване на женските. Подобни поведенчески модели се различават съществено от описаните при северноамериканския вид *Thamnophis sirtalis* (Linnaeus, 1758), при който се наблюдават размножителни струпвания („mating balls“) и дори специфични стратегии като т.нар. „she-males“.

Връзката между химичната комуникация, брачното поведение и морфологията на половите органи при змиите остава слабо проучена. Особеностите в структурата на хемипенисите предполагат различни еволюционни стратегии за репродуктивен успех, което прави интегрирания подход – съчетаващ поведенчески, биохимични и морфологични изследвания – особено ценен.

2. Литературен обзор

2.1. Изследвани видове

Семейство Viperidae включва 405 вида, разпространени в Европа, Азия, Африка, Северна и Южна Америка (Uetz et al., 2025). Изследваните видове (Фигура 1), пепелянката (*Vipera ammodytes*) и усойницата (*Vipera berus*), са единствените представители на семейство Viperidae, които понастоящем се срещат на територията на България (Stojanov et al, 2011). И двата вида проявяват специфично и сравнително сложно брачно поведение (Shine, 1978), което ги прави интересни обекти за изследване на химичната комуникация и функционалната морфология на половите органи.



Фигура 1. *Vipera ammodytes* – ляво; *Vipera berus* - дясно (снимки: Ангел Дюгмеджиев)

2.2. Морфология на половите органи

Копулаторните органи на животните са обект на изследване от дълги години. Фокусът традиционно пада върху морфологията на тези органи, докато въпросът за механизмите на тяхната еволюция остава дискуссионен още от пионерното изследване на Dufour (1844), който въвежда термина за т.нар. „механизъм ключ-ключалка“ (lock-and-key). Повечето изследвания на гениталиите са съсредоточени върху мъжките такива и е установено, че тяхната еволюция представлява сложен процес, който все още не е еднозначно интерпретиран, макар да е сред централните теми в еволюционната биология през последните десетилетия (Langerhans et al., 2016). В процеса на развиване на научните изследвания по въпроса се предлагат различни хипотези, според които еволюцията на гениталиите би могла да е резултат от плейотропия, експресия на т.нар.

Нох-гени, естествен подбор, полов подбор и дори социален подбор (Darwin, 1871; Mayr, 1963; Thornhill, 1983, 1984; Eberhard, 1985; East et al., 1993; Hosken and Stockley, 2004; Cohn, 2011; Gredler et al., 2014). В рамките на хипотезата за половия подбор могат да се разграничат различни механизми, включително полов конфликт, криптичен избор на женската, избор на партньор от страна на женските и конкуренция между мъжките (Brennan and Prum, 2015), които имат своите ограничения, но и не са задължително взаимноизключващи се (Langerhans et al., 2016). Важно е да се отбележи обаче, че по-голямата част от изследванията досега са концентрирани почти изцяло върху мъжките копулаторни органи, докато женските гениталии остават значително по-слабо проучени (Ah-King et al., 2014).

Изследванията на гениталиите при змиите също поставят основен акцент над мъжките. Морфологията на мъжките копулаторни органи при змиите (хемипенис) е обект на научен интерес почти от 130 години, още с фундаменталното изследване на Cope (1895), включващо подробни *in situ* описания на хемипенисите на 234 вида. Мъжките змии притежават хемипениси, разположени в основата на опашката, разнообразни по форма и орнаментирани с разнообразни структури, като калциеви шипове, различни издувания и други (Cope, 1895; Dowling and Savage, 1960). При копулация или в някои случаи като защитен механизъм, хемипенисите се напълват с кръв и съответно се издават навън, обръщайки се и еректирайки (Cope, 1895; Dowling and Savage, 1960). Общата морфология на хемипенисите се счита за видовоспецифична (Dowling and Savage, 1960; Keogh, 1999; Zaher, 1999), макар че има документиран и вътревидови вариации (Bernardo et al., 2012; Inger and Marx, 1962; Klaczko et al., 2014; Myers, 1974; Zaher, 1999; Zaher and Prudente, 1999). С изключение на няколко случая (Bernardo et al., 2012; Zaher and Prudente, 1999), тези вариации не засягат общата форма и орнаментацията копулаторните органи, а по-скоро детайлни характеристики на хемипенисната морфология. Механизмите, които имат ключова роля за еволюцията на морфологията на мъжките копулаторни органи при змиите, все още не са напълно изяснени, въпреки наличието на задълбочени проучвания по темата (Hollis, 2006; Jadin et al., 2010; Jenner and Dowling, 1985; King et al., 2009; Malhotra and Thorpe, 2004; Utiger et al., 2002; Myers and McDowell, 2014).

Женският репродуктивен тракт при змиите се състои от два яйцепровода (включващи вагинална торбичка („vaginal pouch“ или само “pouch”), нежлезиста маточна част, жлезиста маточна част, заден инфундибулум и преден инфундибулум) и два яйчника, като съхранението на сперматозоиди се осъществява основно в нежлезиста маточна част на яйцепровода и задния инфундибулум (Siegel et al., 2012; Jurkfitz et al., 2023). Яйцепроводите са обвити от тънък висцерален плевроперитонеум и са закрепени в целомната кухина посредством дорзалния мезентерий. Нежлезистата маточна част се характеризира с тънка *lamina propria* и е покрита от епител, съставен предимно от ресничести клетки (Siegel et al., 2011). От макроскопска гледна точка клоаката може да бъде разделена на три или четири ясно различими региона, които могат да варират при видовете: проктодеум, уродеум, предно разширение на уродеума (което липсва при някои видове) и копродеален комплекс, състоящ се от две части (Siegel et al., 2011, 2012).

Макар изследванията върху мъжките гениталии да преобладават, през последното столетие са публикувани и някои изследвания върху женските (напр. Pope, 1941; Edgren, 1953; Inger and Marx, 1962; Gabe and Saint-Girons, 1965; Pisani, 1976; Siegel et al., 2011, 2012; Showalter et al., 2014; Granados et al., 2022). Въпреки това, едва малко на брой проучвания разглеждат потенциалното съответствие между хемипениса и т.нар. вагинална торбичка (Pope, 1941; Inger and Marx, 1962; Granados et al., 2022).

В литературата женските гениталии при змиите обикновено се описват *in situ* след дисекция, с малко изключения (напр. Granados et al., 2022). За разлика от това, мъжките се изследват в обърнато и издуто състояние. Този „двуизмерен“ подход ограничава възможността за анализ на копулаторната съвместимост между половите органи. Използваният от Granados et al. (2022) метод за триизмерна реконструкция предлага ценен модел за бъдещи изследвания, вече прилаган и при други гръбначни като крокодили (Moore et al., 2022) и морски бозайници (Orbach et al., 2018, 2021).

Морфологията на половите органи при змиите поражда въпроси за ролята им в размножителното поведение и еволюционните стратегии. Според Andonov et al. (2017) различията в орнаментацията на хемипениса може да отразяват алтернативни механизми за репродуктивен успех, което подчертава значението на поведенческите и биохимични изследвания наред с морфологичните.

2.3. Биохимична комуникация и брачно поведение

2.3.1. Кожни секрети при змиите

Влечугите отделят липиди и мастноразтворими вещества в епидермиса, както директно от кожните клетки, така и чрез специализирани за целта жлези (Mason et al., 1989; Mason and Parker, 2010; Vitt and Caldwell, 2013; Martín et al., 2014; Mayerl et al., 2015; Baedke et al., 2019). Отделените кожни липиди и други мастноразтворими вещества изпълняват разнообразни функции, включително регулиране на водопрпускливостта, антибактериална функция, комуникация и разпознаване, както в рамките на вида, така и между различни видове (Burken et al., 1985; Mason et al., 1989; Tu et al., 2002; Mason and Parker, 2010; Torri et al., 2014, Oh et al., 2015; Medeiros dos Reis et al., 2019; Van Moorlegghem et al., 2020).

Водопрпускливостта на кожата при влечугите, включително змиите, има ключово значение за еволюцията на сухоземния живот (Martín et al., 2014; Mayerl et al., 2015). По аналогичен начин восъчните естери регулират водопрпускливостта при безгъбначните животни (Patel et al., 2001). Ключова особеност на тяхната кожа е наличието не само на еластичния α -кератин, присъщ на другите гърбначни животни, но и на твърдия и крехък β -кератин (Vitt and Caldwell, 2013). В епидермиса на влечугите се откриват липиди, сред които особено често холестерол и негови производни, които заедно с кератиновите люспи и специфични кожни адаптации имат важна роля в ограничаването на дехидратацията (Ahern and Downing, 1974; Burken et al., 1985; Mason et al., 1987; Weldon et al., 2008). Част от веществата в кожните секрети участват в химичната комуникация на междувидово и вътревидово ниво, функционирайки като химически сигнали (Mason et al., 1987, 1989).

2.3.2. Химична комуникация

Химичната комуникация е широко разпространено явление при змиите, като много видове разчитат на химически сигнали (semiochemicals) за вътревидови и междувидови взаимодействия, включително хранене, избягване на хищници, размножаване и др. (Bogert, 1941; Kubie et al., 1978; Mason et al., 1989, 1990; Ford, 1986, Ford and Burghardt, 1993; Greene et al., 2001; LeMaster et al., 2001; Mason and Parker, 2010). Поради липсата на крайници змиите имат известни ограничения във визуалното възприятие (Walls, 1942). Въпреки че при някои видове, като *Pantherophis vulpinus* (Baird & Girard, 1853), зрението може да има преимуществена роля спрямо химичната рецепция при хранене и други

дейности (Saviola et al., 2012), повечето змии в голяма степен разчитат на химични сигнали за комуникация (Mason et al., 1989; Ford and Burghardt, 1993; Mason and Parker, 2010).

Съединенията, участващи в химичната комуникация между индивидите, се наричат химични стимули (semiochemicals) и се класифицират според ролята им в комуникацията или според рецептора (Wyatt, 2014). Тези химични стимули, които са се развили като сигнали между индивиди от един и същи вид, се наричат феромони (Butenandt et al., 1959; Wyatt, 2009, 2014). Друг вид сигнализация между индивиди от един и същ вид се осъществява и чрез т. нар. сигнални комплекси от вещества (signature mixtures). Терминът „сигнални комплекси от вещества“ е въведен за такива групи от химични сигнали, които не се използват с цел насочена комуникация (като полово привличане, предупреждение за хищници и т.н.), а просто за разпознаване на индивиди от същия вид (Wyatt, 2010a). Синонимни термини са „мозаични сигнали“ (mosaic signals) (Johnston, 2003, 2005) и „характерна миризма“ (signature odors) (Wyatt, 2005). Такива сигнални комплекси от вещества се използват например от кучетата за индивидуално разпознаване, от мравките за разпознаване на индивиди от своята колония и такива от чужди колонии и т.н. (Wyatt, 2010a). Концепцията за феромон (от гръцки *pherein* – пренасям и *hormōn* - възбудям) е въведена вследствие изследванията на Butenandt et al. (1959) и Karlson and Lüscher (1959) и е базирана на първия регистриран феромон, бомбикол, който е половият феромон при копринената пеперуда *Bombyx mori* Linnaeus, 1758.

Веществата, които служат за междувидова комуникация (т. нар. allelochemicals), обикновено се разделят спрямо спецификата на подателя и получателя на сигналите и съответно положителния и отрицателния ефект за всеки от тях (Nordlund and Lewis, 1976; Wyatt 2010b). Към тези allelochemicals спадат аломоните (allomones) – полза за подателя на съответния сигнал, кайромоните (kairomones) – отличават се с полза за получателя на сигнала и синомоните (synomones) – имат положителен ефект както върху подателя, така и върху получателя (de Brito-Sanchez et al., 2008).

Химичните сигнали при змиите са част от липидния комплекс в кожните им секрети (Garstka and Crews, 1981; Mason et al., 1989), като феромоните обикновено се смятат за смесица от тежки, слабо летливи, дълговерижни наситени или мононенаситени кетони (Mason et al., 1987, 1989). Въпреки това, някои проучвания показват, че има и летливи

вещества, които вероятно играят значима роля в междуполовата комуникация (Aldridge et al., 2005; Shine and Mason, 2011; Jellen et al., 2022). Например, при *Thamnophis sirtalis parietalis* феромоните на женските са описани като комплекс от 17 наситени и ненаситени метилкетони (C29–C37), които служат за привличане на мъжки (Mason et al., 1989). Според Mason et al. (1990) ненаситените кетони са по-атраaktivни от наситените. Интересен е и фактът, че някои мъжки синтезират феромони, подобни на тези на женските, което им осигурява предимство в шансовете за копулация, тъй като по този начин те подвеждат конкурентите си, които започват да се „бият“ за тях и по този начин губят ценна енергия (Shine et al., 2000). Освен това LeMaster and Mason (2002) отбелязват, че по-едрите женски отделят по-големи количества ненаситени кетони, което повишава тяхната атраktivност. При други видове обаче, например *Boiga irregularis*, не са открити метилкетони, като се предполага, че феромоните при този вид се състоят от друг тип съединения (Greene and Mason, 1998). Има също така и сведения за видове, при които в състава на феромонния комплекс вероятно се включват и летливи съединения (Aldridge et al., 2005; Shine and Mason 2011; Jellen et al., 2022). С малки изключения, повечето изследвания върху химичната комуникация и феромонната активност при змиите са концентрирани върху род *Thamnophis* (Mason et al., 1989, 1990; Shine and Mason, 2011).

Въпреки че химичното възприятие е едно от водещите сетива при змиите, тази област остава сравнително слабо проучена. Съществуват редица изследвания върху влечуги и по-конкретно върху змии (напр. Mason et al., 1989; Baeckens et al., 2017a; 2017b; Van Moorleghe et al., 2020 и др.), но техният брой е несъизмеримо малък в сравнение с проучванията при насекоми или дори бозайници (Symonds and Elgar, 2008). Това се дължи както на скрития начин на живот на змиите и трудното намиране на достатъчен брой индивиди от някои видове, така и на трудностите и високата цена при извличането и анализа на кожните им секрети. Допълнителна пречка са и юридическите ограничения, свързани със събирането на екземпляри, особено на голям брой индивиди от локална популация. В резултат на това има много пропуски в проучването на биохимичната комуникация на змиите, макар да се наблюдава нарастващ научен интерес към тази тематика (Mason and Parker, 2010).

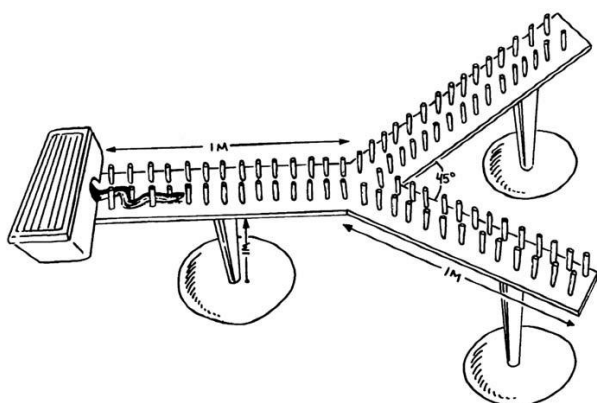
Изследванията върху химичната комуникация при змиите са географски ограничени, като почти липсват данни за видове от Стария свят, а повечето публикации са съсредоточени върху видове от Новия свят (напр. Ahern and Dowling 1974; Mason et al. 1989, 1990; Murata et al. 1991; Shine and Mason 2011). Въпреки това, макар и да не

разглеждат точно конкретната идентификация на половите феромони, в Европа има проучвания върху вътревидовата комуникация и поведение при представители на род *Vipera* (Andrén 1986; Andrén and Nilson 1983; Shine 1978).

2.3.3. Брачно поведение

През годините са провеждани разнообразни поведенчески експерименти за изследване на химичната комуникация при различни видове змии. В зависимост от целите и хипотезите, изследванията включват експерименти с проследяване на химична следа (напр. Ford and Low 1983; Greene et al. 2001; LeMaster and Mason 2001), анализ на честотата на езиковите докосвания или наблюдение на брачното поведение в терариуми (Mason et al. 1990; Greene and Mason 1998).

Изследванията на феромонни и други химични сигнали при змии най-често се основават на т.нар. експерименти с проследяване на химична следа (*trailing experiments*) (Mason and Parker, 2011). При тях се наблюдава реакцията на индивидите към химични следи, за



Фигура 2 Отворен Y-образен лабиринт за поведенчески експерименти. Изображението е използвано от LeMaster, M. P. and Mason, R. T. 2001. *Chemoecology* 11: 149-152, Fig. 1.

да се определи дали съединенията действат като атрактанти, репеленти или неутрални стимули. Този подход се използва широко за установяване на полови феромони (напр. Noble, 1937; Ford, 1986; Greene et al., 2001) чрез Y-образни лабиринти или открити конструкции (Фигура 2) (Ford and Low, 1984; LeMaster and Mason, 2001), както и върху плоски площадки с подменяема повърхност (Noble, 1937). В някои случаи реакциите

се проследяват и в естествени условия (LeMaster et al., 2001). Провеждани са и изследвания, при които реакцията към изолирани химични съединения се проследява пряко в естествени условия (LeMaster et al., 2001). Публикувани са и редица радиотелеметрични или директни наблюдения, документиращи мъжки индивиди, които проследяват химични следи, оставени от женски (Andrén and Nilson, 1983; Duvall et al., 1985; Andrén, 1986; Slip and Shine 1988; Cardwell 2008).

В много проучвания на биохимична комуникация при влечуги, съответно и при змии, се наблюдава и записва честотата и/или броя на изплезвания на езика (*tongue-flick rate* и

tongue-flicks) на изследвания индивид за да се оцени интересът към химични сигнали, вкл. предполагаеми феромони (Cooper, 1998). Методът е предпочитан, тъй като е бърз, евтин и дава добри резултати. Съответното химично вещество се нанася върху памучен тампон, който след това се поднася на животното, а броят на изплезванията се отчита за единица време. Трябва да се има предвид, че този метод може да доведе до двусмислени резултати ако не бъдат използвани подходящи контроли, както и ако не бъде избегнато човешкото присъствие по време на експериментите (Mason and Parker, 2011). Освен това, честотата на изплезванията сама по себе си показва единствено дали животното проявява по-голям интерес към даден стимул спрямо други, което често налага необходимостта от допълнителни поведенчески опити (Mason and Parker, 2011).

Описани са три основни типа изплезвания („tongue-flicks“) в зависимост от движението на езика – прости вертикални (надолу) разтягания, единични изплезвания и многократни изплезвания, които могат да имат различен контекст и да се използват в различни ситуации като проследяване, хранене, разпознаване на себеподобни и др. (Gove, 1979; Gove & Burghardt, 1983). Приема се, че многократните изплезвания се появяват в отговор на летливи химични сигнали, докато вертикалните разтягания са по-чести при наличие на нелетливи такива (Daghfous et al., 2012). Освен това различните типове движения на езика могат да имат различен смисъл в различни ситуации (Gove, 1979; Gove & Burghardt, 1983). Бързите движения с къси разтягания се наблюдават главно при проследяване и хранене, т.е. когато концентрацията на стимули е висока, докато бавните движения с максимални разтягания се наблюдават при среща с непознат индивид от същия вид или при наличие на потенциална заплаха. По-бавни движения обхващащи по-голяма площ или единични изплезвания могат да служат и като защитен механизъм (Gove, 1979).

Макар данните за брачното поведение и химичната комуникация при змиите да са ограничени, за европейските видове от род *Vipera* са провеждани изследвания, без обаче да се идентифицират конкретни феромонни вещества. Тези видове се отличават със специфично брачно поведение, при което активността е предимно от страна на мъжките (Andrén, 1986; Andrén and Nilson, 1983). Преди ухажването често се наблюдават „ритуални битки“ между съперници, включващи изправяне, преплитане и натиск на телата, докато единият успее да притисне главата на другия към земята. Победителят пристъпва към ухажване чрез езикови докосвания, движения на главата и триене на

брадичката по тялото на женската. И при двата пола се наблюдават характерни вибрации на опашката (Andrén, 1986; Andrén and Nilson, 1983; Shine, 1978).

Брачното поведение на европейските представители на род *Vipera* се различава коренно от това на най-силно проучения вид по отношение на химична комуникация, а именно *T. sirtalis*, при които се наблюдават т. нар. размножителни струпвания (mating balls) (Mason et al., 1989, 1990). Скоро след хибернация женските започват да отделят феромони, които привличат десетки, понякога стотици мъжки, които се струпват върху и около тях, с цел да избутат останалите мъжки и да копулират успешно с женската (Mason et al., 1989, 1990). Интересно е, че някои мъжки имат специфична адаптация, с която печелят предимство при копулацията, а именно – самите те отделят женски феромон, а останалите мъжки се струпват върху тях и се борят, опитвайки се да копулират (Shine et al., 2000, 2001). Такива мъжки се наричат „she-males” в англоезичната литература. По този начин мъжкят „she-male” не хаби енергия, докато другите го правят, така че когато се появи женска, той има предимство пред останалите мъжки.

3. Цел и задачи

Основната цел на настоящата работа е установяване на химичния състав на кожните секрети, детайлната структура на половите органи и характера на брачното поведение при *Vipera ammodytes* и *Vipera berus* в България.

В рамките на проучването бяха заложили следните **задачи**:

1. Събиране (в полеви условия), обработка и химичен анализ на проби от кожни секрети на *V. ammodytes* и *V. berus*.
2. Статистически анализ, базиран на присъствие и относителното количество на установените химични съединения, който би могъл да даде представа за разликите в състава на феромоните между половете (включително по време на отделните фази от годишния жизнен цикъл) при двата вида, както и да покаже неизвестна досега разлика между таксоните с подвидов ранг при *V. ammodytes*.
3. Проучване на морфологията на копулаторните органи на *V. ammodytes* и *V. berus* в сравнителен аспект.

4. Проследяване на поведението на *V. ammodytes* и *V. berus* по време на размножителния им период с акцент върху пряката зависимост от химична стимулация.

4. Материал и методи

4.1. Проучване на кожни секрети и химични сигнали

4.1.1. Полеви дейности

В периода 2019-2022 г. бяха събрани проби от двата целеви вида от цялата страна – 100 индивида *Vipera ammodytes* и 12 индивида *V. berus*. Основният фокус при събиране на проби бе поставен върху няколко работни полигона, с цел осигуряване на по-голяма извадка от конкретни популации за последващи междупопулационни сравнения, а именно: околностите на с. Карлуково, с. Балша, с. Лакатник, Кресненско дефиле и района на Рупите за *V. ammodytes*, и Витоша за *V. berus*. Освен от двата целеви вида, проби от кожни секрети бяха събрани и от още 11 вида змии, както следва: *Natrix natrix* (Linnaeus, 1758) (n = 1), *Natrix tessellata* (Laurenti, 1768) (n = 1), *Dolichophis caspius* (Gmelin, 1789) (n = 8), *Platyceps najadum* (Eichwald, 1831) (n = 3), *Zamenis situla* (Linnaeus, 1758) (n = 2), *Zamenis longissimus* (Laurenti, 1768) (n = 9), *Elaphe quatuorlineata* (Lacépède, 1789) (n = 5), *Coronella austriaca* Laurenti, 1768 (n = 10), *Malpolon insignitus* (Geoffroy Saint-Hilaire, 1827) (n = 7), *Montivipera bornmuelleri* (Werner, 1898) (n = 2) и *Daboia mauritanica* (Gray, 1849) (n = 1). Пробите от кожните секрети на тези 11 вида бяха събирани от съблекла, живи или мъртви екземпляри, произхождащи от различни части на България, с изключение на екземплярите от видовете *M. bornmuelleri* и *D. mauritanica*, които произхождат съответно от Сирия и Мароко. Във всички случаи (както при двата целеви вида, така и при другите 11) проби от кожни секрети бяха събирани само от полово зрели индивиди, тъй като се предполага, че секретите на ювенилни и субадултни се различават от тези на възрастните (Ball, 2004).

В допълнение бяха изследвани и индивиди на *V. ammodytes*, гледани известно време в плен, вкл. през поне един зимен сезон, като някои от тях бяха поставяни в подходящи условия за хибернация (n = 6), а други – не, т.е. оставаха активни през цялата зима (n = 28). За сравнение бяха използвани и индивиди, които са зимували в естествени условия

(n = 18). Пробите от индивидите за тези анализи са събирани през 2019 г. и 2020 г. Пробите от индивидите, които са задържани в плен са използвани само за това конкретно сравнение (хибернирали спрямо нехибернирали), т.е. не са включвани в останалите анализи с цел избягване на възможни отклонения в данните.

4.1.2. Извличане на кожни секрети

Извличането на кожни секрети от змиите беше направено по три начина – от живи индивиди, от съблекла и от мъртви индивиди. И в трите случая беше използвана принципно еднаква методика, но с различно времетраене на пробовземането. Кожните секрети бяха извлечени от живи, мъртви и съблечени индивиди чрез потапяне в *n*-хексан, следвайки утвърдени методики (LeMaster and Mason, 2001; Baedke et al., 2019). При живите змии тялото (без глава и опашка) се потапяше за 1 минута, след което индивидите бяха измивани, подсушавани и освобождавани. Съблеклата и мъртвите екземпляри (намерени пряко убити по пътищата) се екстрахираха за 24 часа в тъмни стъклени съдове, като при последните главата и опашката оставаха извън разтвора за предотвратяване на замърсяване.



Фигура 3 Извличане на кожни секрети от *V. ammodytes*, потопена в *n*-хексан

Подготовка на пробите

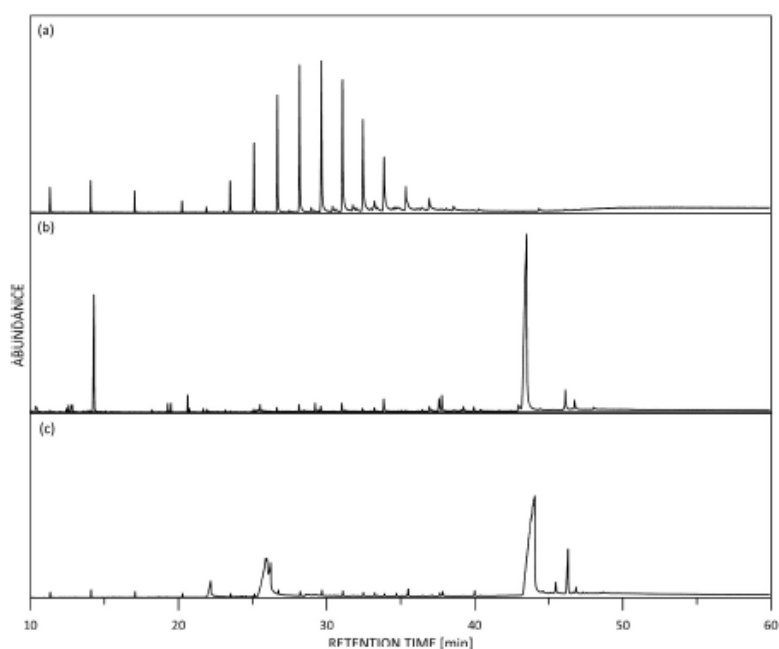
За последваща обработка всички проби бяха концентрирани приблизително 1:150 чрез изпаряване на разтворителя с ротационен вакуумен изпарител до краен обем от 2 ml и съхранявани в тъмни стъклени флакони с алуминиеви капачки и септа с диаметър 8 mm в хладилник (при 5 °C) до анализа.

4.1.3. Химичен анализ на кожните секрети

Химичният анализ на пробите беше извършен чрез газова хроматография, комбинирана с мас-спектрометрия (GC-MS), използвайки газов хроматограф Agilent 7820A, свързан с мас-селективен детектор 5977B (Agilent Technologies). Анализите се проведоха при стандартни условия с хелий като носещ газ и капилярна колона със средна полярност (DB-17HT). Контролни проби с *n*-хексан бяха анализирани паралелно.

Идентифицирането на съединенията се извърши чрез маспектрални библиотеки (NIST, Wiley) и времена на задържане, а количественото определяне — по метода на вътрешна нормализация (Nedeltcheva-Antonova et al., 2017). Примерни хроматограми бяха изведени за визуализация на ключови проби (**Error! Reference source not found.**).

4.1.4. Статистически анализи



Фигура 4. Сравнение на представителни хроматограми за резултатите от пробите на *V. ammodytes*, показващи разликите между трите начина на пробовземане – а) проба от жив женски индивид, б) проба от мъртъв мъжки индивид и с) проба от съблекло съпоставка между индивиди в естествена среда и такива, гледани на затворено, които не са изпадали в хибернация през предшестващия зимен сезон. Тъй като анализите бяха извършвани в последователни години от проучването, извадките на налични индивиди се различават, както и използваните тестове.

Сравнение между мъжки и женски индивиди при относителни количества на извлечените секрети

Този анализ бе извършен през първата година от докторантурата. За целта бяха използвани мъжки ($n = 20$) и женски ($n = 17$) възрастни индивиди на *V. ammodytes*, събрани от околностите на с. Карлуково, с. Балша, с. Лакатник, Кресненско дефиле и района на Рупите (вж. 4.1.1. *Полеви дейности*). Като зависими променливи бяха използвани относителните концентрации на всички открити съединения. Тъй като нямаше нормално разпределение на данните, те бяха трансформирани чрез

Статистическите анализи бяха проведени със софтуерите PAST v. 3.25 (Hammer et al., 2001) и R 4.5.1 (R Core Team, 2025). Статистически тестове бяха проведени в няколко различни аспекта от изследването на химичния състав на кожните секрети, а именно с цел сравнение между мъжки и женски индивиди от вида *V. ammodytes*, междувидово сравнение, а също и

композиционен анализ с натурален логаритъм, като нулевите стойности бяха заменени с малки константи (10^{-6}) (Aebischer et al., 1993; Warton and Hui, 2011). Сравненията между двата пола бяха извършени със Student's t-тест.

Беше извършен анализ на главните компоненти (PCA) за оценка на влиянието на променливите върху главните компоненти. Корелациите между броя на откритите съединения и дължината, и масата на тялото на живите индивиди бяха тествани чрез непараметричния коефициент на Спирман.

Анализ на влиянието на хибернацията върху концентрацията на кожните секрети при относителни количества на извлечените секрети

Този анализ се основава на проби от 30 мъжки и 22 женски *Vipera ammodytes*. Тестваните проби бяха разделени на три групи на база наличието и типа хибернация: 1) незимуващи в плен (ННС) – индивиди, които са отглеждани в плен повече от година, без да изпаднат в хибернация през зимата ($n = 28$); 2) зимуващи в плен (НС) – индивиди, които са отглеждани в плен за повече от една година и са изпаднали в хибернация през зимата ($n = 6$); 3) зимуващи в дивата природа (НВ) – индивиди, намерени в дивата природа и държани за кратко време (от един ден до четири седмици) до момента на линеење ($n = 18$).

За всички статистически анализи бяха използвани относителните концентрации на регистрираните съединения в екстрактите като зависими променливи. Работата с относителни концентрации може да създаде проблем с независимостта на пропорциите предвид презумпцията, че общият сбор на пропорциите винаги е 100% (Warton, 2011). Поради това данните бяха трансформирани чрез естествен логаритъм по протокола на Aebischer et al. (1993), като трансформираните стойности се изчисляват по формулата $\ln(x_i/1-x_i)$, където „ x_i “ е относителната концентрация на дадено съединение. За да се избегнат нулевите стойности, те бяха заменени с пренебрежимо малки стойности, близки до нула (0,000001) (Aebischer et al., 1993).

Първо бяха проведени тестове за статистически достоверни разлики между мъжки и женски проби във всяка от трите групи. Тъй като химичният състав на липидите в кожата не се различаваше между половете, което като резултат съвпада с анализите на всички проби на целевите видове (вж. 5. *Резултати*), мъжките и женските индивиди бяха анализирани заедно. За сравнение между трите групи беше приложен Kruskal-Wallis ANOVA, а при установяване на значими разлики – и Mann-Whitney U тест.

4.2. Проучване на брачно поведение и комуникация

С оглед някои видово-специфични екологични особености, за изследване на брачното поведение бяха използвани само индивиди от вида *Vipera ammodytes*. Брачното поведение на другия целеви в настоящата работа вид, *V. berus*, вече е сравнително добре проучено (Andrén, 1986; Andrén & Nilson, 1983; Shine, 1978), а освен това у нас той се явява типичен високопланински обитател, поради което изследването на поведението на индивиди в лабораторни условия на много по-малка надморска височина по всяка вероятност би довело до получаване на нереални резултати. В допълнение, тясната филогенетична близост между *V. ammodytes* и *V. berus* (Uetz et al., 2025) предполага, че резултатите от анализа на брачното поведение при първия вид могат да бъдат в значителна степен екстраполирани и към втория.

4.2.1. Полеви дейности и тествани индивиди

Осем мъжки и седем женски индивида от *Vipera ammodytes* бяха събрани през април 2022 г. и април 2023 г. от една популация в района на с. Карлуково, Северозападна България. Събраните индивиди бяха отглеждани в отделни терариуми в лаборатория на ИБЕИ-БАН, а след извършване на съответните експерименти бяха освободени в местата на улавянето им.

4.2.2. Лабораторни експерименти

Експериментите се провеждаха от началото на май до средата на юни, т.е. в периода на размножаване на *V. ammodytes* (Beshkov, 1977; Stojanov et al., 2011; Dyugmedzhiev, 2020). При всеки опит в терариума на съответния индивид се поставяше парче попивателна хартия, напоено с определено съединение, следвайки методиката на Mason et al. (1990). Общият брой проведени поведенчески тестове беше 270 (144 при мъжки и 126 при женски индивиди). Всяка напоено парче хартия бе оставяно в терариума за 10 минути, като реакциите на животното се записваха с видеокамера, без присъствие на човек в помещението с цел намаляване човешкия фактор и разсейващи стимули. Тествани бяха различни синтетични съединения, както и контролни опити без никакво вещество а само парче хартия в терариума. За всяка проба се използваша между 0.20 и 0.25 ml разтвор, нанесен с пипета. Всеки експеримент бе повторен по три пъти за всеки индивид и всяко съединение, като се провеждаха максимум по четири опита на ден за индивид, с пауза от поне час, и най-малко един ден между отделните сесии.

Използваните съединения бяха: синтетичен n-хексан (C_6H_{14} ; „hexane“), хептакозан ($C_{27}H_{56}$; „C27 alkane“), 2-пентакозанон ($C_{25}H_{50}O$; „C25 ketone“), 2-хептакозанон ($C_{27}H_{54}O$; „C27 ketone“), както и смес от равни части 2-пентакозанон и 2-хептакозанон („C25–C27 ketones“). Посочените съединения бяха избрани на база вече публикуваните в рамките на докторантурата, данни за вида и съответно техният потенциал за участие в половия феромон. В лабораторията твърдите вещества бяха разтворени в n-хексан до концентрация 1 mg/ml (Mason et al., 1990), като използваният n-хексан беше с 99% концентрация.

За всеки 10-минутен опит се изчисляваха общата (GTF – брой плезения/общо време на експеримента) и специфичната честота на изплезванията (STF – брой плезения/времето между първото и последното изплезване), както и времето до първото изплезване (tongue-flick). Периодите, в които индивидът беше извън кадър, се изключваха. Отчитаха се и прояви на интерес към стимула (INT) — насочени плезения и взаимодействие с хартията за ≥ 10 s — както и броят на търканията с брадичка (RUB), типично ухажващо поведение при мъжките *Vipera* (Andrén, 1986; Andrén & Nilson, 1983; Shine, 1978; Mason et al., 1990).

Въпреки че съществуват функционални различия в типовете изплезвания при влечугите и по-конкретно, при змиите, според амплитудата и честотата им (Gove & Burghardt, 1983; Daghfous et al., 2012), използваната методика не позволява разграничаването им. Поради това всички изплезвания на тестваните индивиди са включени в бройката за всяка от посочените променливи.

4.2.3. Статистически анализи

Всички статистически анализи бяха извършени със статистическия софтуер R 3.4.2 (R Core Team, 2024), като бяха използвани пакетите *brms* (Bürkner, 2021), *emmeans* (Lenth, 2025), *loo* (Yao, 2017) и *mvabund* (Wang et al., 2022). Наличие на нормално разпределение на данните бе проверено чрез тест на Shapiro–Wilk, като нулевата хипотеза беше отхвърлена. За всяка променлива бе проведена дескриптивна статистика. С оглед на различния тип променливи (INT – бинарна; RUB – меристична; GTF и STF – метрични), разпределението на всяка променлива беше тествано поотделно.

Първо беше изчислен дялът на нулевите стойности, който се оказа висок (вж. 5. *Резултати*), поради което бяха тествани модели, пригодени за голям брой нули (zero-inflation models). За GTF и STF бяха приложени hurdle модели с гама и логнормално

разпределение, които бяха сравнени чрез критерия на Watanabe–Akaike (WAIC) и, при необходимост, чрез крос-валидация с изключване на една стойност (LOO). И за двете променливи беше избран hurdle gamma моделът. За INT бе предпочетен zero-inflated binomial модел пред стандартните binomial Модели, а за RUB – zero-inflated Poisson модели пред стандартните (на база WAIC стойността).

След това беше извършен т.нар. Generalized Linear Mixed-effects Model (GLMM), използвайки мултивариантната формула (*mvbrmsformula*) в *brms*. Променливите „пол“ и „вид съединение“ бяха зададени като фиксирани предиктори, а „индивид“ – като случаен ефект. Моделите бяха изпълнени с четири вериги, по 4000 итерации на верига и *adapt_delta* от 0.95. Сравнения между групите бяха извършени с *emmeans*.

Анализите първо бяха проведени върху целия набор от данни, след което – отделно за мъжки и женски индивиди със същия GLMM и двойкови сравнения. Допълнително съединенията бяха групирани, както следва: (1) кетони – C25 кетон, C27 кетон, C25–C27 кетони; (2) други – хексан, C27 алкан; (3) контрол – контролна група. Върху тези групирани данни бяха проведени допълнителни анализи за мъжки и женски индивиди.

4.3. Проучване на морфологията на половите органи

4.3.1. Мъжки полови органи

За описателното сравнение на мъжките полови органи на целевите видове, бе използвана статията, публикувана в рамките на магистърската дипломна работа на докторанта (Andonov et al., 2017). Данните за морфологичните характеристики на хемипенисите на *V. ammodytes* и *V. berus*, са базирани на изготвени препарати, следвайки методологията на Pesantes (1994), допълнена от Zaher и Prudente (2003) и Myers и Cadle (2003), с малки модификации и допълнения. След екстракцията органите се накисват в 2% KOH разтвор за период между 30 минути и 6 часа, в зависимост от техния размер и времето на предходно съхранение в алкохол. След потапянето хемипенисите се обръщат внимателно ръчно с помощта на пинсети и в следствие се запълват с вазелин. Оцветяването се извършва чрез накисване в разтвор на Alizarin Red S (няколко кристала, разтворени в 100 мл 50% етанол) (Harvey и Embert, 2008; Nunes et al., 2012; Passos et al., 2013). Накрая хемипенисите се поставят в 75% етанол с цел дългосрочно съхранение.

4.3.2. Женски полови органи

В рамките на докторантурата бе изследвана морфологията на женските гениталии на седем вида змии от три семейства. Макар изследването да бе фокусирано върху целевите видове, *V. ammodytes* и *V. berus*, проучване морфологията на гениталиите на други видове змии бе извършено с цел сравнителен анализ и установяване на новоприлагана методология. За целите на изследването и междуполовата сравнителна морфология бяха използвани 16 възрастни женски индивиди, принадлежащи към следните семейства и видове: Voidae: *Eryx jaculus* (Linnaeus, 1758) (n = 1); Colubridae: *Dolichophis caspius* (Gmelin, 1789) (n = 2), *Zamenis longissimus* (Laurenti, 1768) (n = 2), *Elaphe quatuorlineata* (Lacépède, 1789) (n = 2), *Coronella austriaca* Laurenti, 1768 (n = 1); Viperidae: *Vipera ammodytes* (Linnaeus, 1758) (n = 5), *V. berus* (Linnaeus, 1758) (n = 1). Тъй като има данни за онтогенетични различия във формата на женските гениталии (Showalter et al., 2014), бяха използвани само възрастни индивиди.

Задният край (опашката, както и дисталната част от корема) на всяка изследвана змия беше потопен в 2% разтвор на KOH за 3-6 часа, в зависимост от степента на фиксация и размера на индивида (Pesantes, 1994). След омекване на тъканта и придобиване консистенция на гума, в клоаката на индивидите бе инжектиран двукомпонентен кондензационен стоматологичен силикон.

За изготвянето на гениталните модели бе използвана методологията, предложена от Granados et al. (2022), но с някои модификации. Например яйцепроводите или червата не бяха завързвани веднага след клоаката, а на по-голямо разстояние от нея, с цел да бъде получена допълнителна информация за ключови структури. Също така и самата клоаката и последващи яйцепроводи и други структури, не бяха отстранявани от индивида, както посочват Granados et al. (2022), а силиконът бе инжектиран *in situ*.

Всеки екземпляр беше завързан с корда на около 5-6 cm преди отвора на клоаката, за да се гарантира, че силиконът ще попадне основно в т.нар вагиналната торбичка (vaginal pouch) и няма да се разпространи по цялото протежение на червата. Всеки пълнеж се втвърдяваше в продължение на 3-5 минути, след което чрез малък разрез в основата на клоакалния отвор силиконовия модел беше отстраняван (Фигура).

За описанието на женските гениталии беше използвана (с някои допълнения) терминологията, предложена от Siegel et al. (2011, 2012), които описват раздвоената клоакална област, която приема дисталната част на хемипениса, като „вагинална торбичка“ или само „торбичка“ (vaginal pouch/ pouch). Имайки предвид, че Siegel et al.

(2011, 2012) описват различните степени на раздвояване на торбичката хистологично, докато в настоящото проучване те са наблюдавани само морфологично, категоризацията на торбичките в четири състояния не е следвана дословно, а е предефинирана по следния начин: прости - без раздвояване, леко разделени - когато силиконовите рамена на модела са по-малко от 25 % от общата дължина на модела, разделени - когато рамената на модела са между 25 % и 50 % от общата дължина на модела, и раздвоени - когато рамената на модела са повече от 50 % от общата дължина на модела (simple, slightly separated, separated, divided). Тази класификация е близка до аналогичната терминология за общата форма на хемипенисите, което позволява сравненията да бъдат възможно най-коректни.



Фигура 5. Отстраняване на силиконовия модел от женските гениталии на *Coronella austriaca*.

5. Резултати

5.1. Проучване на кожни секрети и химични сигнали

5.1.1. Анализ и описание на съединенията в кожни секрети на *Vipera ammodytes* и *V. berus*

В рамките на дисертационния труд бяха установени комплексите от вещества на кожни секрети при 13 вида змии, като акцент бе поставен върху целевите видове *V. ammodytes*

и *V. berus*. Бяха регистрирани ключови кетони, сквален и други съединения, които по литературни данни се предполага, че могат да участват в половия феромон и химичната комуникация при видовете. Кожните комплекси на 12 от тези видове бяха описани за първи път, а за *V. berus* бяха допълнени данните към изследването на Van Moorleghe et al. (2020).

В кожните секрети на изследваните проби бяха открити общо 88 съединения. Идентифицираните компоненти могат да бъдат класифицирани като алкани, алкени, стеролови липиди, кетони, алдехиди, мастни киселини, мастни алкохоли, естери и феноли. Най-разпространената група съединения в анализирания секрет са алканите ($n = 27$), които представляват над 30,6% от всички установени вещества. Освен тях бяха идентифицирани и ключови кетони, за които е известно, че участват в състава на женския полов феромон при други видове: 2-деканон ($C_{10}H_{20}O$), 2-нонадеканон ($C_{19}H_{38}O$), 2-хенейкозанон ($C_{21}H_{42}O$), 2-трикозанон ($C_{23}H_{46}O$), 2-пентакозанон ($C_{25}H_{50}O$), 2-хептакозанон ($C_{27}H_{54}O$) и 2-нонакозанон ($C_{29}H_{58}O$).

5.1.2. Сравнение на кетони и други ключови съединения между мъжки и женски индивиди

Не бяха намерени статистически достоверни разлики между относителните стойности на кетони и други ключови съединения, с потенциално участие в половия феромон, между мъжки и женски индивиди.

5.1.3. Сравнение на кетони и други ключови съединения между индивиди в пре-репродуктивна и репродуктивна фаза

Не бяха намерени статистически достоверни разлики между индивиди, тествани непосредствено преди и по време на размножителния период. Това вероятно се потвърждава от предположението, че използваните за сравнението съединения имат роля в химичната комуникация между индивидите, както и участие в половия феромон, но вероятно не са единствените, а има и други съединения, които ги допълват.

5.1.4. Сравнение на индивиди с пълноценна хибернация и такива с нарушена хибернация

Тъй като тази част от резултатите все още не е публикувана, тук е разгледана по-подробно спрямо останалите резултати. Тестът на Kruskal-Wallis показва статистически достоверни разлики между трите групи за 22 съединения (Таблица 1). Сред кетоните, при които се установиха такива различия, са 2-пентакозанон ($H = 14.41518$, $p = 0.0007$) и 2-нонакозанон ($H = 8.822115$, $p = 0.0121$), които в рамките на дисертационния труд бяха потвърдени като участници в междувидовата комуникация. Последващите тестове на Mann-Whitney показаха статистически достоверни разлики в концентрациите на 6 съединения между пробите от НС (зимували, отглеждани в плен – hibernating in captivity) и ННС (незимували, отглеждани в плен – not hibernating in captivity) индивиди (Таблица 1). Сред тях – 2-пентакозанон ($U = 37$, $Z = 2.1$, $p = 0.04$) и 2-нонакозанон ($U = 39$, $Z = 2.01$, $p = 0.04$). Статистически достоверни разлики бяха намерени и в концентрациите на 6 съединения между пробите от НС и НВ (зимували в дивата природа – hibernating in the wild) индивиди (Таблица 1). При кетоните не беше установена такава разлика, въпреки че при 2-нонакозанон резултатите са близки до статистическа значимост ($U = 25$, $Z = 1.9$, $p = 0.06$). Статистически достоверни разлики бяха намерени и в концентрациите на 21 съединения между пробите от ННС и НВ индивиди (Таблица 1). Единственият кетон който се различава по концентрация в двете групи е 2-пентакозанон ($U = 118$, $Z = -3.004$, $p = 0.003$).

Таблица 1. Съединения в кожните секрети на *Vipera ammodytes*. Стойностите, открити само в една проба, са представени като относителен процент на съединението; във всички останали случаи относителният процент е даден като медиана (минимум–максимум) и броя на пробите, в които съединението е регистрирано. Статистически значимите разлики в относителния процент на съединенията между трите групи са отбелязани до химичната формула със символи * ($p < 0.05$), ** ($p < 0.01$) и *** ($p < 0.001$), докато разликите между НС и ННС са означени с +, ++, +++ , между НС и НВ – с ^, ^^, ^^, а между ННС и НВ – със #, ##, ###; съединения, които не са открити в пробите на нито една от групите, са означени като N/A.

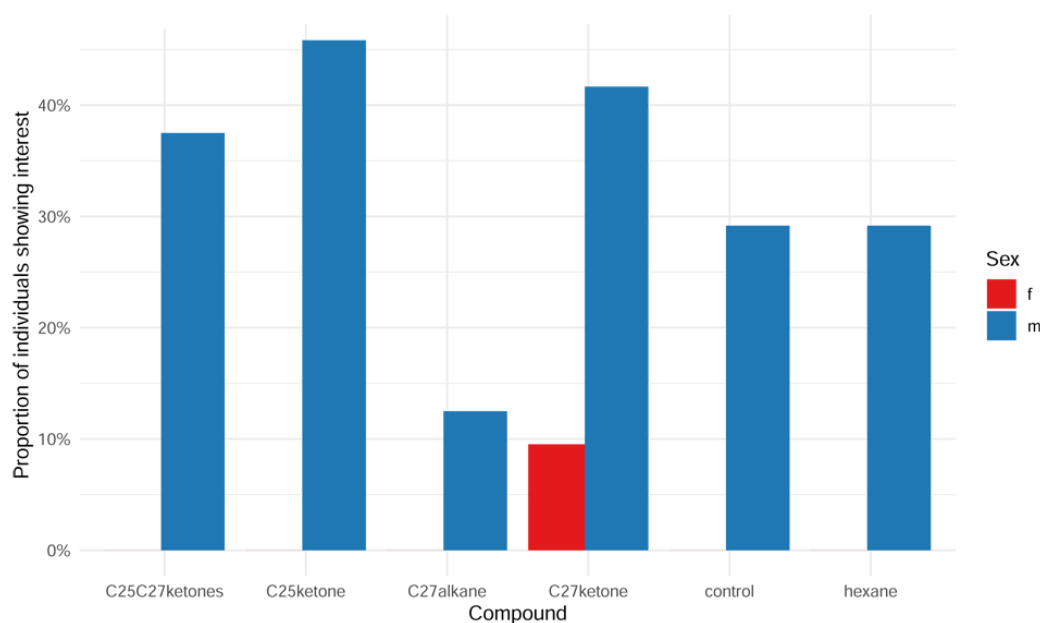
Съединение	НС	ННС	НВ
n-Dodecane ** #	0.07	0.26	0.81 (0.24-1.41), 7
n-Tetradecane	0.07	0.09 (0.05-0.27), 17	0.53 (0.01-3.98), 7
n-Pentadecane *** + ^^ ###	0.255 (0.07-0.44), 6	0.51 (0.21-1.48), 26	0.06 (0.03-0.21), 3
Tridecanal *** ###	0.2 (0.14-0.36), 3	0.37 (0.13-1.25), 22	N/A
Cyclododecane * #	0.15	0.405 (0.05-1.74), 12	0.06
n-Hexadecane ** ^ ###	1.03 (0.45-2.15), 6	1.755 (0.03-4.05), 24	0.7 (0.01-4.48), 6
5,9-Undecadien-2-one, 6,10-dimethyl- ** ##	0.62 (0.3-0.94), 2	0.37 (0.06-1.23), 13	N/A
2-Nonen-1-ol *** ^^ #	0.61 (0.14-0.98), 5	0.5 (0.04-2.1), 13	0.16
n-Heptadecane *** ^^ ###	1.97 (1.23-2.57), 5	2.11 (0.05-4.69), 23	0.02 (0.01-0.12), 9
Phenol, ditert-butyl-	0.22	2.38 (0.26-3.86), 5	0.02
Tetradecanol ** ##	0.245 (0.1-0.39), 2	0.36 (0.08-1.98), 17	0.02 (0.01-0.03), 2
n-Octadecane ** ^ ##	1.005 (0.08-1.5), 6	1.09 (0.13-1.58), 23	0.99 (0.03-3.47), 5

n-Nonadecane ** ###	0.56 (0.35-0.72), 4	0.34 (0.05-0.91), 21	0.04 (0.01-0.1), 8
Pentadecanol * #	0.42 (0.18-0.66), 2	0.12 (0.04-1.02), 15	0.02 (0.01-0.03), 5
2-Decanone	0.115 (0.04-0.19), 2	0.06 (0.04-0.34), 3	0.01
Eicosane * +	0.61	0.195 (0.07-1.14), 22	0.09 (0.01-2.1), 10
Methyl palmitate (Hexadecanoic acid, methyl ester-) ** #	N/A	0.14 (0.03-0.68), 10	N/A
Benzoic acid, butyl ester-	0.27 (0.15-0.39), 2	0.09 (0.03-0.21), 5	0.03
n-Heneicosane	0.25 (0.14-0.39), 3	0.52 (0.15-0.9), 9	0.115 (0.02-0.34), 12
Hexadecanoic acid (Palmitic acid) #	2.07 (1.93-2.21), 2	1.59 (0.26-3.93), 19	0.3 (0.01-2.65), 11
Docosane #	0.63 (0.32-0.94), 2	0.11 (0.02-0.42), 19	0.355 (0.03-0.84), 4
Octadecanal (Stearaldehyde)	0.62	0.34 (0.02-1.46), 3	0.02 (0.01-0.05), 3
Tricosane	2.15	0.12 (0.05-0.39), 19	0.07 (0.01-1.79), 11
Octadecanoic acid (Stearic acid)	N/A	1.34 (0.43-4.78), 6	0.81 (0.08-5.21), 6
9-Octadecenoic acid * + #	3.02	5.85 (0.22-26.75), 19	0.41 (0.04-8.98), 9
9,12-Ocatdecadienoic acid * #	7.45	4.94 (0.51-9.52), 21	0.37 (0.01-4.72), 13
Tetracosane	1.305 (0.35-3.88), 4	0.2 (0.07-1.63), 20	0.34 (0.01-3.52), 10
2-Heneicosanone	N/A	N/A	0.05 (0.02-0.08), 2
Docosanal	0.13	0.065 (0.03-0.1), 2	0.03 (0.02-0.13), 5
Pentacosane	1.18 (0.08-5.52), 3	0.11 (0.05-0.31), 20	0.24 (0.02-3.99), 13
4,8,12-Trimethyltridecan-4-olide	N/A	0.11	0.06 (0.02-0.07), 3
Hexacosane	3.755 (1.31-6.2), 2	0.1 (0.04-0.28), 17	0.19 (0.04-4.14), 9
Heptacosane	1.34	0.105 (0.08-0.26), 16	0.21 (0.04-3.47), 13
Octacosane	3.015 (1.12-4.91), 2	0.11 (0.03-0.78), 10	0.31 (0.08-2.45), 7
2-Pentacosanone *** + ##	0.115 (0.08-0.18), 4	0.1 (0.05-0.14), 4	0.1 (0.04-0.75), 12
Nonacosane *** ###	2.01 (0.1-3.92), 2	0.04 (0.02-1.31), 3	0.195 (0.04-1.71), 12
Triacotane ** ###	2.65	N/A	0.625 (0.04-0.94), 6
Squalene	N/A	0.095 (0.03-4.57), 12	0.11 (0.03-0.26), 6
2-Heptacosanone	0.17 (0.17-0.17), 1	0.04 (0.04-0.04), 1	0.095 (0.05-2.43), 4
Hentriacontane *** ##	1.49 (1.49-1.49), 1	0.05 (0.01-0.34), 3	0.23 (0.01-1.45), 11
Cholesterol myristate (Tetradecanoic acid, cholesteryl ester)	0.05 (0.04-0.11), 3	0.12 (0.01-0.24), 11	0.08 (0.04-0.11), 3
Cholesterol benzoate (Benzoic acid, cholesteryl ester) ** ^ #	0.34 (0.19-0.74), 5	0.2 (0.09-0.64), 21	0.39 (0.31-0.5), 4
Cholesta-4,6-dien-3-ol	1.03 (1.03-1.03), 1	0.82 (0.12-2.81), 5	0.34 (0.03-13.64), 8
Cholesta-3,5-diene	3.14 (3.14-3.14), 1	0.48 (0.07-1.74), 23	0.345 (0.04-12.75), 12
Phytane **	0.19 (0.1-0.28), 2	N/A	0.02 (0.02-0.02), 1
a-Tocopherol (Vitamin E)	N/A	0.08 (0.08-0.08), 1	0.09 (0.01-0.51), 3
Tocopherol (isomer)	N/A	N/A	4.9 (4.9-4.9), 1
2-Nonacosanone * +	0.235 (0.11-0.3), 4	0.17 (0.12-0.38), 4	0.08 (0.05-0.43), 3
Cholesterol	Unidentified	Unidentified	Unidentified
2-Hentriacontanone	Unidentified	Unidentified	Unidentified
Cholestan-3-one	52.97 (52.97-52.97), 1	0.66 (0.35-1.34), 5	1.13 (0.17-77.83), 4
Desmosterol (Cholesta-5,24-dien-3-ol) * +	N/A	0.27 (0.11-1), 17	0.67 (0.06-1.29), 5

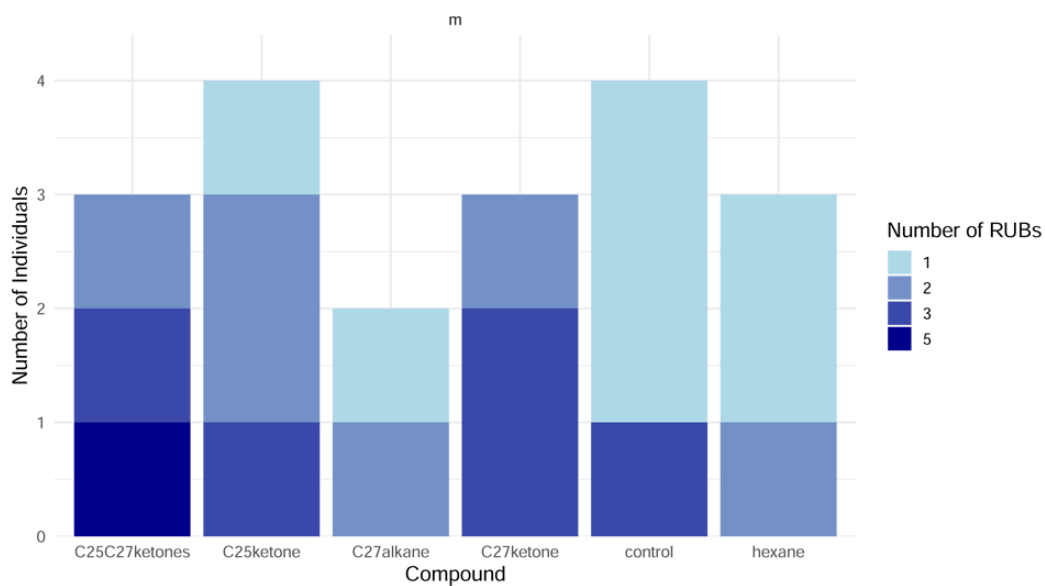
Cholest-4-en-3-one **	0.25 (0.25-0.25), 1	N/A	0.425 (0.09-16.17), 6
2-Tritriacontanone	0.83 (0.83-0.83), 1	0.53 (0.47-1.77), 3	N/A
Sitosterol	0.37 (0.3-0.44), 2	0.34 (0.05-1.23), 5	1.01 (0.83-1.19), 3
Cholesta-4,6-diene-3-one	0.34 (0.34-0.34), 1	0.355 (0.19-2.45), 8	0.71 (0.38-1.83), 9
Stigmast-4-en-3-one	0.21 (0.21-0.21), 1	0.02 (0.02-0.02), 1	0.64 (0.64-0.64), 1
Docosanol, formate	N/A	N/A	0.09 (0.09-0.09), 1

5.2. Проучване на брачно поведение и комуникация

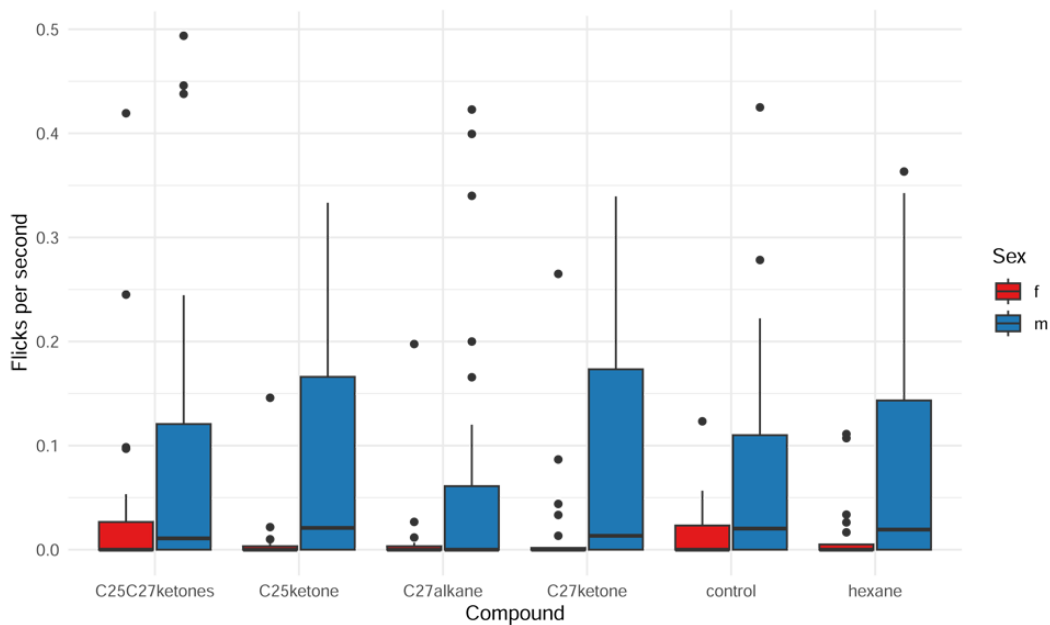
В рамките на дисертационния труд бе установено, че дълговерижните наситени метилкетони (C25-C33) участват в химичната комуникация и в женския полов феромон на *Vipera ammodytes*. Особеностите на резултатите предполагат наличие и на други вещества, които участват във феромонния комплекс, по всяка вероятност летливи. Доказано бе и че мъжките се привличат от дълговерижни метилкетони много повече от женските. Бе установена статистически достоверна разлика в реакциите на мъжки и женски индивиди към целевите вещества като мъжките проявяват по-силен поведенчески отговор (Фигури 6-9).



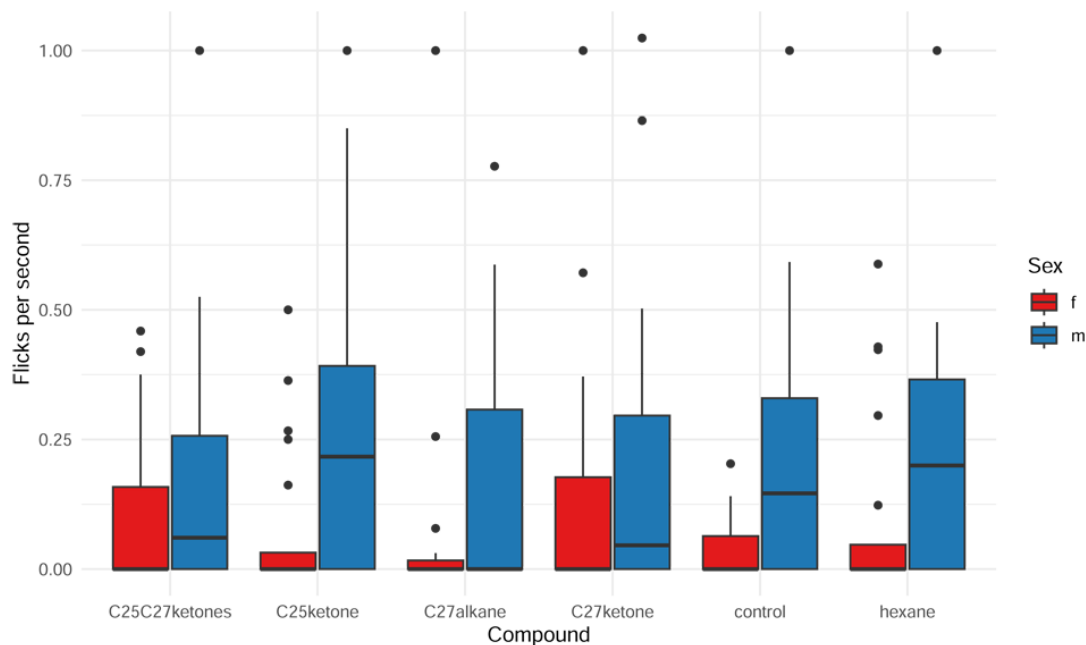
Фигура 6 Дял на мъжките и женските индивиди, проявили интерес (INT) към различните съединения.



Фигура 7 Брой мъжки индивиди, проявили поведение на триене с брадичката (RUB), с посочен съответен брой търкания. Нито една женска не е показала такова поведение.

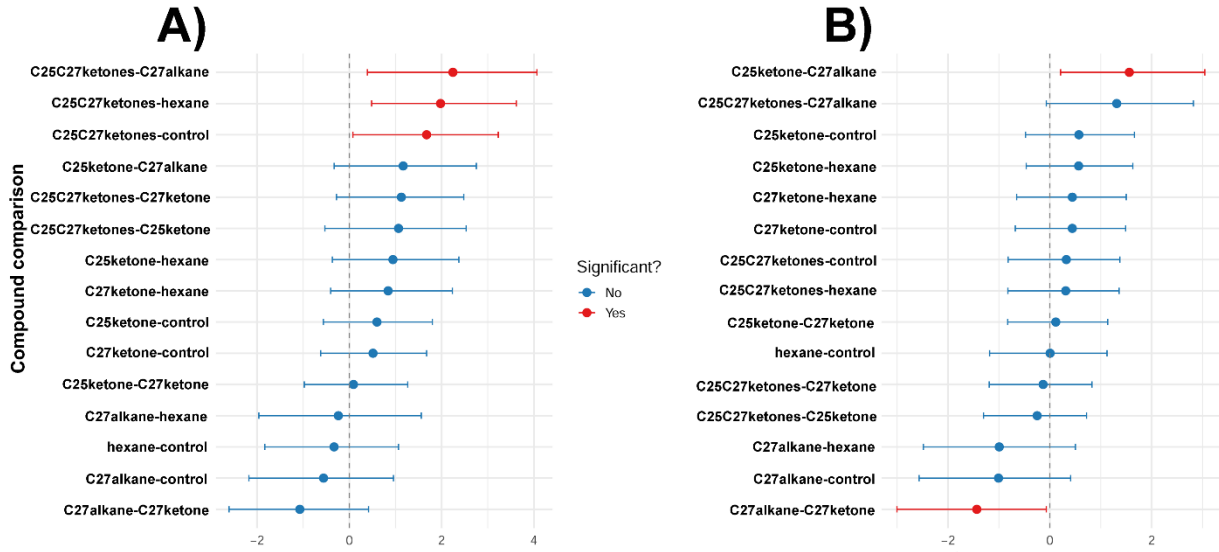


Фигура 8 Бокс-плот за общата честота на езикови докосвания (GTF) с минимални, максимални и средни стойности за мъжки и женски индивиди.

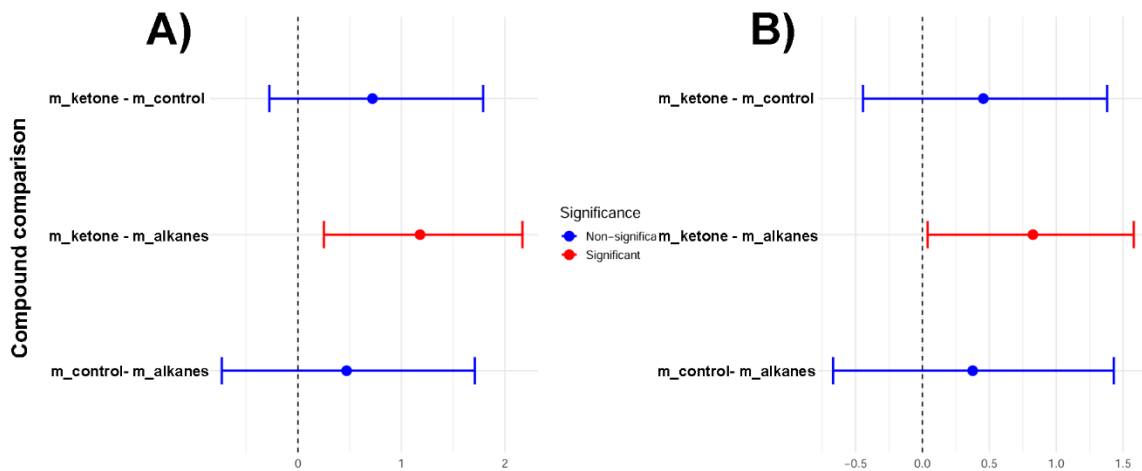


Фигура 9 Бокс-плот за специфичната честота на езикови докосвания (STF) с минимални, максимални и средни стойности за мъжки и женски индивиди.

Статистическите анализи за мъжките показват статистически значими разлики (на база на Highest Posterior Density interval, HPD) за INT между реакциите към C25 ketone и C27 alkane, както и между C27 alkane и C27 ketone. Почти значима разлика бе отчетена между C25–C27 ketones и C27 alkane. C25 ketone и C27 ketone предизвикаха по-силни реакции в сравнение с C27 alkane, като C25–C27 ketones вероятно предизвикват сходна по сила реакция. По показателя RUB при мъжките бяха установени статистически значими разлики между реакциите към C25–C27 ketones и C27 alkane, между C25–C27 ketones и hexane, както и между C25–C27 ketones и контролната група. Следователно, C25–C27 ketones предизвикват по-силни реакции при мъжките в сравнение с C27 alkane, hexane и контрола. Не бяха открити статистически значими разлики за GTF и STF (Фигура 10). При групиране на съединенията, мъжките показаха статистически значими разлики между ketones и alkanes по показателите INT и RUB, със значително по-силна реакция към ketones. Не се установиха значими разлики между групите съединения за GTF и STF (Фигура 11).



Фигура 10 Интервали на Highest Posterior Density (HPD) за двойкови сравнения на реакциите на мъжките индивиди по показателите RUB и INT към различни съединения. Статистически значимите разлики са отбелязани в червено. А) HPD интервали за двойкови разлики в RUB; В) HPD интервали за двойкови разлики в INT.



Фигура 11 Графики на HPD интервали за двойкови сравнения на реакциите на мъжките индивиди по показателите RUB и INT към различни групи съединения. Статистически значимите разлики са отбелязани в червено. А) HPD интервали за двойкови разлики в RUB; В) HPD интервали за двойкови разлики в INT.

5.3. Проучване на морфологията на половите органи

За първи път бяха описани морфологичните особености на женски гениталии на 7 вида змии от три семейства, обитаващи територията на България, а именно сем. *Voidae: Eryx*

jaculus; сем. Colubridae: *Dolichophis caspius*, *Zamenis longissimus*, *Elaphe quatuorlineata*, *Coronella austriaca*; сем. Viperidae: *Vipera ammodytes*, *V. berus*. За целта беше използвана нововъведена методология с триизмерни силиконови отливки, която бе потвърдена и доразвита в рамките на проучването. За първи път бе направено триизмерно сравнение между мъжки и женски полови органи на посочените видове с акцент върху *V. ammodytes* и *V. berus*.

6. Дискусия

6.1. Проучване на кожни секрети и химични сигнали

Кожни секрети

Получените резултати показват, че кожните секрети на различните видове змии имат сходен качествен състав, но се различават количествено, което предполага видово-специфични вариации и потенциална роля на определени съединения в комуникацията между индивидите (Mason et al., 1989). Най-често срещани са алканите, които вероятно изпълняват не само структурна и защитна функция, но и участват в химичната сигнализация, въпреки че част от тях може да имат външен произход (Ahern & Downing, 1974; Gutzke et al., 1993; Lillywhite & Maderson, 1988). Наличието на съединения като фитан, с известен растителен произход (Dean & Whitehead, 1961), подсказва възможен екзогенен принос, макар и да не може да се изключи ендегенен произход (Avigan et al., 1967).

Стеролните липиди, включително холестеролът и неговите производни, са често срещани в кожните секрети на влечуги и участват в регулацията на водопроницаемостта и защитата от дехидратация (Ahern & Downing, 1974; Roberts & Lillywhite, 1980; Burken et al., 1985; Mason et al., 1987; Weldon et al., 2008). Разликите между видовете вероятно отразяват динамична роля на тези липиди, свързана с физиологията, растежа и процеса на линееене (Abraham et al., 1987), както и възможна функция в смазването на кожата, улесняваща придвижването (Ripamonti et al., 2009; Vaio et al., 2015).

Кетоните потвърждават ключовото си значение в химичната комуникация при змиите (Mason et al., 1987, 1989; Parker & Mason, 2011). Откритите дълговерижни кетони са сходни с тези, описани като компоненти на женския полов феромон при *Thamnophis sirtalis parietalis* (Mason et al., 1987, 1989), което предполага подобен механизъм на сигнализация и при други видове, включително *Vipera ammodytes* и *V. berus*.

Освен тях бяха открити и други съединения като мастни киселини, естери, феноли и алдехиди, които вероятно имат вторични функции, свързани с водна пропускливост или антимикробна защита (Patel et al., 2001; Frank et al., 2018; Oh et al., 2015). Някои от тях могат да действат като кайромони или аломони, разпознаваеми и от други видове (Van Moorlegghem et al., 2020).

Влияние на хибернацията върху секрецията на химични вещества

Процесът на секреция на химични сигнали при *Vipera ammodytes* и връзката му с други биологични и физиологични характеристики представлява особен интерес. Parker и Mason (2009) предполагат, че хибернацията влияе върху производството на феромони при *Thamnophis sirtalis*, като количеството на кетоните се увеличава през зимата и пролетта и намалява през есента. Въпреки това, авторите изследват само хиберниращи индивиди и не включват такива, които не са преминали през зимен сън. Счита се също, че някои физиологични процеси могат да бъдат регулирани от ендогенни ритми (Nilson, 1980), което означава, че процеси, свързани с пола, като сперматогенеза или оогенеза, не са винаги пряко свързани с годишния цикъл на хибернация. Редица проучвания посочват, че отделянето на феромони е хормонално обусловено (Bruce, 1965; Mendonça and Crews, 1996; Yamamoto et al., 1996), което предполага, че някои от химичните сигнали, установени в настоящото изследване, вероятно също се влияят от хормонални сигнали.

С цел да се изследва влиянието на хибернацията върху отделянето на химични сигнали, бяха сравнени екстракти от кожни секрети на хиберниращи и нехиберниращи индивиди, използвайки съблекла, които се сменят през цялата година. Поради различните периоди на линееене между групите, изследването не беше ограничено до определени месеци или сезон (например само пролетния брачен период), за да се избегне загуба на ценна информация. Индивидите, гледани на затворено и особено тези, които не са изпадали в хибернация, имат отклонение от стандартните периоди за линееене, което възпрепятства сравнение между съблекла, събрани в един конкретен период. Резултатите показват, че хибернацията действително влияе върху някои химични съединения в кожните секрети

при *V. ammodytes*, като липсата на такава или смущението ѝ води до по-ниски относителни концентрации на някои кетони.

Особено ясно се наблюдава разлика в относителните концентрации на 2-пентакозанон между нехибернаращите индивиди и всяка от двете групи хибернаращи (в изкуствени условия или в природата). Това предполага, че хибернацията е ключов фактор за продукцията на този кетон, който според вече публикуваните данни в рамките на този дисетационен труд, играе важна роля във вътревидовата комуникация. Липсата на хибернация вероятно намалява продукцията на този кетон и съответно ефективността на химичната комуникация.

Брачните и полово обусловени процеси, като развитие на гамети, могат значително да се различават сред влечугите и конкретно змиите. При много видове копулацията може да се случи месеци преди овулацията и вителогенезата, а гамето- и сперматогенезата не винаги следват хибернационния цикъл (Saint Girons 1972, 1992; Aldridge et al., 2009). За *V. ammodytes* е характерен един брачен сезон през пролетта и смесен цикъл на сперматогенезата – започва през лятото/есента със сперматоцитогенеза и завършва следващата пролет със спермиогенеза (Saint Girons 1972, 1976, 1982, 1992; Aldridge et al., 2020). При *Thamnophis sirtalis* има както летен, така и пролетен брачен сезон с постнупциална сперматогенеза (Aleksiuk and Gregory, 1974; Aldridge et al., 2020), а вителогенезата протича през пролетта (Aldridge et al., 2009). Въпреки различията в репродуктивните цикли, хибернацията влияе на активността на химическата комуникация и при двата вида.

Производството на феромони е свързано с хормонални сигнали, които от своя страна се регулират от фактори като температура и фотопериод. За видове като *V. ammodytes*, които преминават през продължителен зимен покой, температурата изглежда основен фактор за гамето- и сперматогенеза и сигнал за продукция на хормони. Високите температури по време на хибернация могат да увеличат концентрацията на мелатонин, който влияе на мъжкото ухажване (Gerhard, 1978; Nelson et al., 1987; Whittier et al., 1987; Crews et al., 1988; Alavi and Cosson, 2005; Lutterschmidt and Mason, 2009; Krohmer and Lutterschmidt, 2011). Тироидните хормони също участват в регулацията на брачното поведение (Turner and Tipton, 1972; Wong and Chiu, 1974; Nilson, 1982;), а половият сегмент на бъбрека (SSK) може да е свързан с продукцията на кетонови феромони, стимулиран от андрогени. Това може да обясни липсата на статистически значима разлика между половете.

В заключение, получените резултати предполагат, че хибернацията играе ключова роля във вътревидовата комуникация при *V. ammodytes*, като липсата ѝ намалява общите нива на важни компоненти на кожните секрети и ключви химични сигнали. Въпреки че се знае, че продукцията на феромони е хормонално обусловена, са необходими допълнителни анализи, за да се изяснят точните биохимични механизми и хормоните, които я регулират, както и влиянието на хибернацията върху тях.

6.2. Проучване на брачно поведение и комуникация

В рамките на проведените опити, 2-pentacosanone (C25 ketone) и 2-heptacosanone (C27 ketone), идентифицирани в екстрактите на *V. ammodytes*, предизвикваха положителна поведенческа реакция у мъжките. Резултатите от проучването, показват, че те вероятно участват във вътревидовата комуникация и допринасят за състава на половия феромон, подобно на описаните при видове от рода *Thamnophis* (Mason et al., 1989, 1990). Комбинацията от двата кетона се оказва по-привлекателна за мъжките, отколкото всяко вещество поотделно, което също съответства на наблюденията при *Thamnophis* (Mason et al., 1990). Въпреки това, реакцията към кетоните не беше силно изразена, което предполага, че и други съединения участват във вътревидовата междуполова комуникация. Също така предполагаме, че дълговерижните кетони могат да се използват и от мъжките за комуникация между самите мъжки, осигурявайки потенциално репродуктивно предимство. Това обаче изисква допълнително проучване.

6.3. Проучване на морфологията на половите органи

В настоящото изследване за първи път описваме морфологията на женските гениталии при седем вида змии (*E. jaculus*, *D. caspius*, *Z. longissimus*, *E. quatuorlineata*, *C. austriaca*, *V. ammodytes* и *V. berus*) чрез модифицирана методология за 3D силиконови отливки (Granados et al., 2022). Резултатите показват значителни видови различия и предполагат различни стратегии за напасване на мъжките и женските гениталии по време на копулация (Siegel et al., 2011, 2012). При *V. ammodytes* наблюдавахме сходна форма и пропорции, което подкрепя хипотезата за видоспецифичност на женските гениталии,

въпреки че има нужда от по-голяма представителна извадка за сигурни заключения. Някои модели показаха различна степен на асиметрия на вагиналната торбичка, вероятно поради неравномерно надуване на силикона, но подобна асиметрия е наблюдавана и при други видове (Gabe & Saint-Girons, 1965), затова трябва да бъде взета предвид. Това подчертава необходимостта от изследвания върху повече и по-пресни екземпляри, за да се оцени пълният диапазон на вариация. Методиката със силиконови отливки, използвана тук, доказва своята стойност за детайлен анализ на женските гениталии и дава възможност за сравнение между мъжки и женски репродуктивни органи. Нашите наблюдения върху напасването между формата на хемипениса и разклонението на вагиналните торбички при различните видове предполагат адаптации за успешна копулация и пренос на сперма, което има значение за репродуктивните стратегии на видовете. Тези данни осигуряват основа за бъдещи изследвания върху коеволюцията на мъжките и женските гениталии и копулаторните адаптации при змии.

7. Обобщение на резултатите

В рамките на настоящото проучване бяха получени следните основни резултати:

1. Установени са веществата, участващи в комплексите от кожни секрети при 13 вида змии, с акцент върху *Vipera ammodytes* и *V. Berus*. За 12 от тези видове, кожните секрети биват изследвани и описвани за първи път;
2. Идентифицирани са дълговерижни метил-кетони (C25–C33), сквален и други ключови съединения в кожните секрети на *Vipera ammodytes* и *V. berus*, които по литературни данни участват в химичната комуникация на някои видове. Аналогични вещества са идентифицирани и в кожните секрети на *N. natrix*, *D. caspius*, *P. najadum*, *Z. situla*, *Z. longissimus*, *E. quatuorlineata*, *C. austriaca*, *M. insignitus*, *M. bornmuelleri*, и *D. mauritanica*.
3. Установено е участието на горепосочените кетони в химичната комуникация и в женския полов феромон на *V. ammodytes*.

4. Не са открити статистически значими разлики в концентрациите на кетони между мъжки и женски индивиди на *V. ammodytes* и *V. berus*.
5. Установени са значими различия в концентрациите на редица съединения (вкл. 2-пентакозанон и 2-нонакозанон) между индивиди от вида *V. ammodytes*, които са изпадали в хибернация и такива, които не са.
6. Установено е, че мъжките индивиди на *V. ammodytes* се привличат повече от дълговерижни метил-кетони в сравнение с женските.
7. За първи път са описани морфологичните особености на женски гениталии при 7 вида змии в България чрез 3D силиконови отливки, като е направен и сравнителен анализ с мъжки полови органи на същите видове, с акцент върху гениталиите на *V. ammodytes* и *V. berus*.

8. Изводи и препоръки

Изводи

1. В кожните секрети на *Vipera ammodytes* и *V. berus* се срещат дълговерижни метил-кетони, сочени в литературата като потенциални участници в половия феромон.
2. Въпреки че някои кетони бяха установени като участници в химичната комуникация при *Vipera ammodytes* и *V. berus*, и част от женския полов феромон на *V. ammodytes*, резултатите водят до заключението, че има и други вещества (вероятно летливи), които участват в половия феромон. Необходими са допълнителни проучвания с алтернативни методологии за установяване на вещества с различна природа и структура.
3. Мъжките *Vipera ammodytes* отделят сходни вещества като женските (без установена достоверна разлика между тях), което трудно може да бъде обяснено с концепцията за т.нар. “she-males” заради спецификата на брачното поведение у тези видове. Последващи проучвания на поведението на мъжките е препоръчително.
4. Както мъжките, така и женските гениталии на изследваните 7 вида змии са разнообразни по морфология.

5. Изследването на химичния състав на кожни секрети при змии е скъпа и трудоемка задача, а за събирането на достатъчен брой проби е необходимо много полева работа, което води до това темата да е все още слабо проучена.

Препоръки

1. Триизмерното проучване на мъжки и женски гениталии разкрива важни особености за тяхната морфология и топология. Препоръчително е при подобни проучвания да се използва комбинация от методи, които да разкрият по-подробна картина за триизмерното съответствие на мъжки и женски гениталии (напр. силиконови отливки на женски гениталии и препарати на мъжки гениталии, в комбинация с компютърна томография, 3D сканиране или рентгеново заснемане и т.н.).
2. Поведенческите експерименти с животни в повечето случаи са непредвидими и трудно може да бъде репликирана конкретна методика, използвана за други видове, затова методиките трябва да бъдат адаптирани към конкретния вид.
3. При извършването на поведенчески опити, човешкото влияние върху индивидите трябва да е сведено до минимум, затова използването на камери за заснемане на индивидите е за предпочитане пред алтернативни методи.

9. Приноси

1. Състав на кожните секрети

- a. Идентифицирани са 88 химични съединения, участващи в кожните секрети при 13 вида змии, като за 12 от тези видове, кожните секрети биват изследвани и описвани за първи път.
- b. За първи път са установени дълговерижни метил-кетони (C25–C33), сквален и други ключви съединения в кожните секрети на *Vipera ammodytes*, които по литературни данни участват в химичната комуникация на някои видове змии. Наличието на такива вещества е потвърдено и при *V. berus*. Аналогични вещества са идентифицирани и в кожните секрети на *N. natrix*, *D. caspius*, *P. najadum*, *Z. situla*, *Z. longissimus*, *E. quatuorlineata*, *C. austriaca*, *M. insignitus*, *M. bornmuelleri*, и *D. mauritanica*.
- c. Установено е участието на горепосочените метил-кетони в химичната комуникация и в женския полов феромон при *Vipera ammodytes*.
- d. Установени са сходства в концентрациите на някои кетони между мъжки и женски индивиди на *Vipera ammodytes* и *V. berus*, което предполага сложни

поведенчески адаптации и/или наличие на други вещества, които участват в женския полов феромон.

- e. Доказана е ключовата роля на хибернацията при *Vipera ammodytes* върху образуването на кетони и други ключови вещества.

2. Брачно поведение

- a. Установено е, че мъжките индивиди на *Vipera ammodytes* проявяват по-активно изследователско поведение от женските.
- b. Установено е, че мъжките индивиди на *Vipera ammodytes* се привличат повече от дълговерижни метил-кетони в сравнение с женските.
- c. Доказано е, че подобно на други видове змии, при *Vipera ammodytes* и *V. berus* женските отделят полов феромон, който предизвиква активно насочване на мъжките към източника на химичния сигнал без друг (напр. визуален) стимул.

3. Морфология на половите органи

- a. За първи път са описани морфологичните особености на женски гениталии при седем вида змии от три семейства на база триизмерни силиконови отливки. Извършен е и сравнителен анализ между женските и мъжките полови органи на същите 7 вида, с акцент върху гениталиите на *Vipera ammodytes* и *V. berus*.

10. Публикации и участия в научни форуми

Публикации

1. Публикация в индексирано международно научно списание с IF в Q1 (WoS) - **Andonov K.**, Dyugmedzhiev A., Lukanov S., Slavchev M., Vacheva E., Stanchev, N., Popgeorgiev G., Duhalov D., Kornilev Y.V., Nedeltcheva-Antonova D., Naumov, B. 2020. Analyses of Skin Secretions of *Vipera ammodytes* (Linnaeus, 1758) (Reptilia: Serpentes), with Focus on the Complex Compounds and Their Possible Role in the Chemical Communication. *Molecules*, 25(16): 3622. [IF = 4.41; Q1 (WoS)] <https://doi.org/10.3390/molecules25163622>.

Цитации (без автоцитирания): 3

2. Публикация в индексирано международно научно списание с IF в Q3 (WoS) - **Andonov K.**, Dyugmedzhiev A., Luknanov S., Vacheva E., Duhalov D., Nedelcheva-Antonova D., Naumov B. 2023. Chemical map of skin secretions in old-world snakes. *Biochemical Systematics and Ecology*, 110: 104713. [IF = 1.40; Q3 (WoS)] <https://doi.org/10.1016/j.bse.2023.104713>.

Цитации (без автоцитирания): 4

3. Публикация в индексирано международно научно списание с IF в Q3 (WoS) - **Andonov K.**, Dyugmedzhiev A., Lukanov S., Vacheva E., Popgeorgiev G., Nedeltcheva-Antonova D., Naumov B. 2025. Behavioral effects of long-chained ketones in *Vipera ammodytes*: an experimental approach. *Herpetozoa*, 38: 161–171. [IF = 0.90; Q2 (Scopus)] <https://doi.org/10.3897/herpetozoa.38.e151358>.

Цитации (без автоцитирания): 0

4. Публикация в индексирано международно научно списание с IF в Q3 (WoS) и Q2 (Scopus) – **Andonov K.**, Dyugmedzhiev A., Naumov B., Todorov N., Vergilov V. 2025. A comparative analysis of female genitalia of seven Old World snakes using a recently proposed technique. *Acta Herpetologica*, 20(1): 29–39. [IF = 0.90; Q2 (Scopus)] https://doi.org/10.36253/a_h-16881.

Цитации (без автоцитирания): 0

Участия в научни форуми

- Доклад пред научно мероприятие в чужбина (участие в научна конференция в Белград, Сърбия „21st European Congress of Herpetology“ - Andonov K, Dyugmedzhiev A, Lukanov S, Vacheva E, Nedeltcheva-Antonova D, Naumov B. 2022. Differences in the composition of *Vipera ammodytes* (Linnaeus, 1758) and *Vipera berus* (Linnaeus, 1758) skin secretions. 21st European Congress of Herpetology. Belgrade, Serbia. p 162)
- Доклад пред научно мероприятие в страната с международно участие (Участие в Четвърти интердисциплинарен докторантски форум с международно участие, в Сандански, България; 16-19.05; Andonov K, Dyugmedzhiev A, Lukanov S, Vacheva E, Nedeltcheva-Antonova D, Naumov B. 2023. Chemical alphabet of snake skin lipids. 4th interdisciplinary PhD forum with international participation, Sandanski, Bulgaria)

11. Благодарности

Издавам искрени благодарности на моя научен ръководител проф. д-р Борислав Наумов, който със своя опит ме превеждаше през трудностите и предизвикателствата на дългото и сложно проучване. Специални благодарности издавам и на доц. д-р Ангел Дюгмеждиев, който имаше ключова роля за финансирането на научното проучване, изпълняване на голяма част от полевите дейности, както и концептуализацията на множество аспекти от него. Благодаря и на колегите доц. д-р Симеон Луканов, д-р Емилия Вачева, проф. д-р Георги Попгеоргиев, доц. д-р Владислав Вергилов, д-р Мирослав Славчев, Никола Станчев, Николай Тодоров и Деян Духалов, които участваха активно в различни аспекти на теренната и лабораторна работа. Издавам специални благодарности и на доц. д-р Даниела Антонова и Камелия Гечовска, които извършиха ключовите химични анализи, заемащи основна част от настоящата работа. Благодаря и на д-р Симеон Борисов, за съветите при оформянето на дисертацията. Основна част от

работата по проучването бе финансирана по проект към Фонд Научни Изследвания (ФНИ) с номер КП-06-Н21/11.

Summary

Many species of the family *Viperidae* have been the focus of diverse studies, yet information on their chemical communication, its relation to courtship behavior, and the morphology of the reproductive organs remains limited. In Europe, such research has mainly concerned the genus *Vipera*, providing data on courtship and intraspecific communication but not on the specific chemical components of pheromonal complexes. European species of the genus exhibit distinctive courtship behavior and elaborate mating rituals, which, together with the morphological characteristics of the male genitalia, make them a valuable model for studying chemical communication.

In the present work, the female genitalia of two *Vipera* species — *Vipera ammodytes* and *Vipera berus* — are described for the first time and compared with those of five other snake species inhabiting Bulgaria. In addition, the skin secretions of these two *Vipera* species are characterized for the first time and compared with the skin secretions of eleven other snake species, also newly described as part of this study. The role of long-chain, heavy, and low-volatility ketones in intraspecific communication and their participation in the female sex pheromone have been demonstrated, along with a description of the species' courtship behavior. Among the important findings of the dissertation is the absence of a statistically significant difference between the ketones identified in the skin secretions of male and female individuals, which opens avenues for further research.