

Міністерство освіти і науки України
Національний університет «Києво-Могилянська академія»
Факультет природничих наук

Кафедра біології
Магістерська робота
освітній ступінь - магістр

на тему «**ФІЛОГЕНІЯ ГЛАДКОНОСИХ КАЖАНІВ З ПІДРОДИНИ
VESPERTILIONINAE: РЕКОНСТРУКЦІЯ ЗА
ПОСЛІДОВНОСТЯМИ ГЕНІВ CYT B ТА RAG-2**»

Виконала: студентка 2-го року навчання
спеціальності 091 — біологія

Хижко Дарина Олександрівна

Керівники

Дзеверін І.І.,

доктор біологічних наук, зав. відділу еволюційної морфології
Інституту зоології ім. І.І.Шмальгаузена;

Гхазалі М.А.,

кандидат біологічних наук, ст.н.сп. відділу еволюційної
морфології

Інституту зоології ім. І.І.Шмальгаузена;

Єфіменко Т.С.,

кандидат біологічних наук, ст. викладач кафедри біології
НаУКМА

Рецензент Зіненко О.І., к.б.н., ст.викладач кафедри зоології та
екології тварин Харківського національного університету ім.
Каразіна

Магістерську роботу захищено
з оцінкою _____

Секретар ЕК _____

Пасічник Т.В.

«____» червня 20__ року
Київ – 2020

ЗМІСТ

	Стор.
ВСТУП _____	2
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ _____	5
1.1. Філогенетична реконструкція та особливості філогенетичного аналізу рукокрилих підродина <i>Vespertilioninae</i> _____	5
1.1.1. Використання послідовностей мітохондріальних та ядерних генів для реконструкції філогенії підродина <i>Vespertilioninae</i> _____	13
1.1.2. Необхідність методів філогенетичної реконструкції для виявлення закономірностей еволюційних процесів рукокрилих _____	16
1.2. Оцінка молекулярного годиннику _____	18
ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА _____	22
РОЗДІЛ 2. ОБ'ЄКТИ, МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ _____	22
2.1. Види підродина <i>Vespertilioninae</i> , використані для формування вибірки з послідовностей _____	22
2.1.1. Послідовності, використані для філогенетичної реконструкції _____	27
2.2. Філогенетична реконструкція дерев для видів роду <i>Nyctalus</i> та близьких родів підродина <i>Vespertilioninae</i> _____	28
2.3. Порівняння отриманих філогенетичних гіпотез _____	34
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ _____	36
3.1. Аналіз нуклеотидного складу та синонімічних і несинонімічних замін у послідовностях генів <i>Cyt B</i> та <i>RAG-2</i> видів підродина <i>Vespertilioninae</i> _____	36
3.1.1. Оцінка кореляції матриць еволюційних відстаней між послідовностями генів <i>Cyt B</i> та <i>RAG-2</i> _____	38
3.2. Філогенетичні гіпотези про родинні зв'язки видів підродина <i>Vespertilioninae</i> на основі послідовностей гена <i>Cyt B</i> _____	39
3.3. Філогенетичні гіпотези про родинні зв'язки видів підродина <i>Vespertilioninae</i> на основі послідовностей гена <i>RAG-2</i> _____	48
3.4. Порівняння філогенетичних гіпотез на основі ядерних та мітохондріальних дерев між собою _____	57
3.5. Філогенетичні гіпотези про час дивергенції найбільших клад на основі послідовностей <i>Cyt B</i> та <i>RAG-2</i> _____	59
3.6. Відповідність отриманих філогенетичних гіпотез літературним даним _____	61
УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ (короткий підсумок дослідження) _____	65
ВИСНОВКИ _____	71
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ _____	73
ДОДАТКИ _____	80

ВСТУП

Систематика та таксономія постійно змінюються, адже з'являються нові види, підвиди, деякі види зникають; розробляються нові методи для уточнення таксономії. Причому зміни у систематиці відбуваються швидше за процеси видоутворення в природі. Досягнення генетики та молекулярної біології дають змогу відтворити родинні зв'язки між видами та іншими таксами. Філогенетичні гіпотези будують на основі реконструкції родинних зв'язків, що дає змогу виявити близькі такси, уточнити дати їх дивергенції, виключити чи включити підвиди та види [1].

Сьогодні відомо понад 1300 видів рукокрилих. Щороку відкривають в середньому 15 видів рукокрилих, і багато філогенетичних гіпотез уточнюють [2].

Підродина *Vespertilioninae* є однією з 23 підродин рукокрих. Ця підродина включає 272 види кажанів, таксономія яких постійно перевіряється відповідно до того, як швидко розвиваються підходи до реконструкції родинних зв'язків [3, 4].

Одним із способів відтворити родинні зв'язки є побудова дерев на основі генетичних послідовностей.

Багато філогенетичних гіпотез побудовано на основі послідовностей із мітохондріальних та ядерних генів. «Мітохондріальні» дерева не у всіх випадках відображають реальні родинні зв'язки. А дерева, отримані за допомогою ядерних послідовностей, не завжди співпадають з деревами на основі мітохондріальних послідовностей [5, 6].

Значна частина філогенетичних дерев для рукокрилих побудована на основі або ядерного, або мітохондріального геному. Значно менше філогенетичних гіпотез сформовано, базуючись на ядерних та мітохондріальних послідовностях одночасно. Декілька досліджень було

присвячено реконструкції родинних зв'язків підродини *Vespertilioninae* в контексті ревізії родини *Vespertilionidae*. Деякі з цих досліджень включають аналіз філогенії на основі ядерних і мітохондріальних генів разом [7, 8].

Всі дослідження філогенії рукокрилих включають різну кількість видів, для них використовують різні гени. Накопичення цих даних позитивно впливає на розвиток напрямку філогенетичної реконструкції, зокрема біоінформатичними методами. Також це дає змогу порівнювати дерева на основі різних послідовностей та одержаних різними методами між собою. Все це наближає дослідників до формування єдиної гіпотези, яка відображатиме родинні зв'язки всередині підродини якомога більш достовірно.

В свою чергу результати філогенетичної реконструкції підродини рукокрилих можна використовувати з цією ж метою для інших видів тварин та навіть царств.

Виходячи з того, що між даними різних авторів є відмінності у родинних зв'язках підродини *Vespertilioninae*, а також з того, що не всі дослідження проводили включаючи як ядерні, так і мітохондріальні послідовності, була сформована унікальна вибірка з ядерних та мітохондріальних послідовностей різних видів підродини *Vespertilioninae*. До вибірок увійшли 42 послідовності гена цитохрому В (*Cyt B*) та 49 послідовностей гена білка RAG-2 (*RAG-2*), що належать відповідно 19 та 21 видам з різних локалітетів.

Метою дослідження є відтворення родинних зв'язків між видами *Vespertilioninae* на основі послідовностей генів *Cyt B* та *RAG-2*. Відповідно до мети було сформовано такі завдання:

1. Проаналізувати вибірки із послідовностей *Cyt B* та *RAG-2* щодо частот нуклеотидів та частот замін нуклеотидів, а також оцінити кореляцію еволюційних відстаней між послідовностями *Cyt B* та *RAG-2*.

2. Отримати по 3 різних дерева (без молекулярного годинника, з «м'яким» та «жорстким» молекулярними годинниками) для кожної вибірки, описати їх та порівняти ці дерева між собою.

3. Порівняти між собою дерева на основі ядерних та мітохондріальних послідовностей.

4. Порівняти дати дивергенції клад на основі дерев з «м'яким» та «жорстким» молекулярними годинниками.

5. Виявити види, положення яких вимагає уточнення родинних зв'язків.

Ця дослідження розширює розуміння родинних зв'язків між видами підродини *Vespertilioninae* та може бути використане для уточнення філогенії родів, що входять до підродини. Також порівняння різних дерев між собою – з молекулярними годинниками та без молекулярного годинника – дають змогу оцінити відмінності у топології дерев, що є наслідком різних підходів до реконструкції одних і тих самих видів. До того ж дерева з молекулярним годинником дають змогу оцінити приблизний час дивергенції.

Дослідження було виконане у відділі еволюційної морфології Інституту зоології ім. І.І. Шмальгаузена під керівництвом д.б.н. Дзеверіна Ігоря Ігоровича та к.б.н. Гхазалі Марії Ахмедівної.

Висловлюю вдячність за консультування під час написання та оформлення дипломної роботи Марії Ахмедівній Гхазалі, Ігорю Ігоровичу Дзеверіну та Тетяні Сергіївній Єфіменко.

РОЗДІЛ 1

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Філогенетична реконструкція та особливості філогенетичного аналізу рукокрилих під родини *Vespertilioninae*

Відповідно до різних ресурсів з систематики та таксономії кількість видів рукокрилих варіює від 1386 [2] до 1314 [3]. Зазначені бази даних оновлюються з різною періодичністю. Простежується тенденція до збільшення числа відомих видів рукокрилих. Зміна кількості видів є наслідком періодичних ревізій таксономії рукокрилих, відкриття нових видів та їх зникненням [2].

Відповідно до бази із систематики та таксономії “ITIS” під родина *Vespertilioninae* належить до родини *Vespertilionida*, під ряду *Yangochiroptera*, ряду *Chiroptera*, підкласу *Theria*, класу *Mammalia*. Під родина *Vespertilioninae* включає 41 рід, 272 види та 227 підвидів рукокрилих з 619 видів родини *Vespertilionida*. Ця родина містить 8 під родин. Під ряд *Yangochiroptera* включає 918 видів зі всіх 1314 видів ряду рукокрилих. Під родина за різними джерелами містить від 6 до 8 триб [3].

Протягом останніх десятиліть нові види рукокрилих знаходили частіше, ніж інші види ссавців. В середньому за рік у період з 1750 до 2017 років відкривали по 25 видів ссавців. З 2005 по 2013 роки було уточнено таксономічне положення близько 200 видів рукокрилих, з яких 120 видів – нові [2, 9]. Отже, в середньому 15 видів рукокрилих відкривають щороку.

Оскільки зміни у таксономії рукокрилих відбуваються постійно, це зумовлює перевірку родинних зв'язків. Цим питанням займається розділ біології – філогенія. Філогенія відображає еволюційну історію групи об'єктів. Цими об'єктами можуть бути види. Філогенетична реконструкція дає змогу відтворити

еволюційні взаємозв'язки між видами відносно їхнього останнього спільного предка. Таким чином можна зробити висновок про походження таксона (виду). Тип філогенетичного взаємозв'язку при походженні від одного спільного предка називають монофілетичним. Незалежне відокремлення від предка є поліфілетичним типом філогенетичного взаємозв'язку, і є результатом конвергентної еволюції. Парафілетичну групу таксонів відокремлюють від монофілетичної, і вона включає частину нащадків від останнього предка, об'єднану рисами, що характерні для більш давніх предків за останнього спільного, та рисами, що виникли у представників таксону незалежним чином одне від одного [10].

Перша класифікація родини Vespertilionidae, до якої входить підродина Vespertilioninae, була розроблена в середині минулого століття на основі порівняльного аналізу премолярів та іклів кажанів. Менш точні опис родинних зв'язків рукокрилих був виконаних ще на початку минулого століття та базувався на подібних морфологічних ознаках. До кінця XX століття систематика родини Vespertilionidae базувалась на морфологічних даних, зокрема на синапоморфних ознаках, за рахунок яких можливо ідентифікувати види підродина Vespertilionidae. Ці ознаки стосуються зубної формули. Наприкінці XX століття було здійснено декілька спроб класифікувати родину відповідно до результатів каріотипування без бендингу та каріотипування методом G-бендингу. Було зроблено висновок про те, що каріотипи видів родини Vespertilionidae проявляють сильну консервативність [11, 13].

Метод каріотипування шляхом GTG-бендингу дозволив перевірити систематичне положення деяких видів *Pipistrellus*, *Neoromicia* та *Eptesicus*. Серед 6 видів африканських пергачів *E.capensis*, *E.cf. melckorum*, *E.rendalli*, *E.somalicus*, *E.zuluensis* та *E.hottentotus* лише останній належить до роду *Eptesicus*. *E.rendalli*, *E.capensis*, *E.zuluensis* належать до роду *Neoromicia*. Цей рід був відокремлений від *Pipistrellus* та набув статусу справжнього роду відносно нещодавно за

результатами каріологічних досліджень, що продемонстрували наявність злиття хромосом, а саме робертсонівських транслокацій, які є диференціальною ознакою даного роду. *Hypsugo nanus* та *cf. melckorum* є видами роду *Neoromicia* [12].

Методом каріотипування 44-х хромосом було встановлено родинні зв'язки між 55 видами, що належать до 23 родів родини Vespertilionidae, до якої входить підродина Vespertilioninae. За результатами аналізу хромосомних перебудов було отримано декілька філогенетичних дерев на основі двох гіпотетичних каріотипів спільних предків родини, отриманих іншими дослідними групами в різний час [14, 15].

Myotini формує окрему підродину. Окремими родами було визнано колишні підроди *Pipistrellus*: *Falsistrellus*, *Vespadehs*, *Hypsugo*. Раніше зазначені 3 роди, а також *Arielulus*, *Neorornicia*, *Perirnyotis* вважали підродинами відповідно до результатів морфології *baculum*, кістки статевого члену. В дослідженні Vollet 2009 сучасний рід *Arielulus* відносять до роду *Eptesicus* в якості підвиду *E.circumdatus*. Всі зазначені колишні підроди вважаються окремими родами підродини Vespertilioninae у більшості сучасних даних із систематики та таксономії. *Scotozous dormeri* у даному дослідженні залишається невизначеним між приналежністю до роду *Pipistrellus*, або ж набуттям статусу окремого виду. Більш сучасна систематика розглядає цей вид як окремий та єдиний у роді. В рамках дослідження родинні зв'язки між підродинами *Eptesicini* та *Nycticeiini* не були остаточно аргументовані, не виключаючи попередню гіпотезу про їхній поліфілетичний зв'язок [3, 14].

Систематика родини Vespertilionidae за допомогою морфометричних та цитогенетичних методів залишає проблеми, що вирішуються молекулярними методами. Спірність приналежності деяких видів до/всередині родини Vespertilionidae, відокремлення її менших таксонів від більших груп та віднесення до окремих груп деяких рукокрилих, а також поява нових видів

створюють потребу періодичної ревізії філогенії даної родини та, зокрема, підродини Vespertilioninae. Порівняльний аналіз різних філогенетичних дерев не дає змогу сформувати остаточний висновок, оскільки такі дерева отримують різними методами. Це в свою чергу вимагає від дослідників більшої впевненості у надійності молекулярних та морфометричних методів. Схожість отриманих філогенетичних дерев, отриманих різними способами, дає підстави вважати використані методи надійними, проте таксономічна класифікація деяких родів та видів підродини Vespertilioninae не збігається. Частині таких видів, присвячені окремі дослідження, мета яких специфікована до ревізії положення конкретного виду в межах групи.

Наприклад, описаний з території В'єтнаму гладконосий кажан *Cassistrellus dismiss* спочатку було віднесено до роду *Eptesicus*. Згідно з результатом філогенетичної реконструкції за послідовностями мітохондріальної та ядерної ДНК цей вид потрапляє в групу з двома кладами, родами *Tylonycteris* та *Philetor*, а за морфологічними та екологічними особливостями він подібний до роду *Nyctalus*. Тим не менш реконструкція філогенезу дала змогу віднести цей рід в окрему кладу, що має спільного предка з родами *Tylonycteris* та *Philetor* [16].

Ревізія філогенії підродини Vespertilioninae також проводилась у дослідженнях, метою яких було встановлення філогеографії, аналіз екологічних особливостей *Nyctalus azoreum*, *Nyctalus plancyi*, *Falsistrellus petersi*, знайдених в різних частинах світу [17, 18].

Супер-дерево всіх родинних зв'язків в межах ряду рукокрилих на основі філогенетичних дерев, отриманих різними дослідниками з 1970-го року, показало те, що підродина Vespertilioninae є парафілетичною. Це заперечує попередню гіпотезу про монофілію підродини. Монофілія триби *Plecotini* зникає після додавання роду *Otonycteris*. Роди *Euderma*, *Idionycteris*, *Plecotus*, *Barbastella* проявляють спорідненість всередині триби. Монофілію проявляють також триби *Lasiurini*, *Nyctophilini*. Не зрозумілим є положення виду *Lasiurus egregius*. Триби

Myotini, *Vespertilionini*, *Nycticeiini* проявились на супер-дереві як парафілетичні. Парафілетичними є також роди *Chalinolobus*, *Eptesicus*, *Nycticeius*, *Pipistrellus*. Сестринські клади, які раніше вважали монофілетичними – клада з родами *Eudiscopus*, *Pipistrellus*, *Nyctalus*, *Glischropus*, *Laephotis*, *Philetor*, *Hesperoptenus*, *Chalinolobus* та клада з родами *Ia*, *Vespertilio*, *Histiotus*, *Tylonycteris*, *Mimetillus*, *Eptesicus* – виявились не монофілетичними, як вважають інші автори. Монофілію проявили роди *Arielulus*, *Falsistrellus*, *Neoromicia*, *Scotozous*, *Vansonia*, *Vespadelus*. Роди *Scotophilus* та *Scotomanes* в цьому аналізі вважають сестринськими до інших клад родини. А таксони *Nyctophilini*, *Antrozoidae*, *Rhogessa*, *Otonycteris*, *Plecotini* утворюють окрему кладу [4].

Проблема систематики підродини *Vespertilioninae* та її підродин зумовлена недостатньою кількістю та вираженістю фенотипних ознак, за якими можливо розділяти види між собою, наявністю ймовірної конвергенції між ознаками та швидким розходженням таксонів всередині підродини. Багато досліджень, метою яких було реконструювання філогенезу видів підродини *Vespertilioninae* базувались на аналізі та порівнянні послідовностей мітохондріальної ДНК. При цьому філогенетичні дерева, отримані на основі послідовностей ядерної ДНК можуть мати відмінності через різні темпи мутацій мітохондріальних та ядерних генів [7].

Різні підходи реконструювати філогенез підродини *Vespertilioninae* були здійснені в рамках досліджень по філогенетичній реконструкції родини *Vespertilionidae*. Одним з таких досліджень є аналіз послідовностей мітохондріальної ДНК (12S рРНК, тРНК^{Валін}, 16S рРНК) і використання їх для побудови філогенетичного дерева. Оскільки ядерна та мітохондріальна ДНК підлягають різним еволюційним темпам, вважають, що для більш точне дерево має базуватись на ядерних послідовностях також. Однак, мітохондріальних послідовностей було достатньо для встановлення того, що *Nycticeiini*, *Pipistrellini*,

Vespertilionini є окремимикладами всередині підродини Vespertilioninae, що попередньо піддавалось сумніву різними авторами в різний час [8].

Різними дослідними групами було секвеновано такі послідовності геному представників родини Vespertilionidae і, зокрема, підродини Vespertilioninae: ген нітрогендигідрогенези-1 (ND1), короткі дисперговані повтори (SINE), рибосомальні мітохондріальні гени, гени RAG-1 та RAG-2, мікросателіти, ген протеїн-кінази C, петля D, ген тиреотропіну, ген TLR-8, контрольна ділянка мітохондріальної ДНК, ген APOB, ген COI та інші. Ці послідовності викладені у вільний доступ у генетичному банку «Genbank».

Одна зі спроб встановити родинні зв'язки між трибами підродини Vespertilioninae була здійснена на основі аналізу послідовностей ядерної та мітохондріальної ДНК з акцентом на ревізію триб Antrozoini, Eptesicini, Lasiurini, Nycticeiini, Nyctophilini, Pipistrellini, Plecotini, Scotophilini, Vespertilionini [7].

Триби Antrozoini та Scotophilini не валідовані всередині підродини відповідно до систематики [3].

Для філогенетичної реконструкції триб Antrozoini, Eptesicini, Lasiurini, Nycticeiini, Nyctophilini, Pipistrellini, Plecotini, Scotophilini, Vespertilionini було одержано філогенетичні дерева за методом Баєса та за методом парсимонії на основі екзонів ядерних послідовностей (APOB, DMP1, RAG2), інтронів ядерних послідовностей (ген протеїн-кінази C, PRKCI, STAT5A, ген тиреопротейну) та мітохондріальних послідовностей (гени 12S рРНК, тРНК^{Валін}, 16S рРНК). Більше, ніж 90% клад співпали між деревами, отриманими за ядерними послідовностями та мітохондріальними. Суперечливим було положення виду *P.coromandra*. Цей вид входить в одну кладу з *P.javanicus* відповідно філогенезу за ядерними послідовностями, але відповідно до мітохондріальних послідовностей він утворює кладу з *P.tenuis*. Була перевірена і доведена монофілія триби Lasiurini. Однак міжвидові зв'язки роду *Lasiurus* всередині клад на двох деревах відрізнялись. Комбінація обох дерев, отриманих двома способам на основі різних

послідовностей, виявила 6 відомих триб (*Antrozoini*, *Lasiurini*, *Scotophilini*, *Vespertilionini*) та дві групи *Hypsugo*-подібні та *Perimyotis*-подібні в підродині *Vespertilioninae*. До останньої включений рід *Parastrellus*, а до гіпсуг – *Hypsugo*, *Neomircia*, *Chalinolobus*, *Laephotis*, *Vespadelus*, *Tylonycteris*. Відокремлення цих груп є гіпотетичним, але закріпленим попередніми морфометричними способами реконструювати філогенез рукокрилих. Багато сучасних досліджень не надає статусу триби групі *Nycticeiini*. В дослідженні група формує окрему кладу на комбінованій філограмі, однак не підтримується статистично. Група видів *Barbastella*, *Corynorhinus*, *Euderma*, *Idionycteris*, *Plecotus*, *Baeodon*, *Nycticeius*, *Otonycteris*, *Rhogeessa*, *Nyctophilus*, *Histiotus*, яка визнається як триба *Plecotini* багатьма авторами, займає сумнівну позицію щодо її приналежності до підродини на комбінованій філограмі в цьому дослідженні. Таким чином монофілія *Plecotini* не заперечується, але й не є доведеною. Ймовірними причинами цьому можуть бути рання та швидка радіація групи від пулу спільних предків підродини, що в свою чергу не дало змогу досліджуваним генами накопичити достатньо синапоморфних ознак. Саме тому існують сумніви вважати трибу *Plecotini* разом з іншими трибами підродини *Vespertilioninae* монофілетичною [7].

Аналіз послідовностей мітохондріального гена *ND1*, ядерного гена Фактору ван Віллебрандта та послідовностей *SINE* продемонстрував на філогенетичному дереві монофілію триби *Plecotini*, а також *Pipistrellini* в рамках дослідження філогенезу родини *Vespertilionidae* [19].

Нетопирів (*Pipistrellus*) та пергачів (*Eptesicus*) відрізняють за відсутністю в останніх 2-го верхнього премоляра. Каріотипування дозволяє відокремити ці групи за кількістю хромосом: 55 хромосом у нетопирів та 44 і менше хромосом у пергачів. Однак, часто класифікація видів цих родів за формулою зубів не збігається з результатами каріотипування. Зважаючи на це, деякі дослідники поділяють роди нетопирів та пергачів на підроди. Існує також проблема з

таксоном *Neoromicia capensis*, яку іноді відносять до роду *Pipistrellus* [2, 12, 20, 21].

Eptesicus disimuss – це рідкісний вид кажанів, що зустрічається у Тайланді. Він був віднесений до роду пергачів на початку минулого століття, однак, сучасні дослідження з використанням методів молекулярної біології свідчать про приналежність цього виду до родів *Tylonycteris* або *Hypsugo*. В рамках досліджень цих видів також було здійснено ревізію філогенії підродини *Vespertilioninae* [21, 22].

Відповідно до аналізу послідовностей мітохондріальних генів цитохрому В, нітрогендегідрогенази-1 та ядерної послідовності гена CR серед 75 геномів сімох видів кажанів роду *Nyctalus* було відокремлено 20 гаплотипів та створено філогенетичне дерево з надійною монофілією. Дивергенція використаних послідовностей між *N.lasiopterus* та *N.aviator* оцінена в 4%, *N.lasiopterus* та *N.noctula* – 6%, послідовності групи *N.leisleri* та *N.azoreum* на 15% відрізняються від послідовностей більших за розмірами видів *Nyctalus*, група *N.leisleri* та *N.azoreum* від *N.plancyi* – на 17%. Таким чином, окрему кладу складають *N.leisleri* та *N.azoreum*, інші клади – *N.noctula*, *N.lasiopterus*, *N.aviator*. Найбільшим чином генетично відрізняється *N.plancyi*, що утворює окремо гілку, яка в свою чергу розходиться у вузлі зі всіма іншими видами. Інші автори також відзначають те, що *N.plancyi* має найменше спільних генетичних ознак з іншими видами роду. *N.noctula*, *N.lasiopterus*, *N.aviator* формують групу із клад, що має спільного предка з групою, сформованою кладою із двох видів - *N.leisleri* та *N.azoreum*. Всередині групи з *N.noctula*, *N.lasiopterus*, *N.aviator* дивергенція від спільного предка відбулась на кладу *N.noctula* та кладу *N.lasiopterus* з *N.aviator*, які в свою чергу також проявляють дивергенцію [17, 23].

Філогенез рукокрилих роду *Nyctalus* на основі генетичної інформації здійснювали в межах ревізії філогенетичних зв'язків підродини *Vespertilioninae*, або родини *Vespertilionidae*, в яку входить зазначена підродина. Найбільш

інформативним було відтворення родинних зв'язків між видами *N.leisleri*, *N.azoreum*, *N.lasiopterus*, *N.noctula*, *N.aviator* та *N.plancyi* з метою прояснити походження азорійської вечірниці [7, 8, 12, 14, 16, 17, 23, 24].

Фенограма, побудована на основі даних морфометрії для видів роду вечірниць, свідчить про той самий висновок щодо спорідненості видів *N.noctula*, *N.lasiopterus* та *N.aviator*. Особини рудої вечірниці з Азії та Європи формують окремі гілки на фенограмі. Це є результатом відмінностей у розмірах їх тіла та, зокрема, у розмірах черепа. *N.azoreum* та *N.leisleri* формують окремі монофілії, але входять до іншої клади, з іншим спільним предком, відмінним від предка більших вечірниць [25].

Методи молекулярної біології дозволяють реконструювати філогенез рукокрилих, і отримані дерева здебільшого збігаються з подібними філогенетичними деревами, отриманими на основі морфометричних досліджень. Однак, кожен метод має свої недоліки, зокрема, це стосується якості даних, отриманих шляхом сиквенсу. Недоліки експериментів у поєднанні з особливостями еволюції рукокрилих не дають змогу зробити остаточний висновок про систематику деяких видів підродини *Vespertilioninae*.

1.1.1. Використання послідовностей мітохондріальних та ядерних генів для реконструкції філогенії підродини *Vespertilioninae*. Топологію філогенезу можна відтворити за допомогою послідовностей мітохондріального геному, але дерева, отримані таким шляхом, не завжди співпадають з реальними філогенетичними деревами, тобто вони можуть не відображати реальні родинні зв'язки. Деревя, отримані за допомогою ядерних послідовностей, теж не завжди співпадають з деревами на основі послідовностей ДНК мітохондрій [5, 6].

Артефакти у філогенетичній реконструкції можуть бути також спричинені слабким філогенетичним сигналом, малою роздільною здатністю. Останнє може призвести до того, що деякі вузли філогенетичного дерева міститимуть політомії. В свою чергу низький філогенетичний сигнал та мала роздільна здатність дерева

можуть бути наслідком невідповідності між характером еволюції мітохондріального та ядерного геномів [26, 27]

Такі розходження у результатах філогенетичного аналізу можуть бути зумовлені особливостями однобатьківського успадкування геному мітохондрій, тобто успадкування по лінії матері, а також низькими темпами рекомбінації. Це призводить до того, що характер еволюції геному мітохондрій певного виду може відрізнитись від еволюції виду в цілому. У випадку, якщо досліджуваний ген еволюціонує повільніше, ніж відбувається спеціалізація виду, або досліджують малу частину з його загальної послідовності, це може призвести до виявлення недостатньої кількості синапоморфій [5, 27, 28].

При цьому темпи еволюції мітохондріального геному більші за темпи еволюції ядерного геному, зокрема, за рахунок більшого числа замін. Саме тому геном мітохондрій містить більше варіабельних сайтів. Втім, це не дає підстав використовувати лише послідовності мітохондріального геному, адже це збільшує ризик виявлення гомоплазій, які є результатом великої кількості мутацій в одному локусі (saturation). А це в свою чергу зменшує філогенетичний сигнал, адже дає підстави для віднесення різних таксонів в одну групу [6].

Розходження в результатах філогенетичного аналізу було виявлено на послідовностях геномів багатьох видів тварин, зокрема, рукокрилих. Древа на основі ультраконсервативних послідовностей (UCE) ядерного та мітохондріального геномів *Myotis* та аут-груп мають різні топології. В ході аналізу було сгенеровано багато дерев, як на основі послідовностей ядерного, так і на основі послідовностей мітохондріального геномів. Відмінності в топології між деревами одного маркера є, однак вони утричі менші за відмінності в топологіях дерев різних маркерів (ядерного та мітохондріального) [5].

Топологія філогенетичних дерев на основі мітохондріальних послідовностей згаданого вище дослідження збігається з результатами аналізу філогенезу на основі генів ДНК мітохондрій інших авторів. Однак, проблема розбіжностей між

еволюцією ядерної та мітохондріальної ДНК існує, і це впливає на прояв родинних зв'язків у спробах реконструювати їх. До зазначених у попередньому пункті причин можна додати також ймовірну інтрогресивну гібридизацію та еволюційну ретикуляцію між особинами різних видів чи родів. Інтрогресивна ретикуляція характерна для видів рукокрилих у період роїння, коли одну територію можуть поділяти декілька видів. В минулому це спричиняло випадки генетичного дрейфу між видами роду *Myotis* під час їх дивергенції. Відмінності в топологіях дерев, зумовлені різним характером еволюції ядерної та мітохондріальної ДНК, можуть бути пояснені неповним розходженням генеалогічних ліній, за яких реальні родинні зв'язки можуть не співпадати зі сценарієм еволюції досліджуваного гена. Причинами цьому є різні темпи закріплення певної ознаки (гена) видом та темпи спеціалізації виду. Особливо сильні ці фактори впливають на картину філогенезу тих видів, дивергенція яких відбувалась порівняно швидко [5].

Розбіжності у топологіях філогенетичних дерев існують для багатьох видів досліджуваних тварин. Це спричинило критику обмеженого використання послідовностей мітохондріальної ДНК для філогенетичних аналізів. Надійність філогенетичного дерева є результатом того, що алелі особин виду є так само монофілетичними, як і сам вид. Однак, іноді алелі особин різних видів більш подібні між собою за алелі всередині виду. Таким чином це призводить до наявності парафілій та поліфілій у філогенетичному дереві [6, 27].

Спостерігають тенденцію у тому, наскільки інтенсивно досліджується таксон та кількістю поліфілетичних груп всередині нього. Існує негативна кореляція між повнотою таксономічних даних та кількістю випадків поліфілії. Це, ймовірно, є результатом того, що систематика таксонів, яким присвячено мало досліджень, містить багато помилок. Статистична перевірка методом бутстрепінгу філогенезу видів на основі мітохондріальних послідовностей показала, що більше 70% досліджуваних клад проявляють поліфілію [27].

Сприятливим ефектом аналізу філогенії на основі мітохондріальних послідовностей є те, що інтрогресія мітохондріальних генів охоплює весь геном, оскільки рекомбінація відсутня. Принаймні, ефект інтрогресії поширюється майже на весь геном мітохондрії. З цієї точки зору мітохондріальний геном підходить для аналізу гібридизації [29].

Використання послідовностей ядерного геному також має недоліки. В цьому випадку на зменшення філогенетичного сигналу можуть впливати гетерозиготність; низькі темпи заміни; мала кількість копій, що ускладнює аналіз технічно; велика кількість копій паралогів [6, 30].

Таким чином використання виключно послідовностей мітохондріального геному, або навпаки – ядерного, може призводити до результату, який не відображає реальних родинних зв'язків, а демонструє сценарій еволюції конкретних генів.

1.1.2. Необхідність методів філогенетичної реконструкції для виявлення закономірностей еволюційних процесів рукокрилих. Ряд рукокрилих містить найбільшу кількість видів після ряду гризунів серед ссавців. Різні таксони рукокрилих набули унікальних спеціалізацій завдяки пристосувань до способу харчування та екологічним вимогам. Число подвійного набору хромосом різних видів рукокрилих варіює від 14 до 62 [31, 32, 33, 34, 35].

Рукокрилі є цікавими об'єктами для досліджень у сфері імунології та еволюції. Зокрема, увагу дослідників привертає набуття рукокрилими здатності до ехолокації, специфічний імунітет та високий рівень метаболізму [31, 33].

Філогенетична реконструкція може бути здійснена на основі морфологічних даних, зокрема на краніометричних та формулі зубного ряду. Іноді результати морфометрії та молекулярного аналізу відображають різні топології філогенетичних дерев, про що йшлося у попередніх пунктах. Однак, часто результати філогенетичного аналізу як за фенотипними, так і за генетичними даними співпадають. Зокрема, це було показано для роду *Myotis*, а саме підвидів

M. formosus watasei та *M. adversus taiwanensis*. Дані сиквенсу послідовностей гена цитохрому В та краніодентичні ознаки дали однаковий результат філогенії. До того ж в ході аналізу було виявлено два неназваних таксони, які не увійшли у жодну з клад філогенетичного дерева. Таким чином можна припустити про виявлення нових підвидів, або видів, що характерно для рукокрилих. В місцях з високим біорізноманіттям часто відкривають криптичні види [36].

Деякі види рукокрилих проявляють консервативний каріотип, але водночас відрізняються за ознаками, що розвивались конвергентно або паралельно [37, 38].

Це зумовлює розбіжності у результатах філогенетичного аналізу та створює потребу у порівняльному аналізі наявних гіпотез про родинні зв'язки рукокрилих. Створення одного дерева на основі комбінації наявних філогенетичних дерев, що включають різні таксони ряду рукокрилих, показало те, що загальна роздільна здатність дерева не перевищувала 50%, в той час як роздільна здатність дерев родинних зв'язків деяких родин дорівнювала 100%. Це може бути наслідком нерівномірної кількості даних про різні таксони рукокрилих, різною якістю сиквенсів [4].

Зважаючи на високе біорізноманіття рукокрилих, наявність невирішених проблем систематики кажанів, виявлення нових видів та підвидів, а також велику кількість криптичних видів методи молекулярної біології, а також морфометрії можуть бути застосовані окремо, або в комплексі, для перевірки та встановлення родинних зв'язків між різними групами рукокрилих.

1.2. Оцінка молекулярного годиннику

Гіпотеза про молекулярний годинник вказує на наявність відносно сталих темпів еволюції послідовностей ДНК, чи білків. Одним з наслідків цієї гіпотези є припущення про те, що генетична відстань між двома видами з моменту їхнього останнього спільного предка пропорційна темпу молекулярного годинника.

Таким чином, молекулярний годинник дає можливість визначити швидкість еволюції [39, 40].

Припускали, що темп закріплення нейтральних мутацій в популяціях (темپ замін) збігається з темпом появи нових мутацій в особин популяції (темپ мутацій). Тобто якщо швидкість мутацій однакова для різних видів, темп замін на філогенетичному дереві – постійний. Однак, це не збігається з реальними значеннями темпів замін серед різних організмів – вони відрізняються [39, 40, 42].

Перше припущення є основою одного з підходів до оцінки молекулярного годинника – «жорстокого» (strict molecular clock). Молекулярний годинник, який передбачає різні темпи замін для різних гілок – «м'якого» (relaxed molecular clock). В свою чергу є декілька підходів до «релаксованого» молекулярного годинника. Перший підхід передбачає те, що темпи можуть змінюватись з часом та відрізняються для різних організмів. При цьому ці темпи співвідносяться з середнім значенням. Другий підхід передбачає незалежні від середнього значення темпи замін, зважаючи на те, що швидкість молекулярної еволюції залежить від багатьох факторів. Зокрема, від рівня обміну речовин. Тим не менш, є свідчення на противагу взаємозв'язку рівня обміну речовин та темпів еволюції. Вважається, що менші за масою види тварин накопичують молекулярні зміни швидше за ті види, які мають велику масу тіла. Існують експериментальні докази, що відхиляють цю гіпотезу. Деякі автори припускають, що ця гіпотеза справедлива не для всіх генів [39, 43].

Застосування Баєсової статистики до оцінки молекулярного годинника навело на висновок про недоцільність оцінки молекулярного годинника для віддалених ліній. Адекватні оцінки молекулярного годинника справедливі лише для вибірок з близьких такс [40].

Для того, щоб побудувати філогенетичне дерево з оцінками часу дивергенції – молекулярним годинником – необхідно застосувати калібрувальні точки. В

якості калібрувальних точок можна використати декілька типів дат. Можна використовувати датування викопних решток. В такому випадку час дивергенції буде оцінений як апріорна ймовірність. Інший тип – фактичні дати дивергенції видів. Інший варіант калібрувальної точки – час геологічної події, пов’язаної з дивергенцією такс. Наприклад, утворення географічного бар’єру. Також можна застосувати оцінки темпів замінів [39, 41].

Оцінка молекулярного годинника ускладнена тим, що інформації, яку можна використати в якості калібрувальних точок, вкрай мало. Зокрема, досі знайдено мало викопних решток в порівнянні з іншими групами тварин. Велика кількість криптичних видів та багато сумнівів з приводу філогенії рукокрилих теж ускладнюють визначення часу дивергенції для багатьох видів. Таким чином, для багатьох такс відсутні дані про час та темпи їх диверсифікації [44].

Оцінка молекулярного годинника на основі філогенетичних дерев, згенерованих на основі Баєсової статистики, ускладнена також тим, що використовуються дані про генетичні відстані (сиквенси), які є наслідком часу та темпів диверсифікації. А даних про час дивергенції такс, що нас цікавлять, вкрай мало. Таким чином, для побудови дерева з молекулярним годинником необхідно використати наявні вхідні дані (priors), кількість яких сильно обмежена, а саме від них залежить точність апріорно ймовірних дат [40].

В Баєсовій статистиці проблема недостатньої кількості інформації долається кількістю моделей на їх основі. Чим більше моделей на основі сиквенсів буде згенеровано, тим більш правдоподібними будуть результати. Однак, якщо задачею є визначення часу дивергенції, то кількість локусів та їх максимально повної довжини не вирішують проблему. Без адекватної кількості калібрувальних точок апостеріорні оцінки часу не збігаються з реальними, що призводить до великої кількості неточностей. Окрім кількості калібрувальних точок, значення має їх точність, і часто це стає предметом детальної перевірки до сумлінності авторів, які надають інформації про точки. Як висновок, на точність

оцінки молекулярного годинника впливає більшою мірою кількість якісних калібрувальних точок, а не кількість і повнота сиквенсів. Тим не менш, за критично недостатньої кількості сиквенсів точність годинника теж зменшується [40, 45].

Для деяких такс рукокрилих знайдено досить багато у порівнянні з іншими таксами вивчених решток. Наприклад, для роду *Myotis*. На основі знайдених решток *M.nattereri* та *M.schaubi* вдалось зробити припущення про їхнього останнього спільного предка у верхньому міоцені (6 мільйонів років тому). Відповідно до аналізу їхні сиквенси генів цитохрому Б та нітроген-дегідрогенази 1 відрзняються на 29,1%. Використовуючи ці дані, вдалось зробити висновок про те, що гени набувають 4,8% змін за мільйон років [37].

Вважають, що використання «м'якого» молекулярного годинника більше підходить у випадках, коли дослідник має справу з такими сиквенсами, щодо яких має сумніви, або використовує значну кількість різних генів чи видів. «М'який» годинник також забезпечує більш широкі апостеріорні часові інтервали. «Жорсткий» годинник краще підходить для тих випадків, коли стандартне відхилення (σ) логарифму темпу гілки $<0,1$ (0,1 заміна/сайт/мільйон років). Недоречно використовувати годинник у випадках, коли логарифм темпу гілки $>0,1$. «Жорсткий» молекулярний годинник підходить для дерев з «неглибоким» корінням, адже в такому випадку спостерігається не значна різниця в темпах між різними гілками. Виходячи з цього, «жорсткий» годинник підходить для ліній, які розійшлись нещодавно. Різниця в результатах часу дивергенції гілок між «м'яким» та «жорстким» годинниками зростає зі збільшенням значення квадратного відхилення (σ^2) між групами у вибірці. Тобто якщо між різними групами різниця між темпами на значна, «м'який» та «жорсткий» годинники теж не сильно відрізняються. У випадках, коли дослідник хоче визначитись з одним з двох видів молекулярного годинника, можна застосувати LTR-тест (likelihood ratio test) [46, 47].

Отже, основною проблемою для отримання молекулярних годинників, максимально найближених до реальних, є відсутність достатньої кількості інформації, яку можна використати в якості калібрувальних точок. У випадках, коли стоїть вибір між «м'яким» та «жорстким» молекулярними годинниками варто зважати на різницю між темпами еволюції різних гілок, якщо дані про це доступні.

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛ ТА МЕТОДИ

2.1. Види підродини *Vespertilioninae*, використані для формування вибірки з послідовностей

Було проаналізовано послідовності 21 виду для гена *Cyt B* та 19 видів для гена *RAG-2* підродини *Vespertilioninae*. До вибірок із ядерних та мітохондріальних послідовностей увійшла різна кількість особин із різних локалітетів (таблиці 2.1, 2.2).

Таблиця 2.1

Види, *Cyt B* - послідовності яких були використані для аналізу

Вид	Кількість особин	Походження	Номери “GenBank”
<i>Nyctalus noctula</i>	5	Філіпіни, Іберійський півострів, Швейцарія	JX570902.1, AJ841967.1, DQ120872.1, DQ120873.1, JF318988.1
<i>Nyctalus lasiopterus</i>	3	Філіпіни, Іберійський півострів	JX570900.1, DQ120867.1, DQ120868.1

Продовження таблиці 2.1

<i>Nyctalus leisleri</i>	3	Філіпіни, Іберійський півострів, Швейцарія	JX570901.1, AF376832.1, DQ120875.1
<i>Nyctalus plancyi</i>	3	Філіпіни, Китай	DQ435073.1, JX570903.1, JX570904.1
<i>Pipistrellus kuhlii</i>	2	Македонія, Іран	AJ504444.1, AJ504445.1
<i>Pipistrellus pygmaeus</i>	2	Македонія, Кіпр	AJ504441.1, AJ504442.1
<i>Pipistrellus nathusii</i>	1	Швейцарія	AJ504446.1
<i>Pipistrellus pipistrellus</i>	3	Греція, Швейцарія, Іран	AJ504443.1, DQ630431.1, KF874512.1
<i>Perimyotis subflavus</i>	1	США	AJ504449.1
<i>Pipistrellus javanicus</i>	1	В'єтнам	KX496357.1
<i>Pipistrellus hesperidus</i>	2	Мадагаскар, Швейцарія	AJ841968.1, KM886086.1
<i>Vespertilio murinus</i>	2	Японія, Швейцарія	AF376834.1, AB287355.1
<i>Tylonycterus pachypus</i>	1	Китай	EF517313.1

Продовження таблиці 2.1

<i>Hypsugo savii</i>	1	Конго	AJ504450.2
<i>Neomircia capensis</i>	2	Ефіопія, Південна Африка	KX184825.1, KX548066.1
<i>Neomircia nanus</i>	2	Ефіопія, Південна Африка	EU797428.1, KM886076.1
<i>Arielulus circumdatus</i>	1	Республіка Конго	MF038474.1
<i>Eptesicus serotinus</i>	2	Азербайджан, Росія	EU751000.1, GQ272577.1
<i>Eptesicus fuscus</i>	2	США, Конго	AF376835.1, MF038479.1
<i>Lasiopterus noctivagans</i>	1	США	KC747682.1
<i>Scotomanus ornatus</i>	1	Китай	DQ435069.1
<i>Chalinolobus neocaledonicus</i>	1	Республіка Конго	MF038472.1

Таблиця 2.2

Види, RAG-2 - послідовності яких були використані для аналізу

Вид	Кількість особин	Походження	Номери "GenBank"
<i>Nyctalus noctula</i>	2	Філіпіни, Швейцарія	HM561658.1, JX570918.1
<i>Nyctalus lasiopterus</i>	1	Філіпіни	JX570916.1
<i>Nyctalus leisleri</i>	2	Пакістан, Філіпіни	HM561657.1, JX570917.1
<i>Nyctalus plancyi</i>	3	Філіпіни	JX570919.1, JX570921.1, JX570920.1
<i>Pipistrellus kuhlii</i>	3	Іберійський півострів, Мароко	DQ120829.1, DQ120830.1, EU360605.1
<i>Pipistrellus pygmaeus</i>	1	Іспанія	GU328107.1
<i>Pipistrellus nathusii</i>	1	Швейцарія	HM561660.1
<i>Pipistrellus pipistrellus</i>	2	Швейцарія, Іберійський півострів	HM561662.1, DQ120831.1
<i>Perimyotis subflavus</i>	1	США	GU328103.1

Продовження таблиці 2.2

<i>Pipistrellus javanicus</i>	3	Філіпіни	GU328105.1, JX570925.1, JX570926.1
<i>Pipistrellus hesperidus</i>	4	Синегал, Південна Африка	NM561659.1, JX276355.1, JX276346.1, JX276358.1
<i>Vespertilio murinus</i>	3	Філіпіни, Швейцарія	NM561676.1, EU786916.1, JX570929.1
<i>Tylonycterus pachypus</i>	2	Філіпіни, В'єтнам	NM561672.1, JX570928.1
<i>Hypsugo savii</i>	3	Іберійський півострів, Мароко, Швейцарія	NM561667.1, DQ120823.1, DQ120824.1
<i>Neomircia capensis</i>	1	Синегал	JX276347.1
<i>Neomircia nanus</i>	4	Південна Африка, Синегал	GU328062.1, JX276349.1, JX276352.1, JX276353.1
<i>Eptesicus serotinus</i>	4	Греція, Туніс, Іберійський півострів, невідоме	KF018941.1, KF018938.1, KF018939.1, KF018954.1

Продовження таблиці 2.2

<i>Eptesicus fuscus</i>	4	США, Респібліка Конго, невідоме	GU328058.1, EU786912.1, EU786913.1, MF038339.1
<i>Lasiopterus noctivagans</i>	1	США	GU328065.1
<i>Scotomanus ornatus</i>	2	Республіка Конго, Філіпіни	MF038345.1, JX570927.1

2.1.1. Послідовності, використані для філогенетичної реконструкції.

Філогенетична реконструкція була здійснена на основі послідовностей ядерного та мітохондріального геномів, доступних у генетичному банку “GenBank” [48]:

- Послідовності мітохондріального гену цитохрому В (CytB)
- Послідовності ядерного гена білка RAG-2

У вибірку увійшли роди та види підродини Vespertilioninae, сиквенси яких були доступні у “GenBank” (таблиця 2.3).

До кожного виду було обрано послідовності різної довжини:

- Для гену *Cyt B* – від 404 п.н. до 1140 п.н.
- Для гену *RAG-2* – від 749 п.н. до

Кількість послідовностей, обраних для роботи:

- 42 послідовності гена *Cyt B*
- 49 послідовностей гена *RAG-2*

Таблиця 2.3

Характеристика послідовностей генів, використаних в аналізі

Ген	Довжина гену, п.н.	Максимальна довжина доступної послідовності, п.н.	Мінімальна довжина доступної послідовності, п.н.	Кількість послідовностей, використаних для аналізу
<i>CytB</i>	1140	1140	404	42
<i>RAG-2</i>	1602	1286	507	49

Для дослідження було обрано по декілька послідовностей різних авторів з максимально наближеними до повних довжинами сиквенсів. Вибірки з видів для обох генів містили різну кількість особин всередині однакових видів.

2.2. Філогенетична реконструкція дерев для видів роду *Nyctalus* та близьких родів підродини *Vespertilioninae*

Для відтворення родинних зв'язків між видами роду *Nyctalus* та іншими видами підродини *Vespertilioninae* були використані біоінформатичні методи. На основі послідовностей 2 генів, доступних у генетичному банку “GenBank”, було виконано їх автоматичне множинне вирівнювання та корекція отриманих вирівнювань вручну.

Вирівнювання було виконане за допомогою програмного забезпечення “MEGA-X” [49] із застосуванням алгоритму “Muscle” [50].

Було знайдено кількості несинонімічних та синонімічних замін для кожної з послідовностей *Cyt B* та *RAG-2* у програмному забезпеченні “MEGA-X” за допомогою опції “Compute Pairwise Distances”. Отримані значення було

використано для розрахунку співвідношення k_a/k_s (ω), тобто несинонімічних до синонімічних заміन. Розрахунки було виконано у програмі “Excel” [51].

В “Excel” також були пораховані середні арифметичні значення k_a/k_s для вибірок з послідовностей *Cyt B* та *RAG-2*. Отримані значення були використані для виявлення корисних мутацій та напрямку добору.

Еволюційні відстані між видами були розраховані за допомогою опції були оцінені як кількість замін на сайт, усереднена між всіма парами послідовностей між видами. Це було виконано у програмі “MEGA-X” Відмінностями вважаються всі заміни: транзиції та трансверсії у всіх позиціях кодонів, в тому числі – у некодуючих частинах послідовностей. Статистичний метод, на основі якого було отримано оцінки еволюційних відстаней – метод максимальної складеної правдоподібності (Maximum Composite Likelihood).

Кореляцію між матрицями з генетичних відстаней на основі послідовностей *Cyt B* та послідовностей *RAG-2* було оцінено непараметричним тестом Мантеля у програмному забезпеченні “Past 4.02” [52]. Задано число перестановок (permutation) = 5000.

Було побудовано по 3 дерева для кожного з вирівнювань, що було головною задачею цього дослідження.

Загалом, було реконструйовано 6 дерев. Для кожного з генів – мітохондріального гену цитохрому В (*Cyt B*) та ядерного гену білка *RAG-2* – було побудовано стандартне дерево без молекулярного годинника (non-clock standart tree), дерево з «жорстким» молекулярним годинником (strict-clock tree), дерево з «м'яким» молекулярним годинником (relaxed-clock tree). Для дерев з молекулярним годинником було підібрано калібрувальні точки, що відповідають датам дивергенції окремих такс.

В якості калібрувальних точок було обрано 4 дати про дивергенцію видів, одержаних іншими авторами (таблиця 2.4).

Таблиця 2.4

Калібрувальні точки для дерев з молекулярним годинником

Дивергенція такс	Дата, мільйонів років току	Джерело
Роди <i>Eptesicus</i> та <i>Scotomanus</i>	23	[53]
Види <i>Eptesicus serotinus</i> та <i>Eptesicus fuscus</i>	11, 14	[53]
Роди <i>Vespertilio</i> та <i>Tylonycteris</i>	15, 5	[54]
Види <i>Pipistrellus</i> <i>pipistrellus</i> та <i>Pipistrellus</i> <i>pygmaeus</i>	6	[55]

Для кожного з дерев було задано модель заміни нуклеотидів, яку було підібрано у програмному забезпеченні “MEGA-X”. Моделі було підібрано за допомогою опції “Find Best DNA/Protein Model (ML)” на основі найменших значень Баєсового інформаційного критерія (BIC) (таблиця 2.5).

Таким чином, для послідовностей гену цитохрому В (мітохондріального дерева) було підібрано модель заміни нуклеотидів “GTR+G+I”, а для послідовностей гену білка RAG-2 було підібрано модель “GTR+G”. Для цих моделей також були розраховані частоти нуклеотидів та замін (додаток 1, додаток 2).

В ході підбору підходящої моделі замін було отримано значення частот кожного нуклеотиду та частот замін для вибірки з ядерних послідовностей та для вибірки з мітохондріальних послідовностей.

Таблиця 2.5

Характеристика оцінки моделей, обраних для реконструкції дерев

Ген	Модель	Кількість Параметрів	BIC	Gamma	Invariant
<i>Cyt B</i>	GTR+G+I	93	24908,6	1,9	0,5
<i>RAG-2</i>	GTR+G	100	13430,6	0,8	n/a

Дерева було побудовано на основі підходів Баєсової статистики. При цьому розраховується апостеріорна ймовірність дивергенцій методами Монте-Карло для ланцюгів Маркова.

Дерева для послідовностей гену *Cyt B* без молекулярного годинника було побудовано за допомогою двох програм – “Mr.Bayes 3.2.7” [56] на власному комп’ютері та на порталі “CIPRES” [57] в опції “Mr.Bayes 3.2.7 on XSED”. Час виконання у встановленій програмі “Mr.Bayes 3.2.7” на 93% довший, ніж на потужностях серверів “CIPRES”. Дерева, отримані обома способами не мали відмінностей, тому у роботі представлено дерево, реконструйоване у порталі “CIPRES”. Дерево для послідовностей гену білка RAG-2 без молекулярного годинника було побудовано на порталі “CIPRES”, використовуючи можливості “Mr.Bayes 3.2.7 on XSED”.

Для обох видів дерев без молекулярного годинника - як мітохондріального, так і ядерного - було задано однакові параметри (таблиця 2.6).

Таблиця 2.6

Задані параметри програми “Mr.Bayes 3.2.7” для побудови дерев без
молекулярного годинника

Вид дерева	Кількість прогонів	Кількість ланцюгів	Burn in	Кількість поколінь	Частота підбору вибірки
RAG-2	2	4	25%	2000000	Кожне 10-те покоління
Cyt B	2	4	25%	2000000	Кожне 10-те покоління

Примітка:

Burn in – рання фаза прогону ланцюгу Маркова, що відповідає відсотковій кількості вибірок, які будуть виключені із аналізу.

Дерева з молекулярним годинником – «м’яким» (relaxed clock) та «жорстким» (strict clock) - було отримано у програмному забезпеченні “BEAST v.1.10.4” [58]. Для обох типів даних – мітохондріальних та ядерних – було задано однакові параметри (таблиця 2.7).

Для всіх дерев без молекулярного годинника та з молекулярним годинником було виконано 2 прогони (run) та перевірено сходимість між собою у програмному забезпеченні “Tracer v.1.7.1” [59] (convergence analysis). Відповідно до графіків, виконаних у цій програмі, було зроблено висновок про достатність сходимості між моделями обох прогонів (додаток 3, 4, 5, 6, 7, 8).

Всі отримані дерева було проаналізовано на значення ефективного розміру вибірки (effective sample size) у програмному забезпеченні “Tracer v.1.7.1”.

Комбінація обох прогонів для кожного з типів дерев мала переважати значення 200, щоб вважати отримані дерева коректними для подальшої роботи (додаток 9, 10).

Таблиця 2.7

Задані параметри програми “BEAST v.1.10.4” для побудови дерев з молекулярним годинником

Вид годинника	Розподіл	Кількість поколінь	Кількість прогонів
Strict clock	Процес Юла	2000000	2
Relaxed clock	Процес Юла	2000000	2

Кожну вибірку всіх типів дерев було проаналізовано у програмі “TreeAnnotator v.1.10.4” [60] з метою отримання єдиного дерева та його анотування підсумованою зі всіх дерев у вибірці інформацією. Дерев, отримані після анотування, були візуалізовані у програмному забезпеченні “FigTree v.1.4.4” [61] та представлені у Розділі 3.

2.3. Порівняння отриманих філогенетичних гіпотез

Між парами дерев було здійснено порівняння (таблиця 2.8):

- між ядерним та мітохондріальним деревами без молекулярного годинника;
- між ядерними деревами з «м'яким», «жорстким» молекулярними годинниками та без молекулярного годинника;

- між мітохондріальними деревами з «м'яким», «жорстким» молекулярними годинниками та без молекулярного годинника.

Таблиця 2.8

Порівняння топологій реконструйованих дерев

Послідовності	CytB, без МГ	CytB, ММГ	CytB, ЖМГ	RAG-2, без МГ	RAG-2, ММГ	RAG-2, ЖМГ
RAG-2, без м.г.	+	-	-	-	+	+
RAG-2, ММГ	-	-	-	+	-	+
RAG-2, ЖМГ	-	-	-	+	+	-
CytB, без м.г.	-	+	+	+	-	-
CytB, ММГ	+	-	+	-	-	-
CytB, ЖМГ	+	+	-	-	-	-

Примітка:

1. МГ – молекулярний годинник;
2. ММГ – «м'який» молекулярний годинник;
3. ЖМГ – «жорсткий» молекулярний годинник.

Кожна пара дерев була візуально порівняна у порталі “Phylo.io” з виділенням кольором тих гілок, які відрізняються між деревами. Значення дистанцій Робінсона-Фолдса (Robinson-Foulds distance) були отримані у порталі “TreeCamp” для кожної пари дерев.

РОЗДІЛ 3

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

3.1. Аналіз нуклеотидного складу та синонімічних і несинонімічних замін у послідовностях генів *Cyt B* та *RAG-2* видів під родини *Vespertilioninae*

Було оцінено частоти кожного нуклеотиду на основі вибірки із послідовностей гена *Cyt B* та на основі гена *RAG-2* для видів під родини *Vespertilioninae* (табл. 3.1.).

В послідовностях гена *Cyt B* серед нуклеотидів переважає тимін (Т), найменша кількість гуаніну (G). Для кажанів роду *Rhinolophus* було виявлене переважання аденіну та цитозину в гені цитохрому В [62, 63].

В послідовностях гена *RAG-2* переважає аденін, найменша кількість цитозину.

Можна припустити, що у генах *Cyt B* та *RAG-2* кажанів під родини *Vespertilioninae* переважає пара нуклеотидів АТ.

Частоти нуклеотидів не значним чином відрізняються між обома генами – мітохондріальним *Cyt B* та ядерним *RAG-2*.

Таблиця 3.1

Частоти нуклеотидів у послідовностях генів *Cyt B* та *RAG-2*

	А	Т	G	С
<i>Cyt B</i>	0,29	0,31	0,26	0,14
<i>RAG-2</i>	0,3	0,26	0,2	0,23

Також для кожного гена було оцінено частоти замін кожної пари нуклеотидів (таблиця 3.2). Для гена *Cyt B* характерне переважання замін цитозину на тимін (C=>T). Заміна цитозину на тимін також переважає у послідовностях гена *RAG-2*. Отже, обом генам притаманні транзиції цитозину в тимін.

Така транзиція може бути наслідком деамінування цитозину, або таутомерного зрушення (tautomeric shift) [64].

Таблиця 3.2

Оцінки замін для кожної пари нуклеотидів для послідовностей генів *Cyt B* та *RAG-2*

Тип замін	Частота для <i>Cyt B</i>	Частота для <i>RAG-2</i>
A=>T	0,02	0,02
A=>C	0,03	0,06
A=>G	0,09	0,16
T=>A	0,02	0,02
T=>C	0,27	0,15
T=>G	0	0,02
C=>A	0,03	0,08
C=>T	0,32	0,19
C=>G	0,01	0,03
G=>A	0,18	0,2
G=>T	0,01	0,03
G=>C	0,02	0,03

На основі послідовностей обох генів було оцінено відношення синонімічних до несинонімічних замін. Для генів *Cyt B* та *RAG-2* відношення несинонімічних

замін до синонімічних для жодного виду не перевищувала 1. Середнє значення k_a/k_s для вибірки з послідовностей *Cyt B* дорівнювало 0,045; для вибірки з послідовностей *RAG-2* – 0,41. Отже, синонімічних мутацій в обох вибірках більше, ніж несинонімічних.

Це свідчить про тенденцію до стабілізуючого добору; переважання нейтральних мутацій [65].

Виключенням є послідовності *Cyt B*, які належать виду *N.noctula*. Співвідношення k_a/k_s між послідовностями особин цього виду з Іберійського півострова та Швейцарії дорівнювала 1,4. А також послідовності *RAG-2*, що належать виду *N.plancyii* (3 послідовності; Філіпіни) та *N.noctula* (Швейцарія). Співвідношення між ними дорівнювали в середньому 1,24. Між послідовностями *RAG-2 P.pipistellus* (Іберійський півострів, Швейцарія) та *N.plancyii* (3 послідовності; Філіпіни) середня значення співвідношень дорівнювало 1,6.

3.1.1. Оцінка кореляції матриць еволюційних відстаней між послідовностями генів *Cyt B* та *RAG-2*. Були одержані матриці еволюційних відстаней між видами для генів *Cyt B* та *RAG-2*. За *Cyt B* накопичено більше змін (міжвидові значення коливаються від 0,068 до 0,233 замін нуклеотидів на сайт), ніж за *RAG-2* (діапазон відстаней від 0,003 до 0,118). Кореляція між еволюційними відстанями невисока, позитивна (тест Мантеля. $r=0.585$, $p < 0.001$)

Різниця в швидкості мутацій для мітохондріальних та ядерних генів, ймовірно, є причиною послаблення цієї кореляції. Адже швидкості набуття змін мітохондріальним та ядерним геномами відрізняються [66, 67].

3.2. Філогенетичні гіпотези про родинні зв'язки видів підродини *Vespertilioninae* на основі послідовностей гена *Cyt B*

Було одержано 3 дерева на основі 42 послідовностей гена цитохрому B, які належать 21 виду підродини *Vespertilioninae*.

Перше дерево є стандартним, без молекулярного годинника; із зазначеними апостеріорними ймовірностями (див. рис. 3.1). Аналіз його МСМС-параметрів показав достатність обраної кількості ітерацій. Ефективний розмір вибірки, ESS = 574,4; обидва згенеровані прогони збігаються на графіку одержаному в аналізі сходимості (див. додаток А).

Отже, на основі отриманого дерева можна будувати філогенетичну гіпотезу про родинні зв'язки [68].

Eptesicus fuscus та *E.serotinus* формують окремі гілки однієї кледи (апостеріорна ймовірність = 0,99). Під *Eptesicus* є сестринським до видів *L.noctivagans*, *S. ornatus*, *A.circumdatatus* (0,94). Базальним видом до цієї кледи є вид *Perimyotis subflavus* (0,99).

До однієї кледи входять всі види роду *Pipistrellus*, окрім *P.nathusii* та *P.javanicus* (0,95). Всі представники цього роду утворюють окремі гілки на дереві разом із іншими особинами свого виду. Однак, *P.pipistrellus* зі Швейцарії увійшов до однієї кледи разом з особинами *P.pygmaeus* (0,99).

Клади із видами роду *Pipistrellus* та *Nyctalus* є сестринськими, однак ця клада набула невисокої підтримки (0,66). В кладі родів *Nyctalus* та *Pipistrellus* найбільш базальним є вид *P.nathusii* (0,98). До цієї кледи базальним є вид *P.javanicus* (0,99).

Найближчим видом до *Nyctalus noctula* є *Nyctalus lasiopterus* (0,99). Спорідненість між видами *Nyctalus leisleri* та *Nyctalus plancyii* не висока, (0,52).

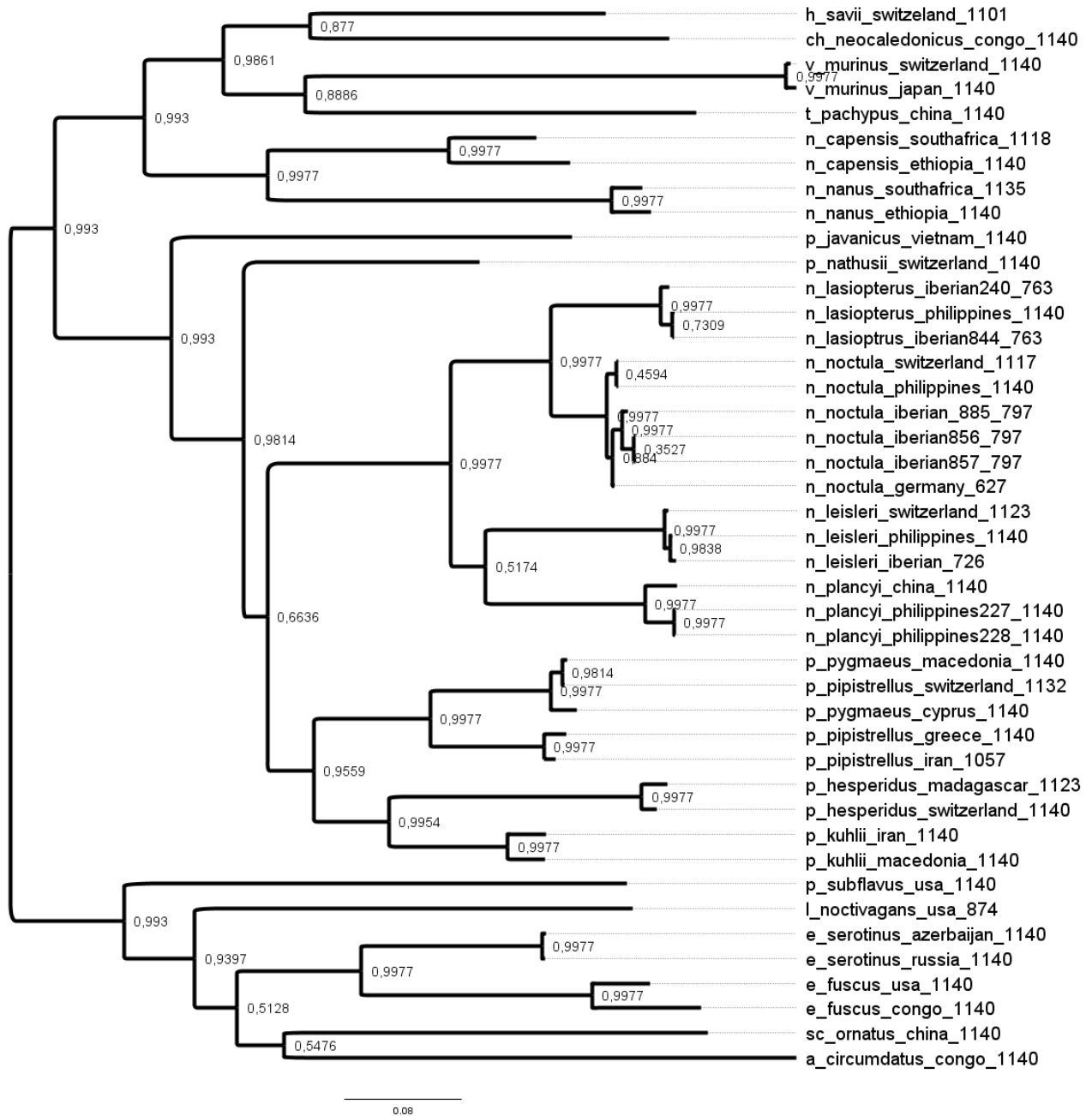


Рис. 3.1. Філогенетичне дерево без молекулярного годинника на основі послідовностей *Cyt B* з апостеріорними ймовірностями.

Спорідненими є представники родів *Hypsugo* та *Chalinolobus* (0,87), *Vespertilio* та *Tylonycteris* (0,88). Разом вони утворюють кладу з підтримкою на рівні 0,99. Базальною до цієї кледи є гілка з видами роду *Neomircia* (0,99).

Друге дерево було отримано з «м'яким» молекулярним годинником та ймовірними датами дивергенції видів (див. рис. 3.2). Аналіз його МСМС-параметрів показав достатність обраної кількості ітерацій. Ефективний розмір вибірки, ESS = 8426,6; обидва згенеровані прогони збігаються на графіку одержаному в аналізі сходимості (див. додаток Б).

Третє дерево було отримано з «жорстким» молекулярним годинником та ймовірними датами дивергенції видів (див. рис. 3.3). Аналіз його МСМС-параметрів показав достатність обраної кількості ітерацій. Ефективний розмір вибірки, ESS = 10040,5; обидва згенеровані прогони збігаються на графіку одержаному в аналізі сходимості (див. додаток В).

Статистичні оцінки порівняння дерев подані у таблиці 3.3.

Таблица 3.3.

Значення дистанцій Робертсона-Фолдса (RF) для всіх пар дерев на основі послідовностей *Cyt B*

	Без МГ	ММГ	ЖМГ
Без МГ	-	3	4
ММГ	3	-	4
ЖМГ	4	4	-

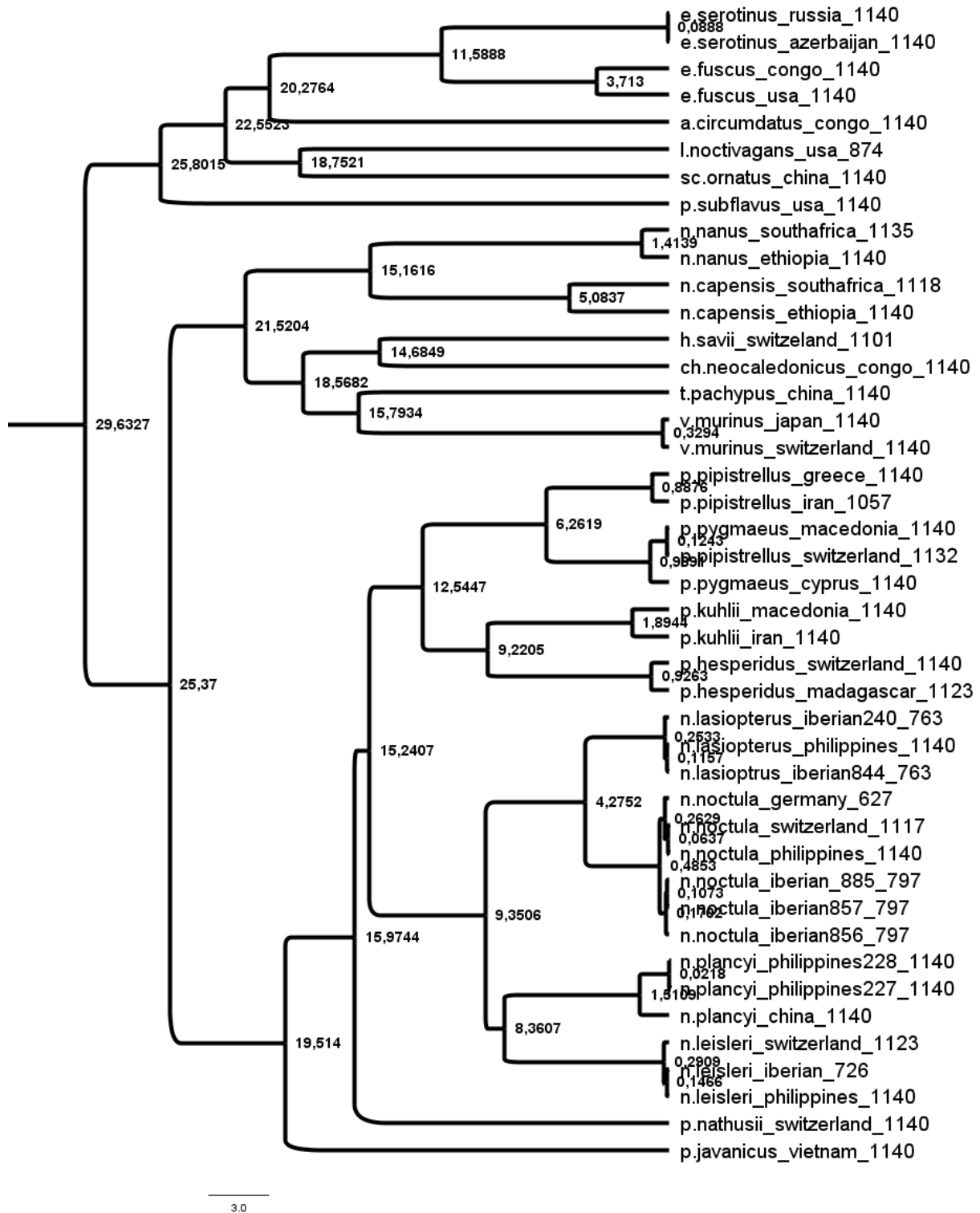


Рис. 3.2. Філогенетичне дерево з «м'яким» молекулярним годинником на основі послідовностей *Cyt B* з датами дивергенції (MY).

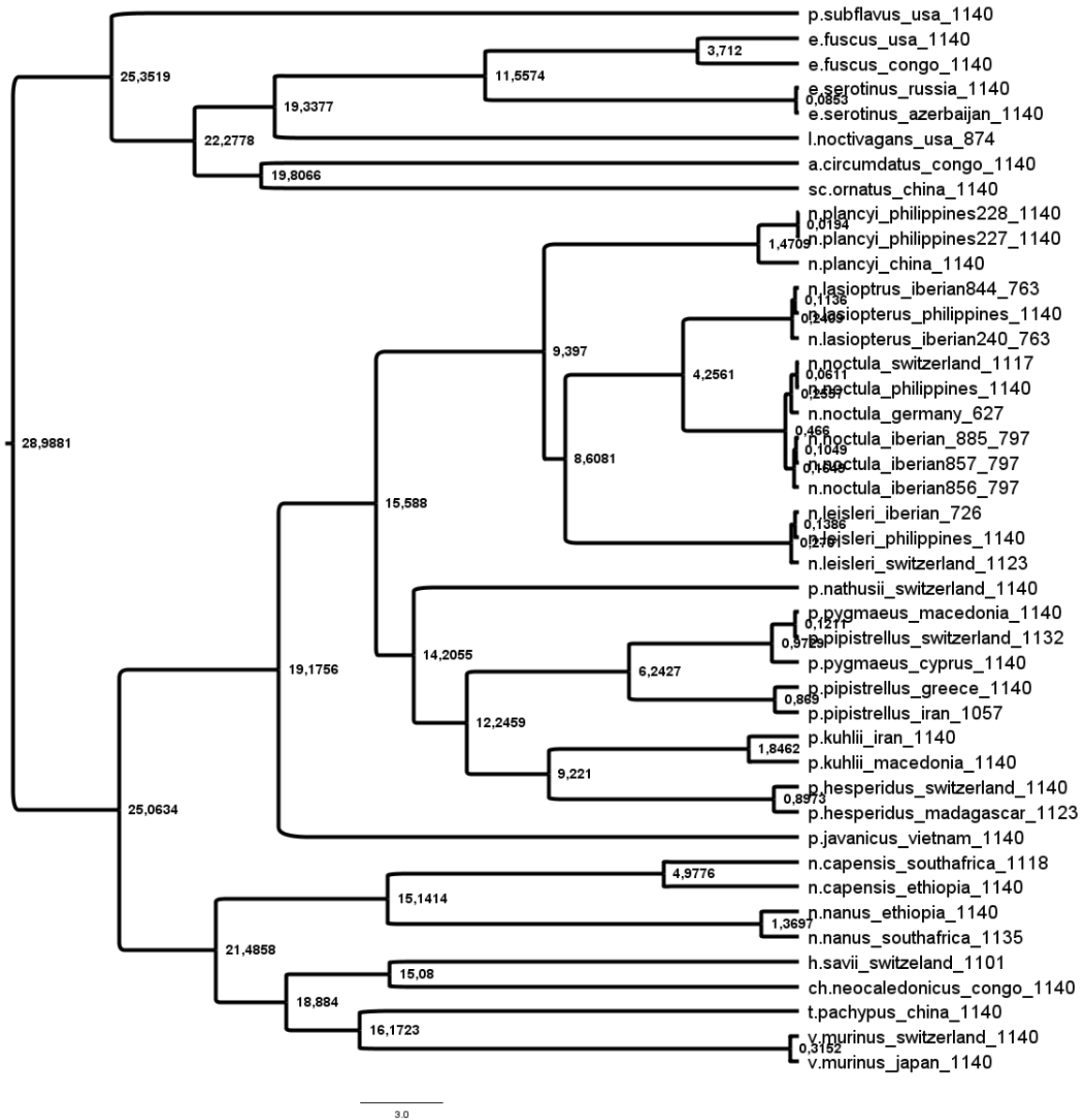


Рис. 3.3. Філогенетичне дерево з «жорстким» молекулярним годинником на основі послідовностей *Cyt B* з датами дивергенції (МҮ).

Найбільш подібні одне до одного дерево з «жорстким» та «м'яким» молекулярними годинниками; найменше сходяться дерево з «м'яким» молекулярним годинником та дерево без нього.

На другому та третьому деревах всі види роду *Eptesicus* формують одну кладу. Ці види є сестринськими до видів *L.noctivagans* та *S.ornatus*, а базальним до них є вид *P.subflavus*. Відрізняється те, що *A.circumdatus* утворює одну кладу з *S.ornatus* на дереві з «жорстким» молекулярним годинником, в той час як на «м'якому» дереві *A.circumdatus* є базальним видом до роду *Eptesicus*, а *S.ornatus* формує одну кладу з *L.noctivagans* (див.рис. 3.4). За цієї ознакою, спорідненістю *A.circumdatus* до *S.ornatus*, дерево з «жорстким» молекулярним годинником більш схоже на дерево без молекулярного годинника, а дерево з «м'яким» годинником та без нього відрізняються (див. рис. 3.5, 3.6).

Дерева з «м'яким» та «жорстким» молекулярними годинниками відрізняються також положенням видів *N.plancyi*. На дереві з «м'яким» молекулярним годинником цей вид входить до клади разом з *N.leisleri*.

Дерева з «м'яким» молекулярним годинником та дерево без молекулярного годинника відрізняються положенням особин виду *N.lasiopterus* з різних локалітетів (див. рис. 3.6).

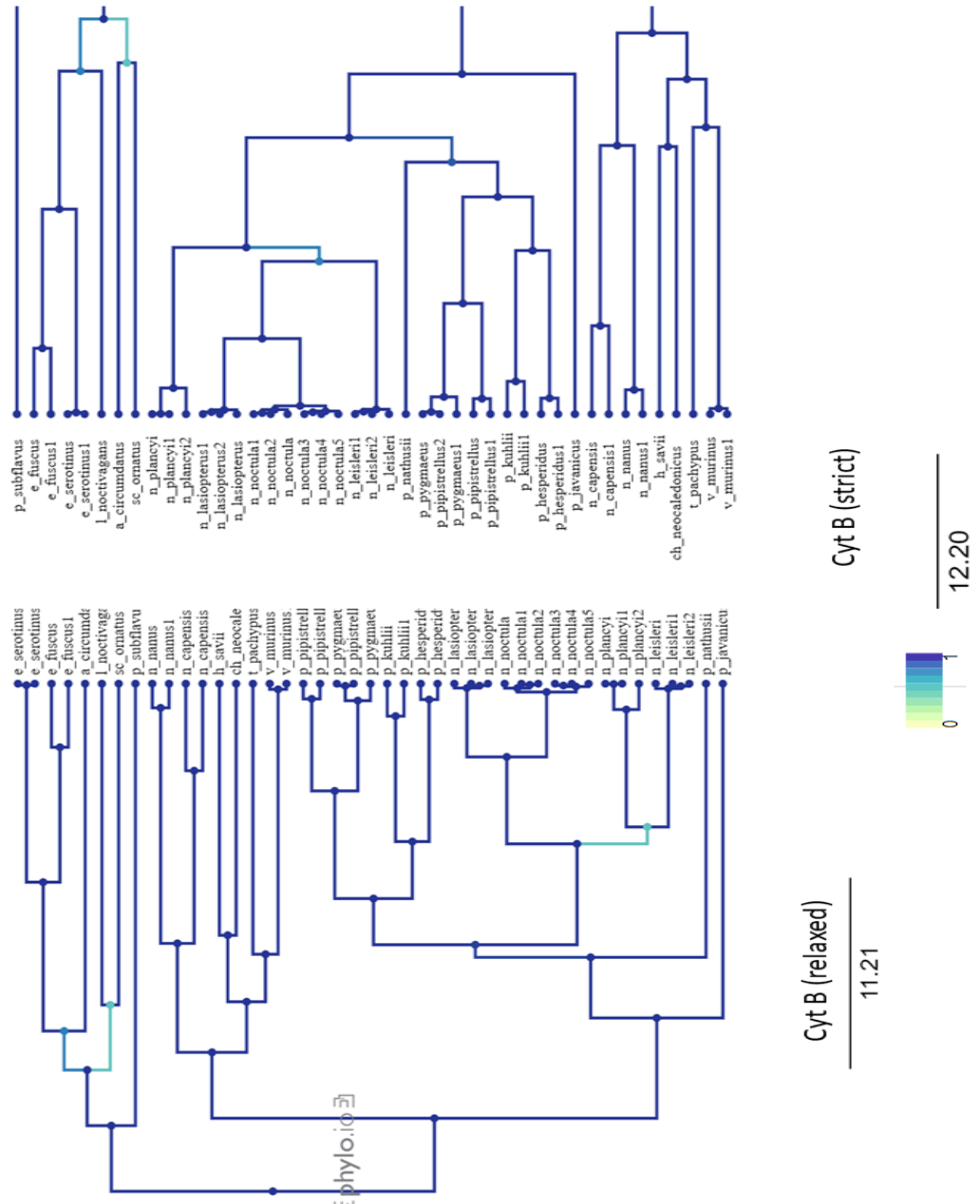


Рис. 3.4. Порівняння філогенетичних дерев з «м'яким» та «жорстким» молекулярними годинниками на основі послідовностей *Cyt B*.

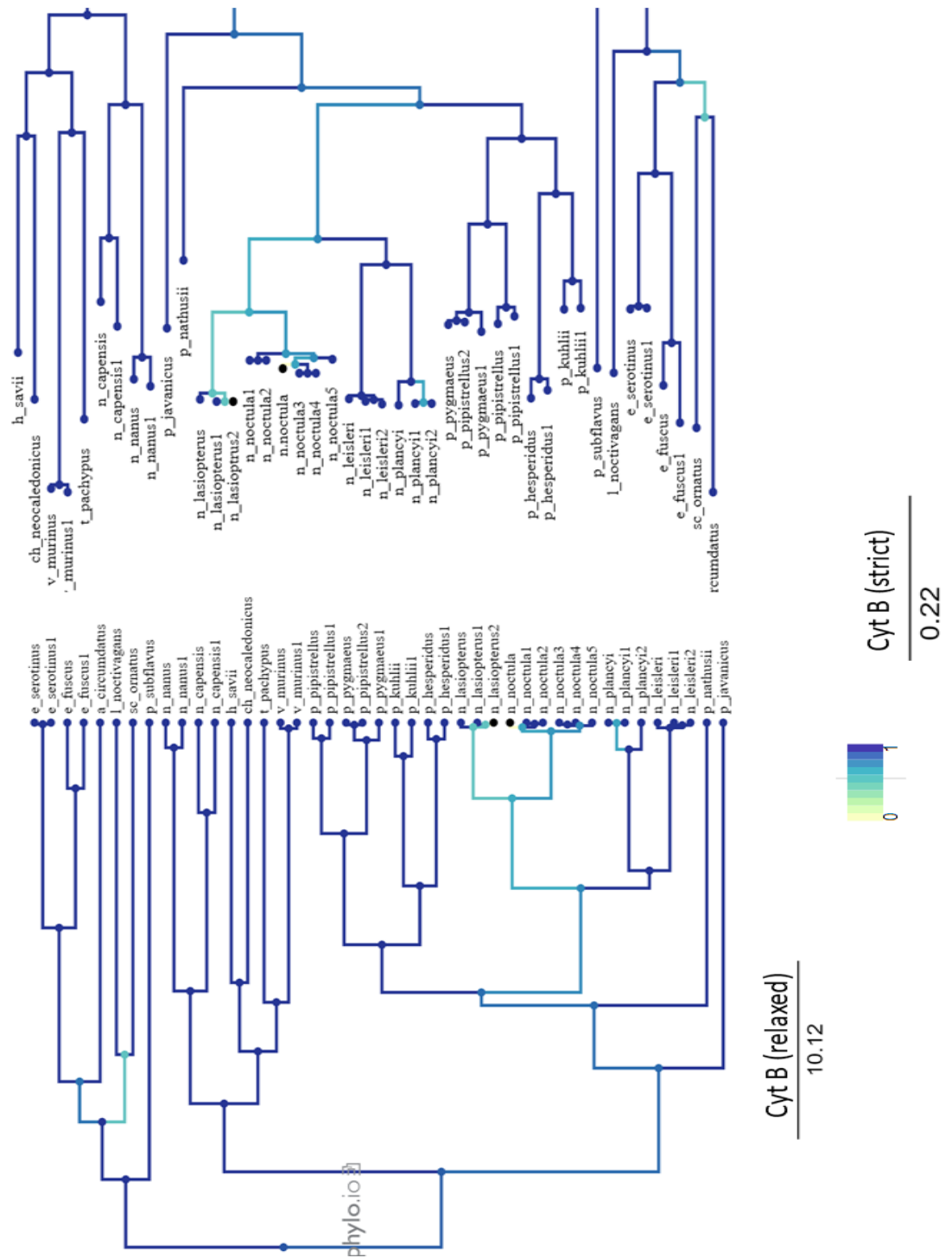


Рис. 3.5. Порівняння філогенетичних дерев з «м'яким» молекулярним годинником та без нього на основі послідовностей *Cyt B*.

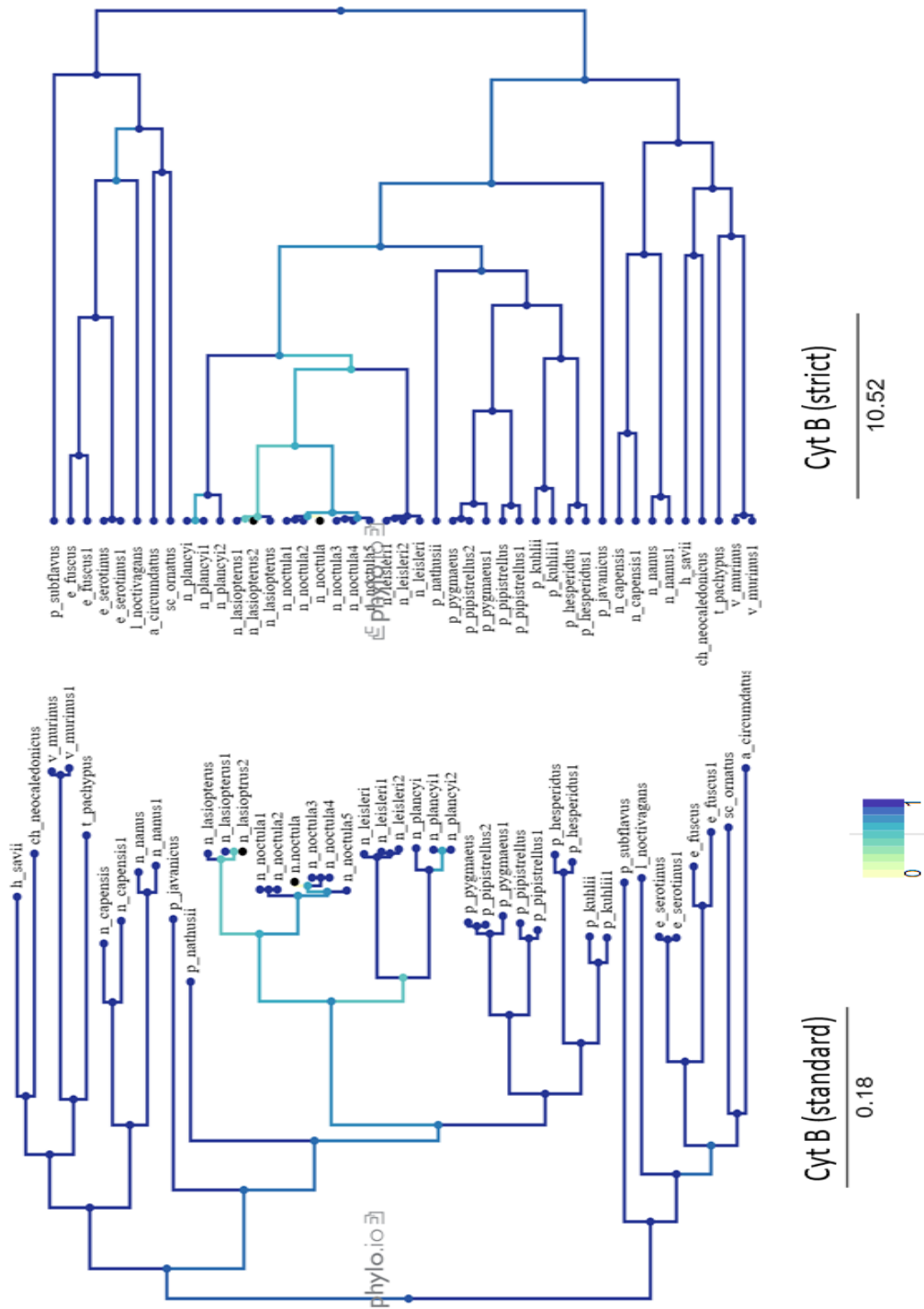


Рис. 3.6. Порівняння філогенетичних без молекулярного годинника з деревом з «жорстким» молекулярними годинником на основі послідовностей Cyt B.

3.3. Філогенетичні гіпотези про родинні зв'язки видів підродини *Vespertilioninae* на основі послідовностей гена *RAG-2*

Одержали 3 дерева на основі 49 послідовностей гена білка *RAG-2*, які належать 19 видам підродини *Vespertilioninae*.

Перше дерево є стандартним, без молекулярного годинника; із зазначеними апостеріорними ймовірностями (див. рис. 3.7). Аналіз його МСМС-параметрів показав достатність обраної кількості ітерацій. Ефективний розмір вибірки, ESS = 863,9; обидва згенеровані прогони збігаються на графіку одержаному в аналізі сходимості (див. додаток Г).

Вид *T.pachypus* є базальним до решти видів (апостеріорна ймовірність – 0,99). Від однієї гілки розходяться клади: види родів *Hypsugo* + *Neomircia* (0,8) та решта видів вибірки (0,85). *N.capensis* є базальним видом до виду *N.nanus* (0,99).

Окрему кладу формують всі види роду *Eptesicus* (0,8) разом з *S.ornatus*, *P.subflavus*, *L.noctivagans*. Останній є базальним у цій кладі (0,98). Види роду *E.fuscus* та *E.serotinus* на дереві мають не високі підтримки: 0,3 та 0,5. Клада з видами роду *Eptesicus*, видами *S.ornatus*, *P.subflavus*, *L.noctivagans* є сестринською до клади з родами *Pipistrellus*, *Nyctalus*, *Vespertilio* (0,86). Види родів *Pipistrellus* та *Nyctalus* є сестринськими (0,99). Базальною до них є кладка з видами *Vespertilio* (0,84).

Всі види *Pipistrellus* формують окремі клади разом із представниками свого виду, окрім особини *P.nathusi*, яка є базальною до видів роду *Nyctalus*. Втім, його положення має не високу підтримку (0,3). Вид *P.pygmaeus* є базальним до виду *P.pipistrellus* (0,99).

Рис. 3.7. Філогенетичне дерево без молекулярного годинника на основі послідовностей *RAG-2* з апостеріорними ймовірностями.

Друге дерево отримали з «м'яким» молекулярним годинником та ймовірними датами дивергенції видів (див. рис. 3.8). Аналіз його МСМС-параметрів показав достатність обраної кількості ітерацій. Ефективний розмір вибірки, ESS = 421,4; обидва згенеровані прогони збігаються на графіку одержаному в аналізі сходимості (див. додаток Д).

Третє дерево отримали з «жорстким» молекулярним годинником та ймовірними датами дивергенції видів (див. рис. 3.9). Аналіз його МСМС-параметрів показав достатність обраної кількості ітерацій. Ефективний розмір вибірки, ESS = 6921; обидва згенеровані прогони збігаються на графіку одержаному в аналізі сходимості (див. додаток Е).

Статистичні оцінки порівняння дерев подані у таблиці 3.4.

Таблиця 3.4.

Значення дистанцій Робертсона-Фолдса (RF) для всіх пар дерев на основі послідовностей RAG-2

	Без МГ	ММГ	ЖМГ
Без МГ	-	10	9
ММГ	10	-	7
ЖМГ	9	7	-

Дерево з «м'яким» молекулярним годинником відрізняється від дерев без молекулярного годинника положенням деяких видів (див. рис. 3.10). На дереві з «м'яким» молекулярним годинником вид *V.murinus* утворює одну кладу з *T.pachypus*, в той час як на дереві без годинника *T.pachypus* є базальним до решти видів вибірки.

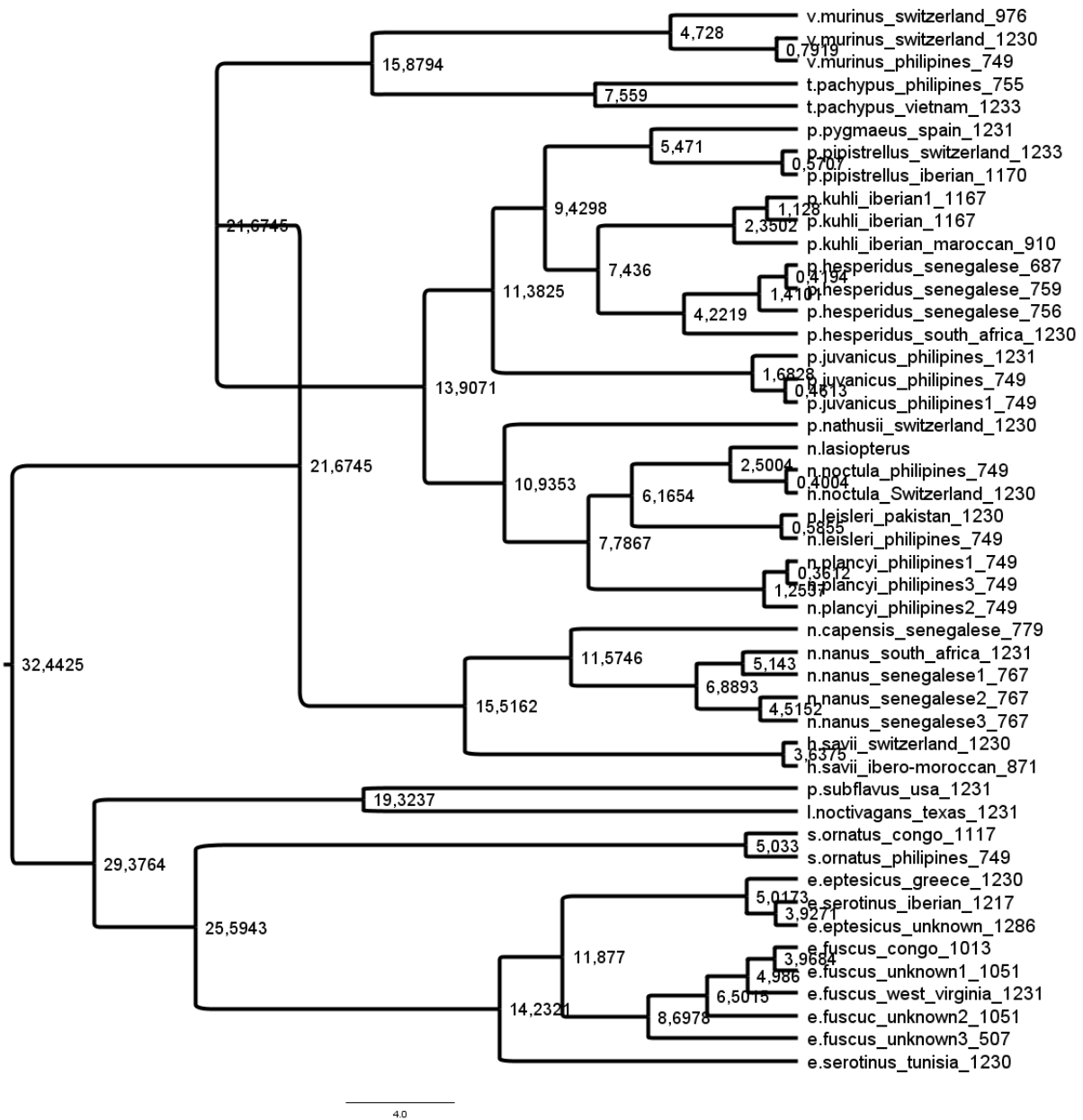


Рис. 3.8. Філогенетичне дерево з «м'яким» молекулярним годинником на основі послідовностей *RAG-2* з датами дивергенції (MY).

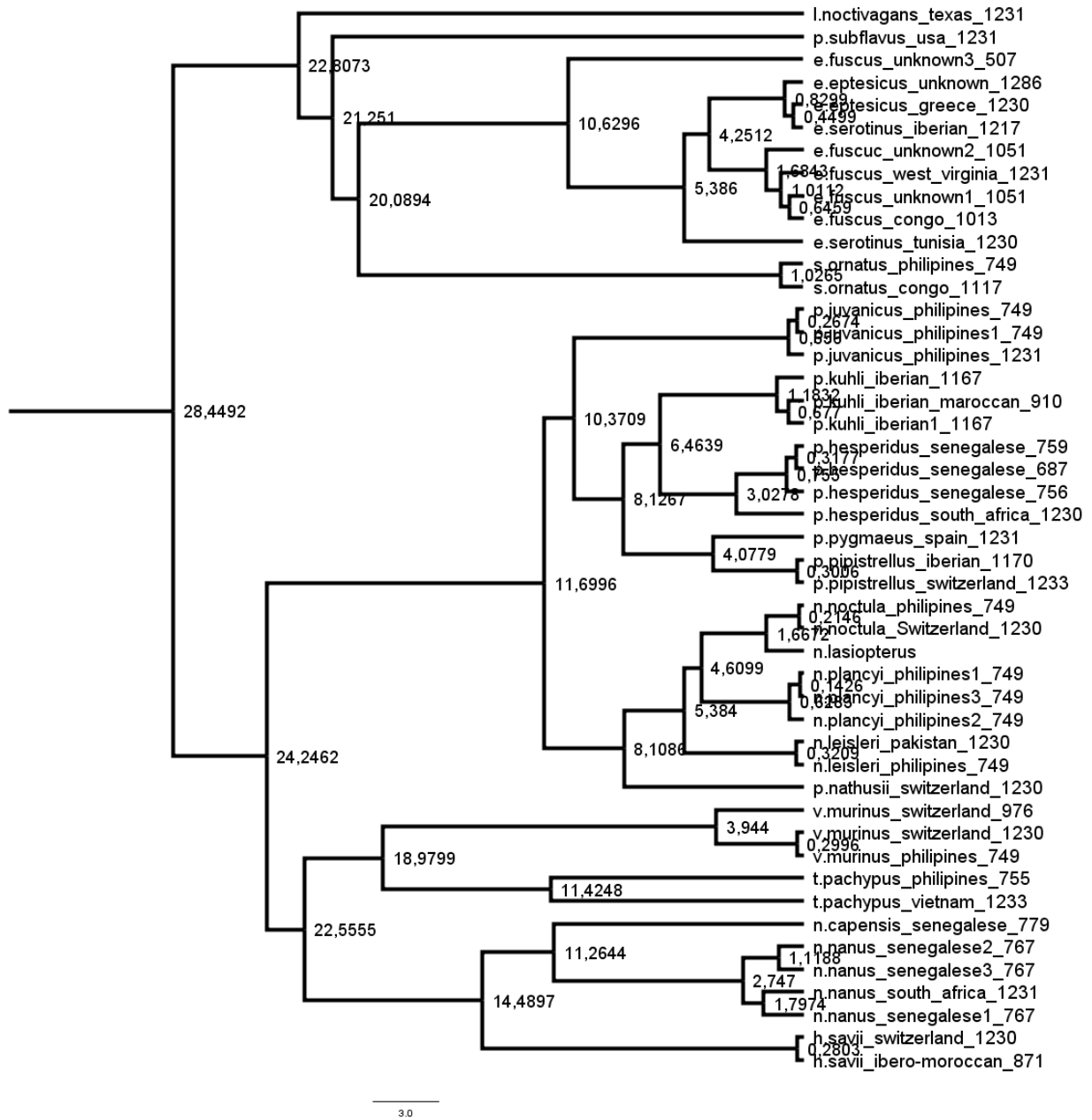


Рис. 3.9. Філогенетичне дерево з «жорстким» молекулярним годинником на основі послідовностей *RAG-2* з датами дивергенції (MY).

Відрязняються також положення особин виду *N.nanus*.

Також між цими деревами є різниця у положеннях особин виду *E.serotinus*.

На дереві з «м'яким» молекулярним годинником роди *Perimyotis*, *Lasiopterus*, *Scotomanus*, *Eptesicus* формують окрему кладу. Така топологія притаманна також дереву з «жорстким» молекулярним годинником (див. рис. 3.11). Отже, дерева з молекулярним годинником більш подібні між собою топологічною.

Види *P.subflavus* та *L.noctivagans* формують одну кладу на дереві з «м'яким» молекулярним годинником, але на дереві без годинника *L.noctivagans* є базальним до *P.subflavus* та близьких йому родів, що також притаманне дереву з «жорстким» молекулярним годинником (див. рис 3.12).

Між дерева з «м'яким» та «жорстким» молекулярними годинниками є незначні відмінності у положенні видів *N.nanus* та *P.javanicus*. Ця тенденція спостерігається при порівнянні всіх пар дерев, в тому числі – дерева з «жорстким» годинником та без нього (див. рис. 3.12).

Відмінності у топології дерев збігаються зі статистичними оцінками попарного порівняння дерев. Відмінності не є значними. Найбільшим чином між собою відрізняється пара дерев з «м'яким» молекулярним годинником та без нього; найменше – пара дерев з молекулярними годинниками.

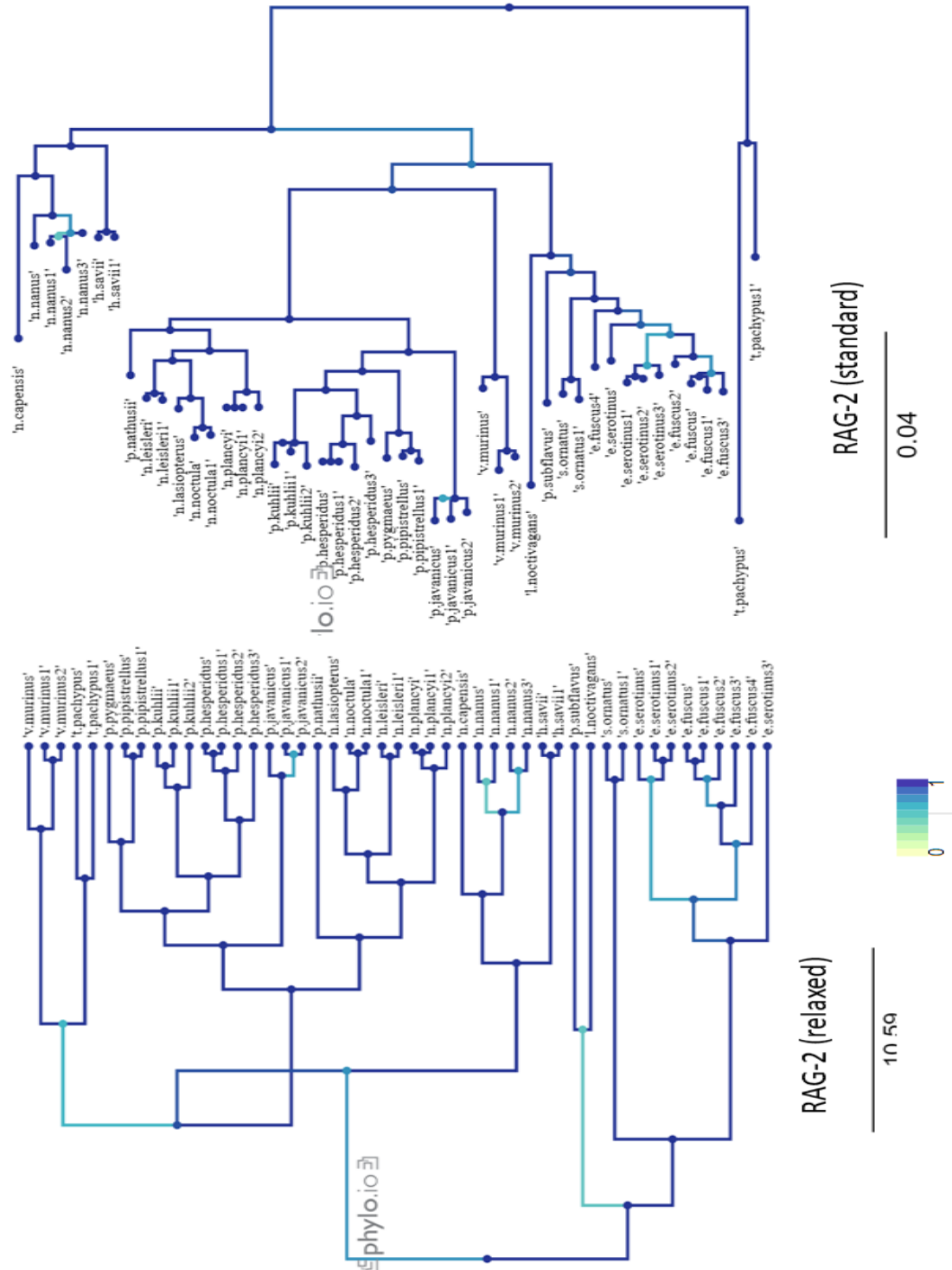


Рис. 3.10. Порівняння філогенетичних дерев з «м'яким» молекулярними годинником та без нього на основі послідовностей RAG-2.

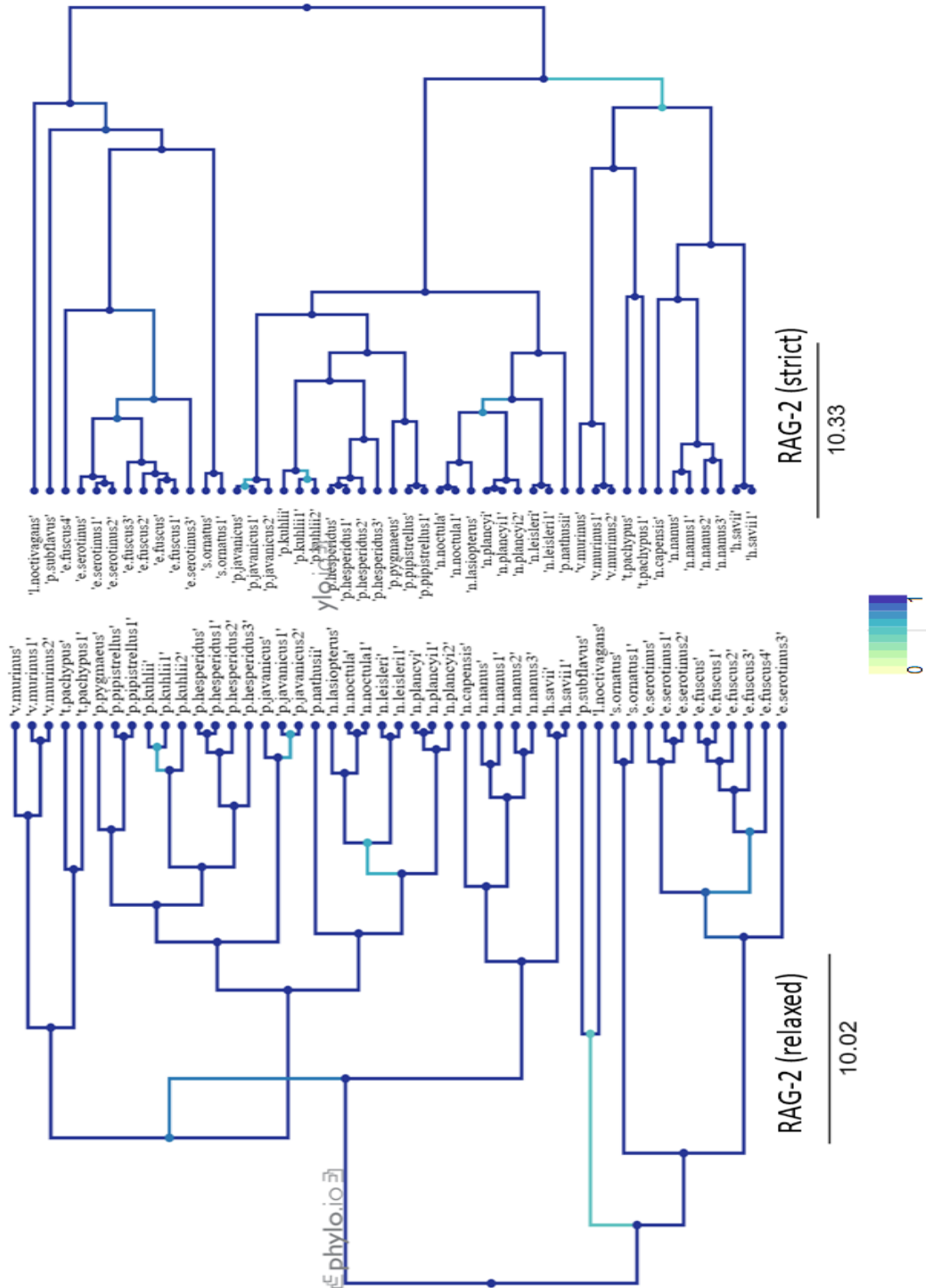


Рис. 3.11. Порівняння філогенетичних дерев з «м'яким» та «жорстким» молекулярними годинниками на основі послідовностей *RAG-2*.

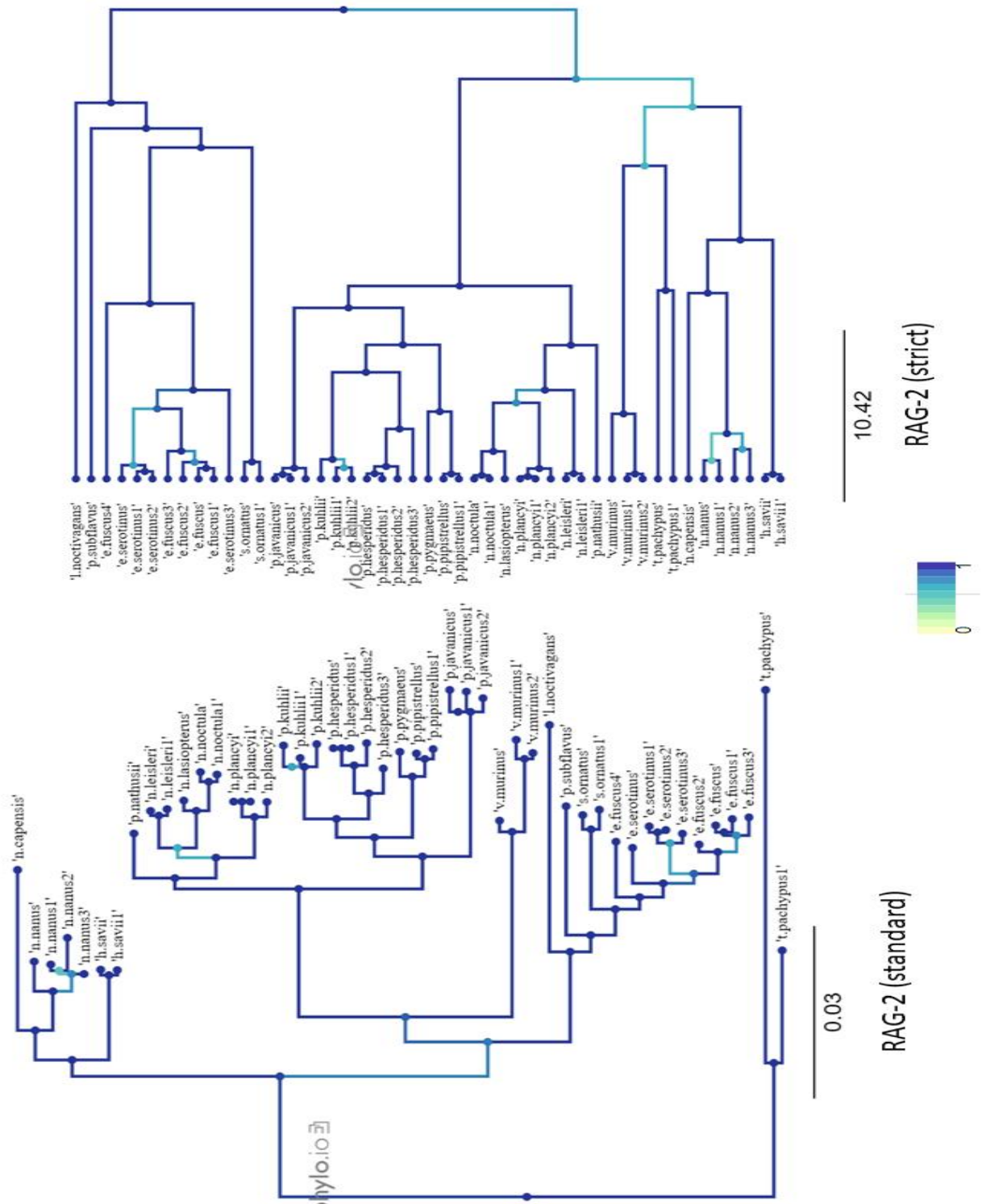


Рис. 3.12. Порівняння філогенетичних без молекулярного годинника з деревом з «жорстким» молекулярними годинником на основі послідовностей RAG-2.

3.4. Порівняння філогенетичних гіпотез на основі ядерних та мітохондріальних дерев між собою

Порівняли стандартні дерева на основі послідовностей *Cyt B* та *RAG-2*. Значення дистанцій Робінсона-Фолдса для цієї пари дорівнювало 9. Кількість спільних видів для обох вибірок – 31.

На обох деревах роди *Hypsugo* та *Neomircia* входять до однієї клади. «Мітохондріальне» дерево включає до цієї клади також рід *Tylonycteris*.

Роди *Pipistrellus* та *Nyctalus* є сестринськими на обох деревах. *P.javanicus* є базальним до всіх видів *Pipistrellus* та *Nyctalus* на «мітохондріальному» дереві, в той час як на «ядерному» дереві він є базальним до видів роду *Pipistrellus* (не включаючи *Nyctalus*), окрім *P.nathusii*.

P.nathusii входить до клади разом із видами роду *Nyctalus* на «ядерному» дереві. На «мітохондріальному» дереві він формує окрему гілку, базальну до родів *Pipistrellus* та *Nyctalus*.

На «мітохондріальному» дереві види *N.plancyii* та *N.leisleri* є сестринськими, в той час як на «ядерному» дереві *N.plancyii* формує окрему кладу.

На обох деревах всі особини свого виду роду *Pipistrellus* формують окремі клади, окрім особин *P.pugmaeus*, які входять до клади разом із *P.pipistrellus*.

На обох деревах *P.subflavus* та *L.noctivagans* є базальними у кладі з родом *Eptesicus*, куди також входить рід *Scotomanus*.

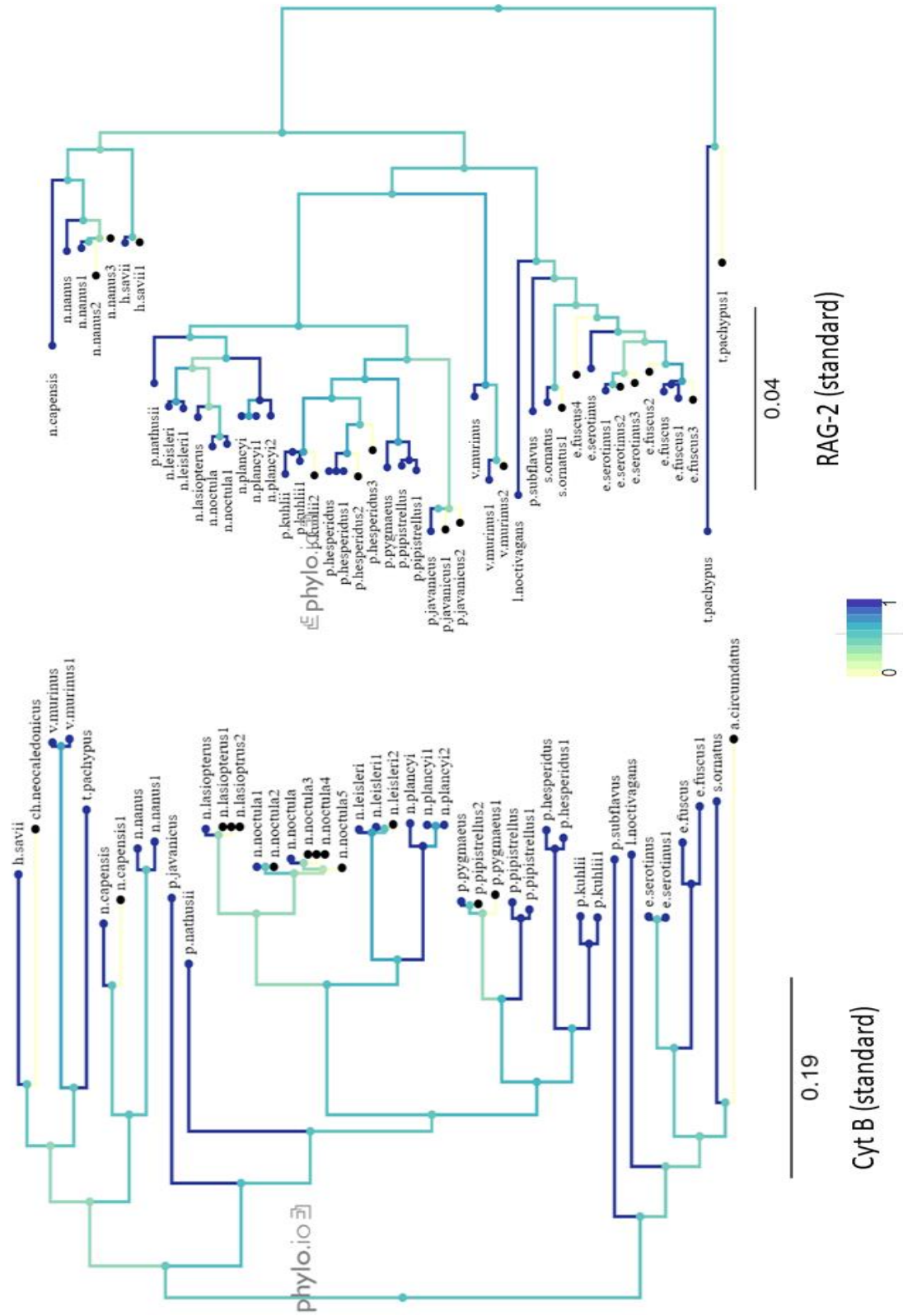


Рис. 3.13. Порівняння дерев на основі ядерних та мітохондріальних послідовностей.

3.5. Філогенетичні гіпотези про час дивергенції найбільших клад на основі послідовностей *Cyt B* та *RAG-2*

Дерева з молекулярним годинником містять дати про час дивергенції окремих клад, зазначені на рисунках 3.2, 3.3, 3.8, 3.9.

Корені обох «мітохондріальних» дерев з «м'яким» та «жорстким» годинниками датовані 29 млн років (МҮ). Корені «ядерних» дерев з «м'яким» та «жорстким» годинниками відрізняються: 32 МҮ («м'який» годинник) та 28 МҮ («жорсткий» годинник).

Час дивергенції клад, що включає роди *Perymiotis*, *Lasiopterus*, *Scotomanus* та *Eptesicus* – 29 МҮ відповідно до «м'якого» годинника (RAG-2), 23 МҮ відповідно до «жорсткого» годинника (RAG-2); 26 МҮ відповідно до «м'якого» годинника (Cyt B) та 25 МҮ відповідно до «жорсткого» годинника (Cyt B), включаючи рід *Arielulus*.

Час дивергенції клад, що включає роди *Vespertilio*, *Tylonycteris*, *Hypsugo*, *Neomircia* для дерев на основі послідовностей *Cyt B* однаковий для «м'якого» та «жорсткого» годинників - 21 МҮ. В деревах RAG-2 час дивергенції родів *Tylonycteris* та *Vespertilio* – 16 МҮ («м'який» годинник) та 19 МҮ («жорсткий» годинник).

Гілки родин *Pipistrellus* та *Nyctalus* розходяться 15 МҮ для обох годинників на основі послідовностей *Cyt B*; на «ядерному» дереві роходження датоване 14 МҮ («м'який» годинник) та 13 МҮ («жорсткий» годинник).

Дивергенція між клядою, яка включає роди *Vespertilio*, *Tylonycteris*, *Hypsugo*, *Neomircia* та клядою з родами *Pipistrellus*, *Nyctalus* датована 25 МҮ для мітохондріальних послідовностей обох годинників та 22 МҮ («м'який» годинник) і 24 МҮ («жорсткий» годинник) для ядерних послідовностей.

Таким чином, дерева, основані на мітохондріальних та ядерних послідовностях відрізняються між собою. Також дати дивергенції

відрізняються для дерев з різними типами молекулярного годинника, що видно у таблиці 3.5.

Таблиця 3.5

Порівняльна таблиця дат дивергенції основних клад

Клади:	Cyt B		RAG-2	
	ММГ, MY	ЖМГ, MY	ММГ, MY	ЖМГ, MY
<i>Perymiotis, Lasiopterus, Scotomanus</i> та <i>Eptesicus</i>	-	-	29	23
<i>Perymiotis, Lasiopterus, Scotomanus, Eptesicus, Arielulus</i>	26	25	-	-
<i>Vespertilio, Tylonycteris, Hypsugo, Neomircia</i>	21	21	-	-
<i>Tylonycteris</i> та <i>Vespertilio</i>	-	-	16	19
<i>Pipistrellus</i> та <i>Nyctalus</i>	15	15	14	13
<i>Vespertilio, Tylonycteris, Hypsugo, Neomircia</i> Vs. <i>Pipistrellus, Nyctalus</i>	25	25	22	24
Корені	29	29	32	28

3.6. Відповідність отриманих філогенетичних гіпотез літературним даним

Відповідно до філогенетичної гіпотези найближчий рід до роду *Nyctalus* – *Pipistrellus*. Це узгоджується з гіпотезами інших авторів про спорідненість родів *Pipistrellus* та *Nyctalus* [12, 16, 69].

Такий самий результат спостерігали на обох деревах – «мітохондріальному» та «ядерному».

P.pygmaeus формує одну кладу разом із *P.pipistrellus* на деревах обох послідовностей, одержаних в аналізі. Це узгоджується з роботою інших авторів, виконаною на основі комбінації послідовностей *Cyt B* та *RAG-2* [17].

Відповідно до результатів роботи *P.nathusii* є базальним до видів роду *Nyctalus*, що також виявлено іншими дослідниками [8, 16].

N.plancyii та *N.leisleri* входять до однієї кледи на «мітохондріальному» дереві. Однак, їхня спорідненість одержала низьку статистичну підтримку. В одному з досліджень *N.plancyii* є базальним до решти видів роду *Nyctalus*. В інших дослідженнях було показано те, що *N.leisleri* є сестринським до виду *N.noctula* [7, 16, 23]. Це збігається з положенням цих видів на «ядерному» дереві, одержаному в ході дослідження.

Рід *Perimyotis* є базальним до кледи з родами *Eptesicus* та *Scotomanus* на «ядерному» та «мітохондріальному» деревах, що узгоджується з деревом на основі *RAG-2* - послідовностей [7].

Проте відповідно до результатів іншого дослідження, в ході якого були використані ядерні (*RAG-2*) та мітохондріальні послідовності (рРНК, тРНК), види роду *Perimyotis* формують окрему кладу від всіх інших видів, про які йшла мова в ході дослідження. Принаймні, цей рід не є базальним до кледи з родами *Eptesicus* та *Scotomanus* [8].

Спорідненість родів *Pipistrellus* та *Nyctalus*; їхня спорідненість із видами родів *Vespertilio* та *Chalinolobus*; а також формування окремих клад родами *Eptesicus* та *Scotomanus* (мають близьке походження разом із *Pipistrellus* + *Nyctalus*, *Chalinolobus* + *Vespertilio*) – все це збігається з даними, отриманими основі послідовностей гена нітрогендегідрогенази 1 (ND1) [69].

Формування окремих клад родами *Eptesicus* та *Scotomanus*; спорідненість *Nyctalus noctula* з *N.lasiopterus*, *N.leisleri* – з *N.plancyii*; спорідненість *Nyctalus* з *Pipistrellus* збігається з даними філогенетичної гіпотези на основі комбінації дерев з послідовностей *Cyt B* та *RAG-2* [17].

Відповідно до ядерних (*RAG-2*) та мітохондріальних (12S рРНК, тРНК^{Вал}, 16S рРНК) послідовностей роди *Eptesicus* та *Scotomanus* входять до триби Nycteciini, *Nyctalus* та *Pipistrellus* - до триби Pipistrellini, *Chalinolobus*, *Hypsugo*, *Neomircia*, *Vespertilio*, *Tylonycteris* – до триби Vespertilionini. Це збігається з філогенетичною гіпотезою, отриманою під час дослідження [7, 8].

Рід *Tylonycteris* є базальним до всіх видів досліджуваної вибірки для «ядерного» дерева, але на «мітохондріальному» дереві цей рід входить до клади з родом *Vespertilio*. Дерев, одержані іншими авторами, свідчать про те, що *T.pachypus* є базальним до споріднених клад з родами *Hypsugo* та *Vespertilio* [8, 17].

В одній з робіт під *Tylonycteris*, а саме види *T.tonkiensis* та *T.malayana*, входить до клади разом з родами *Hypsugo* та *Neomircia*, базальною до них є клада з родом *Nyctalus* [16]. Це не узгоджується з жодним одержаним деревом.

Аналіз послідовностей мітохондріальних РНК (12S рРНК, тРНК^{Вал}, 16S рРНК) дозволив дослідникам зробити висновок про те, що роди *Scotomanus* та *Arielulus* входять до клади, від якої беруть початок гілки з видами роду *Eptesicus*, що збігається з одержаною філогенетичною гіпотезою в ході дослідження [7].

S.ornatus є базальним до видів роду *Eptesicus* [7, 69]. Це узгоджується з даними, одержаними як з «мітохондріального», так і з «ядерного» дерев.

P.javanicus є базальним до клади, сформованої родами *Pipistrellus* та *Nyctalus*. Дані одержані на основі комбінації послідовностей *Cyt B* та *RAG-2* [17]. Це узгоджується з отриманим результатом обох дерев – «ядерного» та «мітохондріального».

Приблизний час дивергенції родів родини *Vespertilionidae*, куди входить підродина *Vespertilioninae*, відповідно до ядерних маркерів оцінюють від 50 MY до 31 MY [53, 70].

В ході дослідження отримали приблизну дату дивергенції видів, що увійшли до вибірки. Вона дорівнює від 29 до 32 MY для різних дерев, що входить у проміжок часу ймовірної дивергенції підродин родини *Vespertilionidae*.

Для побудови дерев з молекулярними годинниками були використані калібрувальні точки. Зокрема, дати дивергенції родів *Eptesicus* та *Scotomanus* (23 MY), *E.serotinus* та *E.fuscus* (11,14 MY) [53]. Це узгоджується з датами, отриманими у ході дослідження: 11,6 MY («м'який» та «жорсткий» молекулярні годинники, *Cyt B*). Відповідно до даних інших авторів час дивергенції родів *Vespertilio* та *Tylonycteris* - 15,5 MY [54].

В ході дослідження було виявлено ймовірні дати дивергенції для цих родів, що збігається з використаними даними (15,8 - 16 MY на «мітохондріальному» дереві та 15,9 – 19 MY на «ядерному» дереві). Ймовірний час дивергенції *P.pipistrellus* та *P.pugmaeus* – 6 MY [55]. Це узгоджується з датами дивергенції, одержаними у ході роботи: 4-5 MY («ядерне» дерево) та 6 MY («мітохондріальне» дерево).

Таким чином, були отримані ймовірні дати дивергенції різних видів. Показали те, що дати дивергенції співпадають з оцінками інших авторів. Положення видів на «ядерному» та «мітохондріальному» деревах збігаються у

більшості випадків за виключенням тих видів, положення яких є спірним для існуючих досліджень.

УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

Ревізію підродини *Vespertilioninae* проводили декілька разів, зокрема в контексті перевірки родинних зв'язків родини *Vespertilionidae* на основі каріологічного аналізу [11].

Багато видів, що входять до підродини *Vespertilioninae*, було включено до філогенетичного аналізу на основі послідовностей ядерних та мітохондріальних генів [8, 17, 23].

Більшість філогенетичних дерев мають розбіжності у положенні тих, чи інших видів. Саме тому перевірка родинних зв'язків різними методами філогенетичного аналізу дає змогу сформулювати якомога більш правдиву гіпотезу про філогенію підродини *Vespertilioninae*.

У цьому дослідженні були використані послідовності, що належать 21 виду. Обрані послідовності та вибірка із видів не повторювали роботи інших дослідників, що дало змогу отримати унікальний результат, який можна порівняти з роботами інших авторів.

В ході роботи одержали по 3 різні дерева для вибірок із ядерних та мітохондріальних послідовностей: дерево без молекулярного годинника, дерево з «м'яким» молекулярним годинником, дерево з «жорстким» молекулярним годинником. Всі дерева були попарно порівняні для того, щоб знайти розбіжності між положенням такс.

Дерева з молекулярними годинниками дали змогу отримати ймовірні дати дивергенції видів, що увійшли до аналізу.

Деякі автори формують гіпотези про родинні зв'язки видів, використовуючи лише один тип генетичного матеріалу – ядерний або мітохондріальний. Філогенетичні дерева, одержані на основі ядерних послідовностей, не завжди співпадають з деревами на основі послідовностей ДНК мітохондрій [5, 6].

Характер еволюції геному мітохондрій певного виду може відрізнятись від еволюції виду в цілому. До того ж швидкість накопичення змін мітохондріальними та ядерними генами відрізняються [5, 27, 28, 66, 67].

Це є аргументов на користь того, що перевірка родинних зв'язків має бути звірена за обома геномами – мітохондріальним та ядерним. Саме тому для відтворення родинних зв'язків між видами підродини *Vespertilioninae* в цьому дослідженні використали послідовності мітохондріального гена *Cyt B* та послідовності ядерного гена *RAG-2*. Деревя на їх основі порівняли між собою.

В ході аналізу нуклеотидних послідовностей було зроблено припущення про те, що у генах *Cyt B* та *RAG-2* кажанів підродини *Vespertilioninae* переважає пара нуклеотидів АТ. Частоти нуклеотидів не сильно відрізняються між обома вибірками із послідовностей *Cyt B* та *RAG-2*. В обох вибірках - із послідовностей *Cyt B* та *RAG-2* – найчастіше зустрічається транзиція цитозину в тимін.

Відношення несинонімічних замін до синонімічних для жодного виду не перевищувала 1 в обох вибірках (*Cyt B* та *RAG-2*). Середнє значення k_a/k_s для вибірки з послідовностей *Cyt B* дорівнювало 0,045; для вибірки з послідовностей *RAG-2* – 0,41. Це означає, що синонімічних мутацій, ніж несинонімічних.

В свою чергу це свідчить про тенденцію до стабілізуючого добору; переважання нейтральних мутацій [65].

Було оцінено кореляції між еволюційними відстанями видів обох вибірок. Відповідно до результату тесту Мантеля кореляція між еволюційними відстанями невисока, позитивна ($r=0.585$, $p < 0.001$). Послідовності *Cyt B* накопичили більше змін, ніж послідовності *RAG-2*.

Це узгоджується з тим, що швидкості мутацій для мітохондріальних та ядерних генів різні.

Відповідно до результатів роботи, отриманих в ході попарного порівняння різних дерев між собою, було зроблено висновок про родинні зв'язки основних клад. Не значні відмінності між деревами з молекулярним годинником та без

нього всередині вибірок із різних послідовностей були описані в ході роботи. Трохи більше відмінностей виникло між «ядерним» та «мітохондріальним» деревами. Однак, ці дерева більш подібні, ніж відмінні.

Положення деяких такс на «ядерному» та «мітохондріальному» деревах збігається з результатами роботи одних авторів, але відрізняється від результатів інших.

Всі одержані «ядерні» та «мітохондріальні» дерева показали те, що роди *Pipistrellus* та *Nyctalus* є сестринськими. Це узгоджується з гіпотезами інших авторів про спорідненість родів *Pipistrellus* та *Nyctalus* [12, 16, 69].

Один із видів роду *Pipistrellus* - *P.pygmaeus* - формує одну кладу разом із *P.pipistrellus* на деревах обох послідовностей, одержаних в аналізі. Ця близька спорідненість узгоджується з роботою інших авторів, виконаною на основі комбінації послідовностей *Cyt B* та *RAG-2* [17].

Деякі з досліджень свідчать на користь того, що виду роду *Nyctalus* - *N.leisleri* та *N.noctula* - є сестринськими [7, 16].

В ході роботи було показано те, що *N.plancyii* та *N.leisleri* входять до однієї клади, виключаючи вид *N.noctula*, на «мітохондріальному» дереві. Однак, їхня спорідненість одержала низьку статистичну підтримку. На «ядерному» дереві

В одному з досліджень *N.plancyii* є базальним до решти видів роду *Nyctalus* [23].

Обидва дерева – «ядерне» та «мітохондріальне» - показали те, що рід *Perimyotis* є базальним до клади з родами *Eptesicus* та *Scotomanus*. Це узгоджується дослідженнями інших авторів, отриманих на основі *RAG-2* - послідовностей [7].

Проте є дослідження, в яких показано те, що рід *Perimyotis* не є базальним до клади *Eptesicus* + *Scotomanus* [8].

Спільне положення роду *Perimyotis* було уточнено на основі результату, що збігається між «ядерним» та «мітохондріальним» деревами. Найбільше даних свідчать на користь того, що *Perimyotis* є базальним до клади з родом *Eptesicus*.

Було показано те, що рід *Tylonycteris* є базальним до всіх видів досліджуваної вибірки для «ядерного» дерева, але на «мітохондріальному» дереві цей рід входить до клади з родом *Vespertilio*.

Результати інших авторів, свідчать про те, що *T.pachypus* є базальним до споріднених клад з родами *Hypsugo* та *Vespertilio* [8, 17].

На деревах обох вибірок *S.ornatus* є базальним до видів роду *Eptesicus*, що було показано іншими дослідниками також [7, 69].

P.javanicus є базальним до клади, сформованої родами *Pipistrellus* та *Nyctalus*. Це видно на «мітохондріальному» дереві.

Це узгоджується з даними на основі комбінації послідовностей *Cyt B* та *RAG-2* [17].

На «ядерному» дереві *P.javanicus* є базальним до всіх видів *Pipistrellus*, не включаючи рід *Nyctalus* та вид *P.nathusii*.

P.nathusii відрізняється також положенням між «ядерним» та «мітохондріальним» деревами. Цей вид входить до клади разом із видами роду *Nyctalus* на «ядерному» дереві. На «мітохондріальному» дереві він формує окрему гілку, базальну до родів *Pipistrellus* та *Nyctalus*.

Реконструкція дерев з молекулярними годинниками дала змогу оцінити приблизний час дивергенції видів підродини *Vespertilioninae*.

Дивергенція всіх видів, що увійшли до аналізу, дорівнює від 29 до 32 Мґ для різних дерев, що входить у проміжок часу ймовірної дивергенції підродини *Vespertilionidae* відповідно до даних інших авторів.

Час дивергенції родів родини *Vespertilionidae*, до якої входить підродина *Vespertilioninae*, відповідно до ядерних маркерів оцінюють від 50 Мґ до 31 Мґ [53, 70].

Для побудови дерев з молекулярними годинниками були використані калібрувальні точки – дати дивергенції. Всі вони збігаються з датами, отриманими у ході дослідження.

Дати дивергенції, в цілому, збігаються як між деревами з «м'яким» та «жорстким» молекулярними годинниками, так і з даними інших авторів.

Одержати більш точні оцінки дивергенції видів можливо лише у тому випадку, якщо у майбутньому з'явиться більше даних про викопні рештки рукокрилих, або ж оцінки набуття мутацій для конкретних генів будуть більш точними.

Відповідно до результатів роботи дерева, побудовані різними методами, мають не значні відмінності навіть, якщо вони були реконструйовані на основі однакових послідовностей. Зокрема, дерева з молекулярним годинником та без нього відрізняються між собою не лише датами дивергенції, але й положенням деяких видів. Однак, ці відмінності не значні.

Найменш надійними є клади з низькою статистичною підтримкою – значеннями апостеріорних ймовірностей. Саме ці клади відрізняються при попарному порівнянні дерев. Втім, положення видів, які підкріплювались високими значеннями, теж відрізнялись між різними деревами.

Вибір із 42 (*Cyt B*) та 49 (*RAG-2*) послідовностей вистачило для того, щоб відтворити родинні зв'язки між 21 видом підродини *Vespertilioninae* та сформулювати філогенетичні гіпотези, що узгоджуються з думкою інших дослідників.

Описані відмінності між деревами можуть слугувати для уточнення родинних зв'язків іншими методами біоінформатики та їх порівняння зі вже одержаним результатом. Зокрема, йдеться про положення видів *N.leisleri* та *N.plancyii*, *P.javanicus*, *P.nathusii* а також роду *Tylonycteris*. Проведення дослідження робить внесок у розуміння родинних зв'язків між представниками рукокрилих, а також дозволяє порівняти між собою результати різних підходів

до реконструкції філогенетичних дерев. Одержані дані можуть бути використані не лише для уточнення філогенії рукокрилих, але й для відтворення родинних зв'язків між представниками інших царств.

ВИСНОВКИ

Реконструйовано родинні зв'язки між деякими видами підродини Vespertilioninae на основі ядерних та мітохондріальних послідовностей. У ході роботи було одержано філогенетичні дерева різними методами: з «м'яким» та «жорстким» молекулярними годинниками та без молекулярного годинника. Всі дерева кожної з вибірок – ядерних та мітохондріальних послідовностей – попарно порівнювали між собою та виявили основні відмінності у положеннях видів *T.pachypus*, *N.leisleri*, *N.plancyii*, *P.nathusii*, *P.javanicus*. Було уточнено положення *P.subflavus*, що відрізняється у різних дослідженнях.

В ході реконструкції родинних зв'язків підродини Vespertilioninae було виконано поставлені завдання та сформовані такі висновки про види підродини:

1. У послідовностях генів *Cyt B* та *RAG-2* переважає пара нуклеотидів АТ. Частоти нуклеотидів мають незначні відмінності між послідовностями *Cyt B* та *RAG-2*. В обох вибірках найчастіше зустрічається транзиція цитозину в тимін. Синонімічні мутації переважають над несинонімічними, що свідчить про тенденцію стабілізуючого добору. Між еволюційними відстанями *Cyt B*-послідовностей та *RAG-2*-послідовностей є невисока позитивна кореляція ($r=0.585$, $p < 0.001$).

2. Дерева з «м'яким» та «жорсткими» молекулярними годинниками, а також без нього мають незначні відмінності у положенні деяких видів та часу дивергенції.

3. Філогенетичні реконструкції, одержані на основі мітохондріальних та ядерних послідовностей, відрізняються розташуванням видів *T.pachypus*, *P.javanicus*, *P.nathusii*, *N.plancyii*, *N.leisleri*.

4. Оцінки часу дивергенції найбільших клад мають незначні відмінності залежно від застосування «м'якого» та «жорсткого» молекулярного годинника; вони добре узгоджуються з даними інших авторів.

5. Уточнено положення *P.subflavus*: вид є базальним до видів роду *Eptesicus* та *Scotomanus*. Найбільш спірними є види *T.pachypus*, *N.leisleri*, *N.plancyii*, *P.nathusii*, *P.javanicus*.

Проведений аналіз ядерних та мітохондріальних послідовностей видів підродини Vespertilioninae, а також реконструкція родинних зв'язків всередині цієї підродини розширює розуміння філогенії окремих видів рукокрилих. Результати можна застосовувати у подальшому дослідженні гладконосих рукокрилих та для філогенетичного аналізу представників інших таксонів.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Lemey P. The Phylogenetic handbook. The practical approach to phylogenetic analysis and hypothesis testing. 2d ed. New York: Cambridge University Press; 2009. 751 p.
2. Wilson DE, Reeder DM. Mammal species of the world: a taxonomic and geographic reference. 3rd ed. Baltimore: Johns Hopkins University Press. 2005. Order Chiroptera; p 312 – 529.
3. Chiroptera. TSN 179985. Integrated Taxonomic Information System [Internet]. Denver: ITIS Report [updated Dec 2019; cited Dec 2019]. Available from: https://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=179985#null
4. Jones KE, Purvis A, MacLarnon E, Bininda-Emonds RP, Simmons NB. A phylogenetic super-tree of bats (Mammalia: Chiroptera). Biol Rev. 2002; 77: 223 – 59.
5. Platt RN, Faircloth BC, Sullivan KA, Kierran TJ, Glenn TC, Wandvege MW, et al. Conflicting evolutionary histories of the mitochondrial and nuclear genomes in new world Myotis bats. Syst Biol. 2018 Mar 1; 67(2): 236 – 49.
6. Rubinoff D, Holland BS. Between Two Extremes: Mitochondrial DNA is neither the panacea nor the nemesis of phylogenetic and taxonomic inference. Syst Biol. 2006 Jan; 54(6): 952 – 61.
7. Roehrs ZP, Lack JB, Van Den Bussche RA. Tribal phylogenetic relationships within Vespertilioninae (Chiroptera: Vespertilionidae) based on mitochondrial and nuclear sequence data. Jour of Mamm. 2010 Oct; 91(5): 1073.
8. Hoofer SR, Reeder SA, Hansen EW, Van Den Bussche RA. Molecular phylogenetic and taxonomic review of Noctilionoid and Vespertilionoid bats (Chiroptera: Yangochiroptera). Jour of Mamm. 2003; 84(3): 809 – 21.

9. Burgin CJ, Collela PJ, Kahn PL, Upham NS. How many species of mammals are there? *Jour of Mamm.* 2018; 99(1):1 – 14.
10. Harrison CJ, Langdale JA. A step by step guide for phylogeny reconstruction. *Plant J.* 2006 Feb; 45(4): 561 – 72.
11. Hoofer SR, Van Den Bussche RA. Molecular phylogenetics of the Chiroptean Family Vespertilionidae. *Acta Chiropterologica.* 2003; 5(1): 1 - 63.
12. Kearney TC, Volleth M, Contrafatto J, Taylor PJ. Systematic implications of chromosome GTG-band and bacula morphology for Southern African *Eptesicus* and *Pipistrellus* and several other species of Vespertilioninae (Chiroptera: Vespertilionidae). *Acta Chiropterologica.* 2002; 4(1): 55 - 76.
13. Adams RA, Pedersen SC. Bat evolution, ecology, and conservation. New York: Springer; 2003. 547 p.
14. Kunz TH, Parsons S. Ecological and behavioral methods for the study of bats. 2nd ed. Baltimore: Johns Hopkins University Press; 2011. 901 p.
15. Bickham JW, Hafner JC. A chromosomal banding study of three species of vespertilionid bats from Yugoslavia. *Genetica.* 1978; 48: 1–3.
16. Tan Tu V, Csorba G, Ruedi M. Comparative phylogeography of bamboo bats of the genus *Tylonycteris* (Chiroptera, Vespertilionidae) in Southeast Asia. *European Journal of Taxonomy.* Feb 2017; 274 (274): 1 – 38.
17. Heaney LR, Balete DS, Alviola P, Rickart EA, Ruedi M. *Nyctalus plancyi* and *Falsistrellus petersi* (Chiroptera: Vespertilionidae) from northern Luzon, Philippines: ecology, phylogeny, and biogeographic implications. *Acta Chiropterologica.* 2012; 14: 265 – 78.
18. Salguiero P. Genetic structure and gene flow of fragmented bats population [dissertation]. Portugal: University of Lisbon; 2007. 189 p.
19. Kawai K, Nikaido M, Harada M, Matsumura S, Lin LK, Yi W, et al. Intra- and Interfamily Relationships of Vespertilionidae Inferred by Various Molecular

- Markers Including SINE Insertion Data. *Journal of Molecular Evolution*. Oct 2002; 55(3): 284 – 301.
20. Heller KG, Volleth M. Taxonomic position of *Pipistrellus societatis* and karyological characteristic of *Eptesicus* (Chiroptera: Vespertilionadae). *Zoologische Jahrbücher Systematik*. 1984; 84: 505 – 40.
 21. Koubinova DN, Irwin P, Hulva P, Koubek ZJ. Hidden diversity in senegalese bats and associated findings in the systematics of the family Vespertilionidae. *Frontiers in Zoology*. 2013; 10: 48.
 22. Lack JB, Roehrs CE, Stanley JR, Ruedi M, Van De Bussche A. Molecular phylogenetics of Myotis indicate familial-level divergence for the genus *Cistugo* (Chiroptera). *Journal of Mammalogy*. 2010; 91: 976 – 92.
 23. Salguero P, Ruedi M, Coelho MM, Palmeirim JM. Genetic divergence and phylogeography in the genus *Nyctalus* (Mammalia, Chiroptera): Implications for population history of the insular bat *Nyctalus azoreum*. *Genetica*. Jul 2007; 130(2): 169-81.
 24. Salguero P, Coelho MM, Palmeirim JM, Ruedi M. Mitochondrial DNA variation and population structure of the island endemic Azorean bat (*Nyctalus azoreum*). *Molecular Ecology*. 2004; 13: 3357–66.
 25. Palmeirim JM. A morphometric assessment of the systematic position of the *Nyctalus* from Azores and Madeira (Mammalia: Chiroptera). *Mammalia*. 1991; 55: 381–88.
 26. Swenson N. Phylogenetic resolution and quantifying the phylogenetic diversity and dispersion of communities. *PLoS ONE*. Feb 2009; 4(2): e4390.
 27. Funk DJ, Omland KE. Species level paraphyly and polyphyly: frequency, causes, consequences, with insights from animal mitochondrial DNA. *Ann Rev Ecol Evol Syst*. 2003; 34: 397 – 423.
 28. Piganeau G, Gardner M, Eyre-Walker A. A broad survey of recombination in animal mitochondria. *Mol Biol Evol*. 2004 Dec; 21(12): 2319-25.

29. Kanthaswamy S, Smith DG. Population subdivision and gene flow among wild orangutans. *Primates*. Jan 2014; 43: 315–27.
30. Lin CP, Danforth B. How do insect nuclear and mitochondrial gene substitution patterns differ? Insights from Bayesian analyses of combined datasets. *Mol Phylogenet Evol*. 2004 Mar; 30(3): 686-702.
31. Gunnell GF, Simmons NB. Fossil evidence and the origin of bats. *J Mammal Evol*. 2005; 12: 209 – 46.
32. Kuns TH, Braun De Torrez E, Bauer D, Lobova T, Flemming TH. Ecosystem services provided by bats. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* March 2011; 1223(1): 1 - 38.
33. Zhang G, et al. Comparative analysis of bat genomes provides insight into the evolution of flight and immunity. *Science*. 2013 Jan 25; 339(6118): 456 - 60.
34. Seim I, et al. Genome analysis reveals insights into physiology and longevity of the Brandt's bat *Myotis Brandtii*. *Nat Commun*. 2013; 4:2212.
35. Sotero-Caio GC, Platt RN, Suh A, Ray DA. Evolution and diversity of transposable elements in vertebrate genomes. *Genome Biol Evol*. 2017 Jan 1; 9(1): 161-177.
36. Ruedi M, Csorba G, Lin LK, Chou CH. Molecular phylogeny and morphological revision of *Myotis* bats (Chiroptera: Vespertilionidae) from Taiwan and adjacent China. *Zootaxa*. 2015; 3920 (1): 301–342.
37. Ruedi M, Mayer F. Molecular systematics of bats of the genus *Myotis* (Vespertilionidae) suggests deterministic ecomorphological convergences. *Mol Phylogenet Evol*. 2001 Dec; 21(3): 436-48.
38. Fenton NB, Bogdanowicz W. Relationships between external morphology and foraging behaviour: Bats in the genus *Myotis*. *Canadian Journal of Zoology*. Feb 2011; 80(6):1004-1013.
39. Simmon HO. The molecular clock and estimating species divergence. *Nature Education*. 2008; 1(1):168.

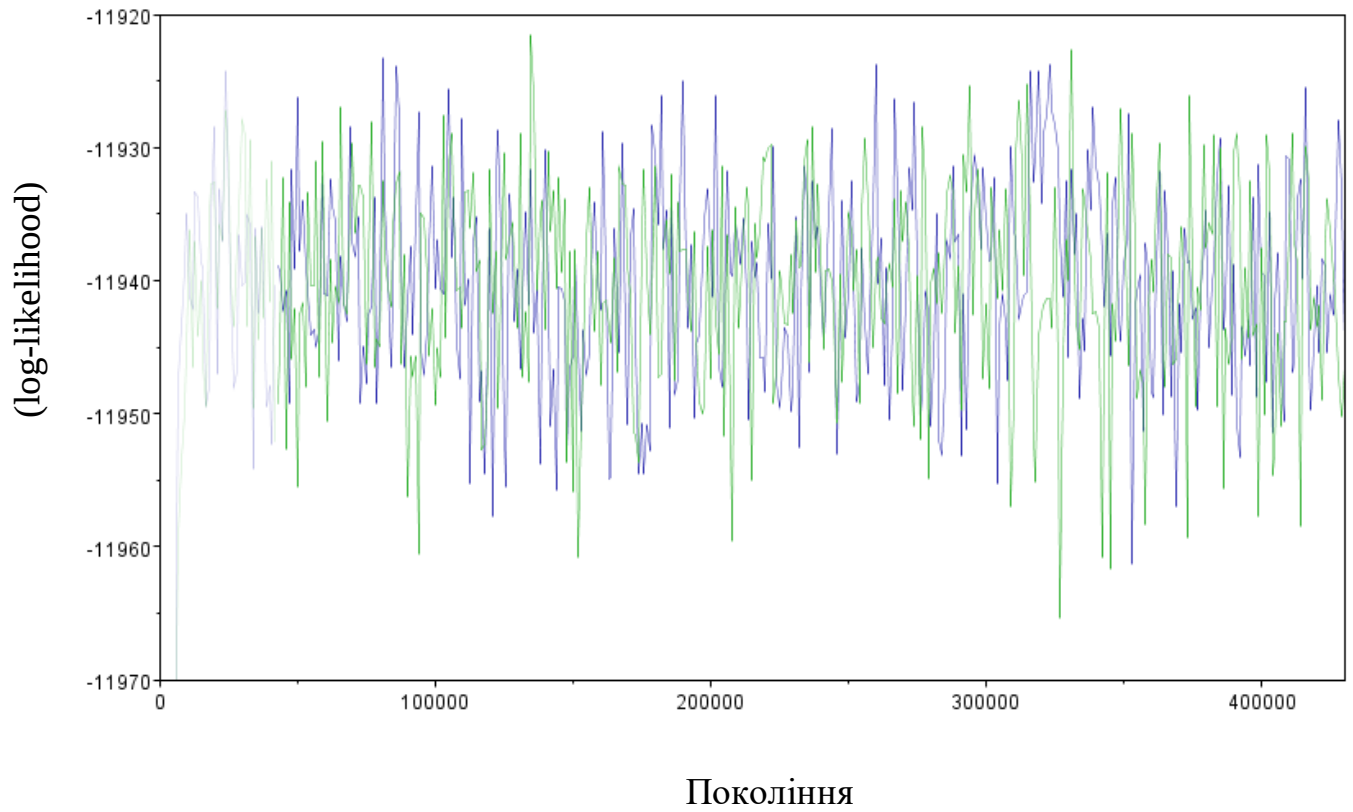
40. Reis MD, Donoghue PCJ, Yang Z. Bayesian molecular clock dating of species divergences in the genomics era. *Nat Rev Genet.* 2016 Feb; 17(2): 71-80.
41. Reis MD, Gunnel GF, Barba-Montoya G, Wilkins A, Yang Z, Yoder Ad. Using phylogenomic data to explore the effects of relaxed clocks and calibration strategies on divergence time estimation: primates as a test case. *Syst Biol.* 2018 Jul 1; 67(4): 594-615.
42. Soojin Yi. Neutrality and molecular clocks. 2013; *Nature Education Knowledge* 4(2):3.
43. Lanfear R, Thomas JA, Welch JJ, Brey T, Bromham M. Metabolic rate does not calibrate the molecular clock. *PNAS.* Sept 2007; 104(39): 15388-93.
44. Jones KA, Bininda-Emond ORP, Gittleman JL. Bats, clocks and rocks: diversification patterns in Chiroptera. *Evolution.* 2005; 59(10): 2243–55.
45. Rannala B, Yang Z. Inferring speciation times under an episodic molecular clock. *Syst Biol.* 2007 Jun; 56(3): 453-66.
46. Takezaki N, Rzhetsky A, Nei M. Phylogenetic test of the molecular clock and linearized trees. *Mol Biol Evol.* 1995 Sep; 12(5): 823-33.
47. Brown RP, Yang Z. Rate variation and estimation of divergence times using strict and relaxed clocks. *BMC Evolutionary Biology.* Sept 2011; 11(1): 271.
48. National Center for Biotechnology Information (NCBI)[Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information; [1988] – [cited 2017 Apr 06].
Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
49. Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution.* 2018; 35:1547-49.
50. Edgar RC. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res.* 2004; 32(5): 1792–97.
51. Microsoft Corporation. Microsoft Excel [Internet]. 2018.

Available from: <https://office.microsoft.com/excel>

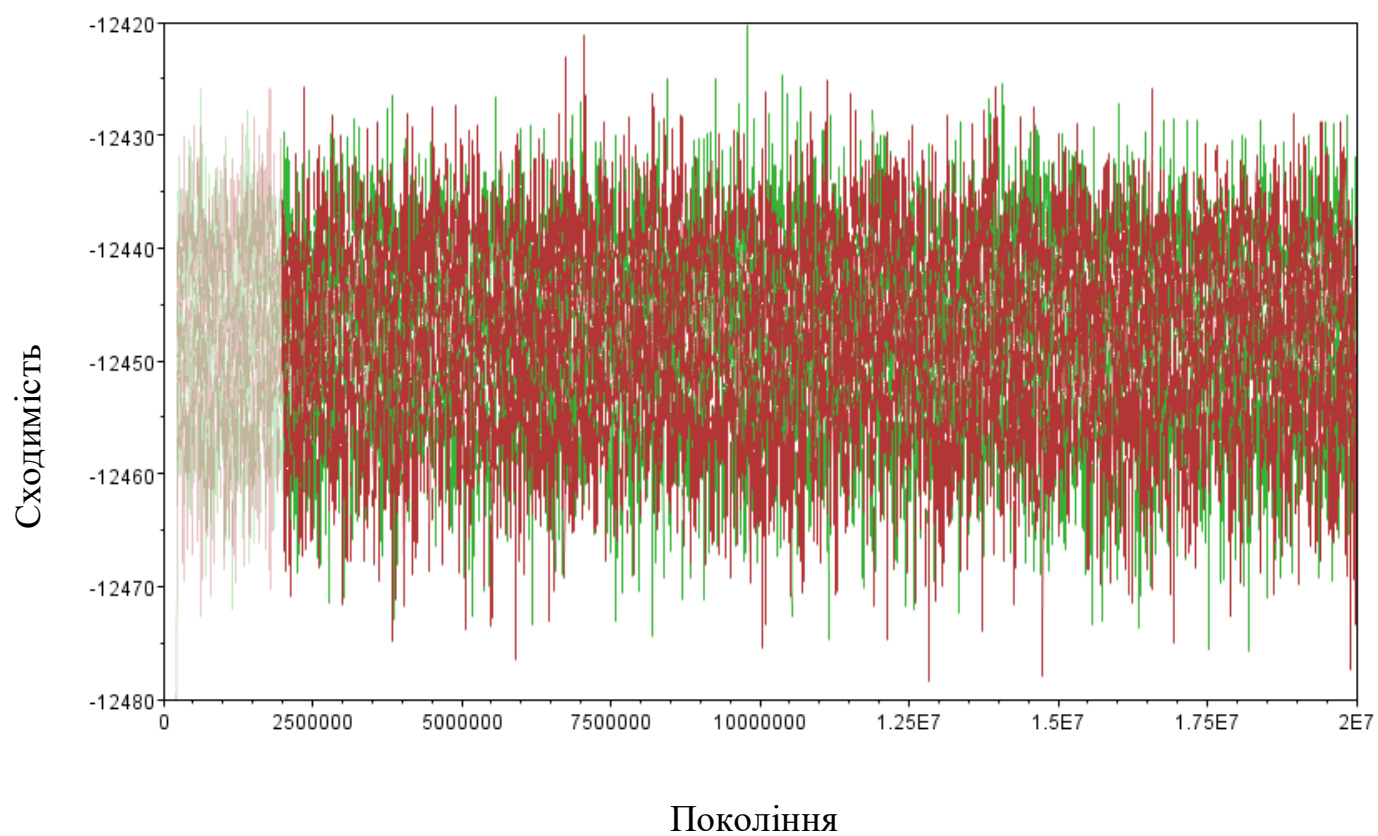
52. Hammer Ø, Harper DAT, Ryan PD. PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontologia Electronica*. 2001; 4(1): 9.
53. Teeling EC, Springer MS, Madsen O, Bates P, O'Brien S, Murphy W J. A molecular phylogeny for bats illuminates biogeography and the fossil record. *Science*. 2005; 307: 580–84.
54. Agnarsson I, Zambralla-Torellio CM, Flores-Sandana NP, May-Collado LJ. A time-calibrated species-level phylogeny of bats (Chiroptera, Mammalia). *PLoS Curr*. 2011 Feb; 4: 3.
55. Hulva P, Horacek I, Strelkov PP, Benda P. Molecular architecture of *Pipistrellus pipistrellus*/ *Pipistrellus pygmaeus* complex (Chiroptera: Vespertilionidae): Further cryptic species and Mediterranean origin of the divergence. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. Oct 2004; 32(3): 1023-35.
56. Huelsenbeck JP, Ronquist F. MRBAYES: Bayesian inference of phylogeny. *Bioinformatics*. 2001; 17: 754-55.
57. Miller MA, Pfeiffer W, Schwartz T. Creating the CIPRES Science Gateway for inference of large phylogenetic trees. *Proceedings of the Gateway Computing Environments Workshop (GCE)*. Nov 2010; New Orleans, LA: 1 - 8.
58. Bouckaert R, Vaughan TG, Barido-Sottani J, Duchêne S, Fourment M, Gavryushkina A, et al. BEAST 2.5: An advanced software platform for Bayesian evolutionary analysis. *PLoS computational biology*. 2019; 15(4): e1006650.
59. Rambaut A, Drummond AJ, Xie D, Baele G, Suchard MA. Posterior summarisation in Bayesian phylogenetics using Tracer 1.7. *Systematic Biology*. 2018; syy032.
60. Helfrich P, Rieb E, Abrami G. TreeAnnotator: Versatile Visual Annotation of Hierarchical Text Relations [conference]. *LREC 2018: 11th edition of the Language Resources and Evaluation Conference*At: Miyazaki, Japan.

61. Rambaut A. FigTree v1.3.1. Institute of Evolutionary Biology, University of Edinburgh. 2010.
62. Irwin DM, Kocher T. Evolution of Cyt B of Mammals. *Journal of Molecular Evolution*. March 1991; 32(2):128-44.
63. Jones G, Teeling EC. The evolution of echolocation in bats. *Trends Ecol Evol*. 2006 Mar; 21(3): 149-56.
64. Reineri D. 11th Hour: Introduction to Molecular Biology. Wiley-Blackwell. 2002; 202 p.
65. Zhang G, Li J, Zhao XQ, Wang J, Wang JKS, Yu G. KaKs_calculator: calculating Ka and Ks through model selection and model averaging. *Genomics, Proteomics & Bioinformatics*. 2006; 4 (4): 259-63.
66. Банникова АА. Молекулярные маркеры и современная филогенетика млекопитающих. *Журн общей биологии*. 2004; 65: 278–305.
67. Brown WM, George JM, Wilson AC. Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1979 Apr; 76(4): 1967-71.
68. Nylander J, Wilgenbusch J, Warren DL, Swofford DL. AWTY (Are We There Yet?): A system for graphical exploration of MCMC convergence in Bayesian phylogenetics. *Bioinformatics*. March 2008; 24(4): 581-3.
69. Thabah A, et al. Diet, Echolocation Calls, and Phylogenetic Affinities of the Great Evening Bat (*Ia io*; Vespertilionidae): Another Carnivorous Bat. *Journal of Mammalogy*. June 2007. 88(3): 728-35.
70. Eick GN, Jacobs DS, Mathee CA. A nuclear DNA phylogenetic perspective on the evolution of echolocation and historical biogeography of extant bats (Chiroptera). *Molecular Biology and Evolution*. 2005; 22: 1869–86.

Графік аналізу сходимості для дерева без молекулярного годинника на основі послідовностей *Cyt B*

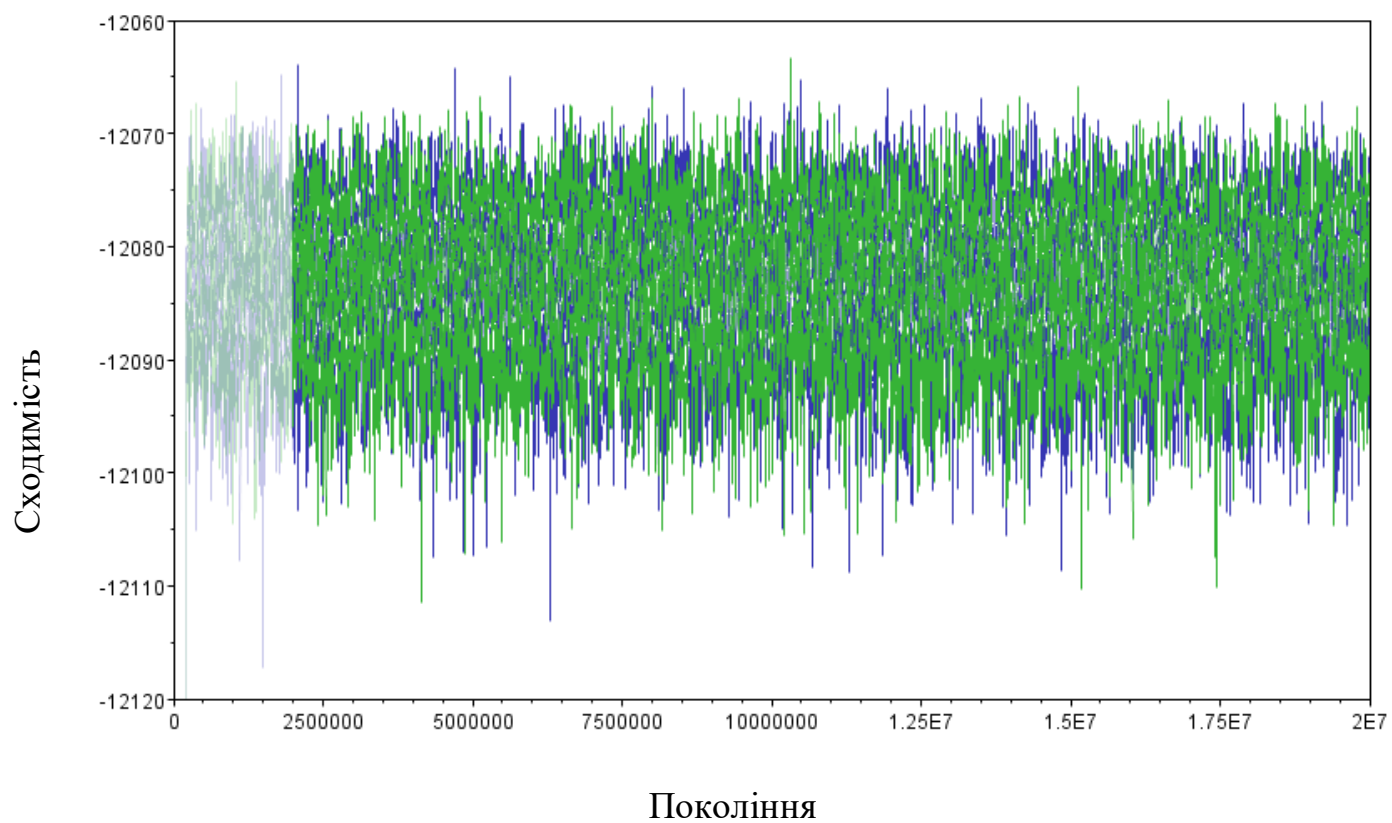


Графік аналізу сходимості для дерева з «м'яким» молекулярним
годинником на основі послідовностей *Cyt B*

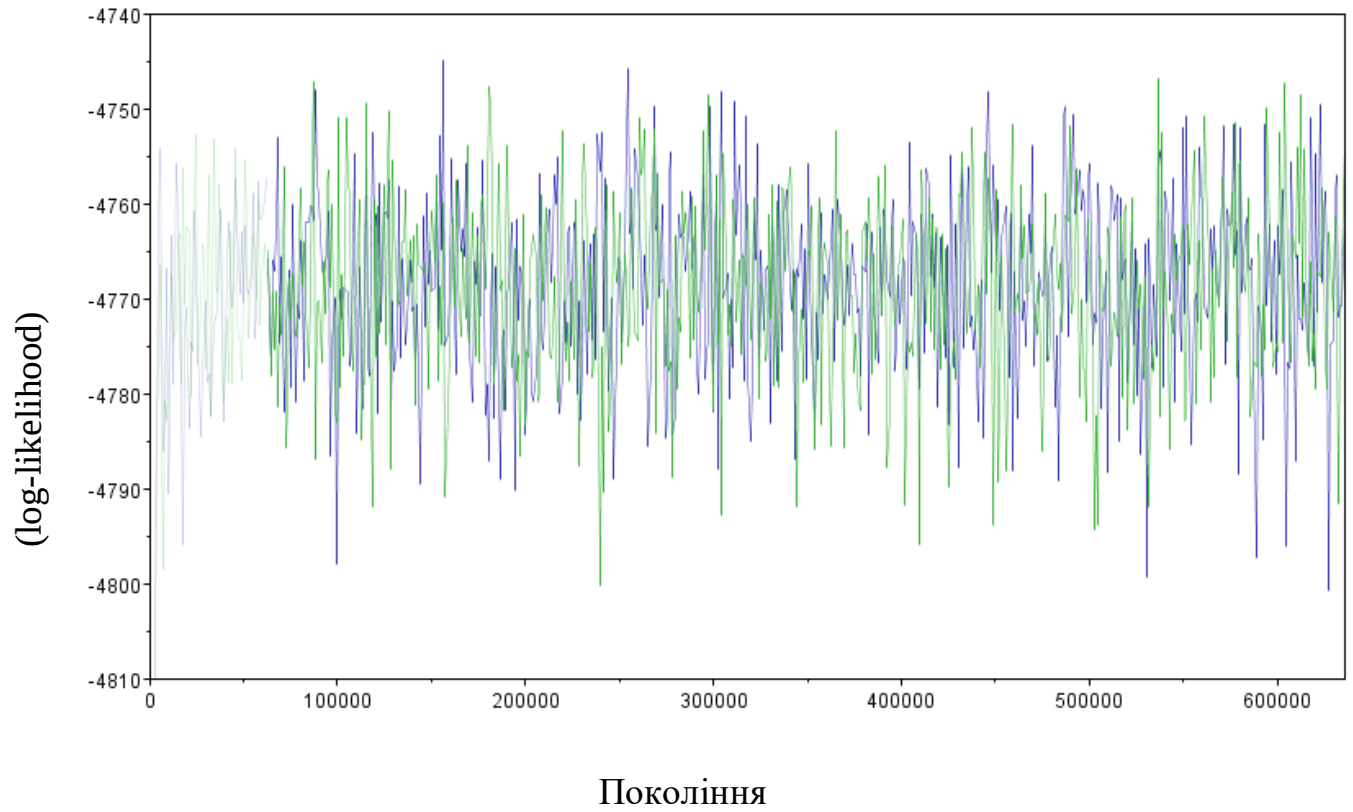


Додаток В

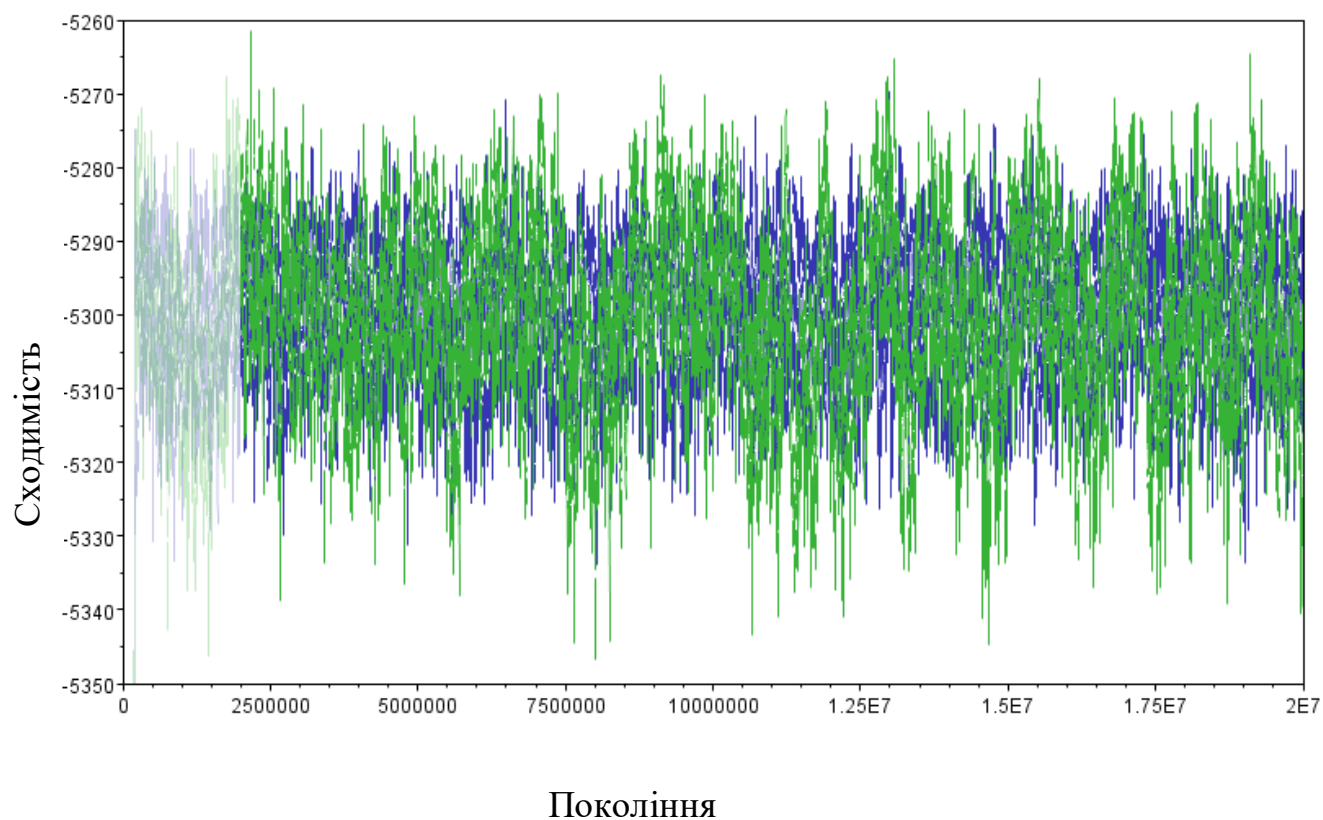
Графік аналізу сходимості для дерева з «жорстким» молекулярним
годинником на основі послідовностей *Cyt B*



Графік аналізу сходимості для дерева без молекулярного годинника на
основі послідовностей *RAG-2*



Графік аналізу сходимості для дерева з «м'яким» молекулярним
годинником на основі послідовностей *RAG-2*



Графік аналізу сходимості для дерева з «жорстким» молекулярним
годинником на основі послідовностей *RAG-2*

