

Állatorvostudományi Egyetem

Biológiai Intézet

A hosszúszárnyú denevér (*Miniopterus schreibersii*) populációgenetikai vizsgálata

Készítette: Győrössy Dorottya

Témavezető: Dr. Görföl Tamás

Magyar Természettudományi Múzeum, muzeológus

Belső konzulens: Dr. Vili Nóra

ÁTE, Biológiai Intézet, tudományos munkatárs

Budapest, 2020

Tartalomjegyzék

1	Rövidítések jegyzéke	2
2	Bevezetés	4
2.1	A denevérek vonulása és szerepe a vírusok terjesztésében	5
2.2	Denevérek populációgenetikai markerei.....	6
2.2.1	Mitokondriális markerek	7
2.2.2	Nukleáris markerek.....	8
2.3	A hosszúsárnyú denevér jellemzése.....	9
2.3.1	Szociális szerveződés, populációgenetikai struktúra.....	10
2.4	A Lloviu filovírus	11
2.5	A hosszúsárnyú denevérrel kapcsolatos korábbi kutatások	13
3	Célkitűzések	16
4	Anyag és módszer	17
4.1	Terepi mintavétel	17
4.2	Laboratóriumi módszerek	19
4.2.1	Mitokondriális HV1	20
4.2.2	Mikroszatellitek	20
4.3	Adatelemzési módszerek	21
5	Eredmények	23
5.1	Mitokondriális HV1	23
5.2	Mikroszatellitek	23
5.2.1	Vizsgált lokuszok	23
5.2.2	Mintavételi helyek variabilitása.....	25
5.2.3	Mintavételi helyek kapcsolata	26
6	Értékelés, következtetések	29
7	Összefoglalás	32
8	Abstract	33
9	Irodalomjegyzék	34
10	Köszönetnyilvánítás	39
11	Témavezetői ellenjegyzés	40
12	Belső konzulensi ellenjegyzés	41

1 Rövidítések jegyzéke

AMOVA: analysis of molecular variance – molekuláris varianciaanalízis

bp: bázispár

CO1: citokróm-c oxidáz I. alegység

CytB: citokróm-b

DNS: deoxiribonukleinsav

dNTP: deoxiribonukleotid-trifoszfát

EBOV: Ebola-vírus

H₀: megfigyelt heterozigócia

H_e: várt heterozigócia

HV1: hipervariábilis régió 1

LD: linkage disequilibrium – kiegyensúlyozatlan kapcsoltság

LLOV: Lloviu-vírus

MARV: Marburg-vírus

MCMC: Markov-chain Monte-Carlo

mtDNS: mitokondriális DNS

ND1: NADH-ubikinon oxidoreduktáz lánc I. alegység

nDNS: nukleáris DNS

PCR: polimerase chain reaction – polimeráz láncreakció

pd: példány

RNS: ribonukleinsav

rpm: revolutions per minute – percenkénti fordulatszám

μl: mikroliter

Mintavételi helyek rövidítése:

BHAB: Bosznia-Hercegovina, Ada-barlang

BUAB: Bulgária, Aina-ini-balang

BUGB: Bulgária, Golak-bánya

HUAT: Magyarország, Antal-táró

HUBB: Magyarország, Bomboly-bánya

HUSZ: Magyarország, Szársomlyó

ROEV: Románia, Esküllői-vizesbarlang

RORB: Románia, Rumunyesti-barlang

SEPB: Szerbia, Petnička-barlang

SETK: Szerbia, Toplik

SLHB: Szlovénia, Huda luknja-barlang

SLSB: Szlovénia, Škocjan-barlangrendszer

2 Bevezetés

A denevérek (Chiroptera) az emlősök osztályának (Mammalia) második legfajgazdagabb rendje. A világ emlősfajainak 25%-át teszik ki, így globális szinten jelentősen hozzájárulnak az emlősdiverzitáshoz (Simmons, 2005). Magyarországon 28 denevérfaj él, mind védett, illetve nyolc fokozottan védett és tíz szerepel az Élőhelyvédelmi Irányelv II. mellékletében (Natura 2000 jelölőfaj). A denevérek fontos ökoszisztéma szolgáltatók (Kunz és mtsai., 2011), akár beporzóként (nektárevő denevérek), akár magok terjesztőiként (gyümölcssevő denevérek), akár természetes rovarirtóként (pl. a hazai denevérfajok mindegyike) tekintünk rájuk. Veszélyeztető tényezők közé tartozik az élőhelyeik fragmentálódása, táplálkozóterületeik megszűnése és az urbanizáció (Jung és Threlfall, 2016), továbbá az épületek mesterséges kivilágítása és renoválási munkálatai (Mickleburgh és mtsai., 2002; Rowse és mtsai., 2016), az egyre fokozódó barlangi turizmus (Furey és Racey, 2016) és a különböző betegségek (vírusos és gombás fertőzések) (Puechmaille és mtsai., 2011; Brook és Dobson, 2015). A vírusoknak általában szűk a gazdaspektrumuk, így az állatokban előforduló vírusok terjedése általában egy-egy fajra vagy fajcsoportra korlátozódik (Shi, 2010). A zoonótikus (állatról emberre terjedő) virális kórokozók felelősek az újonnan kialakuló, illetve az újból megjelenő (ún. felbukkanó) vírusos betegségek 70%-áért (Jones és mtsai., 2008). Ma már több, mint 80 vírust izoláltak különböző denevérfajokból, ezek pl. a Rhabdoviridae, Paramyxoviridae, Coronaviridae, Herpesviridae, Adenoviridae és Filoviridae víruscsaládok tagjai (Calisher és mtsai., 2006), de a molekuláris vizsgálatokkal igazolt vírusok száma nagyságrendekkel nagyobb. A Filoviridae családba tartozó Ebola-vírus (EBOV) és Marburg-vírus (MARV) az emberek esetében vérzéses lázat okoz, a mortalitási arányuk igen magas. A denevéreket a Marburg-vírus rezervoárjának (hordozó) azonosították, továbbá bizonyították, hogy szerepük van az Ebola-vírus emberre való terjesztésében is (Amman és mtsai., 2017; Coltart és mtsai., 2017). Mióta 2002-ben Spanyolországban kimutatták a Lloviu-vírust (LLOV) hosszúsárnyú denevérekből, azóta a filovírusok lehetséges gazdaszervezeteinek tartják az európai denevéreket is (Negredo és mtsai., 2011). A LLOV magyarországi felbukkanása pedig jelenlegi tudományos ismereteink alapján komoly kockázatot jelenthet a fokozottan védett hosszúsárnyú denevér kolóniáinak stabilitására és egészségére.

2.1 A denevérek vonulása és szerepe a vírusok terjesztésében

Habár a legtöbb denevér helyhű, a vonulás rendkívül fontos szerepet tölt be sok faj életében (Fleming és Eby, 2003), továbbá befolyásolja a populációk genetikai struktúráját is (Moussy és mtsai., 2012). A mérsékelt égövi denevérek regionális vándorlásaik során mindig igyekeznek azt a szálláshelyet választani, ami a legjobb mikroklimatikus feltételeket biztosítja az adott évszakban (Baudinette és mtsai., 1994), ezért esetenként nagyobb távolságok megtételére is képesek (Hutterer és mtsai., 2005). A leggyakoribb szezonális mozgások a téli szálláshelyről – a tavaszi kolóniába, a tavaszi kolóniából – a nyári szülőkolóniába, a nyári szülőkolóniából – az őszi párzási helyekre és az őszi párzási helyekről – a téli szálláshelyekre történnek, de ez változhat fajok között, illetve ugyanazon faj populációi között is (Rodrigues és Palmeirim, 2008), sokszor a hibernáció után közvetlenül a kölykezőkolóniáknak otthont adó szálláshelyekre vonulnak. Bizonyos vándorló fajoknak igen helyhű populációik is vannak, és az ilyen populációkban az egyedeknek csupán töredéke vonul (Russell és mtsai., 2005). A denevérek eltérő nagyságú utat tesznek meg vonulás közben (Strelkov, 1969), a nyári és téli szálláshelyeik közötti távolságok alapján különböző csoportokba lehet sorolni őket (Fleming és Eby, 2003). Vannak olyan fajok, melyek nyári szálláshelye és téli pihenőhelye csupán néhány méterre (10-15 m) található egymástól (pl. a kis patkósdenevér). Azok a fajok, amelyek közepes távolságokra vonulnak, 10-100 km-t is repülhetnek a két hely között (pl. nyugati piszedenevér). A harmadik csoportba pedig olyan denevérek tartoznak, amelyek több mint 100 km-t is megtesznek azért, hogy megfelelő téli szálláshelyet találjanak (pl. a koraidenevérek vagy a törpedenevérek egyes fajai). A vonulás idő- és térbeli mintázata nagyon fontos jellemzője a denevér biológiájának. Ezeknek a megértése pedig aktuális feladat, mert sok faj veszélyeztetett és a vonuló viselkedésükről szóló információk nélkülözhetetlenek a természetvédelmi intézkedések megtervezéséhez. Egy denevérfaj megőrzéséhez az időszakosan használt szálláshelyeinek egész hálózatát szükséges megvédeni (Rodrigues és Palmeirim, 2008).

A denevérek mozgásmintázatának pontos megértése elengedhetetlen a fertőző betegségekkel érintett populációk vizsgálatához, illetve pl. a vírusok potenciális terjedési útvonalának meghatározásához (Moussy és mtsai., 2012). Mivel vonuló fajokról beszélünk, szerepük a vírusok terjesztésében igen nagy. A denevérek nyálukkal, vizeletükkel, guanójukkal és vérével is terjeszthetik a vírusokat, illetve a rajtuk található ektoparaziták

(ízeltlábúak) is képesek rá (Parrish és mtsai., 2008). Ősszel, amikor több különböző területről összegyűlnek a denevérek párzani az ún. nászbarlangokba, megnő a fertőzések egymás közötti átadásának esélye (Sulkin és Allen, 1974; Fleming és Eby, 2003; Calisher, 2015). A denevérekre általában jellemző, hogy a nőstények helyhűbbek a hímeknél, mindig próbálnak visszatérni abba a kolóniába, ahol születtek. Ezzel ellentétben a hímek többet mozognak, így a génáramlás mellett a vírusok terjesztéséhez is nagyobb mértékben hozzájárulnak (Fleming és Eby, 2003; Calisher, 2015; Dietz és Kiefer, 2016).

2.2 Denevérek populációgenetikai markerei

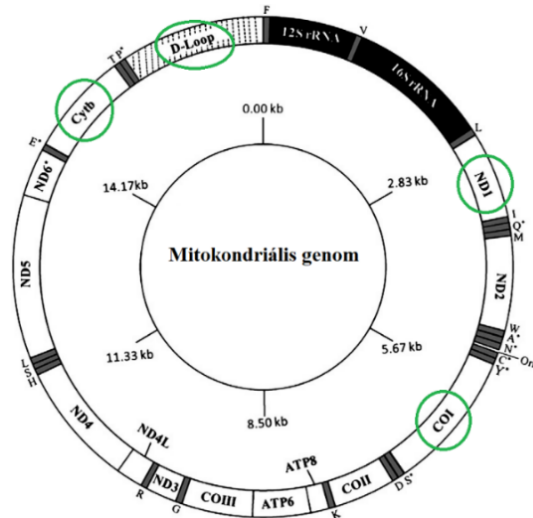
A denevérek rejtett életmódja miatt nehéz direkt módszereket (pl. gyűrűzés) alkalmazni ezen kis emlősök nagy populációinak tanulmányozására. Habár a jelöléses módszerekkel végig lehet követni egy egyed életét és dokumentálni lehet reprodukciós sikerességét, az alacsony visszafogási ráta miatt mégsem alkalmasak ilyen vizsgálatokra (Dietz és Kiefer, 2016). A genetikai markerek indirekt mérése azonban információt szolgáltat a populáción belüli vagy a populációk közötti viszonyokról, továbbá egy adott pillanatban jelen lévő mintázat gyors feltárása is lehetővé válhat. A genetikai vizsgálatok sok szempontból felülmúlják a gyűrűzésekből származó eredményeket, mivel sokkal több egyed nagyobb léptékű vizsgálatára alkalmasak. Az ilyen vizsgálatok során általában variábilis genetikai elemeket tanulmányoznak, amelyek különböző mutációk hatására eltérő hosszúságúvá evolválódnak (pl. mikroszatellitek). Ezeknek a különböző lokuszoknak (egy adott gén vagy szekvencia helye a genomban) a viszonyaiból, egymás közötti eltéréseiből következtethetünk az egyes mintavételi helyek közötti kapcsolatokra. A rendkívül variábilis kontroll régióval rendelkező mitokondriális DNS elemzése mellett, leginkább a sejtmagból származó mikroszatelliteket szokták használni denevérek populációgenetikai vizsgálatára (Dietz és Kiefer, 2016). A minták begyűjtése a genetikai vizsgálatokhoz történhet invazív (pl. szárnybiopszia) és nem-invazív (pl. ürülék) módon. A nem-invazív populációgenetikai vizsgálatok egyre népszerűbbek, mivel nem jár együtt az állatok befogásával. Az invazív módon történő mintavételhez viszont be kell fogni az állatot, ami egy veszélyeztetett vagy ritka faj esetében kockázatos lehet (pl. stressz, utódgondozás szempontjából). A bizonytalanságok ellenére mégis sokan alkalmazzák ezt a módszert, mivel a legtöbb esetben jobb minőségű DNS vonható ki belőle. Denevérek esetében a két módszert összehasonlító tanulmányban kimutatták, hogy habár a mtDNS vizsgálati eredményei hasonlóak lettek

szárny- és ürülminták esetében, addig a nDNS kivonása és markereinek vizsgálata a szármintákból sikeresebb volt (Boston és mtsai., 2012).

2.2.1 Mitokondriális markerek

A mtDNS anyai öröklődésű, nem rekombinálódik és magas szintű polimorfizmus jellemzi. A mutációk halmozódásával különböző haplotípusai (változatai) alakulnak ki, melyek egymásból levezethetőek és minimum egy, de több bázispárban is különbözhetnek egymástól. A mtDNS segít megismerni a jelenlegi állapot történeti hátterét, ezzel hozzájárulva a populációk genetikai struktúrájának feltárásához. Alkalmazásának azonban vannak hátrányai is: viszonylag gyorsan evolválódik és ennek következtében ismét megjelenhet az eredeti bázis a szekvenciában (többszörös mutáció révén). Így tehát nem biztos, hogy meg tudjuk különböztetni a haplotípusokat a szekvenciák összehasonlítása alapján. Ez főleg akkor jelent problémát, amikor távolabbi taxonok leszármazási kapcsolataira vagyunk kíváncsiak (Pecsenye, 2006).

Mivel a denevérekre jellemző a filopátia (nőstények helyhűsége), a mitokondriális DNS markerei alkalmasak a nyári szülőkolóniáik szerkezetének vizsgálatára. A denevérek mitokondriális genomja több, mint 16 500 bázispár hosszú. Különböző génszakaszok találhatóak benne, mint pl. CytB, ND1, D-loop (kontroll régió) és CO1 (1. ábra). Ezeknek a génszakaszoknak eltérő szubsztitúciós értékeik vannak, azaz az idő során eltérő változásokat mutatnak (a legnagyobb változásokat az ND1 és a CytB gének mutatják). A mitokondriális génszakaszokon belül a kontroll régió mérete is jelentős mértékben variábilis, sőt lokális eltérések is felismerhetőek közöttük. A mtDNS anyai öröklődése leegyszerűsíti az elemzéseket, ugyanakkor magában hordozza annak a kockázatát, hogy figyelmen kívül hagyjuk a populációk közötti génáramlást, melyet ezzel a módszerrel nem tudunk mérni. A mtDNS jó képet adhat a kolonizáció történetéről, azonban fajok között teljes mtDNS átadás is megtörténhet kolonizáció során. Ennek következtében a populációgenetikai vizsgálatokhoz ma egyre többet alkalmaznak a mindkét szülőktől örökölt nukleáris DNS-t (Dietz és Kiefer, 2016).



1. ábra. Denevér mitokondriális genom séma, jelölve rajta az egyes említett szakaszok
(Forrás: Meganathan és mtsai., 2012)

2.2.2 Nukleáris markerek

A mikroszatellitek kodomináns öröklésmentű, rövid tandem (egymás utáni) ismétlődésekből (2-6 bp) álló szekvenciaszakaszok a nukleáris genom nem kódoló régióiban. Egy lokuszon tipikusan 50 és 100 közötti ismétlődés van jelen, így összesen néhány száz bázisból állnak (Pecsenye, 2006). A mikroszatellitek viszonylag instabil genomszakaszok a magas mutációs ráta miatt. Az egyedi DNS szakaszokkal szemben itt a hosszpolimorfizmus adja a variabilitás jellegét, ami két homológ kromoszóma között nagy mértékben különbözhet. A mikroszatellitek, mint nukleáris markerek használata eléggé elterjedt, mivel minden élőlény genomjában megtalálhatóak és sok lokusz együttes vizsgálata lehetséges velük. A mikroszatellitek hosszát PCR-rel (polimeráz-lánreakció) egybekötött kapilláris elektroforézissel elemzik, amivel a populációkon belüli vagy a populációk közötti allélgyakoriság-eloszlásokat lehet megkapni. A mikroszatellitek tehát mind ökológiai időskálán, mind populációs (génáramlás, migráció) és egyedi szinten is (rokonságbecslés, genealógia) alkalmazhatóak, a többi markerrel ellentétben. Azonban, mint minden markernek, ennek is vannak hátrányai: pl. a mutációs mechanizmusuk igen komplex és még nem teljesen tisztázott, továbbá rejtett alléldiverzitás is előfordulhat homoplázia (két független allélban ugyanaz a méret kialakulása) és null-allélek (valós heterozigóta hamis homozigótának való detektálása) miatt. Az eltérő mutációs folyamatok és alléleloszlások főleg a fajok közti összehasonlításoknál okoznak problémát, fajon belüli vizsgálatoknál ezek a hibák már kisebb mértékben jelentkeznek.

2.3 A hosszúsárnyú denevér jellemzése

A hosszúsárnyú denevér (*Miniopterus schreibersii* Kuhl, 1817) nagy elterjedési területtel rendelkező faj. Európában főként a Mediterráneumban fordul elő, hazánkban, illetve a Kárpátokban éri el areájának északkeleti határát. (2. ábra). Hazai elterjedését tekintve hegyvidéki denevérfajunk, elsősorban karszterületek denevére. Állománya a 20. században folyamatos csökkenést mutatott, több jelentős kolóniája tűnt el (pl. a Baradla-barlangból) (Topál, 1989; Dobrosi, 1993). Jelenleg a Bükkben és a Zempléni-hegységben élnek legnagyobb állományai, de a Dél-Dunántúlon is megtalálható egy jelentősebb kolóniája (a Szársomlyón).



2. ábra. A hosszúsárnyú denevér (*Miniopterus schreibersii*) elterjedési térképe (Forrás: <https://www.iucnredlist.org/species/13561/4160556>)

Közepes méretű denevérfaj. Szárnya jelentős mértékben megnyúlt, melynek köszönhetően kiemelkedő repképességgel rendelkezik (3. ábra). Alkarhossza 42-48 mm, tömege 10-14 gramm. Életmódját tekintve igazi barlanglakó denevérfaj, egész évben földalatti szálláshelyeken található meg. Elsősorban a szélesebb járatokkal, nagyobb termekkel rendelkező barlangokat kedveli. Táplálkozása során fás vegetációjú helyeken, gyorsan repülve különféle éjszaka repülő rovarokra vadászik: főleg (80%) éjjeli lepkékre (Lepidoptera), kétszárnyúakra (Diptera) és recésszárnyúakra (Neuroptera).



3. ábra. A hosszúsárnyú denevér repülés közben (Fotó: Estók Péter)

A hosszúsárnyú denevér fokozottan védett faj (természetvédelmi értéke: 250.000 Ft) és szerepel az Élőhelyvédelmi Irányelv II. mellékletében (Natura 2000 jelölőfaj). A veszélyeztető tényezői közé tartozik a barlangok, vagyis a szálláshelyeik zavarása, mivel az egyre fokozódó barlangi turizmus is a nagyobb járatokkal és termekkel rendelkező barlangokat preferálja, csakúgy, mint a denevér. További veszélyeztető tényező a barlangok nem megfelelő lezárása. Mivel hosszú szárnyai miatt nagyon gyorsan repül, a barlangok kisebb kirepülőnyílások meghagyásával történő lezárását nem viseli el és ezért sokszor inkább elhagyja tanyahelyét.

2.3.1 Szociális szerveződés, populációgenetikai struktúra

A hosszútávú vonuló fajok populációi általában alacsony szintű genetikai különbségeket mutatnak a geográfiai régiók közötti magas génáramlás következtében (Waser, 2000). A hosszúsárnyú denevér is egy ilyen vonuló faj, gyakran néhány 100 km-es távolságokat is megtesz nyári szülőkolóniája és téli szálláshelye között. Rekordtávolsága több, mint 800 km (Hutterer és mtsai., 2005). Sok más barlanglakó denevérhez hasonlóan, a hosszúsárnyú denevér is egy igen szociális faj. Az év nagy részében nagy kolóniákat képez földalatti szálláshelyein, amik akár több ezer egyedből is állhatnak (4. ábra). Ez a tulajdonságuk különösen sérülékennyé teszi őket, továbbá az ilyen kolóniákban nagyobb az esélye a vírusok átadásának is (Palmeirim és Rodrigues, 1995).



4. ábra. Hosszúszárnyú denevér kolónia egy bányajáratban (Fotó: Boldogh Sándor)

A denevérek különböző kolóniákból származó egyedei párzási időszakban összegyűlnek a nászbarlangokban, így a kolóniák közötti keveredés, megtermékenyítés várható, ami hozzájárul a génáramláshoz (Pereira és mtsai., 2009). Habár a nőstények az utód világrahozatalához majdnem mindig visszatérnek abba a kolóniába, ahol születtek, a hímek kevésbé kötődnek a születési helyükhöz (Palmeirim és Rodrigues, 1995). Ez a szociális szerveződés hatással van a hosszúszárnyú denevér populációgenetikai struktúrájára, mint ahogy ez a többi denevérfajnál is megfigyelhető (Pereira és mtsai., 2009; Altringham, 2011). A magas szintű filopátia egy észrevehető struktúrát eredményezhet az anyai ágon örökített mtDNS-re nézve, míg a két szülő által örökített nukleáris markerek a hím-mediált génáramlás miatt nem biztos, hogy erős strukturáltságot mutatnak (Petit és Mayer, 1999; Castella és mtsai., 2001; Petit és mtsai., 2001). A hibernáló kolóniák továbbá gyakran befogadnak más szülőkolóniából származó egyedeket is. Következésképpen, ha a hosszúszárnyú denevér populációinak szociális szerveződése hatással van a genetikai struktúrára, akkor a szülőkolóniák és a hibernáló kolóniák más-más genetikai kompozíciót mutathatnak (Pereira és mtsai., 2009).

2.4 A Lloviu filovírus

A filovírusok súlyos, gyakran halálos vérzésekkel járó betegségeket okoznak emberekben és más főemlősökben. A 20. század második felében több évtizeden át kutatták a filovírusok hordozóit, míg végül 2003-ban a nílusi repülőkutya (*Rousettus aegyptiacus*) kimutatták

a MARV-t. Ez a denevér az egyetlen igazolt rezervoár szervezete a vírusnak, ami azt jelenti, hogy az állat nem betegszik meg tőle, ugyan végigmegy egy virémiás fázison, de utána csak üríti a vírust (Towner és mtsai., 2007). Az EBOV rezervoárjának is három gyümölcssevő denevért tartanak és ebben az esetben sem okoz tüneteket a vírus az állaton (Leroy és mtsai., 2005). Az egyetlen olyan filovírus, amiről ma ismert, hogy megbetegíti a denevért az a LLOV, ami az általunk is vizsgált hosszúszárnyú denevérekben található meg (Negredo és mtsai., 2011). 2002-ben több tömeges elhullást észleltek hosszúszárnyú denevérek néhány száz vagy akár több ezer egyed alkotta spanyol, portugál és francia kolóniái esetében (Quetglas és mtsai., 2003). Végül Spanyolországban, a Cueva del Lloviu nevű barlangban talált vérzéses tüneteket mutató tetemekből sikerült Negredo és munkatársai (2001)-nak kimutatni egy, az Ebolához nagyon közeli rokonságot mutató filovírust, a LLOV-t. Egészen idáig úgy tudták, hogy csak Afrikában vannak filovírusok, viszont a LLOV spanyolországi hosszúszárnyú denevér mintában történő felfedezése óta az európai denevéreket is figyelembe veszik, mint lehetséges filovírus gazdaszervezetek (Negredo és mtsai., 2011).

Magyarországon 2013-ban egy hosszúszárnyú denevér kolóniából mintegy 500 egyed elpusztult a Bükk hegység területén (Bükkszentlászlón). A kutatók nem tudtak virológiai vizsgálatokat végezni, mivel nem azonnal találták meg a tetemeket és azok már eléggé lebomlottak. Néhány elhullott egyed orrán azonban alvadt vércseppek voltak láthatóak, amikből lehetséges légzőrendszeri vérzésre következtettek. Ekkor megvizsgálták a többi ismert denevért kolóniát is a területen, de azoknál nem találtak fertőzésre utaló nyomokat. Három évvel később, 2016-ban öt hosszúszárnyú denevér tetemet találtak 50 km-re a korábbi incidens helyszínétől, Mád mellett. Ez az öt egyed a bánya bejáratánál volt, míg hét másik nem fertőzött egyed bentebb hibernált. Az elhullott állatok itt is erős légzőrendszeri vérzéses tüneteket mutattak. Az öt friss tetem egy tudómintájából a Pécsi Tudományegyetem Kutatóközpontjában filovírus RNS-t azonosítottak (Kemenesi és mtsai., 2018). A másik négy mintában valószínűleg a tetemek rossz minősége és a vírus nukleinsavainak degradációja magyarázta a jelek hiányát. További filogenetikai vizsgálatokkal (747 bp hosszú génszakasz elemzésével) pedig azt mutatták ki, hogy a Magyarországon izolált vírus legközelebbi rokona a spanyol LLOV vírus (98%-os nukleinsav egyezéssel). Így tehát elmondható, hogy a LLOV a hosszúszárnyú denevérek spanyolországi tömeges pusztulása után több, mint egy évtizeddel újra felbukkant Európában, és ugyanabban a denevérfajban azonosították Magyarországon, mint Spanyolországban. A LLOV fertőzések és a hosszúszárnyú denevérek pusztulása közötti feltételezhető kapcsolat alapján pedig úgy

tűnik, hogy ez a faj nem a rezervoár szervezete a vírusnak. A LLOV pontos eredetének és geográfiai elterjedésének tisztázásához azonban további denevérekhez kötődő ökológiai és populációgenetikai kutatásokra van szükség (Kemenesi és mtsai., 2018). 2016 után hazánkban havi rendszerességgel történt az ismert denevérkolóniák ellenőrzése és a következő években is találtak elhullott állatokat a mádi helyszínen, amikből kimutatták a vírust: 2017-ben 25-öt, 2018-ban egyet és 2019-ben kettőt. Ezek mindegyike a kolónia többi egészséges egyedétől elkülönülten lógott a bánya bejáratánál. A 2019-es egyedek nem mutattak vérzéses tüneteket, hanem le voltak fogyva. A vírussal kapcsolatos legújabb publikálatlan eredmény pedig az, hogy kimutatták a LLOV-t egészséges állatból is (Kemenesi személyes közlés, 2019).

2.5 A hosszúszárnyú denevérrel kapcsolatos korábbi kutatások

A Miniopteridae családba tartozó hosszúszárnyú denevérek a világ legszélesebb elterjedési területtel rendelkező emlősei közé tartoznak (Miller-Butterworth és mtsai., 2007). A 2000-es évek elejétől több kutatást is végeztek a hosszúszárnyú denevérek taxonómiai helyzetének tisztázásával és populációgenetikai vizsgálatával kapcsolatban. Tian és munkatársai (2004) kutatásuk során a hosszúszárnyú denevér (*Miniopterus schreibersii*) populációk közötti genetikai eltérését és filogenetikai viszonyait vizsgálták a mitokondriális CytB szekvenciákon keresztül. Kutatásukban japán, kínai, ausztráliai és spanyol mintákkal dolgoztak. A különböző területeken összességében nagy variabilitást találtak a genetikai távolságok között. A legkisebb eltérés kevesebb, mint 1% volt a két japán populáció között (0,57%), de a két kínai populáció genetikai távolsága is csak 0,86% volt. Ezen értékekből, illetve a populációk közötti távolságokból arra következtettek, hogy annak ellenére, hogy a földrajzi távolság nagyobb volt, mint 600 km, a génáramlás a két-két populáció között nagy, így csökkentve a genetikai sokféleségüket. Ezzel szemben a spanyol és a többi helyről származó minták összehasonlításánál jóval nagyobb genetikai távolságokat találtak (15,04 - 16,40%), ami pedig arra utal, hogy az ázsiai és ausztráliai hosszúszárnyú denevér már korábban szétvált a spanyol hosszúszárnyú denevértől.

A mitokondriális markerek mellett a nDNS vizsgálata is fontos szerepet tölt be a populációk vizsgálatában. Miller-Butterworth és munkatársai (2002) öt polimorf dinukleotid mikroszatellita primert fejlesztettek ki a *Miniopterus schreibersii* fajra, Han és munkatársai (2008) tíz polimorf mikroszatellita primert a *Miniopterus magnater* fajra, majd Wood és munkatársai (2011) 20 polimorf mikroszatellita primert a *Miniopterus schreibersii*

ausztráliai fajkomplexére. Ezen markerek kifejlesztése után lehetővé vált a mitokondriális és a nukleáris DNS együttes vizsgálata.

Miller-Butterworth és munkatársai (2003) a Dél-Afrikában lévő hosszúszárnyú denevér alfaj (*Miniopterus schreibersii natalensis*) tíz kolóniájából származó mintákon vizsgálták a populációk struktúráját mikroszatellitek és a mtDNS kontroll régiója alapján. Hasonló eredményeket kaptak a két vizsgálati módszer során, három alpopulációra különült el a tíz kolóniából származó 78 minta, valamint 55 haplotípust azonosítottak. Habár a legtöbb emlősfajnál – köztük a denevéreknél is – a hímek vándorolnak és a nőstényekre inkább a filopátia jellemző (Wilkinson és Chapman, 1991; Petit és Mayer, 1999; Kerth és mtsai., 2000), az itt talált nukleáris és mitokondriális markerek eredményei közötti hasonlóságból arra következtettek, hogy ezen alfaj mindkét neme erős filopátriát mutat és ez az alpopulációk közötti korlátozott génáramláshoz vezet. Ezzel ellentétben viszont az alpopulációkon belüli alacsony szintű genetikai különbségek feltételezhetően az alpopulációnkénti kolóniák közötti intenzív génáramlásnak köszönhető.

Pereira és munkatársai (2009) Portugáliában főleg a hosszúszárnyú denevér (*Miniopterus schreibersii*) nyári szülőkolóniáit vizsgálták ugyancsak a mitokondriális kontroll régió és öt mikrosatellita lókuszt alapján. Kutatásuk eredményei alapján arra következtettek, hogy van némi geográfiai strukturáltság a kolóniák között, valamint hogy összességében nagyon hasonló a kolóniák genetikai mintázata a nukleáris és mtDNS alapján. Azonban a mtDNS strukturáltsága (39 haplotípus azonosításával) itt is észrevehetőbb volt a nDNS-hez képest (a nőstény filopátia és a hím-mediált génáramlás következtében). Az ugyanahhoz a geográfiai régióhoz tartozó kolóniák közötti genetikai különbség a mtDNS esetében általában mérsékelt vagy alacsony volt, míg a nDNS esetében általában csak alacsony. A telelő kolóniák továbbá genetikailag is, és a haplotípusok szempontjából is szignifikánsan ($p < 0.0001$) diverzebbnek bizonyultak a nyári kolóniáknál, mivel télen más kolóniákból származó egyedeket is befogadnak a denevérek a hibernációs időszak végéig.

Gürün és munkatársai (2019) készítettek egy átfogó tanulmányt a *Miniopterus schreibersii* szociális struktúrájáról és filogeográfiájáról. Korábban Bilgin és munkatársai (2016) mitokondriális markerek (pl. CytB, kontroll régió HV1 szakasza) alapján azt valószínűsítették, hogy a fajra az "oak gall wasp" (tölgy gubacsdarázs) paradigma az érvényes, mely szerint az utolsó jégkorszak után azok a fajok népesítették be újra Európát, melyeknek Anatólia volt az elsődleges refúgiuma az utolsó jégkorszak glaciális maximuma

alatt. Ezt az elméletet vizsgálták Gürün és kutatótársai is mikroszatellita lókuszekkal kiegészítve. Összesen 17 ország 40 kolóniájából volt 333 szövetmintájuk, melyeken a mitokondriális markerek mellett tíz mikroszatellita markert is használtak. 12 filogeográfiailag meghatározott, földrajzi barrierékkal elválasztott régióra csoportosították a területeket. Vizsgálatuk során egy szlovákiai populáció (téli hibernáló kolónia) kivételével mind Hardy-Weinberg egyensúlyban volt. A populációk között relatíve alacsony szintű genetikai különbségeket figyeltek meg, a genotípusok elterjedése egységes volt, a legtöbb minta ugyanahhoz a klaszterhez tartozott ($K=1$). A populációk és a meghatározott geográfiai régiók között a strukturáltság hiányát ők is a nőstények filopátriájával és a hímek okozta génáramlással magyarázták, úgy, mint a korábbi kutatásokban (Fleming és Eby, 2003; Pereira és mtsai., 2009; Bilgin és mtsai., 2016), annyi különbséggel, hogy itt kontinentális léptékkal, a faj egész elterjedési területét vizsgálták. Mivel a mtDNS diverzitása Anatóliában volt a legnagyobb, illetve a nDNS bizonyos leíró statisztika értékei is szintén itt voltak a legjelentősebbek, így Gürün és munkatársai is támogatják az "oak gall wasp" paradigmát.

3 Célkitűzések

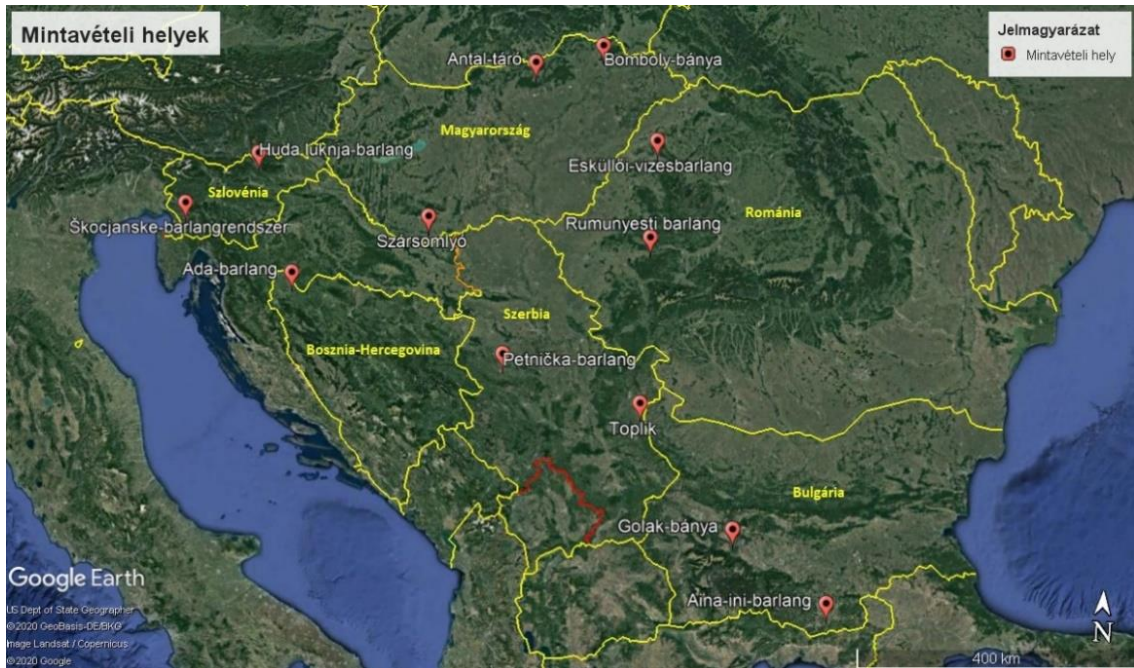
Kutatásunk célja a hosszúszárnyú denevér populációgenetikai vizsgálata mikroszatellita lókuszok és mitokondriális gének segítségével a különböző geográfiai régiók közötti kapcsolatok kimutatására. Ez azért fontos, mert szükséges a populációk közötti kapcsolatok ismerete a hatékony védelemhez és a vírus negatív hatásainak mérsékléséhez. Arra kerestük a választ, hogy a különböző szálláshelyek egymástól való földrajzi távolsága hogyan befolyásolja a populációk genetikai szerkezetét, diverzitását. Azt feltételezzük, hogy a hosszúszárnyú denevér nagy mértékű vándorlása és kiemelkedő repképessége miatt nem lesz nagy genetikai különbség a populációi között sem a mitokondriális, sem a nukleáris markerek vizsgálatánál.

A kutatás során megszerzett információk alapvetően hozzájárulnak a Lloviu-vírus lehetséges fertőzési útvonalainak megismeréséhez, mivel mintavételi helyeink közé tartozik a magyarországi Mád melletti helyszín, ahol már több fertőzött egyedet is találtak. Ezen útvonalak felderítése közvetlen segítséget nyújt a későbbi denevérvédelmi eljárások kidolgozásához, így a kolóniák stabilitásának és egészségének megőrzéséhez. Az ismeretek segíthetnek megelőzni a tömeges pusztulásokat, melyekre korábban több hazai példa és valószínűsíthetően számos külföldi példa is volt. Továbbá egy esetleg lokális kihalás esetén, a már feltárt, genetikailag legközelebbi populációból tudjuk pótolni az elpusztult egyedeket.

4 Anyag és módszer

4.1 Terepi mintavétel

A kutatás során 12 mintavételi helyünk volt: Magyarországon három, Romániában kettő, Szlovéniában kettő, Bulgáriában kettő, Szerbiában kettő és Bosznia-Hercegovinában egy (5. ábra).



5. ábra. Mintavételi helyek

A 2017-es szerbiai mintavételeken kívül az összes többi 2019-ben frissen gyűjtött minta volt. Igyekeztünk nyári kolóniákat vizsgálni, de ez nem minden esetben volt lehetséges, így a minták egy része (3 kolónia mintái) őszi időszakból származik. Össességében 121 egyedet sikerült mintáznunk (ezek a Magyarország és Románia területén található kolóniák), további 136-ot pedig a kinti helyi partnerek biztosítottak (1. táblázat).

1. táblázat. A mintavételi helyek és az egyes helyeken a gyűjtés ideje, a minták száma és a minták típusa

	Ország	Mintavételi hely	Mintavétel ideje	Mintaszám	Minta típusa
HUSZ	Magyarország	Károly-táró (Szársomlyó)	2019	20	szárnybiopszia
HUBB	Magyarország	Bomboly-bánya	2019	32	szárnybiopszia
HUAT	Magyarország	Antal-táró	2019	19	szárnybiopszia
ROEV	Románia	Esküllői-vizesbarlang	2019	25	szárnybiopszia
RORB	Románia	Rumunyesi-barlang	2019	25	szárnybiopszia
SLSB	Szlovénia	Škocjan-barlangrendszer	2019	11	szárnybiopszia
SLHB	Szlovénia	Huda luknja-barlang	2019	11	szárnybiopszia
BUGB	Bulgária	Golak-bánya	2019	19	szárnybiopszia
BUAB	Bulgária	Aina-ini-barlang	2019	23	szárnybiopszia
SEPB	Szerbia	Petnička-barlang	2017	18	szárnybiopszia
SETK	Szerbia	Toplik	2017	28	szárnybiopszia
BHAB	Bosznia-Hercegovina	Ada-barlang	2019	26	szárnybiopszia

A mintavételek során általában 19:00 és 21:00 között, a barlangok bejáratánál felállított hálóval vagy húrscapdával fogtuk be az állatokat. A biotikai adatok rögzítése után a denevérek szárnyának öregvitorla részéből egy kicsi, 3 mm átmérőjű körben eltávolítottuk a membránt biopszia-mintavevővel (6. ábra).



6. ábra. Szárnyminta vétele biopszia-mintavevővel (Fotó: Görföl Tamás)

Ez a mintavételi módszer gyors és fájdalommentes, mivel a membránban nincsenek fájdalomreceptorok és a biopsziák olyan területről származnak, ahol a hiányuk a legkevésbé akadályozza a denevért a repülésben. A denevérek szárnya rendkívül gyorsan gyógyul, ezért a mintavétel helye két héten belül teljesen begyógyul (Faure és mtsai., 2009). A mintázás után minden egyedet szabadon engedtünk. Az ilyen módon begyűjtött minták jó minőségű és elegendő mennyiségű DNS-t tartalmaznak a legtöbb standard, PCR alapú molekuláris genetikai vizsgálathoz (Wilmer és Barratt, 1996). A szövetdarabokat szilikagélben vagy 96%-os alkoholban fixáltuk, majd a Magyar Természettudományi Múzeum Molekuláris Taxonómiai Laboratóriumába szállítottuk. A mintákat feldolgozásig a gyűjteményben a kutatói adatbázis egyedi azonosítást lehetővé tévő növedéki számaival ellátott fiolákban -80°C -on tároltuk. A gyűjtést a Pest Megyei Kormányhivatal Környezetvédelmi és Természetvédelmi Főosztálya által kiadott, PE/KTF/4384/2018 ügyiratszámú természetvédelmi engedéllyel végeztük.

4.2 Laboratóriumi módszerek

A laboratóriumi munka a Magyar Természettudományi Múzeum Molekuláris Taxonómiai Laboratóriumában folyt. A mintákból először izoláltuk a genomi DNS-t az E.Z.N.A. Tissue DNA Kit segítségével a következő protokoll alkalmazásával:

1. A szövetet $200\ \mu\text{l}$ TL pufferbe helyeztük és $25\ \mu\text{l}$ Proteináz-K enzim hozzáadásával 55°C -on és $400\ \text{rpm}$ -en inkubáltuk min. 3 órán keresztül, mely időszak alatt fél óránként kézzel felráztuk a mintákat.
2. A 3 óra letelte után, amikor a szövet teljesen feloldódott, 5 perc centrifugálást követően a felülúszót (csapadék nélkül) átvittük egy új $1,5\ \text{ml}$ -es Eppendorf csőbe, utána pedig az oldathoz $220\ \mu\text{l}$ BL puffert adtunk és vortex segítségével összeráztuk, majd 70°C -on ismét 10 percig inkubáltuk.
3. A következő lépésben az oldathoz hozzáadtunk $220\ \mu\text{l}$ 100%-os etanolt, összevortexeltük, majd az így keletkezett terméket DNA Mini Column oszlopra vittük fel és centrifugáltuk 1 percig ($14\ 000\ \text{rpm}$).
4. Az oszlopon megtapadt DNS-t először $500\ \mu\text{l}$ HBC pufferrel mostuk, 30 másodpercig centrifugáltuk ($14\ 000\ \text{rpm}$), majd $700\text{-}700\ \mu\text{l}$ mosópufferrel (DNA Wash Buffer) kétszer áttisztítottuk, 30-30 másodperc centrifugálással ($14\ 000\ \text{rpm}$).
5. Ez után a DNS-t tartalmazó oszlopot üresen (puffer nélkül) 2 percig centrifugáltuk ($14\ 000\ \text{rpm}$), hogy az esetlegesen az oszlopon maradt alkoholt teljesen eltávolítsuk.

6. Végül 150 µl 70°C-ra előmelegített elúciós puffert használva a megtisztított DNS-t lemostuk az oszlopról és az adott minta jelölését tartalmazó 1,5 ml-es Eppendorf csőbe juttattuk. Ezt a lépést egy második adag eluátum érdekében megismételtük.
7. A további laboratóriumi munka idejére az izolált DNS-mintákat -20°C-on tároltuk.

Az izolált DNS mennyiségét NanoDrop készülék segítségével állapítottuk meg. A további vizsgálatokat Miller-Butterworth és munkatársai (2002), Han és munkatársai (2008) és Wood és munkatársai (2011) által kifejlesztett mikroszatellita primerek közül a – régióinkban – tíz legvariábilisabbal végeztük, illetve a Bilgin és munkatársai (2016) által használt mitokondriális kontroll régió HV1 szakaszát is vizsgáltuk.

4.2.1 Mitokondriális HV1

A PCR 25 µl végtérfogaton ment végbe, amely mintánként tartalmazott 0,125 µl Thermo Fisher DreamTaq enzimet, 2,5 µl Thermo Fisher DreamTaq Green puffert, 18,625 µl nukleázmentes vizet, 1 µl MgCl₂-t, 1,5 µl dNTP-t, 0,5-0,5 µl forward és reverse primert (HV1-C: 5'-TGAATTGGAGGACAACCAGT-3', HV1-E: 5'-CCTGAAGTAGGAACCAGATG-3' (Wilkinson és Chapman, 1991), valamint 2 µl DNS templátot.

A PCR – melyet egy Techne Prime G. (Staffordshire, UK) gépben végeztünk – programja a következő volt: a kezdeti denaturáció 3 perc 94°C-on, a 40 ciklus: denaturáció 30 mp 94°C-on, primer tapadás 40 mp 55°C-on és szintézis 1 perc 72°C-on, majd végső szintézis 5 perc 72°C-on. Az így keletkezett PCR termékek meglétét 1%-os agaróz gélen elektroforézissel ellenőriztük, majd a Macrogen Europe B. V.-nek küldtük szekvenálni.

4.2.2 Mikroszatelliték

Első lépésben néhány kiválasztott, elegendő DNS-t tartalmazó mintával optimalizáltuk a PCR reakciókat. Megkerestük a megfelelő primer tapadási hőmérsékletet és ciklusszámot, amellyel az adott lokusz tiszta és értékelhető eredményt ad. Különböző hőmérsékleteken (50°C és 64°C között) próbáltuk megtalálni a primerek optimális kötődési feltételeit. A PCR itt is 25 µl végtérfogaton ment végbe, a reakcióelegy megegyezett a HV1 marker vizsgálatánál használttal.

A vizsgált mikroszatellita lokuszok PCR hőmérsékleti profilja a következő volt: a kezdeti denaturáció az MM02, az MM03, az MM12, az MM18 és az MM23 lokuszok esetében 5

perc 94°C-on, az Mschreib2 és Mschreib4 lokuszoknál 2 perc 95°C-on, továbbá a CH37, a CHD2 és a CHB12 lokuszok esetében 15 perc 95°C-on. A ciklus az MM03, az MM12, az MM18 és az MM23 lokuszok esetében megegyezik: 40x: 45 mp 94°C -on, 1 perc 58°C-on és 7 perc 72°C-on. A többi primer esetében azonban változó az idő, a tapadási hőmérséklet és a ciklusszám is. A végső szintézis az MM02, az MM03, az MM12, az MM18, az MM23, az Mschreib2 és az Mschreib4 lokuszok esetében 10 perc 72°C-on, a CH37, a CHD2 és a CHB12 lokuszoknál pedig 20 perc 72°C-on. A PCR optimalizálás eredményeit és a végső profilokat az eredmények részben levő 2. táblázat foglalja össze.

A PCR termékeket itt is 1,5%-os agaróz gélen elektroforézissel ellenőriztük és ezen eredmények alapján, a mintákat megfelelő töménységben, HIDI+LIZ size standard hozzáadásával előkészítettük kapilláris elektroforézisre. A fragmentanalízist egy 3130 ABI Genetic Analyzeren (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Usa) futtattuk. Az allélhosszúságokat a PEAK SCANNER v1.0 program (Applied Biosystems) segítségével olvastuk le.

A DNS izolálás, a PCR reakcióelegy elkészítése, valamint a kapilláris elektroforézishez a PCR termékek előkészítése a legnagyobb körültekintés mellett történtek UV fényel sterilizált elszívófülkék alatt, steril eszközökkel.

4.3 Adatelemzési módszerek

A mitokondriális HV1 vizsgálatánál a visszkapott szekvenciák illesztését és vágását a MEGA7 programmal (Kumar és mtsai., 2016) végeztük, majd POPART 1.7 segítségével (Bandelt és mtsai., 1999) Median Joining haplotípus hálózatot készítettünk.

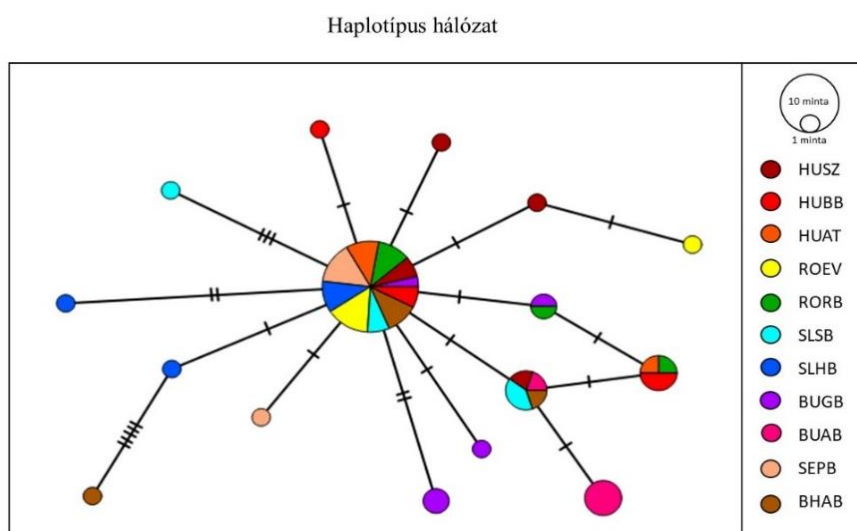
A mikroszatellitek vizsgálata során a MICROCHECKER 2.2.0.3 programmal (Van Oosterhout és mtsai., 2004) ellenőriztük, hogy az adatsorunk tartalmaz-e null-allélokot. A GENALEX 6.503 segítségével (Peakall és Smouse, 2012) az alábbi vizsgálati eredményeket kaptuk meg: a különböző allélok és privát allélok száma, a megfigyelt (H_o) és várt heterozigotia (H_e) értékei, páronkénti F_{ST} értékek, Nei-féle genetikai távolság és AMOVA eredményei, továbbá főkoordináta analízist (PCoA) is végeztünk a variancia mintázatának feltárására és Mantel-tesztet a genetikai és földrajzi távolság közötti korreláció vizsgálatára. Az FSTAT 2.9.4. program (Goudet, 1995) az allélgazdagságról és az F_{IS} értékekről adott információt. A GENEPOP 4.2 (Raymond és Rousset, 1995) segítségével megvizsgáltuk, hogy mintavételi helyenként van-e eltérés a HWE-től, hogy a lokuszok között találunk-e olyat,

ami LD-ban van, illetve csoportok közötti isolation-by-distance analízist is végeztünk. A populációk struktúráját először a STRUCTURE 2.3.4 (Pritchard és mtsai., 2000) segítségével vizsgáltuk, mely genetikai adatok alapján végzi az egyedek klaszterezését, térbeli paramétereket nem használ. Az elemzések során a $K=1-12$ értékeket állítottuk be, amik a minimum és maximum feltételezett populációk számát mutatják és tíz szimulációt futtattunk minden K értékre. A további beállításaink a következők voltak: admixture modell, korrelált allélgyakoriság, 450 000 MCMC ismétlés 150 000 elégetéssel. A ΔK értéket – ami kifejezi a legvalószínűbb K értéket – a STRUCTURE HARVESTER WEB 0.6.94 online program segítségével határoztuk meg (Earl és VonHoldt, 2012). Az utolsó vizsgálatunk a GENELAND 4.0.9 R csomaggal történt (Guillot és mtsai., 2005), ami a földrajzi koordináták felhasználásával végzi az egyedek klaszterezését. A vizsgálat során az alábbi beállításokkal dolgoztunk: 150 000 MCMC ismétlés, 150 elégetés, tíz független futás és $K=1-12$ a populációk száma.

5 Eredmények

5.1 Mitokondriális HV1

54 minta alapján készítettük el a haplotípus hálózatot (7. ábra), melynek csillag-szerű alakja lett. Összesen 16 haplotípust határoztunk meg. A középső haplotípus a leggyakoribb és majdnem az összes kolóniában meg is található, kivétel a bulgáriai Aina-ini-barlang. A többi haplotípus csupán 1-6 bp-ban különbözik a leggyakoribbtól. Haplotípus diverzitási értéknek 0,74-et kaptunk.



7. ábra. Haplotípus hálózat a PopART programmal készítve. A különböző színek az egyes mintavételi helyeket jelölik, melyek négybetűs rövidítése látható az ábra jobb oldalán. A körök mérete az egyes haplotípusokba tartozó minták számát szemlélteti.

5.2 Mikroszatellitek

5.2.1 Vizsgált lokuszok

A PCR optimalizálásának eredményeit a 2. táblázat foglalja össze. Az MM02 lokusz 40-szer ismétlődő szakasza a következő: 45 mp 94°C-on, anellálás 1 perc 62°C-on, majd 1 perc 72°C-on. Az Mschreib2 lokusznál a következő: 40-szer: 50 mp 95°C-on, anellálás 50 mp 59°C-on és 1 perc 72°C-on. Az Mschreib4 csak az anellációs hőmérsékletben különbözik az Mschreib2-től, ami ebben az esetben 56°C. A CH37 lokusz esetében 40-szer ismétlődik: 45 mp 94°C, 50 mp 62°C és 50 mp 72°C, míg a CHB12 ettől csak az anellációs hőmérsékletében tér el: ami 54°C. A CHD2 lokusznál 35-ször ismétlődik: a 30 mp 94°C, a 30 mp 56°C és a 30 mp 72°C. A megfelelőnek vélt körülményeket alkalmazva jól leolvasható allélhosszúságokat kaptunk, ezért az optimalizálás sikeres volt.

2. táblázat. A mikroszatellita primerek PCR profiljai

Primer	Kezdeti denaturáció	Denaturáció	Primer tapadás	Szintézis	Végső szintézis
MM02	5 perc 94°C	40 ciklus			10 perc 72°C
		45 mp 94°C	1 perc 62°C	1 perc 72°C	
MM03, MM12, MM18, MM23	5 perc 94°C	40 ciklus			10 perc 72°C
		45 mp 94°C	1 perc 58°C	1 perc 72°C	
Mschreib2	2 perc 95°C	40 ciklus			10 perc 72°C
		50 mp 95°C	50 mp 59°C	1 perc 72°C	
Mschreib4	2 perc 95°C	40 ciklus			10 perc 72°C
		50 mp 95°C	50 mp 56°C	1 perc 72°C	
CH37	15 perc 95°C	40 ciklus			20 perc 72°C
		45 mp 94°C	50 mp 62°C	50 mp 72°C	
CHD2	15 perc 95°C	35 ciklus			20 perc 72°C
		30 mp 94°C	30 mp 56°C	30 mp 72°C	
CHB12	15 perc 95°C	40 ciklus			20 perc 72°C
		45 mp 94°C	50 mp 54°C	50 mp 72°C	

Az MM03 és a CH37 lokuszokat kihagytuk a vizsgálatból, mert nem voltak elég variábilisak. Egyik lokusz sem tartalmazott null-allelot, így a fennmaradó nyolc lokusszal végeztük el az elemzéseket: MM02, MM12, MM18, MM23, Mschreib2, Mschreib4, CHD2 és CHB12. Az általunk vizsgált hosszúsármnyú denevér populációk lokuszain megfigyelhető legkevesebb allélszám 2, míg a legtöbb 16 volt. A lokuszonkénti allélgazdagsági értékek 1,944 és 7,922 között találhatóak (3. táblázat). A lokuszok között csak az Mschreib2 és az MM02 lokuszok esetében találtunk szignifikáns ($p=0,0392$) kiegyensúlyozatlan kapcsoltságot.

3. táblázat. A vizsgált mikroszatellita lokuszok, ismétlődő motívumaik, valamint az egyes lokuszokon talált allélok száma és az allélgazdagság

Lokusz	Ismétlődő motívum	Allélok száma	Allélgazdagság
MM02	di-tetra complex	5	2,71
MM12	dinukleotid	2	1,94
MM18	di-tri complex	11	6,06
MM23	di-tetra complex	10	5,71
Mschreib2	dinukleotid	4	2,34
Mschreib4	dinukleotid	16	7,92
CHD2	dinukleotid	7	3,74
CHB12	dinukleotid	8	3,61

5.2.2 Mintavételi helyek variabilitása

A lokuszok közül szignifikánsan eltér a HWE-től a HUBB mintavételi helyen MM02 ($p=0,0021$) lokusz, a ROEV mintavételi helyen a Mschreib4 ($p=0,0018$) és a MM23 ($p=0,0043$) lokuszok, a RORB mintavételi helyen a MM02 ($p=0,0005$) lokusz, a SLSB mintavételi helyen a MM02 ($p=0,0140$) lokusz, a BUGB mintavételi helyen a MM02 ($p=0,0095$) lokusz, a SETK mintavételi helyen a CHD2 ($p=0,0276$) és a MM02 ($p=0,0251$) lokuszok, illetve a BHAB mintavételi helyen a MM02 ($p=0,0010$) lokusz, 5%-os szignifikancia szint mellett. Az alapvető populációgenetikai mérőszámokat mintavételi helyenként a 4. táblázat tartalmazza.

4. táblázat. Populációgenetikai mérőszámok mintavételi helyenként

Mintavétel helye	Mintaszám	Allélok száma	Privát allélok száma	H_0 átlag ($\pm SE$)	H_e átlag ($\pm SE$)	F_{IS}
HUSZ	18	34	3	0,47($\pm 0,10$)	0,47($\pm 0,10$)	0,042
HUBB	18	38	1	0,53($\pm 0,10$)	0,59($\pm 0,08$)	0,144
HUAT	16	40	1	0,59($\pm 0,09$)	0,58($\pm 0,08$)	0,007
ROEV	18	31	0	0,42($\pm 0,08$)	0,53($\pm 0,09$)	0,247
RORB	18	42	1	0,52($\pm 0,10$)	0,57($\pm 0,08$)	0,117
SLSB	11	29	0	0,38($\pm 0,10$)	0,45($\pm 0,11$)	0,208
SLHB	11	30	0	0,49($\pm 0,06$)	0,55($\pm 0,07$)	0,154
BUGB	17	35	1	0,58($\pm 0,09$)	0,57($\pm 0,08$)	0,002
BUAB	17	41	5	0,57($\pm 0,06$)	0,63($\pm 0,06$)	0,120
SEPB	16	37	0	0,50($\pm 0,08$)	0,56($\pm 0,07$)	0,104
SETK	16	31	0	0,47($\pm 0,06$)	0,53($\pm 0,06$)	0,176
BHAB	16	34	0	0,53($\pm 0,07$)	0,55($\pm 0,08$)	0,095

Az allélok száma 29 és 42 között jellemző mintavételi helyenként. Összesen 12 privát allélt találtunk: HUSZ mintavételi helyen a CHB12 lokuszon kettőt és az MM02 lokuszon egyet, a HUBB mintavételi helyen az MM23 lokuszon egyet, a HUAT mintavételi helyen az Mschreib4 lokuszon egyet, a RORB mintavételi helyen az MM23 lokuszon egyet, a BUGB mintavételi helyen az Mschreib4 lokuszon egyet, a BUAB mintavételi helyen az MM18 lokuszon kettőt, az Mschreib4, a CHB12 és a MM02 lokuszokon egyet-egyet. A heterozigóták lokuszonkénti átlagos gyakorisága (H_0) az egyes mintavételi helyeken 0,3 és 0,6 között változott. Ez az érték a legtöbb mintavételi hely esetén csak kis mértékben tér el a HWE alapján várt heterozigótia értékétől (H_e). Az F_{IS} értékek megmutatják, hogy a szubpopulációkon belüli pánmixis hiánya mekkora arányban okozza a heterozigóta hiányt.

Az általunk vizsgált mintákra vonatkozó F_{IS} értékek 0,002 és 0,247 között találhatóak. Az AMOVA eredménye alapján a teljes genetikai varianciának csupán 2,27%-a adódik az egyes mintavételi helyek közti különbségekből, és a variancia 97,73%-a az élőhelyeken belül figyelhető meg (84,68% az egyedeken belül és 13,05% az egyedek között).

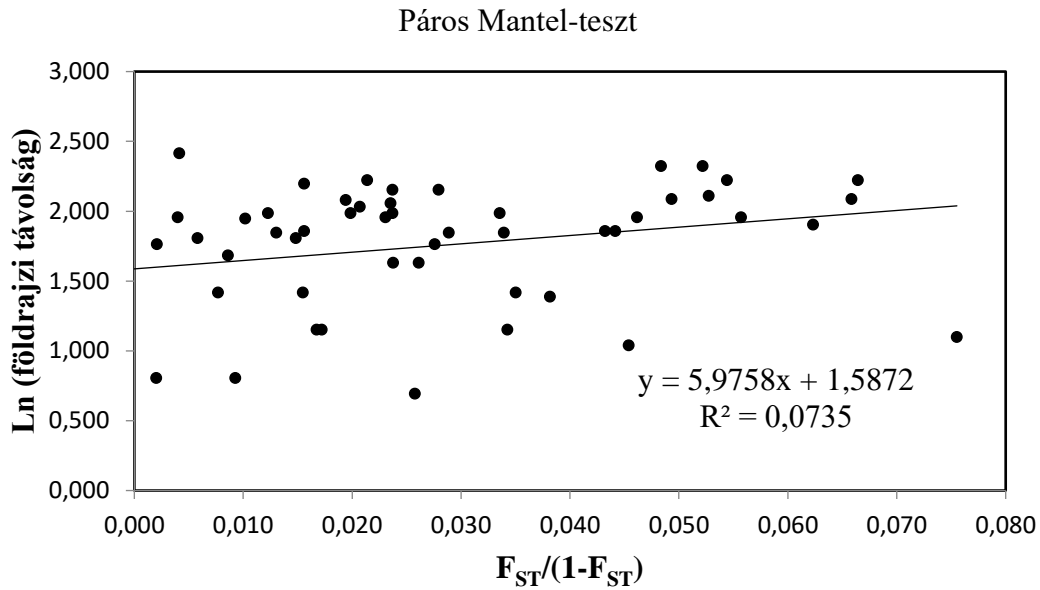
5.2.3 Mintavételi helyek kapcsolata

A mintavételi helyekre számolt páronkénti F_{ST} értékeket – melyek a szubpopulációk közötti allélgyakoriság eltéréseket mutatják – az 5. táblázat tartalmazza.

5. táblázat. Páronkénti F_{ST} értékek mintavételi helyenként

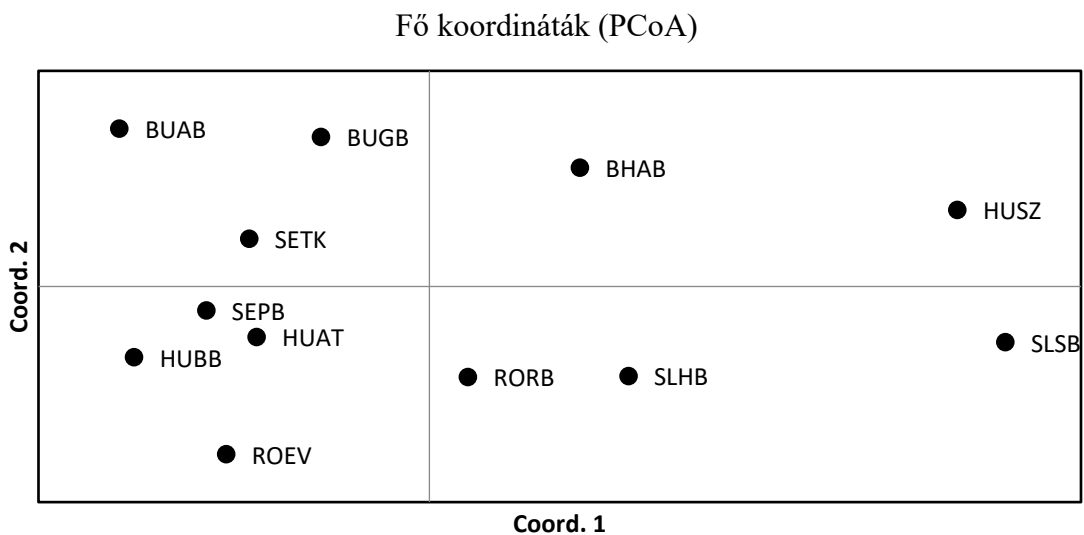
	HUSZ	HUBB	HUAT	ROEV	RORB	SLSB	SLHB	BUGB	BUAB	SEPB	SETK	BHAB
HUSZ	0,000											
HUBB	0,054	0,000										
HUAT	0,037	0,019	0,000									
ROEV	0,056	0,015	0,020	0,000								
RORB	0,034	0,013	0,012	0,016	0,000							
SLSB	0,032	0,054	0,043	0,041	0,039	0,000						
SLHB	0,049	0,030	0,026	0,034	0,024	0,048	0,000					
BUGB	0,038	0,024	0,029	0,035	0,027	0,044	0,041	0,000				
BUAB	0,052	0,023	0,027	0,041	0,024	0,068	0,039	0,012	0,000			
SEPB	0,047	0,012	0,020	0,020	0,020	0,049	0,019	0,023	0,023	0,000		
SETK	0,038	0,028	0,026	0,040	0,023	0,051	0,042	0,022	0,019	0,026	0,000	
BHAB	0,019	0,038	0,022	0,046	0,025	0,042	0,032	0,030	0,033	0,029	0,033	0,000

A páros Mantel-teszt kimutatta, hogy a populációk genetikai távolsága (amit az isolation-by-distance analízis eredményeként kapott $F_{ST}/(1-F_{ST})$ értékekből számoltunk) a földrajzi távolságukkal nem korrelál szignifikánsan ($p=0,6700$) (8.ábra). R^2 értéknek 0,0735-et kaptunk, ami azt jelenti, hogy ez a teljes varianciának 7,35%-át magyarázza.



8. ábra. A páros Mantel-teszt eredménye a genetikai és a földrajzi távolság közötti kapcsolat kimutatására

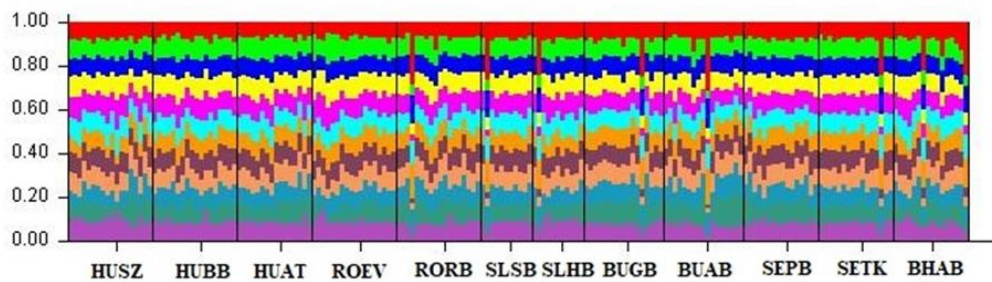
A 9. ábra a mintavételi helyeink főkoordináta analízisét szemlélteti a páronkénti F_{ST} értékekből számolt genetikai távolság alapján, koordináta rendszerben. Az ábrán nem figyelhető meg a mintavételi helyek csoportosulása. A magyarországi Szársomlyó, illetve a szlovéniai Škocjan-barlangrendszer esik genetikailag legtávolabb a többi mintavételi helytől.



9. ábra. A páronkénti F_{ST} értékek alapján készült főkoordináta analízis eredménye. Az ábrán fekete körökkel a mintavételi helyek rövidítései láthatóak.

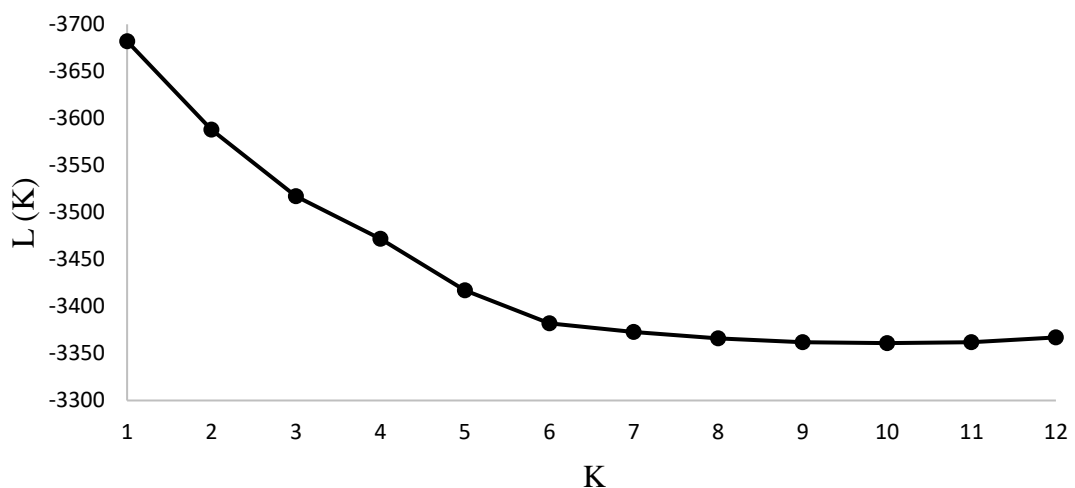
A STRUCTURE program által készített elemzések és a kapott oszlopdiagram alapján a $K=1$ tűnt a legvalószínűbb értéknek ($\Delta K=14,21$), vagyis a mintavételi terület nem osztható fel alpopulációkra genetikai adatok alapján. Az oszlopdiagramon a mintavételi helyek egyedeinek genotípusai láthatóak (10. ábra), melyek mintánként viszonylag egységesnek mondhatóak. Az $\ln(P)$ D tapasztalati szabály kimondja, hogy az a valós K érték, amelyik után a legnagyobb esés történik a következő K értékre (Rosenberg és mtsai., 2001), ezt figyelhetjük meg a 11. ábrán, ahol ugyancsak a $K=1$ a legértelmezhetőbb. A GENELAND esetében is mind a tíz független futásnak $K=1$ lett az eredménye 52-61%-os valószínűséggel, ami azt jelenti, hogy a populációk feltehetően egy csoportba tartoznak a térbeli paraméterek figyelembevételével is.

Az egyedek genotípusai mintavételi helyenként



10. ábra. A STRUCTURE által készített oszlopdiagram az egyedek genotípusaival, mintavételi helyenként.

K valószínűségi értékei



11. ábra. K valószínűségi értékei ($K=1-12$)

6 Értékelés, következtetések

A hosszúszárnyú denevér populációk genetikai szerkezetét és a közöttük levő kapcsolatokat más országokban is vizsgálták mitokondriális és nukleáris markerek segítségével (Miller-Butterworth és mtsai., 2003; Tian és mtsai., 2004; Pereira és mtsai., 2009; Bilgin és mtsai., 2016; Gürün és mtsai., 2019). Ezek közül legjelentősebbnek a Gürün és munkatársai által készített, a hosszúszárnyú denevér egész elterjedési területét átfogó, kontinentális léptékű tanulmány tekinthető. Kutatásuk során 17 ország 40 kolóniáját vizsgálták, melyek között viszont vegyesen voltak nyári szülőkolóniák és téli szálláshelyek is, melyeknek eltérő genetikai diverzitásuk lehet. A vizsgált országok között nem volt jelen az általunk kutatott Magyarország, Szerbia és Bosznia-Hercegovina, továbbá mintáik nagy részénél nem történt ivarmeghatározás, így ők is azt javasolták, hogy további vizsgálatokra van szükség.

Kutatásunkban főleg nyári hosszúszárnyú denevér kolóniákat vizsgáltunk, melynek két oka volt. Az egyik, hogy mivel a denevérekre jellemző a magas szintű filopátia, így az anyai ágon öröklődő mtDNS tanulmányozására ezek a legalkalmasabb kolónia típusok (Dietz és Kiefer, 2016). A másik ok pedig a kolóniák genetikai diverzitása volt, hiszen például a téli hibernáló kolóniákra magasabb genetikai diverzitás jellemző, mivel gyakran más kolóniából származó egyedeket is befogadnak a hibernációs időszak végéig (Pereira és mtsai., 2009). A mitokondriális HV1 markert főleg nőstény példányokon vizsgáltuk. Eredményeink alapján megállapítottuk, hogy az általunk mintázott egyedek nagy része egy haplotípusba tartozik, amely egy kivételével (bulgáriai Aina-ini-barlang) az összes mintavételi helyen belül megtalálható volt. A többi jelen levő 15 haplotípus pedig 1-6 bp-ban különbözik a leggyakoribbtól. Haplotípus diverzitásnak 0,74-et kaptunk, ami azt jelenti, hogy ha véletlenszerűen kiválasztunk két allélt, akkor azok 74% valószínűséggel különbözni fognak. Ezek alapján elmondható, hogy habár megfigyelhető az egyedek közötti genetikai diverzitás, a strukturáltságuk nem túl erős. A miénkhez hasonló eredményeket és csillag-alakú haplotípus hálózatokat kaptak Pereira és munkatársai (2009), Bilgin és munkatársai (2016), illetve Gürün és munkatársai (2019) a hosszúszárnyú denevér különböző mitokondriális markereinek (CytB, HV1) vizsgálata során.

A nukleáris mikroszatelliteken alapuló eredményeink ugyancsak a strukturáltság hiányát és az alacsony genetikai diverzitást mutatják a populációk között. A nyolc lokuszon végzett összes elemzésünk azt mutatja, hogy az allélek nagyjából egyforma elterjedésűek és a

populációk között nincsenek jelentős eltérések. A legtöbb mintánk egy csoportba tartozik ($K=1$) a klaszter-elemzéseink alapján, mind csupán genetikai-, mind földrajzi adatokat is figyelembe véve. A populációk összehasonlítására szolgáló F_{ST} értékeink nagyon alacsonyak ($F_{ST} = 0-0,068$), amihez hasonlót Gürün és munkatársai (2019) is kaptak (átlagos $F_{ST} = 0,015$). Vizsgálati eredményeiket a null-allélek feltételezhető jelenléte és a Wahlund-effektus hatása helyett egy nem olyan régen történt populáció expanzióval magyarázzák, mivel null-allélra utaló jeleket csak egy mintavételi hely egy lokuszán találtak. Null-allélek az általunk vizsgált lokuszokon sem voltak és további elemzéseink során nem találtuk a jelét távolság miatt kialakuló esetleges izolációnak. Mindezen vizsgálatok alátámasztják a populációk közötti strukturáltság hiányát, ami ellentétben áll azzal a magas szintűnek várt populáció strukturáltsággal, melyet ilyen nagy elterjedési területtel rendelkező kis emlősök esetében várunk. Az AMOVA eredménye szerint a teljes genetikai varianciának csupán 2,27%-a adódik a populációk közötti különbségekből, a többi 97,73% pedig az élőhelyeken belül figyelhető meg. Ezt az alacsony genetikai diverzitást feltételeztük a faj populációi között, hiszen a kiemelkedő repképeség és a hím egyedek vándorlása okozta intenzív génáramlás csökkentik a populációk közötti genetikai különbségeket (Palmeirim és Rodrigues, 1995; Pereira és mtsai., 2009; Gürün és mtsai., 2019).

Vizsgálatunk során a fő kérdés az volt, hogy a különböző szálláshelyek egymástól való földrajzi távolsága hogyan befolyásolja a populációk genetikai szerkezetét és diverzitását. Kérdésünkre a választ a páros Mantel-teszttel kaptuk meg, miszerint a mintavételi helyek közötti földrajzi távolság nincs jelentős hatással ($p=0,6700$) a populációk közötti genetikai távolságokra. Velünk ellentétben Pereira és munkatársai (2009) azt az eredményt kapták, hogy a Portugáliában vizsgált hosszúsárnyú denevér kolóniák genetikai távolsága szignifikánsan ($p<0,05$) korrelál a földrajzi távolságukkal. Azonban Gürün és munkatársai (2019) már a mi eredményeinkhez hasonlóan nem találtak jelentős ($p=0,13$) korrelációt közöttük a faj egész elterjedési területét vizsgálva. Eredményünk feltételezhetően annak köszönhető, hogy ez a denevér egy hosszú távú vonuló faj, aminek a rekordtávolsága több mint 800 km (Hutterer és mtsai., 2005) és vizsgálatunkban a két legtávolabbi populáció (egy szlovéniai és egy bulgáriai) egymástól légvonalban kb. 1100 km-re van. Nincs közöttük jelentős földrajzi barrier (pl. tenger), így könnyen elképzelhető, hogy ha nem is közvetlenül, de közvetett módon kapcsolatban állnak egymással, akár a hímek vándorlásának következtében, akár őszi párzási időszakban vagy akár teleléshez használt szálláshelyeik felkeresése során. A hosszúsárnyú denevérek az általunk vizsgált mintavételi helyek közül

őszi gyülekezőhelynek is használják pl. a Bomboly-bányát (7000-8000 pd) és Szársomlyót (1500-2000 pd), de hibernáló kolóniáknak egyaránt otthont ad a Bomboly-bánya (0-50 pd) és Szársomlyó (500-1000 pd), továbbá a Rumunyesti-barlang, a Petnička-barlang, Toplik és a Škocjan-barlangrendszer (2500-4500 pd) is.

Földrajzilag egymástól legtávolabb eső két mintavételi helyünk a szlovén Škocjan-barlangrendszer és a bolgár Aina-ini-barlang. A Škocjan-barlangrendszer nyári hosszúszárnýú denevér szülőkolóniája 1000-2500 egyedből áll, míg az Aina-ini-barlangé 500-1000 egyedből. Habár a Mantel-teszt eredménye alapján a geográfiai távolságnak nincs statisztikailag is szignifikáns hatása a genetikai távolságokra ($p=0,6700$), mégis ez a két populáció volt genetikailag is a legmesszebb egymástól. Az egyébként alacsonynak mondható páros F_{ST} értékek közül is e két hely közötti érték a legmagasabb ($F_{ST} = 0,068$). Az Aina-ini-barlangban a legmagasabb továbbá a privát allélok száma (5 db) és a mitokondriális markeren alapuló haplotípus hálózatban is ez az egyetlen olyan populáció, amelyben nem található meg az általunk meghatározott leggyakoribb haplotípus.

A kutatásunk során az állományok közötti szoros kapcsolatok feltárása egyrészt azt jelenti, hogy egy, a Lloviu-vírus miatt kialakuló esetleges lokális kihalás esetén tudjuk, hogy honnan lehet pótolni a fajt, mivel ismerjük a genetikailag hozzá legközelebb álló populációkat. Fontos azonban kiemelni, hogy a hosszúszárnýú denevér egy veszélyeztetett, ritka faj majdnem az egész elterjedési területén, ezért egy ilyen pótlás nagyon alapos tervezést igényel, hogy a forráspopulációk se sérüljenek jelentős mértékben. A természetvédelem másik szempontjából azonban ezen szoros kapcsolatok hátrányt jelentenek a fajra nézve, hiszen feltételezhetően a hím egyedek nagyobb távolságokra való vonulásuk során magukkal hurcolhatják a Lloviu-vírust. A magyarországi Mád melletti helyszínen (Bomboly-bánya) – ahol már több fertőzött egyedet is találtak – genetikailag nagyon közel áll a többi populációhoz a páronkénti F_{ST} értékek alapján, sőt az átlagos F_{ST} érték ($F_{ST} = 0,026$) itt a legalacsonyabb. Ez alapján feltételezhető, hogy a vírust hordozó állatok újabb járványokat és tömeges pusztulásokat okozhatnak más területeken, így továbbra is kiemelten fontos az ismert kolóniák 2016 óta megkezdett havi rendszerességű ellenőrzése a kolóniák stabilitásának és egészségének megőrzése érdekében.

7 Összefoglalás

A denevérek életében fontos szerepet tölt be a vonulás, ami hatással van a populációk genetikai struktúrájára is. Vonuló fajok lévén, a denevérek magukkal hordoznak különböző patogén szervezeteket, amik később komoly betegségek forrásai lehetnek. A fokozottan védett hosszúszárnyú denevér esetében – ami egy hosszú távú vonuló faj – több országban is tömeges pusztulásokat figyeltek meg, amelyek során több ezer egyedből álló kolóniák tűntek el. Ezt a folyamatot a Lloviu-vírus okozta, ami a 2002-es spanyolországi felfedezése után több mint egy évtizeddel Magyarországon is megjelent.

Kutatásunk célja a hosszúszárnyú denevér populációgenetikai vizsgálata volt (nukleáris és mitokondriális DNS markerek segítségével) a különböző geográfiai régiók közötti kapcsolatok feltárása érdekében.

Vizsgálatunkat hat ország (Magyarország, Románia, Szlovénia, Bulgária, Szerbia, Bosznia-Hercegovina) 12 hosszúszárnyú denevér populációjából származó szármymintákkal végeztük. A laboratóriumi munka során a mitokondriális DNS kontroll régiójának hipervariábilis szakaszát (HV1) és tíz mikroszatellita lokuszt vizsgáltunk, melyek segítségével később jellemeztük az egyes mintavételi helyek genetikai változatosságát.

Eredményeink azt mutatják, hogy a vizsgált hosszúszárnyú denevér populációk genetikailag gyengén strukturáltak. Habár a mitokondriális marker esetében kis mértékben megfigyelhető a genetikai diverzitás, az a nukleáris markerek esetében kevésbé mutatható ki. A molekuláris varianciaelemzés eredménye szerint a teljes genetikai varianciának csupán 2,27%-a adódik az egyes mintavételi helyek közti különbségekből, és a variancia 97,73%-a az élőhelyeken belül figyelhető meg. A mintavételi helyek közötti földrajzi távolság nincs jelentős hatással a populációk közötti genetikai távolságokra. Az egyedek klaszterezése során $K=1$ értéket kaptunk, miszerint a vizsgált populációk egy csoportba tartoznak. Ez egyrészt jó, mert egy esetleges lokális kihalás esetén a már feltárt, genetikailag legközelebbi populációból tudjuk pótolni az elpusztult egyedeket. Másrészt azonban a populációk közötti szoros kapcsolat következtében a denevérek – főleg a hím egyedek – magukkal hurcolhatják a Lloviu-vírust, ezzel újabb járványokat okozva más területeken is.

8 Abstract

Population genetic analysis of Schreiber's bent-winged bat (*Miniopterus schreibersii*)

Migration is a fundamental aspect in the life of bats affecting the genetic structure of the population. Being migratory species, bats may carry various pathogens that might cause serious diseases. Recently, mass extinctions have been observed in several countries in case of the highly protected, long-distance migratory species, Schreiber's bent-winged bats, that resulted in the disappearance of colonies of thousands of individuals. This was caused by the Lloviu virus that appeared in Hungary more than a decade after its discovery in 2002, Spain.

The aim of our research was to analyse the population genetics of Schreiber's bent-winged bats, using nuclear and mitochondrial DNA markers, in order to understand the connections between different geographical regions.

Wing samples from 12 populations of Schreiber's bent-winged bats from six countries (Hungary, Romania, Slovenia, Bulgaria, Serbia and Bosnia and Herzegovina) were collected. We examined the hypervariable sequence (HV1) of the control region of the mitochondrial DNA as well as ten microsatellite loci which were later applied to characterize the genetic diversity of the sampling sites.

Our results suggest that the populations of Schreiber's bent-winged bats are genetically weakly-structured. Although, little genetic diversity is observed for the mitochondrial marker, it is less detectable for the nuclear markers. The analysis of molecular variance proved that only 2.27% of the total genetic variance is due to differences between sampling sites and 97.3% of the variance is observed within habitats. We found that the geographical distance between sampling sites did not have a significant effect on genetic distance between populations. During the clustering of the individuals we obtained a value of $K=1$, according to which the examined populations belong to the same group. This might be advantageous because in the case of a possible local extinction we can translocate the individuals from the genetically closest populations. However, due to the strong connections between the populations, these bats, especially the male individuals might become the vectors of the Lloviu virus triggering novel epidemics in distinct areas.

9 Irodalomjegyzék

- Altringham, J.D., 2011. Migration, social structure, and population structure. In: Altringham, J. D. (ed): *Bat. From Evolution to Conservation*. Oxford, Oxford University Press. 175-194. <https://doi.org/10.1093/acprof:osobl/9780199207114.001.0001>
- Amman, B.R., Swanepoel, R., Nichol, S.T., Towner, J.S., 2017. Ecology of Filoviruses. In: Mühlberger, E., Hensley, L. L., Towner, J. S. (eds.): *Marburg- and Ebolaviruses: From Ecosystems to Molecules (Current Topics in Microbiology and Immunology)*. Springer, Cham. 23-61.
- Bandelt, H.J., Forster, P., Rohl, A., 1999. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Mol. Biol. Evol.* 16, 37–48. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a026036>
- Baudinette, R., Wells, R., Sanderson, K., Clark, B., 1994. Microclimatic conditions in maternity caves of the bent-wing bat, *Miniopterus schreibersii*: an attempted restoration of a former maternity site. *Wildl. Res.* 21, 607. <https://doi.org/10.1071/WR9940607>
- Bilgin, R., Gürün, K., Rebelo, H., Puechmaille, S.J., Maracı, Ö., Presetnik, P., Benda, P., Hulva, P., Ibáñez, C., Hamidovic, D., Fressel, N., Horáček, I., Karataş, Ayşegül, Karataş, Ahmet, Allegrini, B., Georgiakakis, P., Gazaryan, S., Nagy, Z.L., Abi-Said, M., Lučan, R.K., Bartonička, T., Nicolaou, H., Scaravelli, D., Karapandža, B., Uhrin, M., Paunović, M., Juste, J., 2016. Circum-Mediterranean phylogeography of a bat coupled with past environmental niche modeling: A new paradigm for the recolonization of Europe? *Mol. Phylogenet. Evol.* 99, 323–336. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2016.03.024>
- Boston, E.S.M., Puechmaille, S.J., Scott, D.D., Buckley, D.J., Lundy, M.G., Montgomery, I.W., Prodöhl, P.A., Teeling, E.C., 2012. Empirical Assessment of Non-Invasive Population Genetics in Bats: Comparison of DNA Quality from Faecal and Tissue Samples. *Acta Chiropterol.* 14, 45–52. <https://doi.org/10.3161/150811012X654259>
- Brook, C.E., Dobson, A.P., 2015. Bats as ‘special’ reservoirs for emerging zoonotic pathogens. *Trends Microbiol.* 23, 172–180. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2014.12.004>
- Calisher, C.H., 2015. Viruses in Bats: a Historic Review. In: Wang, L-F., Cowled, C. (eds.): *Bats and Viruses. A New Frontier of Emerging Infectious Diseases*. Hoboken, New Jersey, John Wiley & Sons, Inc. 23-46.
- Calisher, C.H., Childs, J.E., Field, H.E., Holmes, K.V., Schountz, T., 2006. Bats: important reservoir hosts of emerging viruses. *Clin. Microbiol. Rev.* 19, 531–545. doi:[10.1128/CMR.00017-06](https://doi.org/10.1128/CMR.00017-06)
- Castella, V., Ruedi, M., Excoffier, L., 2001. Contrasted patterns of mitochondrial and nuclear structure among nursery colonies of the bat *Myotis myotis*. *J. Evol. Biol.* 14, 708–720. <https://doi.org/10.1046/j.1420-9101.2001.00331.x>
- Coltart, C.E.M., Lindsey, B., Ghinai, I., Johnson, A.M., Heymann, D.L., 2017. The Ebola outbreak, 2013–2016: old lessons for new epidemics. *Phil. Trans. R. Soc. B* 372, 20160297. <https://doi.org/10.1098/rstb.2016.0297>
- Dietz, C., Kiefer, A. (eds.), 2016. *Bats of Britain and Europe*. London, Bloomsbury Publishing, 400 p.

- Dobrosi, D., 1993. Adatok a Bükk denevérfaunájához. *Fol. Hist. Nat. Mus. Matr.* 18, 191-197.
- Earl, D.A., vonHoldt, B. M., 2012. STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conserv. Genet. Resour.* 4, 359–361. <https://doi.org/10.1007/s12686-011-9548-7>
- Faure, P.A., Re, D.E., Clare, E.L., 2009. Wound Healing in the Flight Membranes of Big Brown Bats. *J. Mammal.* 90, 1148–1156. <https://doi.org/10.1644/08-MAMM-A-332.1>
- Fleming, T. H., Eby, P., 2003. Ecology of Bat Migration. In: Kunz, T. H., Fenton, M. B. (eds.): *Bat ecology*. Chicago, University of Chicago Press, 156-208.
- Furey, N. M., Racey, P. A., 2016. Conservation Ecology of Cave Bats. In: Voigt, C., Kingstone, T. (eds.): *Bats in the Anthropocene: Conservation of bats in a changing world*. Springer, Cham. 463-500.
- Goudet, J., 1995. FSTAT (Version 1.2): A Computer Program to Calculate F-Statistics. *J. Hered.* 86, 485–486. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jhered.a111627>
- Guillot, G., Mortier, F., Estoup, A., 2005. Geneland: a computer package for landscape genetics. *Mol. Ecol. Notes* 5, 712–715. <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2005.01031.x>
- Gürün, K., Furman, A., Juste, J., Ramos Pereira, M.J., Palmeirim, J.M., Puechmaille, S.J., Hulva, P., Presetnik, P., Hamidovic, D., Ibáñez, C., Karataş, A., Allegrini, B., Georgiakakis, P., Scaravelli, D., Uhrin, M., Nicolaou, H., Abi-Said, M.R., Nagy, Z.L., Gazaryan, S., Bilgin, R., 2019. A continent-scale study of the social structure and phylogeography of the bent-wing bat, *Miniopterus schreibersii* (Mammalia: Chiroptera), using new microsatellite data. *J. Mammal.* gyz153. <https://doi.org/10.1093/jmammal/gyz153>
- Hutterer, R., Ivanova, T., Meyer-Cords, C., Rodrigues, L. (eds.), 2005. Bat migrations in Europe: a review of banding data and literature. Bonn, German Agency for Nature Conservation. 180 p.
- Jones, K.E., Patel, N.G., Levy, M.A., Storeygard, A., Balk, D., Gittleman, J.L., Daszak, P., 2008. Global trends in emerging infectious diseases. *Nature* 451, 990–993. <https://doi.org/10.1038/nature06536>
- Jung, K., Threlfall, C.G., 2016. Urbanisation and its effects on bats - a global meta-analysis. In: Voigt, C., Kingstone, T. (eds.): *Bats in the Anthropocene: Conservation of bats in a changing world*. Springer, Cham. 13-33.
- Kemenesi, G., Kurucz, K., Dallos, B., Zana, B., Földes, F., Boldogh, S., Görföl, T., Carroll, M. W., Jakab, F., 2018. Re-emergence of Lloviu virus in *Miniopterus schreibersii* bats, Hungary, 2016. *Emerg. Microbes Infec.* 7(1):66.
- Kerth, G., Mayer, F., König, B., 2000. Mitochondrial DNA (mtDNA) reveals that female Bechstein's bats live in closed societies. *Mol Ecol.* 9, 793–800. <https://doi.org/10.1046/j.1365-294x.2000.00934.x>
- Kumar, S., Stecher, G., Tamura, K., 2016. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Mol. Biol. Evol.* 33, 1870–1874. <https://doi.org/10.1093/molbev/msw054>

- Kunz, T.H., Braun de Torrez, E., Bauer, D., Lobova, T., Fleming, T.H., 2011. Ecosystem services provided by bats: Ecosystem services provided by bats. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1223, 1–38. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2011.06004.x>
- Leroy, E.M., Kumulungui, B., Pourrut, X., Rouquet, P., Hassanin, A., Yaba, P., Délicat, A., Paweska, J.T., Gonzalez, J.-P., Swanepoel, R., 2005. Fruit bats as reservoirs of Ebola virus. *Nature* 438, 575–576. <https://doi.org/10.1038/438575a>
- Meganathan, P.R., Pagan, H.J.T., McCulloch, E.S., Stevens, R.D., Ray, D.A., 2012. Complete mitochondrial genome sequences of three bats species and whole genome mitochondrial analyses reveal patterns of codon bias and lend support to a basal split in Chiroptera. *Gene* 492, 121–129. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2011.10.038>
- Mickleburgh, S.P., Hutson, A.M., Racey, P.A., 2002. A review of the global conservation status of bats. *Oryx* 36, 18–34. <https://doi.org/10.1017/S0030605302000054>
- Miller-Butterworth, C.M., Jacobs, D.S., Harley, E.H., 2002. Isolation and characterization of highly polymorphic microsatellite loci in Schreibers' long-fingered bat, *Miniopterus schreibersii* (Chiroptera: Vespertilionidae). *Mol. Ecol. Notes* 2, 139–141. <https://doi.org/10.1046/j.1471-8286.2002.00170.x>
- Miller-Butterworth, C.M., Jacobs, D.S., Harley, E.H., 2003. Strong population substructure is correlated with morphology and ecology in a migratory bat. *Nature* 424, 187–191. <https://doi.org/10.1038/nature01742>
- Miller-Butterworth, C.M., Murphy, W.J., O'Brien, S.J., Jacobs, D.S., Springer, M.S., Teeling, E.C., 2007. A Family Matter: Conclusive Resolution of the Taxonomic Position of the Long-Fingered Bats, *Miniopterus*. *Mol. Biol. Evol.* 24, 1553–1561. <https://doi.org/10.1093/molbev/msm076>
- Moussy, C., Hosken, D.J., Mathews, F., Smith, G.C., Aegerter, J.N., Bearhop, S., 2013. Migration and dispersal patterns of bats and their influence on genetic structure: Bat movements and genetic structure. *Mammal Review* 43, 183–195. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2907.2012.00218.x>
- Negredo, A., Palacios, G., Vázquez-Morón, S., González, F., Dopazo, H., Molero, F., Juste, J., Quetglas, J., Savji, N., de la Cruz Martínez, M., Herrera, J.E., Pizarro, M., Hutchison, S.K., Echevarría, J.E., Lipkin, W.I., Tenorio, A., 2011. Discovery of an Ebolavirus-Like Filovirus in Europe. *PLoS Pathog.* 7, e1002304. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002304>
- Palmeirim, J.M., Rodrigues, L., 1995. Dispersal in colonial animals - the case of *Miniopterus schreibersii*. In: Racey, P. A., Swift, S. M. (eds.): *Ecology, evolution and behaviour of bats*. Oxford, Oxford University Press. 219–231.
- Parrish, C.R., Holmes, E.C., Morens, D.M., Park, E.-C., Burke, D.S., Calisher, C.H., Laughlin, C.A., Saif, L.J., Daszak, P., 2008. Cross-Species Virus Transmission and the Emergence of New Epidemic Diseases. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 72, 457–470. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00004-08>
- Peakall, R., Smouse, P.E., 2012. GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research—an update. *Bioinformatics* 28, 2537–2539. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts460>

- Pecsenye, K., 2006. Populációgenetika. Nagykovácsi, Pars Kft. 401 p.
- Pereira, M.J.R., Salgueiro, P., Rodrigues, L., Coelho, M.M., Palmeirim, J.M., 2009. Population Structure of a Cave-Dwelling Bat, *Miniopterus schreibersii*: Does It Reflect History and Social Organization? *J. Hered.* 100, 533–544. <https://doi.org/10.1093/jhered/esp032>
- Petit, E., Balloux, F., Goudet, J., 2001. Sex-biased dispersal in a migratory bat: a characterization using sex-specific demographic parameters. *Evol.* 55, 635. [https://doi.org/10.1554/0014-3820\(2001\)055\[0635:SBDIAM\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1554/0014-3820(2001)055[0635:SBDIAM]2.0.CO;2)
- Petit, E., Mayer, F., 1999. Male dispersal in the noctule bat (*Nyctalus noctula*): where are the limits? *Proc. R. Soc. Lond. B* 266, 1717–1722. <https://doi.org/10.1098/rspb.1999.0837>
- Pritchard, J.K., Stephens, M., Donnelly, P., 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155, 945–959.
- Puechmaile, S.J., Frick, W.F., Kunz, T.H., Racey, P.A., Voigt, C.C., Wibbelt, G., Teeling, E.C., 2011. White-nose syndrome: is this emerging disease a threat to European bats? *Trends Ecol. Evol.* 26, 570–576. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2011.06.013>
- Quetglas, J., González, F., Paz, Ó.D., 2003. Estudian la extraña mortandad de miles de murciélagos en cueva. *Quercus* 203, 50–51.
- Raymond, M., Rousset, F., 1995. GENEPOP (Version 1.2): Population Genetics Software for Exact Tests and Ecumenicism. *J. Hered.* 86, 248–249. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jhered.a111573>
- Rodrigues, L., Palmeirim, J.M., 2008. Migratory behaviour of the Schreiber's bat: when, where and why do cave bats migrate in a Mediterranean region? *J. Zool.* 274, 116–125. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7998.2007.00361.x>
- Rosenberg, N.A., Burke, T., Elo, K., Feldman, M.W., Freidlin, P.J., Groenen, M.A.M., Hillel, J., Mäki-Tanila, A., Tixier-Boichard, M., Vignal, A., Wimmers, K., Weigend, S., 2001. Empirical evaluation of genetic clustering methods using multilocus genotypes from 20 chicken breeds. *Genetics* 159, 699–713.
- Rowse, E.G., Lewanzik, E.L., Stone, S.H., Jones, G., 2016. Dark Matters: The Effects of Artificial Lighting on Bats. In: Voigt, C.C., Kingstone, T. (eds.): *Bats in the Anthropocene: Conservation of Bats in a Changing World*. Springer, Cham. 187-214.
- Russell, A.L., Medellín, R.A., Mccracken, G.F., 2005. Genetic variation and migration in the Mexican free-tailed bat (*Tadarida brasiliensis mexicana*): Population Genetics of *Tadarida Brasiliensis*. *Mol. Ecol.* 14, 2207–2222. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2005.02552.x>
- Shi, Z., 2010. Bat and virus. *Protein Cell* 1(2):109–114.
- Simmons, N.B., 2005. Order chiroptera. In: Wilson, D. E., Reeder, D. M. (eds.): *Mammal Species of the World: a Taxonomic and Geographic Reference*. Baltimore, Johns Hopkins University Press. 213-529.
- Strelkov, P.P., 1969. Migratory and stationary bats (Chiroptera) of the European part of the Soviet Union. *Acta Zool. Crac.* 14, 393–436.
- Sulkin, S.E., Allen, R., 1974. Virus infections in bats. *Mg. Virology* 8:1-103. doi: 10.1159/isbn.978-3-318-04030-2

- Topál, Gy., 1989. A barlangi denevérek magyarországi kutatásának áttekintése. *Karszt és Barlang*, 1989. évf. I-II. füzet: 85-86
- Towner, J.S., Pourrut, X., Albariño, C.G., Nkogue, C.N., Bird, B.H., Grard, G., Ksiazek, T. G., Gonzalez, J-P., Nichol, S.T., Leroy, E.M., 2007. Marburg virus infection detected in a common African bat. *PLoS ONE* 2(8): e764. doi: [10.1371/journal.pone.0000764](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0000764)
- Van Oosterhout, C., Hutchinson, W.F., Wills, D.P.M., Shipley, P., 2004. Micro-checker: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Mol. Ecol. Notes* 4, 535–538. <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2004.00684.x>
- Waser, N.M., 2000. A Primer of Population Genetics (3rd edn). Daniel L. Hartl. Sinauer Associates, Inc., Sunderland, MA. 2000. Pp. 221. ISBN 0 87893 304 2. *Heredity* 85, 510–510. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2540.2000.0827c.x>
- Wilkinson, G.S., Chapman, A. M., 1991. Length and sequence variation in evening bat D-Loop mtDNA. *Genetics* 128, 607–617.
- Wilmer, J.W., Barratt, E., 1996. A non-lethal method of tissue sampling for genetic studies of Chiropterans. *Bat Research News* 37, 1–3.

10 Köszönetnyilvánítás

Köszönöm témavezetőmnek, Görföl Tamásnak a lehetőséget a kutatás kivitelezésére, illetve a minták gyűjtésében és a laboratóriumi munka koordinálásában nyújtott segítséget. A minták gyűjtéséért továbbá hálás vagyok Estók Péternek, Kemenesi Gábornak, Boldogh Sándor Andrásnak, Bücs Szilárd Lehelnek, Szabadi Krisztának, Golen Gerhárdnak, Primoz Presetniknek, Ivana Budinskinak, Branka Pejićnek, Jasminko Mulaomerovićnek, Heliana Dundarovanak és Dimitar Ragygovnak. Köszönöm Szabadi Krisztának és a Magyar Természettudományi Múzeum Molekuláris Taxonómiai Laboratórium munkatársainak, Tuschek Máriának és Krizsik Virágnak a laboratóriumi munka során nyújtott segítségét. További köszönettel tartozom belső konzulensemnek, Vili Nórának az észrevételeiért, javaslataiért, valamint nővéremnek, Győrössy Krisztinának az angol nyelvű összefoglaló lektorálásáért. A kutatás az Európai Denevérvédelmi Egyezmény (EUROBATS) és az Innovációs és Technológiai Minisztérium ÚNKP-19-2-1 kódszámú Új Nemzeti Kiválóság Programjának szakmai támogatásával valósulhatott meg.




11 Témavezetői ellenjegyzés

Témavezetői nyilatkozat

Alulírott Dr. Görföl Tamás igazolom, hogy Győrössy Dorottya „A hosszúszárnyú denevér (*Miniopterus schreibersii*) populációgenetikai vizsgálata” című szakdolgozatát ismerem, azt beadásra és védésre alkalmasnak tartom.

Budapest, 2020. április 15.

DR. GÖRFÖL TAMÁS 

a témavezető neve és aláírása

12 Belső konzulensi ellenjegyzés

Belső konzulensi nyilatkozat

Alulírott Vili Nóra igazolom, hogy Győrössy Dorottya A hosszúsárnyú denevér (*Miniopterus schreibersii*) populációgenetikai vizsgálata című szakdolgozatát ismerem, azt beadásra és védésre alkalmasnak tartom.

Budapest, 2020. április 22.



.....

Vili Nóra
ÁTE Ökológiai Tanszék
tanszék