

UNIVERZITET U BEOGRADU

BIOLOŠKI FAKULTET

Branka B. Bajić

Genetički diverzitet i struktura populacija  
beskrilnih muva familije Nycteribiidae i grinja  
familije Spinturnicidae, ektoparazita dve litofilne  
vrste slepih miševa u Srbiji

doktorska disertacija

Beograd, 2023

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF BIOLOGY

Branka B. Bajić

Genetic diversity and population structure of bat  
flies of the family Nycteribiidae and mites of the  
family Spinturnicidae, ectoparasites of the two  
cavernicolous bat species in Serbia

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2023

## MENTORI

dr Jelena Blagojević, naučni savetnik  
Univerzitet u Beogradu  
Institut za biološka istraživanja “Siniša Stanković”  
Odeljenje za genetička istraživanja

dr Milan Paunović, naučni saradnik i muzejski savetnik  
Prirodnjački muzej u Beogradu  
Biološko odeljenje

## ČLANOVI KOMISIJE

dr Dragana Cvetković, vanredni profesor  
Univerzitet u Beogradu  
Biološki fakultet

dr Ivana Budinski, viši naučni saradnik  
Univerzitet u Beogradu  
Institut za biološka istraživanja “Siniša Stanković”  
Odeljenje za genetička istraživanja

dr Marija Rajičić, naučni saradnik  
Univerzitet u Beogradu  
Institut za biološka istraživanja “Siniša Stanković”  
Odeljenje za genetička istraživanja

Datum odbrane: \_\_\_\_\_

*Ova doktorska disertacija urađena je u Odeljenju za genetička istraživanja Instituta za biološka istraživanja “Siniša Stanković” – Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju, Univerziteta u Beogradu. Istraživanja su započeta u okviru projekta osnovnih istraživanja Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije (OII73003 Genetička i fenetička raznovrsnost u prirodnim populacijama u različitim sredinama – doprinos polimorfizama B hromozoma) kojim je rukovodio dr Mladen Vujošević, a rukovođenje projektom 2019. godine preuzela je dr Jelena Blagojević. Od 2020. godine izrada doktorske disertacije nastavljena je u okviru institucionalnog finansiranja od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije, a od 2023. godine Ministarstva nauke, tehnološkog razvoja i inovacija Republike Srbije.*

*Deo podataka prikupljen je i prilikom terenskih istraživanja u okviru projekta “Monitoring skloništa i populacija slepih miševa Chiroptera u Srbiji” (broj 401-00-200/2016-17) kojim je rukovodio dr Milan Paunović iz Prirodnjačkog muzeja u Beogradu.*

*Značajna za deo laboratorijskog rada bila je i stipendija nemačke agencije za akademsku razmenu DAAD (Deutcher Akademischer Austausch Dienst/German Academic Exchange Service) koja je pokrila troškove boravka u Grajsvaldu, Nemačka, gde je ostvarena vredna saradnja sa dr Jaap van Schaik, sa Odeljenja za primenjenu zoologiju i očuvanje prirode, Univerziteta u Grajsvaldu, a zahvaljujući njemu i saradnja sa dr Juliane Schaer sa Odeljenja za molekularnu parazitologiju Humboltovog univerziteta u Berlinu.*

*Svoju zahvalnost dugujem:*

*Mentorima, koji su me na ovaj ili onaj način vodili kroz putovanje doktorskih studija. Dr Jeleni Blagojević, sa pravom merom između autoriteta i prijatelja/saveznika, koja je znala kada i koliko da me pusti da lutam, a kada da me usmeri, i povremeno istera iz zone komfora kako bih mogla napredovati. Na njen nagovor i podstrek su se desili mnogi ključni koraci tokom izrade ove teze. Dr Milanu Paunoviću, od koga smo svi "učili zanat", koji nas je uključivao u projekte od najmlađih dana bavljenja terenskim istraživanjima i davao šansu. Uz Milana, Branka Karapandžu, Jelu i Vukašina, Dragu, Hipi i naravno Ivku (dr Ivana Budinski), imala sam čast da budem deo slepomišarskog čopora u Srbiji. Veliko hvala dr Mladenu Vujoševiću koji me pozvao u Odeljenje za genetička istraživanja i od koga sam uvek mogla očekivati reči ohrabrenja i dobronamerni savet. Hvala prof. dr Dragani Cvetković za vreme koje je posvetila bavljenju kako mojim ispitima i tezom, tako i svim administrativnim procedurama na fakultetu, koje je učinila jednostavnijim. Hvala za savete i komentare koji su unapredili moj rad.*

*To Dr. Jaap van Schaik who, although not my official mentor, also contributed to making of this thesis and was a key factor in figuring out how and where to publish our parasitological work. Our paths crossed at the right moment and I am grateful to have him on my side. Thanks to him, I also get to know and cooperate with Dr. Jules Schaer and Oscar Werb, whom I deeply thank for their efforts on our second paper. I would also like to thank the entire network of bat researchers across Europe that I have had the privilege to meet and learn from during this academic journey.*

*Hvala kolegama iz Odeljenja za genetička istraživanja na podršci, a posebno dr Mariji Rajičić, koja je uvek tu za mene, od konsultacija oko optimizacije uslova PCR reakcije, do dubokih razgovora o smislu životu uz ručak, koji ima tendenciju da postane doručak. Dr Ivani Budinski, bez koje je teško zamisliti odlazak na teren ili u pećinu, i koja je verovatno glavni "krivac" za ovakav razvojni put moje dosadašnje karijere. Poput starije sestre od koje sam toliko toga naučila, i još uvek učim - zahvalna sam joj više no što umem rečima izraziti.*

*Hvala svim mojim divnim prijateljima (i kumovima) koji su se postarali da moj život, mimo akademskog, uvek bude zabavan i aktivan, a slobodno vreme nikad bez planova za druženje. Mom Bajiću što postoji takav kakav je, uz mene, i da dočekamo uskoro sličnu zahvalnicu i od njega. Mojoj porodici, koja me osposobila da mislim svojom glavom i budem samostalna od najranijih dana, koja me podržavala, i i dalje podržava, na sve načine, i što bez obzira gde otišla, uvek imam gde da se vratim.*

# Genetički diverzitet i struktura populacija beskrilnih muva familije Nycteribiidae i grinja familije Spinturnicidae, ektoparazita dve litofilne vrste slepih miševa u Srbiji

## Sažetak

Studija predstavlja prvo istraživanje genetičkog diverziteta mitohondrijskih gena beskrilnih muva i grinja, ektoparazita dve vrste slepih miševa, u Srbiji. Analizirani su sastav vrsta, specifičnost prema domaćinu i struktura populacija, te kvantitativni parametri parazitiranosti. Muve su testirane na prisustvo krvnog parazita *Polychromophilus* sp. čiji je genetički diverzitet takođe analiziran. Analizirani su genetički diverzitet i struktura populacija jedne vrste domaćina, *M. schreibersii*, koji su potom poređeni sa parametrima ektoparazita nađenih na njemu. Uzorci su prikupljeni sa 9 lokaliteta u Srbiji i Bosni i Hercegovini, sa ukupno 241 jedinke domaćina (*Miniopterus schreibersii* 168, *Rhinolophus ferrumequinum* 73). Prikupljeno je 369 jedinki beskrilnih muva (4 vrste) i 564 jedinki grinja (2 vrste), sa izuzetno izraženom specifičnošću prema primarnom domaćinu i bez ijednog zabeleženog slučaja unakrsne infekcije, uprkos činjenici da su domaćinske vrste povremeno delile skloništa. Domaćinska vrsta koja formira veće i gušće kolonije i migrira na veće distance, *M. schreibersii*, imala je veći intenzitet infekcije i diverzitet vrsta beskrilnih muva, a muve prikupljene sa nje imale su veći genetički diverzitet od muva prikupljenih sa drugog, manje mobilnog domaćina, *R. ferrumequinum*, u skladu sa očekivanjama. Parametri genetičkog diverziteta domaćina *M. schreibersii* i dveju ektoparazitskih vrsta, muve *Nycteribia schmidlii* i grinje *Spinturnix psi* nisu bili značajno korelisani. Infekcija parazitom *Polychromophilus melanipherus* detektovana je kod 33 beskrilne muve, od čega je samo jedna bila poreklom sa domaćina *R. ferrumequinum* - prvi takav slučaj zabeležen do sad. Potvrđen je značaj upotrebe ektoparazita koji se hrane krvlju u neinvazivnom testiranju populacija slepih miševa na prisustvo infekcija.

**Ključne reči:** Domaćin, slepi miševi, *Miniopterus*, *Rhinolophus*, ektoparaziti, Nycteribiidae, Spinturnicidae, Haemosporidia, *Polychromophilus*, mtDNK

**Naučna oblast:** Biologija

**Uža naučna oblast:** Genetika

**UDK:** [575.822:[595.422+[595.772.1+591.69]]]:599.477.1(043.3)

# Genetic diversity and population structure of bat flies of the family Nycteribiidae and mites of the family Spinturnicidae, ectoparasites of the two cavernicolous bat species in Serbia

## Abstract

This study represents the first investigation of genetic diversity of mitochondrial genes of bat flies and mites, ectoparasites of two bat species, in Serbia. Species composition, host specificity, population structure and quantitative parameters of parasitism were analyzed. The flies were tested for the presence of the blood parasite *Polychromophilus* sp., whose genetic diversity was also analyzed. The genetic diversity and population structure of one host species, *Miniopterus schreibersii*, were analyzed and then compared with those of its ectoparasites. Samples were collected from 9 sites in Serbia and Bosnia and Herzegovina from a total of 241 host individuals (*M. schreibersii* 168, *Rhinolophus ferrumequinum* 73). 369 individuals of bat flies (4 species) and 564 individuals of mites (2 species) were collected, with a marked specificity for the primary host and without a single case of cross-infection recorded, despite the fact that the host species occasionally shared roosts. A host species that forms larger and denser colonies and migrates over longer distances, *M. schreibersii*, had a higher intensity of infection and species diversity of bat flies, and the flies collected from it had greater genetic diversity than those collected from the other, less mobile host *R. ferrumequinum*, as expected. The genetic diversity parameters of the host *M. schreibersii* and two ectoparasitic species, the bat fly *Nycteribia schmidlii* and the mite *Spinturnix psi*, were not significantly correlated. Infection with the parasite *Polychromophilus melanipherus* was detected in 33 bat flies, only one of which originated from the host *R. ferrumequinum* - the first such case recorded so far. The importance of using blood-feeding ectoparasites in non-invasive surveys of bat populations for the presence of infections was confirmed.

**Key words:** Host, bats, *Miniopterus*, *Rhinolophus*, ectoparasites, Nycteribiidae, Spinturnicidae, Haemosporidia, *Polychromophilus*, mtDNA

**Scientific field:** Biology

**Scientific subfield:** Genetics

**UDC:** [575.822:[595.422+[595.772.1+591.69}]]:599.477.1(043.3)

## SADRŽAJ

<b>1 UVOD</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1 Slepí miševi (red Chiroptera)</b> .....	<b>1</b>
1.1.1 Osnovne odlike reda .....	1
1.1.2 Socijalna organizacija, godišnji ciklus, migracije .....	1
<b>1.2 Litofilne vrste – odabrani domaćini</b> .....	<b>4</b>
1.2.1 Evropski dugokrilaš, <i>Miniopterus schreibersii</i> .....	4
1.2.2 Veliki potkovičar, <i>Rhinolophus ferrumequinum</i> .....	6
<b>1.3 Odnos parazit-domaćin</b> .....	<b>9</b>
<b>1.4 Ektoparaziti slepih miševa</b> .....	<b>10</b>
1.4.1 Beskrilne muve familije Nycteribiidae .....	10
1.4.2 Grinje familije Spinturnicidae .....	11
<b>1.5 Specifičnost prema vrsti domaćina</b> .....	<b>12</b>
<b>1.6 Hiperparazitizam i vektori</b> .....	<b>13</b>
1.6.1 Gljivica <i>Arthrorhynchus</i> .....	14
1.6.2 Krvni paraziti slepih miševa .....	14
<b>1.7 Genetička varijabilnost i molekularni markeri</b> .....	<b>17</b>
<b>2 CILJEVI</b> .....	<b>18</b>
<b>3 MATERIJAL I METODE</b> .....	<b>19</b>
<b>3.1 Prikupljanje uzoraka</b> .....	<b>19</b>
<b>3.2 Identifikacija vrsta i procena specijalizovanosti ektoparazita za domaćinsku vrstu</b> .....	<b>19</b>
<b>3.3 Kvantitativna analiza inficiranosti domaćina odabranim ektoparazitima</b> .....	<b>21</b>
<b>3.4 Molekularne analize DNK ektoparazita</b> .....	<b>22</b>
3.4.1 Izolacija i umnožavanje fragmenata DNK ektoparazita .....	22
3.4.2 Reakcija prečišćavanja i sekvenciranja fragmenata DNK ektoparazita .....	23
3.4.3 Analiza sekvenci DNK ektoparazita .....	24
<b>3.5 Molekularna detekcija krvnih parazita iz roda <i>Polychromophilus</i> sp. iz DNK beskrilnih muva</b> .....	<b>26</b>
3.5.1 Umnožavanje fragmenata gena krvnog parazita <i>Polychromophilus</i> sp. iz prethodno izolovane DNK beskrilnih muva .....	26
3.5.2 Prečišćavanje produkata i sekvenciranje fragmenata gena <i>Polychromophilus</i> sp. krvnog parazita .....	28
3.5.3 Analiza sekvenci DNK krvnog parazita <i>Polychromophilus</i> sp. ....	28



<b>3.6 Molekularne analize DNK odabrane domaćinske vrste – <i>Miniopterus schreibersii</i></b>	<b>28</b>
3.6.1 Izolacija DNK i umnožavanje fragmenata gena <i>M. schreibersii</i> .....	28
3.6.2 Analiza sekvenci DNK <i>M. schreibersii</i> .....	29
<b>3.7 Poređenje genetičkog diverziteta odabrane domaćinske vrste slepog miša <i>M. schreibersii</i> i njegovih ektoparazita .....</b>	<b>29</b>
<b>4 REZULTATI .....</b>	<b>30</b>
<b>4.1 Identifikacija vrsta i specijalizovanost ektoparazita za vrstu domaćina.....</b>	<b>30</b>
<b>4.2 Prisustvo hiperparazitske gljivice na muvama .....</b>	<b>32</b>
<b>4.3 Kvantitativna analiza inficiranosti domaćina ektoparazitima .....</b>	<b>33</b>
4.3.1 Poređenje kvantitativnih parametara infekcije dve vrste slepih miševa domaćina ektoparazitima iz familija Nycteribiidae i Spinturnicidae .....	33
4.3.2 Poređenje inficiranosti dveju vrsta slepih miševa domaćina, <i>M. schreibersii</i> i <i>R. ferrumequinum</i> beskrilnim muvama iz familije Nycteribiidae .....	36
4.3.3 Poređenje inficiranosti dveju vrsta slepih miševa domaćina, <i>M. schreibersii</i> i <i>R. ferrumequinum</i> grinjama iz familije Spinturnicidae .....	37
<b>4.4 Molekularne analize DNK ektoparazita .....</b>	<b>37</b>
<b>4.5 Genetički diverzitet, bogatstvo haplotipova i struktura populacija ektoparazita na domaćinu <i>Miniopterus schreibersii</i> .....</b>	<b>40</b>
4.5.1 Beskrilna muva <i>Nycteribia schmidlii</i> .....	40
4.5.2 Beskrilna muva <i>Penicillidia conspicua</i> .....	42
4.5.3 Beskrilna muva <i>Penicillidia dufourii</i> .....	44
4.5.4 Grinja <i>Spinturnix psi</i> .....	45
<b>4.6 Genetički diverzitet, bogatstvo haplotipova i struktura populacija ektoparazita na domaćinu <i>Rhinolophus ferrumequinum</i> .....</b>	<b>47</b>
4.6.1 Beskrilna muva <i>Phthiridium biarticulatum</i> .....	47
4.6.2 Grinja <i>Eyndhovenia euryalis</i> .....	49
<b>4.7 Infekcija muva iz familije Nycteribiidae krvnim parazitom iz roda <i>Polychromophilus</i> .....</b>	<b>51</b>
4.7.1 Molekularne analize DNK krvnog parazita <i>Polychromophilus melanipherus</i> .....	54
4.7.2 Genetički diverzitet i bogatstvo haplotipova <i>Polychromophilus</i> .....	55
<b>4.8 Genetički diverzitet i bogatstvo haplotipova odabrane domaćinske vrste <i>M. schreibersii</i>.....</b>	<b>58</b>
<b>4.9 Poređenje genetičkog diverziteta odabrane domaćinske vrste slepog miša <i>M. schreibersii</i> i njegovih ektoparazita .....</b>	<b>59</b>
<b>5 DISKUSIJA.....</b>	<b>62</b>
<b>5.1 Identifikacija vrsta i specijalizovanost ektoparazita za vrstu domaćina.....</b>	<b>62</b>
<b>5.2 Prisustvo hiperparazitske gljivice na muvama .....</b>	<b>64</b>

5.3 Kvantitativna analiza inficiranosti.....	64
5.4 Parametri molekularnog diverziteta, struktura populacija i analiza haplotipova ektoparazita.....	65
5.5 Infekcija muva iz familije Nycteribiidae krvnim parazitom iz roda <i>Polychromophilus</i> .....	68
5.6 Genetički diverzitet i bogatstvo haplotipova <i>Polychromophilus</i> .....	70
5.7 Genetički diverzitet i bogatstvo haplotipova odabrane vrste domaćina <i>M. schreibersii</i> .....	71
5.8 Poređenje genetičkog diverziteta odabrane vrste domaćina <i>M. schreibersii</i> i njegovih ektoparazita.....	71
6 ZAKLJUČCI .....	73
7 LITERATURA .....	75
8 PRILOZI.....	88
Prilog 1. Lista dozvola za istraživanje slepih miševa u Srbiji i Bosni i Hercegovini ....	88
Prilog 2. Jedinstvene sekvence gena submitovane u GenBank bazu kao doprinos ove studije.....	89
Prilog 3. Sekvence iz GenBank baze, iz prethodno objavljenih studija, korićenih kao dodatak sekvencama ove studije .....	92
Prilog 4. Temperaturni protokoli PCR reakcija za umnožavanje <i>cytb</i> i <i>cox1</i> gena <i>Polychromophilus</i> sp. parazita .....	95
Prilog 5. Sekvence vrste <i>Polychromophilus melanipherus</i> iz GenBank baze, iz prethodno objavljenih studija, korićenih kao dodatak sekvencama ove studije.....	96
Prilog 6. Sekvence vrste <i>Miniopterus schreibersii</i> iz GenBank baze, iz prethodno objavljenih studija, korićenih kao dodatak sekvencama ove studije.....	106
Prilog 7. Procena stepena evolutivne divergencije između sekvenci ektoparazita ....	110
Prilog 8. Analiza strukturiranosti populacija ektoparazita u softveru BAPS .....	116
Prilog 9. <i>Mismatch</i> analiza distribucije parova nukleotidnih razlika.....	119
Prilog 10. Primer rezultata analize iz programa Geneland.....	122

# 1 UVOD

## 1.1 Slepí miševi (red Chiroptera)

### 1.1.1 Osnovne odlike reda

Red slepih miševa (Mammalia: Chiroptera) drugi je najbrojniji u klasi sisara, sa 1462 vrsta (Simmons i Cirranello 2023), rasprostranjen u svim klimatskim pojasevima i na svim kontinentima, sa izuzetkom Antarktika (Simmons 2005). Zajedničko sa drugim sisarima je da su homeotermni organizmi, imaju tipičnu denticiju, zglobljavanje vilica, krzno i rađaju žive mladunce koji po rođenju sisaju (Dietz i Kiefer 2016). Ono što ih od drugih sisara izdvaja je sposobnost aktivnog letenja i upotreba eholokacije (Simmons 2005), koja se sekundarno izgubila kod frugivornih slepih miševa (Jones i Teeling 2006). Izdužene falange prstiju prednjih ekstremiteta obuhvaćene su letnom membranom, koja se dalje proteže između prednjih i zadnjih ekstremiteta i tela, opravdavajući naučni naziv reda – Chiroptera, ili u bukvalnom prevodu “šakokrileci” (Dietz i Kiefer 2016). Slepí miševi imaju jedinstven i veoma razvijen sistem ultrazvučne eholokacije, pomoću koga se orijentišu u prostoru i lociraju plen. Umesto primarnog oslanjanja na čulo vida, oni emituju ultrazvuk čiji se odbijeni eho vraća do sofisticiranog čula sluha, pomoću koga se formira slika okruženja ili pozicija plena. To im je omogućilo da postanu nokturnalni i popune upražnjenju nišu životinja koje su aktivne noću i hrane se hranom koju danju koriste ptice, izbegavajući tako oštru kompeticiju. Izuzetno su uspešan red sisara, sa evolutivnom istorijom od oko 70 miliona godina i velikim diverzitetom vrsta (Altringham 2011). Pripadnici ovog reda najvećim delom su insektivorni i frugivorni, ali ima i onih koji se hrane sitnim kičmenjacima, te tri vrste koje se hrane krvlju. Sve evropske vrste slepih miševa su primarno insektivorne, sa izuzetkom vrste *Rousettus aegyptiacus* koja se hrani voćem, a u evropskim granicama se može naći jedino na Kipru i delovima Turske (Korine 2016). Slepí miševi su izuzetno dugovečni u poređenju sa drugim sitnim sisarima slične veličine, poput glodara i roščica. Mnoge jedinke redovno dostižu starost od 20 i više godina (Podlutzky i sar. 2005). Rekord za najdugovečnijeg slepog miša za sada drži vrsta *Myotis brandtii*, 41 godina od momenta prstenovanja. Glodari u prirodnim uslovima često ne prežive ni 12 meseci, a u kontrolisanim laboratorijskim uslovima znake starenja pokazuju već nakon dve godine (Podlutzky i sar. 2005). Slepí miševi imaju malo prirodnih neprijatelja (sove, lasice, zmije, mačke) i noćni način života, naročito kod litofilnih vrsta, im je pomogao da imaju relativno nisku stopu smrtnosti (Wilkinson i Adams 2019).

### 1.1.2 Socijalna organizacija, godišnji ciklus, migracije

Slepí miševi su najvećim delom socijalne životinje, a najčešći vid organizacije su manje ili veće kolonije, koje mogu da broje od nekoliko desetina, do više hiljada, pa i miliona jedinki (Webber i Willis 2016, Wilkinson i sar. 2018). Koloniju čine pripadnici jedne vrste, ali povremeno mogu formirati i mešovite, sa dve ili više prisutnih vrsta. Neki od razloga za obrazovanje kolonija su: olakšano gajenje mladunaca u većim grupama (Safi i Kerth 2007), nedovoljan broj dostupnih skloništa za sve jedinke, olakšana termoregulacija u grupi, izbegavanje predatora kooperacijom (Kerth 2008), te razmena informacija o dostupnim skloništim i lovnim teritorijama (Safi i Kerth 2007). Kod nekih vrsta kolonije čine isključivo bliski srodnici i takve kolonije nisu otvorene za prihvatanje novih članova (Kerth i sar. 2000). Prema jednoj teoriji stalnost neke društvene zajednice slepih miševa u vezi je sa postojanošću samog skloništa, te da vrste koje koriste postojanija skloništa poput podzemnih objekata ili građevina, imaju i stalnije kolonije, dok vrste koje koriste nestalna i kratkotrajna skloništa poput

listova tropskih biljaka ili kore drveta, imaju tendenciju da formiraju i manje postojeane kolonije, koje se često razbijaju, mešaju i ponovo okupljaju (Wilkinson i sar. 2018).

Slepi miševi umerenog klimata, gde postoje redovne smene godišnjih doba, prilagodili su svoj godišnji ciklus aktivnosti spoljašnjim uslovima i dostupnosti plena. U vezi sa sezonskom dinamikom slepih miševa je i formiranje različitih tipova kolonija, te tako gravidne ženke, praćene manjim brojem nereprodukujućih ženki, i povremeno mužjaka, na proleće, ili rano leto, formiraju porodiljske kolonije, u kojima će kasnije rađati mladunce. Najčešće ženke rađaju po jedno mladunče, retko dva (Crichton i Krutzsch 2000, Dietz i Kiefer 2016). Razlog tako malom broju potomaka je ograničenje u težini koju gravidna ženka može dostići a da pri tom još uvek može aktivno da leti i hrani se, naročito kada se ima u vidu da novorođeni mladunac može da teži i do 43 % majčine telesne mase (Crichton i Krutzsch 2000). Takođe, u prvim danima po porođaju, majke nose mladunce na sebi kada odlaze u lov (Kunz i Hood 2000). Skloništa pogodna za formiranje porodiljskih kolonija moraju da ispunjavaju određene zahteve (Humphrey 1975). Na prvom mestu moraju biti relativno topla kako bi omogućila dovoljno brz razvoj fetusa, a kasnije dovoljno topla za mladunce koji se rađaju bez krzna i sa nedovoljno razvijenom termoregulacijom (Kunz i Hood 2000). Poželjno je da skloništa u kojima se obrazuju porodiljske kolonije budu skrovita, kako bi se izbegli predatori u ovom najranjivijem periodu za razvoj mladih. Upravo zbog činjenice da rađaju jedno mladunče godišnje (Crichton i Krutzsch 2000), populacioni rast kod slepih miševa je izrazito spor. Ta činjenica, zajedno sa svim promenama koje je čovek izazvao u životnoj sredini (promenjena namena zemljišta, urbanizacija), te direktna eksploatacija i uznemiravanje (Voigt i Kingston 2015) doveli su vrste ovog reda do statusa ugroženih i ranjivih. Dok su ženke u porodiljskim kolonijama, mužjaci su najčešće solitarni, ili se udružuju u manje mužjačke kolonije (Senior i sar. 2005, Safi i Kerth 2007). Manji broj mužjaka može da ostane kao deo porodiljskih kolonija, iako ni na koji način ne učestvuju u odgajanju mladunaca. Ova segregacija polova, odnosno isključivost u sezonskoj razdvojenosti mužjaka i ženki ima svoj praktični značaj – time što ne žive zajedno u periodu kada su ženke gravidne, odnosno odgajaju mladunce, mužjaci i ženke izbegavaju kompeticiju za hranu (Senior i sar. 2005). Boraveći na drugom mestu, a neretko i na većim nadmorskim visinama u odnosu na ženke (Nardone i sar. 2015), mužjaci „prepuštaju“ ženkama bogatije lovnne teritorije. Ženke, kojima je delimično otežan let usled dodatne težine mladunaca (Kunz i Hood 2000), moraju da se hrane intenzivnije kako bi proizvele dovoljno mleka (Crichton i Krutzsch 2000). Slepi miševi tokom dana obaraju svoju telesnu temperaturu i ulaze u stanje torpora, sa značajno smanjenim metaboličkim stopama, kako bi umanjili svoje dnevne potrebe za energijom do sumraka. Ovaj dnevni torpor može biti produžen u slučaju hladnijeg vremena, kiše i vetra, čak i tokom toplih sezona. Tokom graviteta i perioda dojenja mladunaca, dolazi do fizioloških promena te ženke ređe ulaze u stanje dnevnog torpora, a telesna temperatura se održava visokom kako bi rast i razvoj mladunca bio ubrzan (Kunz i Hood 2000).

Kopulacija se dešava u kasno leto i tokom jeseni, kada se kod nekih vrsta dešava „rojenje“ – pojava okupljanja slepih miševa iz različitih skloništa i regija, ispred ili u određenom skloništu radi udvaranja i razmnožavanja (Veith i sar. 2004, Dekeukeleire i sar. 2016), ili iz drugih razloga (Fraser i McGuire 2023). Smatra se da ova pojava ima svoju ulogu u razmeni gena među nesrodnicima, budući da jedinke dolaze iz različitih područja ili delova areala vrste, npr. poreklom su iz različitih porodiljskih kolonija (Kerth i sar. 2003). Iako se kopulacija dešava na jesen, i u manjem obimu tokom same hibernacije prilikom spontanog buđenja pojedinačnih jedinki, fertilizacija, odnosno nastupanje trudnoće, je odloženo do proleća (zavisno od vrste). Mladi se rađaju početkom leta kako bi njihovo odgajanje bilo sinhronizovano sa periodom najpovoljnijih temperaturnih uslova i obilja hrane (Crichton i Krutzsch 2000). Do jeseni već postaju samostalni i smatraju se subadultima, a kod pojedinih vrsta mogu dostići čak i polnu zrelost u prvoj godini života (Dietz i Kiefer 2016).

Slepi miševi predela sa umernom klimom usled opadanja ambijentalne temeprature i nedostupnosti hrane (insekata) tokom zime podležu produženom i drastičnom usporavanju metabolizma i svih neesencijalnih životnih procesa u stanju koje se zove hibernacija, te preživljavaju zimske mesece na rezervama nagomilane telesne masnoće. Hibernacija predstavlja fiziološki i ponašajni odgovor kojim se minimizira potrošnja energije do završetka nepovoljnih spoljašnjih uslova (Boyles i sar. 2020). Hibernacijska skloništa moraju da imaju određene karakteristike, ali su one često drugačije za različite vrste slepih miševa. Neke vrste preferiraju toplija skloništa, dok druge preferiraju niže temperature i visoku vlažnost vazduha. Za sva hibernacijska skloništa zajedničko je da temperatura treba da bude relativno stabilna, da se ne menja lako ni naglo, te da su slepi miševi zaštićeni od uznemiravanja, bilo ljudskog, bilo od strane potencijalnih predatora (grabljive ptice, kune, lasice, zmije). Svako naglo buđenje iz duboke hibernacije za jedinku predstavlja ogroman energetski trošak i dovodi je u rizik da neće imati dovoljno skladištenih rezervnih masti da preživi zimu i dočeka proleće kada će njihov insekatski plen ponovo postati dostupan (Speakman i Racey 1989).

Neke vrste slepih miševa imaju mali areal aktivnosti i svoja skloništa u različitim sezonama godine (letnje – tranzitorno – zimsko/hibernacijsko) menjaju u radijusu od svega nekoliko destina kilometara, te se smatraju sedentarnim vrstama. Druge vrste migriraju na veće ili manje distance (nekoliko desetina, stotina, pa i hiljada kilometara) između svojih letnjih i zimskih skloništa, te se smatraju pravim migrantima (Hutterer i sar. 2005). Među migrantima su češće dendrofilne vrste koje prezimljuju ispod kore drveća ili u dupljama, koje ne pružaju najbolju zaštitu od ambijentalnih temperatura, te su primorane da migriraju u regije sa blažom klimom (Popa-Lisseanu i Voigt 2009). Migracije se mogu pratiti različitim metodama kao što su: metoda markiranja (prstenovanja) i ponovnog hvatanja markiranih jedinki (eng. *mark – recapture*), pomoću PIT-tagova, kao i upotrebom različitih tipova odašiljača (npr. VHF, GPS odašiljači) (Ruczyński i sar. 2010). Na taj način može se doći do izuzetno važnih saznanja o upotrebi staništa i skloništa, na osnovu čega se se mogu doneti smernice o adekvatnoj zaštiti (Hutterer i sar. 2005, Bücs i sar. 2015). Najduža do sada zabeležena migracija iznosila je 2.200 km, od strane mužjaka vrste *Pipistrellus nathusii* prstenovanog u Letoniji a pronađenog u Španiji (Alcalde i sar. 2021). Migratorne vrste, po pravilu, imaju niske nivoe genetičke strukturiranosti populacija, za razliku od sedentarnih vrsta koje pokazuju visok nivo diferencijacije između svojih populacija koje međusobno ne dolaze u kontakt, usled čega ne postoji, ili je smanjen, protok gena (Popa-Lisseanu i Voigt 2009).

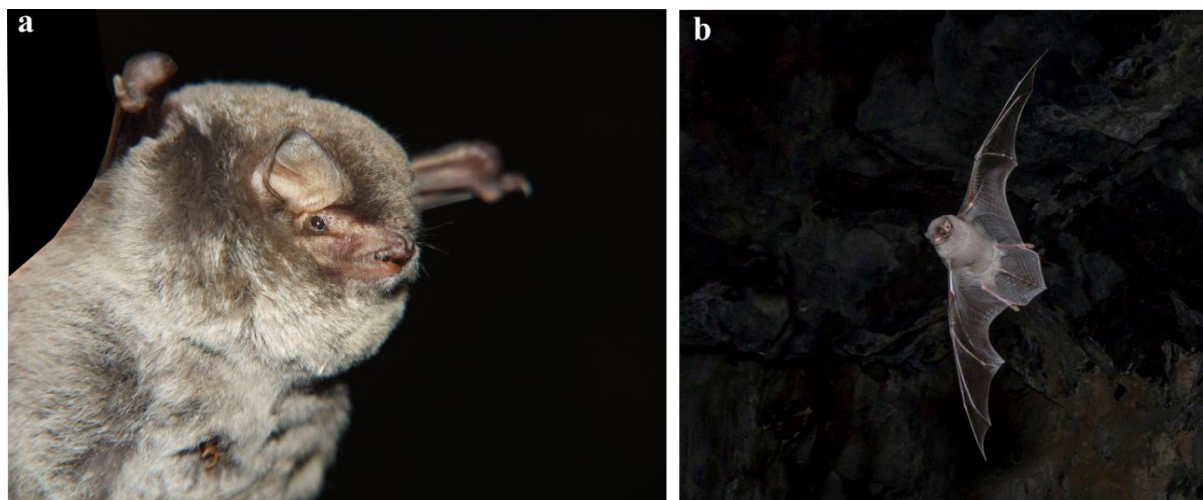
Prema sporazumu o očuvanju populacija slepih miševa (Protected Bat Species | UNEP/EUROBATS n.d.), u Evropi i susednim regijama relevantnim za migratorne aktivnosti njenih vrsta slepih miševa (zemlje Severne Afrike i Bliskog istoka) živi 55 vrsta slepih miševa. Budući da se deo tih vrsta može naći samo na pojedinim ostrvima, ili u delovima koji geografski ne pripadaju Evropi, ukupan broj slepih miševa kontinentalne Evrope pada na 41, a od toga je u Srbiji do sada potvrđeno prisustvo 31 vrste (Pejić i sar. 2017, Paunović i sar. 2020). U Srbiji je postojao program markiranja slepih miševa krilnim prstenovima u periodu od 1955-1972. godine i ponovo od 1994. godine u kontinuitetu do danas (Stanković i sar. 2018). Zahvaljujući nalazima prethodno markiranih jedinki dobijaju se podaci o tome kako i za koju namenu koriste skloništa, koje su njihove migratorne rute, kao i koliko dugo žive. Zahvaljujući prstenovanju otkriveno je da pripadnici jedne velike porodijske kolonije velikog potkovičara, *Rhinolophus ferrumequium*, iz Deliblatske peščare svake godine odlaze da hiberniraju u pećinama banatske regije Rumunije (Pejić i sar. 2018). Značaj ovakvih potvrđenih nalaza je veliki – govore o tome da je populacije slepih miševa neophodno zaštititi regionalno, a ne samo lokalno ili nacionalno, a dodatno ukazuju na potrebu posmatranja “šire slike” prilikom proučavanja npr. populacione genetike ili parazitologije slepih miševa.

## 1.2 Litofilne vrste – odabrani domaćini

Za ovu studiju odabrane su dve litofilne vrste, odnosno vrste koje najčešće koriste podzemna skloništa kao što su pećine i jame. Najveći broj pećina u Srbiji nalazi se u području karsta zapadne i jugozapadne Srbije (Dinaridi), te istočne i jugoistočne Srbije (Karpato-Balkanidi) (Đurović 2018) – područje Đerdapa i dalje na jug, uključujući pećine Timočke krajine. Razlog ovakvoj raspodeli je upravo podloga od karbonatnih stena koje su rastvorljive u vodi, te podložne formiranju karstnih oblika reljefa (Ćalić 2015). Vrste evropski dugokрилаš, *Miniopterus schreibersii* i veliki potkovičar, *Rhinolophus ferrumequinum* su među najčešće nalaženim litofilnim vrstama u Srbiji (Paunović i sar. 2020), neretko obe prisutne u istom podzemnom objektu, a povremeno čak i u mešovitim kolonijama (Pejić i sar. 2021). Obe vrste imaju svoje ektoparazite, a činjenica da ovi slepi miševi mogu biti u istim skloništimama u bliskom fizičkom kontaktu, tim ektoparazitima u teoriji pruža priliku da prelaze sa jedne vrste na drugu. Zbog toga je postavljeno prvo istraživačko pitanje, da li, i u kojoj meri ove dve vrste domaćina slepih miševa dele iste ektoparazite, s obzirom na njihove različite životne istorije.

### 1.2.1 Evropski dugokрилаš, *Miniopterus schreibersii*

Evropski dugokрилаš, *Miniopterus schreibersii* (Kuhl, 1817), je jedini predstavnik familije dugokрилаša (Miniopteridae) u Srbiji. U pitanju je vrsta srednje veličine (u poređenju sa vrstama koje žive u Evropi), kratke njuške i kratkih trouglastih ušiju koje ne nadilaze vrh glave (**Slika 1. a**). Krzno je kratke dlake, pretežno sive boje, a ventralno nešto svetlije. Odrasle jedinke sa prostora Balkana mogu imati zlatno obojeno krzno grla i grudi (Paunović i sar. 2020). Krila su izdužena (**Slika 1. b**), prilagođena za brz let, a zahvaljujući širokoj repnoj letnoj membrani dobro manevrišu u prostoru (Dietz i Kiefer 2016, Paunović i sar. 2020).



**Slika 1.** Evropski dugokрилаš, *Miniopterus schreibersii* **a** izgled jedinke iz profila; **b** izgled jedinke u letu (Autori fotografija: a Aleksandar Bajić; b Boris Krstinić)

Areal rasprostranjenja ove vrste pruža se širom Sredozemlja, od jugozapadne Evrope, preko Balkana, sve do Kavkaza i priobalja Male Azije (Furman i sar. 2010). U severnim delovima granice areala su u povlačenju, jer se u Nemačkoj, Ukrajini i Austriji ova vrsta smatra iščezlom (Godlevska 2018, Peterman i Schall 2018), a u Švajcarskoj je brojnost značajno smanjena (Gazaryan i sar. 2020). Prethodno se smatralo da ova vrsta ima mnogo veći areal rasprostranjenja, koji je pored Evrope obuhvatao i severnu Afriku i Aziju, ali je nakon više



genetičkih i morfoloških istraživanja zaključeno da se radilo o kompleksu vrsta: *M. pallidus* na Bliskom istoku (Furman i sar. 2010, Bilgin i sar. 2012) i *M. maghrebensis* u Severnoj Africi (Puechmaille i sar. 2014), sa kojima živi u simpatriji u nekim delovima areala.

Evropski dugokrilaš za skloništa koristi isključivo podzemne objekte, pećine, rudnike i tunele, a za lov preferira bogata šumska ili žbunasta područja. Lovne teritorije najčešće su 10-30 km udaljene od skloništa. Dominantni udeo u njegovom plenu čine moljci, praćeni dvokrillacima i mrežokrillacima (Kyheröinen i sar. 2019). Formira velike i veoma gusto "pakovane" kolonije (**Slika 2**), koje mogu imati i više hiljada jedinki (Dietz i Kiefer 2016), sa maksimalnim zabeleženim brojem od 70.000 u Francuskoj, a 40.000 u hibernacijskoj koloniji u istočnoj Srbiji (Paunović 2004). Jedinke u kolonijama su međusobno tesno pribijene i često vise jedna preko druge, tako da je procenjena brojnost na jednom kvadratnom metru tavanice 2.000 životinja (Rodrigues i Palmeirim 2008).



**Slika 2.** Hibernacijska kolonija vrste *Miniopterus schreibersii* sa procenjenih 20.000 jedinki (Autor fotografije: Lazar Mrčarica)

Ova vrsta se smatra regionalnim migrantom, koja rutinski prelazi 40-100 km između letnjih i zimskih skloništa u potrazi za pogodnim mikroklimatskim uslovima (Hutterer i sar. 2005, Rodrigues i Palmeirim 2008). Ipak, zahvaljujući građi krila, povremeno preleće i distance od nekoliko stotina kilometara (Ramos Pereira i sar. 2009). Najduža zabeležena migracija iznosi 833 km (Hutterer i sar. 2005), a maksimalna zabeležena starost jedinke ove vrste je 22 godine (Gazaryan i sar. 2020). U Srbiji je brojna i široko rasprostranjena, a najčešće obrazuje monotipske porodijske kolonije, dok hibernacijske kolonije neretko budu mešane sa drugim pećinskim vrstama: *Rhinolophus ferrumequium*, *Myotis myotis*, *M. blythii*, *M. capaccinii*. U Srbiji je markirano preko 3.200 jedinki ove vrste (Budinski i sar. 2018) i ponovo uhvaćeno blizu 200 (Pejić i sar. 2018a) na osnovu čega se došlo do informacija o dužini životnog veka i pređenim distancama prstenovanih jedinki. Jedinke sa prstenom koji je najduže nošen, u momentu hvatanja bila je stara više od 11 godina, a najduža pređena distanca iznosila je 216

km, i to za svega četiri dana od momenta prstenovanja do momenta ponovnog hvatanja (Pejić i sar. 2018a, Budinski i sar. 2018). Iako je većina ponovo uhvaćenih jedinki bila na istoj lokaciji gde je i prstenovana, 11 jedinki je uhvaćeno na lokacijama udaljenim više od 100 km. Zabeleženo je ukupno devet slučajeva prekograničnih migracija, i to dva iz Bugarske, dva iz Bosne i Hercegovine (Pejić i sar. 2018) i najmanje pet iz Rumunije (lična komunikacija). Pokazano je da ženke imaju izraženu privrženost ka skloništu u kome su rođene (natalna filopatrija), a da se protok gena odvija posredstvom mužjaka (Ramos Pereira i sar. 2009, Rodrigues i sar. 2010, Moussy i sar. 2012). Kao posledica toga, očekivana je lokalna genetička strukturiranost populacija, što je pokazano na osnovu jednog mitohondrijskog gena kao markera, ali ne i na osnovu nuklearnih mikrosatelita (Bilgin i sar. 2016, Gürün i sar. 2019).

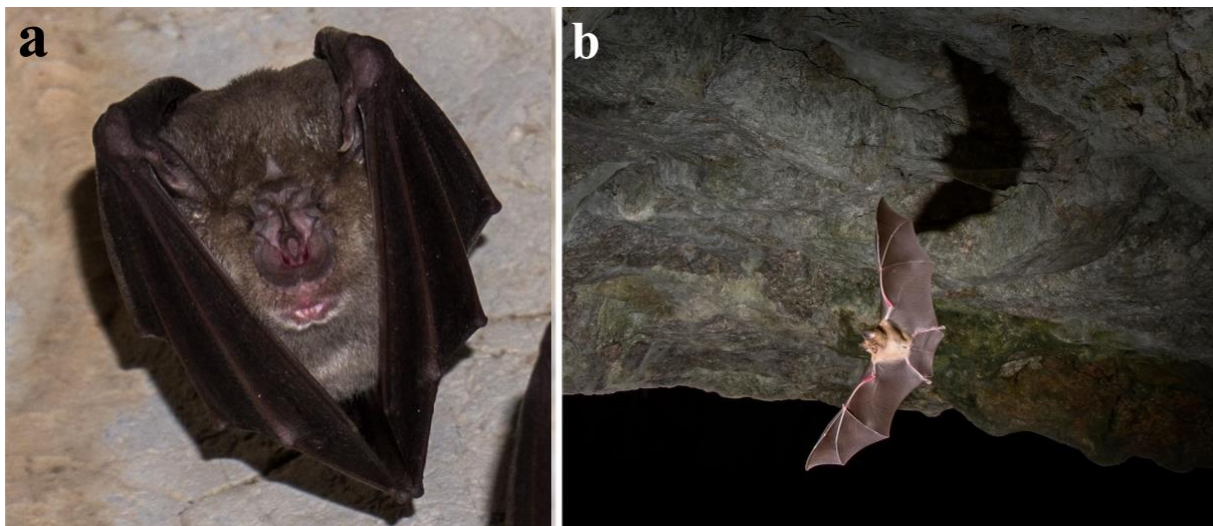
Na globalnom nivou, prema Crvenoj listi Međunarodne unije za zaštitu prirode i prirodnih resursa (IUCN) ova vrsta se smatra ranjivom (kategorija VU – *vulnerable*), usled opadanja brojnosti populacija za 30 % u poslednjih 16.5 godina, kao i usled smanjenja areala rasprostranjenja (Gazaryan i sar. 2020). Glavni faktori ugrožavanja su gubitak staništa, uznemiravanje od strane ljudi i upotreba pesticida. Mnoge pećine nisu adekvatno zaštićene, pa ih uznemiravanje od strane ljudi, naročito u slučaju velikih kolonija, čini izuzetno ranjivim. Do povećane smrtnosti jedinki ove vrste dovode i vetrogeneratorska polja ukoliko su izgrađena na njihovim migratornim rutama (Rodrigues i sar. 2008). Do slučajeva masovnog uginjavanja u Francuskoj, Španiji i Portugaliji došlo je 2002. godine kada je uginulo 40-60 % jedinki ove vrste, pod nerazjašnjenim okolnostima i sa nepoznatim uzrokom. Naknadno je kod uginulih slepih miševa iz Španije potvrđeno prisustvo *Lloviu* virusa (LLOV), koji je potom pronađen i u Mađarskoj, ali se pouzdano ne zna da li je on doveo do masovnog uginuća (Kemenesi i sar. 2018). Ono što se sa sigurnošću može reći je da *M. schreibersii* jeste domaćin ovog virusa, koji je detektovan kako kod uginulih tako i kod živih slepih miševa, ali i u ektoparazitima pronađenim na njima (Nycteribiidae, Ixodidae), te da je zbog potencijala za širenje na druge vrste potrebno pratiti prisustvo i prenosivost ovog virusa (Kemenesi i sar. 2022).

U Srbiji ova vrsta ima stabilan populacioni trend, sa procenjenom brojnošću od 150.000 jedinki (Paunović 2016). Zabeležena je na više od 75 različitih lokaliteta relativno ravnomerno raspoređenih na celoj teritoriji države, a naročito tamo gde postoje karstne formacije. Pećine u kojima su zabeležene izuzetno velike brojnosti jedinki ove vrste su Degurička pećina kod Valjeva (20.000, porodiljska kolonija) i pećina Vernjikica kod Bora (40.000, hibernacijska kolonija). U Srbiji je procenjena kategorija ugroženosti vrste najmanja briga (LC – *least concern*) (Paunović 2016). U Evropi je ova vrsta zaštićena nacionalnim legislativama većine zemalja. U okviru Banske i Bernske konvencije svrstana je u Dodatak II i Dodatak IV EU direktive o staništima i vrstama. U Srbiji je ova vrsta svrstana u Prilog I – strogo zaštićene vrste Pravilnika o proglašenju i zaštiti strogo zaštićenih i zaštićenih divljih vrsta biljaka, životinja i gljiva (“Službeni glasnik RS”, br. 5/10, 47/10 i 32/16), te Zakona o zaštiti prirode Republike Srbije (“Službeni glasnik RS”, br. 36/09, 88/10, 91/10 i 14/16).

### 1.2.2 Veliki potkovičar, *Rhinolophus ferrumequinum*

Druga vrsta odabrana kao domaćin u ovoj studiji je veliki potkovičar, *Rhinolophus ferrumequinum* (Schreber, 1774). Jedna je od pet vrsta iz familije potkovičara (Rhinolophidae), a prema rasponu krila i masi među najvećim vrstama koje se mogu naći u Srbiji. Krzno je smeđe do sivo-smeđe dorzalno, a ventralno nešto svetlije žućkasto-beličasto. Na licu oko nosa ima kožne izraštaje u obliku potkovice (**Slika 3. a**). Kada vise sa tavanice, najčešće se potpuno obaviju letnom membranom krila, sa specifično povijenim repom i repnom membranom ka spolja (Dietz i Kiefer 2016). Krila su široka i prilagođena finom manevarisanju (**Slika 3. b**), a ne letovima na duge distance.





**Slika 3.** Veliki potkovičar, *Rhinolophus ferrumequinum* **a** izgled jedinke u mirovanju; **b** izgled jedinke u letu (Autori fotografija: a Aleksandar Bajić; b Boris Krstinić)

Veliki potkovičar ima mnogo šire rasprostranjanje od evropskog dugokrilaša. U Evropi areal ove vrste obuhvata celo Sredozemlje i centralnu Evropu sa najsevernijom tačkom u Velsu, a na istok se pruža centralnom i južnom Azijom sve do Tihog okeana (Piraccini 2016). Populacije ove vrste su u opadanju u evropskom delu areala, a naročito na severnim granicama rasprostranjenja (Rossiter i sar. 2002, Piraccini 2016).

Kao skloništa koristi pećine na jugu areala, a na severu češće ljudske građevine, dok hibernira isključivo u podzemnim skloništim. Lovi iznad pašnjaka i listopadnih šuma, kao i sredozemne žbunaste vegetacije. Lovne teritorije su u blizini skloništa, najčešće u radijusu 2-5 km. Hrani se pretežno tvrdokrilcima i krupnijim moljcima, i često sakuplja plen zadnjim nogama sa tla ili vegetacije. Za razliku od prethodne vrste ne formira tako guste kolonije (**Slika 4**). U Evropu najveća zimska kolonija broji 1.600 jedinki, a neretko se viđaju kako sa tavanica pećina vise pojedinačno i ne dodirujući druge jedinke. Za hibernaciju bira velike i hladne pećine. Porodiljske kolonije najčešće čini 20-200 jedinki, maksimalno oko 1000 (Paunović 2016). Najčešće obrazuje monotipske kolonije, ređe mešovite sa vrstama srednjih potkovičara (*R. euryale*, *R. blasii*), *M. emarginatus* (naročito porodiljske) i *M. schreibersii* (Paunović 2016, Pejić i sar. 2021). Ubraja se u sedentarne vrste koje prelaze 10-60 km između letnjih i zimskih skloništa, sa retkim slučajevima zabeleženih distanci od preko 100 km (Hutterer i sar. 2005). Upravo zbog prelaženja tako malih distanci, kod ove vrste može se očekivati izražena genetička strukturiranost populacija. Veliki potkovičar je takođe vrsta kod koje je izražena filopatija (Ransome i Hutson 2000, Rossiter i sar. 2002), sa ženka koje se vraćaju na mesto svog rođenja kako bi tamo i same formirale porodiljsku koloniju. O tome svedoče i nalazi markiranih jedinki iz jednog skloništa u Banatu gde su prstenovane i u kasnijim godinama u više navrata hvatane jedinke koje ovaj objekat koriste za formiranje porodiljske kolonije (Pejić i sar. 2018b). U Srbiji je od 1955. do danas prstenovano preko 2.200 jedinki ove vrste, a ponovo uhvaćeno preko 200 jedinki. Najveći broj slučajeva podrazumeva jedinke koje su uhvaćene na mestu prstenovanja, ili u obližnjim skloništim unutar radijusa od 10 km. Najveća zabeležena migracija velikog potkovičara u Srbiji iznosi 135 km, od Valjeva do okoline Čuprije (Pejić i sar. 2018b), a najduže nošen prsten preko 15 godina od momenta prstenovanja. Zahvaljujući saradnji sa kolegama iz Rumunije i zajedničkog projekta praćenja vrsta potkovičara na području

Đerdapske klisure i Banata<sup>1</sup>, prstenovane jedinke velikog potkovičara pronađene su na najmanje pet lokaliteta u Rumuniji (Bücs i sar. 2021), što dodatno naglašava značaj regionalne saradnje i zaštite vrsta na širem području rasprostranjenja a ne samo lokalno.



**Slika 4.** Hibernacijska kolonija vrste *Rhinolophus ferrumequinum* sa oko 200 jedinki (Autor fotografije: Lazar Mrčarica)

Prema kategorizaciji Crvene liste IUCN ova vrsta je zahvaljujući svom širokom palearktičkom rasprostranjenju svrstana u kategoriju najmanje brige (LC – *least concern*) na globalnom nivou, iako je primetno opadanje brojnosti jedinki u populacijama u pojedinim delovima areala (Piraccini 2016). U evropskom i sredozemnom delu areala se smatra skoro ugroženom vrstom (NT – *near threatened*) (Hutson i sar. 2007). Glavni faktori ugrožavanja su fragmentacija staništa i direktno uznemiravanje od strane ljudi u skloništima, renoviranje zgrada koje koriste kao skloništa, i smanjenje brojnosti insekata kojima se hrane usled upotrebe insekticida.

U Srbiji je veliki potkovičar zabeležen na preko 200 lokaliteta širom Srbije, uglavnom u prirodnim podzemnim skloništima, ali i u antropogenim skloništima tamo gde su pećine odsutne, poput vodenica, šupa, štala, podruma i tavana, laguma i tunela (Paunović i sar. 2020). Najveća zabeležena kolonija tokom zime imala je 1.200 jedinki u pećini Vernjikici, u okolini Bora (Paunović 2004), a značajna skloništa zimi su još i Drenajička pećina kod Valjeva, te Petrovaradinska tvrđava u Novom Sadu, a leti pećina Pećurski kamen kod Ražnja, Gradašnička pećina (Donji Milanovac) i lokalitet Rošijana (Deliblatska pešćara) (Paunović 2016). Ukupna populacija ove vrste u Srbiji je procenjena na oko 50.000 jedinki, sa stabilnim trendom, te se svrstava u kategoriju najmanja briga (LC– *least concern*).

Kao i *M. schreibersii*, *R. ferrumequinum* je vrsta u okviru Bonske i Bernske konvencije svrstana u Dodatak II i Dodatak IV EU direktive o staništima i vrstama, u delu areala gde su ove konvencije primenjive. U Evropi postoje brojne konzervacione aktivnosti po pitanju zaštite ove vrste i njenih skloništa (Piraccini 2016). U Srbiji je ova vrsta svrstana u Prilog I – strogo zaštićene vrste Pravilnika o proglašenju i zaštiti strogo zaštićenih i zaštićenih divljih vrsta biljaka, životinja i gljiva (“Službeni glasnik RS”, br. 5/10, 47/10 i 32/16), te Zakona o zaštiti prirode Republike Srbije (“Službeni glasnik RS”, br. 36/09, 88/10, 91/10 i 14/16).

---

<sup>1</sup> „Prekogranična zaštita potkovičara u rumunsko-srpskom području Đerdapske klisure“ finansiran od strane *Conservation Leadership Programme*

### 1.3 Odnos parazit-domaćin

Parazit je organizam koji živi na račun drugog organizma, metabolički zavisi od domaćina kako bi završio svoj životni ciklus, a koji u određenoj meri smanjuje fitness domaćina (fertilitet, fekunditet, sposobnost parenja, preživljavanje). Paraziti su heterogena grupa organizama i imaju neverovatno različite načine prenošenja i strategije životne istorije. Vrste domaćini su takođe heterogene i razlikuju se u ključnim osobinama kao što su veličina populacije i distribucija, dužina života i otpornost (Barrett i sar. 2008). Interakcije između domaćina i parazita, upravo zbog svoje kompleksnosti, oduvek su bile od interesa za evolucionu ekologiju (Balvín i sar. 2012). Paraziti razvijaju mehanizme kako bi povećali svoj fitness koristeći resurse svog domaćina. Domaćin, za uzvrat, pokušava da poveća sopstveni fitness minimizirajući negativne efekte infestacije parazitima, što dovodi do evolucije odbrambenog ponašanja (Hart 1992). Domaćini parazitima služe kao stanište, obezbeđujući im neophodni prostor za život i izvor hrane (Combes 2001). Domaćinovu podložnost infestaciji parazitima određuje njegova sposobnost odbrane, bilo ponašajna (Reckardt i Kerth 2007), bilo imunološka (Christe i sar. 2003). Domaćini koji nude bolji kvalitet resursa, vrlo verovatno će imati i bolji odgovor protiv parazita. Domaćini slabog opšteg stanja tela su ranjiviji prema infestaciji parazitima, ali nude lošije uslove/resurse za eksploataciju, te su s toga manje atraktivni za parazite (Sheldon i Verhulst 1996). Paraziti mogu igrati značajnu ulogu u regulaciji populacione dinamike domaćina, budući da domaćin mora da bira između reproduktivnog ulaganja i imune funkcije: ulaganje u reprodukciju dovodi do povećanja brojnosti populacije, a u isto vreme usled smanjenje imune funkcije može dovesti do povećanja u prevalenci parazita. Veća prevalenca i intenzitet infekcije parazitima rezultovaće i većim prenošenjem parazita među jedinkama domaćina, te povećanje u gustini populacije domaćina dovodi i do povećanja stope transmisije parazita (Sheldon i Verhulst 1996). Sve ovo utiče na dinamične koevolutivne procese na relaciji domaćin-parazit.

Jedan važan mehanizam održavanja genetičkog diverziteta u prirodnim populacijama, kako domaćina, tako i parazita, podrazumeva njihovu koevolucionu interakciju i cikličnu smenu učestalosti alela i kod jednih i kod drugih, a zove se selekcija zavisna od učestalosti sa vremenskih zakašnjenjem, ili kolokvijalno „trka u naoružanju“ (Lively 2001). U populaciji domaćina sa jednim čestim i dominantno prisutnim genotipom, da bi došlo do infekcije parazitom, parazit mora da ima genotip koji blisko odgovara domaćinovom, kako ne bi bio prepoznat kao uljez i uspešno ga zarazio. Takav genotip parazita koji je uspešan u inficiranju, biva favorizovan od strane selekcije, a njegovi aleli počinju da se šire u populaciji. Posledično, budući da je najčešći domaćinov genotip sve češće inficiran, selekcija počinje da deluje protiv njega, i vremenom dolazi do smanjenja njegove učestalosti u populaciji. Nekada najzastupljeniji genotip domaćina postaje sve ređi, dok neki novi, do tada redak, genotip domaćina postaje najčešće prisutan. Ovo obezbeđuje novu metu za populaciju parazita, koja sada mora da odgovori sopstvenim novim genotipom, kako bi ponovo mogla uspešno da inficira domaćina. Dakle, postoji selekcija protiv najzastupljenijih genotipova domaćina, ali se ona dešava sa vremenskim zakašnjenjem jer parazit ne može istog momenta da odgovori na promene u populaciji domaćina, nego treba da prođe više generacija kako bi parazitske populacije mogle da odgovore. Domaćin konstantno mora da se menja kako bi izbegao parazita, a parazit konstantno mora da se menja kako bi ispratio promene u domaćinu i sustigao ga. S toga je ideja o koevoluciji domaćina i parazita koja dovodi do cikličnih promena u zastupljenosti alela i kod jednih i kod drugih, poznata još i kao hipoteza Crvene kraljice (Lively 2001).

## 1.4 Ektoparaziti slepih miševa

Slepi miševi imaju mnoge fiziološke, morfološke, ponašajne i ekološke adaptacije i nose različite i specijalizovane parazite (Whitaker i sar. 2009), kako unutrašnje (Gardner i Jimenez-Ruiz 1982), tako i spoljašnje (Marshall 1982). Kao sisari koji mogu formirati najveće grupe, njihova društvenost i veličina agregacija mogu da olakšaju transmisiju parazita i određenih zoonoza koje oni mogu da prenose (Webber i Willis 2016, Sándor i sar. 2019, Patterson i Ruckstuhl 2021). Pored toga što se grupišu u velike kolonije, njihova sposobnost letenja, jedinstven imuni sistem i izrazita dugovečnost su važne osobine koje ih čine adekvatnim domaćinima za mnoštvo parazitskih grupa (Calisher i sar. 2006, Zhang i sar. 2013, Lagunas-Rangel 2020). Kao posledica razlika koje postoje prilikom izbora skloništa između polova, populacija i vrsta slepih miševa, mogu se očekivati velike varijacije u stepenu opterećenja parazitima (Marshall 1982). Unutar skloništa koja koriste mogu doći u kontakt sa drugim vrstama slepih miševa, a zavisno od svojih migratornih sposobnosti, mogu dolaziti u kontakt ili razmenjivati gene sa jedinkama koje pripadaju različitim populacijama, geografski bližim ili daljim. Takve razlike u ekologiji domaćina mogu dovesti do različite podložnosti parazitima i različitog intenziteta infekcije, te do razlika u diverzitetu vrsta parazita koje nose (Patterson i sar. 2007).

Red slepih miševa je drugi najbrojniji u klasi sisara (posle reda glodara) po broju familija i vrsta ektoparazita kojima služe kao domaćini (Marshall 1982). Ektoparaziti žive na površini tela domaćinskog organizma, kome nanose štetu tako što se hrane njegovim tkivima i izazivaju iritacije, ili time što su vektori drugih patogena – izazivača bolesti (Poulin 2007, Lučan i sar. 2016, Patterson i Ruckstuhl 2021). Ektoparaziti slepih miševa imaju najmanje 20 miliona godina dugu koevoluciju sa svojim domaćinima (Poinar i Brown 2012) i adaptirali su se na takav način da im ne nanose preveliku štetu, iako se hrane njihovom krvlju i utiču na ponašanje i zdravlje svojih domaćina.

Slepi miševi su domaćini obligatnih ektoparazita koji se hrane krvlju: stenica, buva, krpelja, grinja i beskrilnih muva. Svaka od ovih grupa na svoj način kompromituje individualni fitnes i rast populacije domaćina ukoliko su stope infekcije visoke (Marshall 1982), služeći tako kao prirodna kontrola veličine populacija domaćina (Fagundes i sar. 2017). Od svih njihovih ektoparazita, beskrilne muve iz familije Nycteribiidae (Diptera, Hippoboscoidea) i krilne grinje iz familije Spinturnicidae (Acari, Mesostigmata) su naročito zanimljive za poređenje, budući da obe grupe žive gotovo isključivo na domaćinu i ne mogu samostalno da se šire, ali se međusobno veoma razlikuju po pitanju fenologije i osobina životne istorije.

### 1.4.1 Beskrilne muve familije Nycteribiidae

Slepomišje beskrilne muve (Diptera: Hippoboscoidea) su visoko specijalizovani ektoparaziti slepih miševa na čijem krznu i letnim membranama žive, hraneći se krvlju. Dele se na dve kosmopolitske familije: Streblidae (bogatije vrstama na zapadnoj Zemljinoj hemisferi) i Nycteribiidae (bogatije vrstama na istočnoj hemisferi) (Dick i Patterson 2006, Dittmar i sar. 2006). Sve beskrilne muve odlikuje osobina koja se naziva larviparnost, što je pojava da ženke ne ležu jaja, nego se larveni stadijumi razvijaju unutar nje. Na kraju ženka mora da napusti domaćina kako bi ovu zrelu larvu, stadijum pre-lutke, položila na supstrat u skloništu u blizini kolonije domaćina, koja će brzo potom metamorfozirati u stadijum lutke (pupa) (Hutson 1984). Izleganje insekta iz lutke indukovano je prisustvom domaćina u skloništu. Do metamorfoze iz lutke u adulta može da prođe 20 do 50 dana, ali beskrilne muve takođe mogu i da prezime u ovom stadijumu. Nakon toga, adulta muva se izleže i mora da locira i kolonizuje svog domaćina. Takva strategija životne istorije ovih muva svedoči o

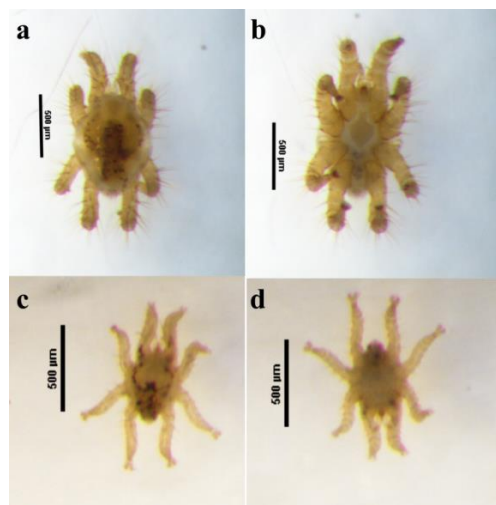


njihovoj obligatnoj vezi sa slepim miševima - ranjivi larveni stadijumi se zadržavaju u telu majke (Dick i Patterson 2006). Upravo zbog tako tesne veze ovih parazita sa vrstom domaćina, geografska distribucija ovih muva neretko odražava distribuciju njihovih domaćinskih vrsta slepih miševa. Beskrilne muve nalazene su kako se aktivno hrane čak i na slepim miševima koji hiberniraju, ali tokom zimskih meseci nema reprodukcije muva (Hutson 1984). Većina vrsta beskrilnih muva se može naći na pećinskim vrstama slepih miševa, dok je kod šumskih vrsta čija su skloništa u šupljim stabalima ili ispod kore drveća verovatnoća infekcije ovim parazitima znatno manja (Dietz i Kiefer 2016).

Muve iz familije Nycteribiidae su beskrilne, dorzoventralno spljoštene i toliko morfološki izmenjene da uopšte ne liče na prave muve, nego podsećaju na paukove (Dick i Pospischil 2015). Dorzalno na toraksu je postavljena glava sa redukovanim očima i noge koje na sebi nose brojne čekinje i bodlje koje im pomažu da se zakače za krzno domaćina (Hutson 1984). Kreću se brzo, podjednako dobro u svim pravcima, što im pomaže da izbegnu domaćinov pokušaj odbrane u vidu timarenja (Dick i Patterson 2006). Ova familija broji preko 275 vrsta, većinom palearktičkog rasprostranjenja (Dick i Pospischil 2015), dok se u Evropi može naći 16 vrsta (Szentiványi i sar. 2016).

#### 1.4.2 Grinje familije Spinturnicidae

Grinje iz familije Spinturnicidae (Acari: Mesostigmata) su još više specijalizovane jer nikada ne napuštaju svog domaćina, već žive na letnim membranama slepih miševa. Jaja, prelarveni stadijum i prvi larveni stadijum se razvijaju u genitalnom traktu ženke grinje, koja potom rađa protonimfu. Protonimfe posle jednog presvlačenja postaju deuteronimfe razdvojenih polova i izgleda odraslih jedinki, a deuteronimfe posle jednog presvlačenja postaju reproduktivno aktivne adultne jedinke. Na ovaj način, smanjenjem broja pojedinačnih larvenih stadijuma povećana je stopa preživaljavanja ovih grinja (Rudnick 1961). Svi razvojni stadijumi su hematofagni - hrane se krvlju i limfom domaćina (Giorgi i sar. 2004). Budući da je preživaljavanje ovih grinja kratko kada se odvoje od svog domaćina, te da je teško održavati žive slepe miševe u laboratoriji na duže vreme, o dužini trajanja pojedinačnih razvojnih stadijuma grinja i detaljima životnog ciklusa se još uvek ne zna mnogo. Nisu u stanju da prežive bez domaćina duže od 24 sata, a njihovo prenošenje moguće je samo prilikom bliskog fizičkog kontakta među domaćinima (Rudnick 1961).



**Slika 5.** Grinje iz familije Spinturnicidae **a i b** sakupljene sa domaćina *Miniopterus schreibersii* (**a** dorzalno, **b** ventralno); **c i d** sakupljene sa domaćina *Rhinolophus ferrumequinum* (**c** dorzalno, **d** ventralno)

Imaju ovalno, dorzoventralno spljošteno telo i debele noge sa zakrivljenim kandžicama i brojnim sklerotiziranim dlakama (**Slika 5**), zahvaljujući čemu mogu da čvrsto prijanjaju za glatke letne membrane krila slepih miševa i tamo opstaju (Rudnick 1961). Tokom hibernacije domaćina, brojnost grinja naglo opada, da bi na proleće ponovo postale aktivne, i dostigle vrhunac brojnosti odnosno intenziteta infestacije domaćina tokom leta (Lourenço i Palmeirim 2008, Reckardt i Kerth 2009). Razmnožavaju se najintenzivnije u vreme kada i slepi miševi imaju mladunce i na njih prelaze pre nego mladunci počnu da lete (Bruyndonckx i sar. 2009b). Zbog drastičnog pada brojnosti tokom zime, populacije grinja prolaze ciklično kroz opadanje genetičke varijabilnosti. Pojava značajnog opadanja efektivne veličine populacija neke vrste naziva se efekat uskog grla (eng. *bottleneck*). Na genetičku raznovrsnost u redukovanim populacijama grinja, u proleće, sa ponovnim početkom razmnožavanja, može značajno da utiče i povećanje inbridinga unutar preostale populacija grinja (van Schaik i sar. 2015).

### 1.5 Specifičnost prema vrsti domaćina

Specijalizacija parazita prema domaćinu je određena ponašanjem, ekologijom, kao i filogenetskom istorijom oba organizma (Poulin i sar. 2006). Parazitska vrsta može biti specijalizovana, odnosno specifična prema jednoj domaćinskoj vrsti nekog roda, ili može biti generalista sposoban da zarazi više domaćinskih vrsta iz nekoliko različitih rodova (Ter Hofstede i sar. 2004). Specifičnost može doneti prednost, jer umanjuje interspecijsku kompeticiju među parazitima, ali isto tako ograničava usko specijalizovane parazite da se ne mogu širiti na druge domaćine, ukoliko dođe do nestanka primarnog domaćina (Zrnčić 2013). Nespecijalizovani paraziti, generalisti, su u prednosti, jer se mogu raširiti na više vrsta domaćina i samim tim imati veće areale. Mana takve strategije je što generalisti nisu dovoljno kompetitivni sa parazitima koji su specifični prema određenoj domaćinskoj vrsti i koji su već zauzeli određenu nišu (Ter Hofstede i sar. 2004). Parazitska vrsta će se specijalizovati ako prednosti korišćenja samo jedne domaćinske vrste prevazilaze prednosti koje bi imala od većeg broja manje uspešnih interakcija sa više različitih domaćinskih vrsta. Domaćinske vrste koje su privremeno dostupne ili retke, po pravilu, usloviće generalizaciju parazita (Christe i sar. 2003), a široko zastupljene i česte domaćinske vrste usloviće pojavu za njih visoko specifičnih parazitskih vrsta (Bruyndonckx i sar. 2009a, Krasnov i sar. 2012).

Opšte pravilo koje važi za većinu parazitskih taksona glasi: kada je način prenošenja parazita u vezi sa domaćinovima ponašanjem, a koje parazita izlaže kontaktu sa potencijalnim domaćinima druge vrste, selekcija teži da favorizuje promenu domaćina, što za posledicu ima smanjenje stepena specifičnosti za domaćina (Poulin 2007). U slučaju sistema slepi miš – beskrilna muva, obe strane imaju takve karakteristike koje bi mogle lako da raskinu njihovu domaćin – parazit vezu i da smanje specifičnost odnosa. Reproductivna strategija pri kojoj ženka muva mora da napusti domaćina kako bi položila pre-lutku na supstrat, i kasnija potreba tek izleglog adulta da brzo kolonizuje domaćina, trebalo bi da dovede do smanjene specifičnosti za domaćina, ako imaju mogućnost izbora između više različitih vrsta slepih miševa koje žive u istom skloništu (Dick i Patterson 2007). Dodatno, primećeno je da beskrilne muve ponekad napuštaju domaćina ukoliko su uznemirene. Slep miševi su leteći organizmi koji se kreću brzo i često, imaju velike areale aktivnosti i neretko dolaze u kontakt sa drugim vrstama. Imajući u vidu ove odlike slepih miševa kao domaćina i beskrilnih muva kao parazita bilo bi za očekivati da će razviti nespecifične asocijacije domaćin – parazit. Međutim, uprkos svemu, specifičnost mnogih vrsta beskrilnih muva ka jednoj, primarnoj domaćinskoj vrsti je veoma visoka (Dick i Patterson 2007, Lourenço i Palmeirim 2008, Seneviratne i sar. 2009). Ukoliko je parazitska vrsta u asocijaciji uvek sa jednom domaćinskom vrstom, ona se naziva monoksena. Oligokseni paraziti su specijalizovani za dve ili nekoliko, najčešće blisko srodnih vrsta iz istog roda, a pravi polikseni paraziti, ili generalisti, žive na vrstama domaćina iz dva ili više rodova, ne nužno

filogenetski srodnih. Većina parazita, čak i ako su generalisti, pokazuje preferenciju ka nekim vrstama domaćina na kojima se češće pojavljuju. Vrste beskrljnih muva mogu se povremeno, uprkos tome što su monoksene, naći na drugim, sekundarnim domaćinima, vrstama slepih miševa na koje su slučajno prešle u potrazi za domaćinom (Szentiványi i sar. 2016).

Kod grinja, kao i kod drugih parazita, specifičnost prema domaćinskoj vrsti može biti rezultat ograničene disperzije ili ustaljenih koevolucionih adaptacija između domaćina i parazita. U zavisnosti od vrste, grinje mogu biti manje ili više specijalizovane za domaćinsku vrstu slepih miševa (Christe i sar. 2003, Giorgi i sar. 2004), a socijalna organizacija domaćina je veoma važan faktor koji utiče i na genetičku strukturu populacija grinja (van Schaik i sar. 2014). U eksperimentalnim studijama specifičnosti dve evropske vrste grinja (*Spinturnix myoti* i *S. andegavinus*), obe vrste su imale niži fitnes i manje uspešnu reprodukciju na netipičnim domaćinima, iako nije postojala nikakva fizička barijera koja bi ih sprečila da nasele netipičnu domaćinsku vrstu (Christe i sar. 2003, Giorgi i sar. 2004). Opsežna kofilogenetska studija vrsta evropskih slepih miševa i njihovih grinja (Bruyndonckx i sar. 2009a) navodi da grinje pokazuju relativno visoku, ali ne toliko striktnu specijalizovanost prema domaćinskoj vrsti, te da mešovite porodijske kolonije slepih miševa pružaju priliku ovim grinjama da promene domaćinsku vrstu.

Ukoliko više vrsta slepih miševa boravi u istom skloništu, postoji mogućnost da će doći do interakcije između njih i da će njihovi ektoparaziti imati šansu da razmene domaćine (Dittmar i sar. 2006). S toga je učestalost susreta vrsta slepih miševa koje dele isto sklonište u vezi sa disperzijom ektoparazita i sa specijalizovanošću njihovih interakcija, te potencijalno vodi do povećane stope unakrsnog zaražavanja. Vrste slepih miševa koje često sreću druge vrste i sa njima su u bliskom fizičkom kontaktu postaju izloženije većem broju vrsta ektoparazita (Fagundes i sar. 2017). Skloništa boljeg kvaliteta privlače veći broj slepih miševa, a gustina njihovih kolonija može biti kritični faktor za prenošenje ektoparazita. Sezonska dinamika slepih miševa umerenog klimata je u skladu sa njihovim energetskeim zahtevima tokom godine i ambijentalnom temperaturom i uslovima, te periodično zahteva grupisanje u velike skupine (Lučan 2006). Vrste slepih miševa koje su sklone obrazovanju velikih kolonija sa jedinkama koje su gusto zbijene pogoduju razmeni ektoparazita.

## 1.6 Hiperparazitizam i vektori

Slepi miševi imaju imunološke i ekološke osobine koje im omogućavaju da nose mnoge parazite i patogene, a da pri tom ne razviju simptome bolesti (Calisher i sar. 2006, Ahn i sar. 2019). Zbog toga su često nepravedno negativno percipirani i mnogo češće testirani na prisustvo patogena nego što je to slučaj sa ostatkom živog sveta, usled čega pored ostalog kod ljudi izazivaju osećaj straha, te ih oni progone i ubijaju (Olival 2016, Lu i sar. 2021). Skorašnja studija (Mollentze i Streicker 2020) pokazala je da je broj zoonoza koje se održavaju u populacijama slepih miševa očekivan za jedan sisarski red koji broji tako puno vrsta. Iako se mnogo može naučiti iz studija imuniteta slepih miševa i njihovih patogena, važno je prepoznati potencijalni izvor novih zoonoza u slepim miševima, kao i kod bilo kojeg drugog divljeg taksona (Melaun i sar. 2014), ali je neophodno raditi to pažljivo i sa oprezom kako ih ne bi uznemiravali više nego što je neophodno. Jedan od načina da se izbegne relativno invazivno uzorkovanje krvi slepih miševa je da se za analize prisustva različitih patogena koriste njihovi ektoparaziti koji se hrane krvlju (Szentiványi i sar. 2020).

Hiperparazitizam je pojava da paraziti imaju sopstvene parazite. Beskrljne muve i grinje, iako su i sami paraziti, mogu biti parazitirani od strane drugih i služiti kao vektori – prenosiooci različitih patogena: hiperparazitske gljivice iz familije Laboulbeniales (Ascomycota: Laboulbeniomycetes) (de Groot i sar. 2020), propagule gljivice *Pseudogymnoascus destructans*, izazivača sindroma belog nosa kod slepih miševa (Lučan i sar. 2016), krvnih

parazita izazivača malarije iz roda *Polychromophilus* (Witsenburg 2014, Witsenburg i sar. 2015), i različitih bakterija (Sándor i sar. 2018, Szubert-Kruszyńska i sar. 2018, McKee i sar. 2019, Szentiványi i sar. 2019, McKee i sar. 2021). Ukoliko su ektoparaziti vektori, i razlikuju se u specifičnosti prema domaćinskoj vrsti, promena domaćina može potencijalno da vodi do transmisije nekog patogena na atipičnog domaćina, uključujući potencijalno i čoveka, što može imati ozbiljne i daleko šire implikacije (Melaun i sar. 2014, McKee i sar. 2019). Hiperparazitizam može imati ulogu u menjanju veličine populacija domaćina, a preko njih indirektno i veličine populacija primarnog domaćina (de Groot i sar. 2020).

### 1.6.1 Gljivica *Arthrorhynchus*

Mikroskopske gljivice iz porodice Laboulbeniales (Ascomycota: Laboulbeniomycetes) paraziti su mnoštva različitih vrsta zglavkara, na čijem integumentu rastu, a u najvećem broju slučajeva inficiraju tvrdokrilce. Spadaju u biotrofe, što znači da im treba živ domaćin (Haelewaters i sar. 2020). Razlikuju se od višecelijskih gljivica po tome što nemaju miceliju i hife, nego talus, koji nastaje uvećanjem i deljenjem jedne dvoćelijske askospore. Talus čine tri glavne regije: haustorijum u obliku korena kojim prodiru kroz telo domaćina kako bi se učvrstile, peritecija – struktura za stvaranje spora, i izraštaji koji nose anteridije koji proizvode spermacije (Blackwell 1980). Postoje tri roda ovih gljivica specijalizovanih za beskrilne muve, od čega je samo rod *Arthrorhynchus* prisutan na vrstama muva iz porodice Nycteribiidae istočne Zemljine hemisfere. Najčešće nalažene vrste su *Arthrorhynchus eucampsipodae* i *A. nycteribiae*, sa prevalencom infekcije od 2.2 - 9 % (Blackwell 1980, Haelewaters i sar. 2017, Szentiványi i sar. 2018, Walker i sar. 2018). Iako su ove gljivice široko rasprostranjene, ne zna se mnogo o njihovom potencijalnom uticaju na fiziologiju muve domaćina. Jedna skorašnja studija pokazala je da kod jedne vrste beskrilne muve prisustvo hiperparazitske gljivice utiče na stopu preživljavanja i dužinu života, dok kod druge vrste muve to nije bio slučaj (Szentiványi i sar. 2020).

### 1.6.2 Krvni paraziti slepih miševa

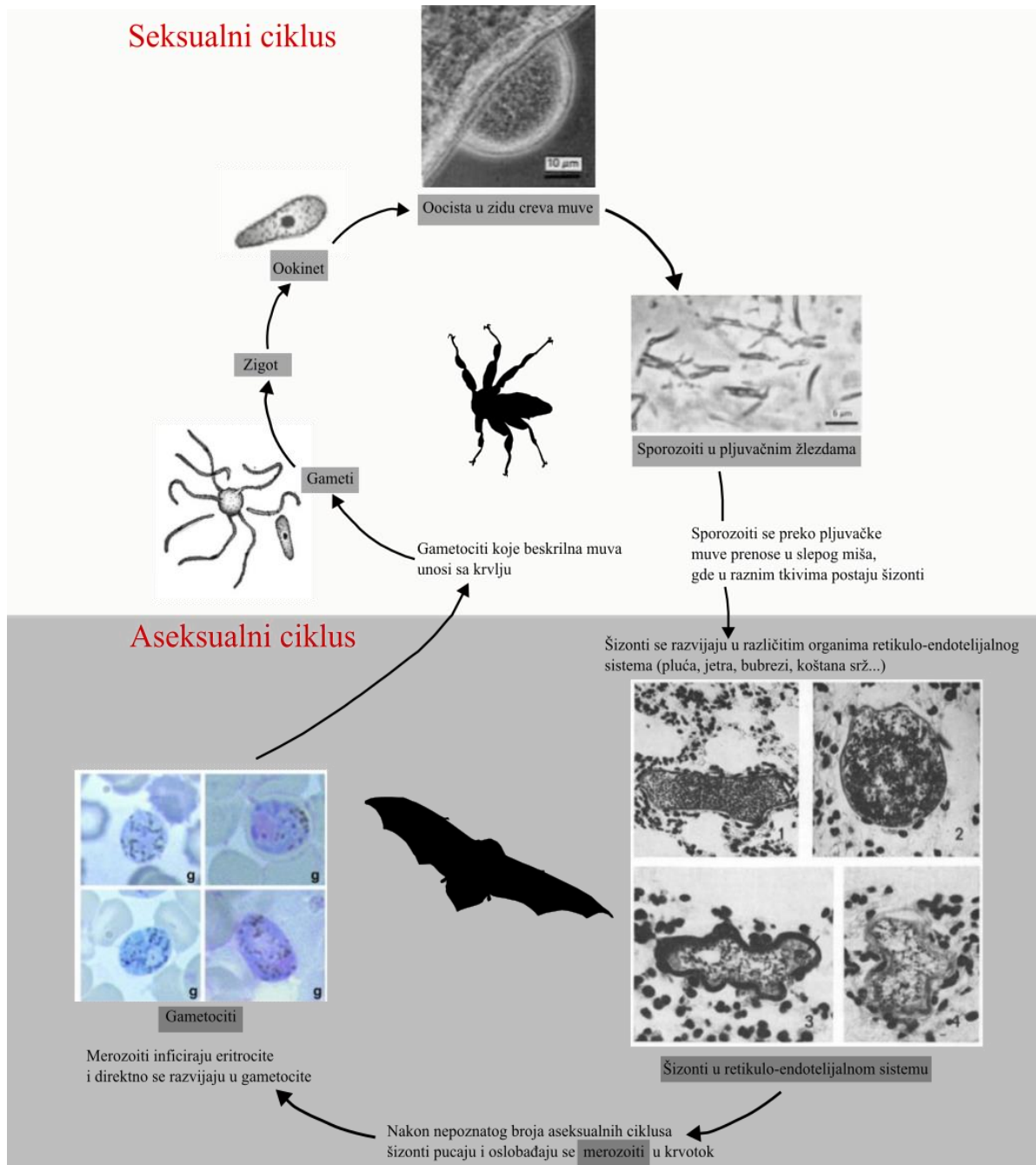
Paraziti iz reda Haemosporida (Apicomplexa) su eukariotski protisti koji inficiraju različite grupe kičmenjaka i prenose se insektima iz reda dvokrilaca (Diptera) koji se hrane krvlju (Garnham 1966). Ovaj red broji preko 500 vrsta, uključujući i vrste roda *Plasmodium*, sposobne da inficiraju čoveka. Paraziti ove grupe se razlikuju po životnim ciklusima, adaptacijama i specifičnosti ka domaćinu (Garnham 1966). Ektoparaziti slepih miševa, beskrilne muve iz porodice Nycteribiidae, su vektori krvnih parazita iz roda *Polychromophilus*. Beskrilne muve služe kao prelazni domaćini i u njima ovaj krvni parazit završava svoj seksualni ciklus. Za razliku od drugih dvokrilaca, beskrilne muve su jedini poznati vektor koji je obligatni ektoparazit, a ne slobodnoživeći insekt, poput komaraca (Megali i sar. 2011).

Paraziti roda *Polychromophilus* inficiraju isključivo slepe miševe kako u tropskim regionima, tako i u umerenom klimatu (Perkins i Schaer 2016). Do sada je opisano svega pet vrsta, ali novije molekularne studije ukazuju na postojanje dodatnih (Schaer i sar. 2013, Chumnicee i sar. 2021). Dve dominantno prisutne vrste su *Polychromophilus murinus* i *P. melanipherus* koje inficiraju brojne vrste slepih miševa iz porodice večernjaka (Vespertilionidae) (Garnham 1973, Gardner i Molyneux 1988, Megali i sar. 2011, Witsenburg i sar. 2014), odnosno dugokрилаша (Miniopteridae), širom sveta (Witsenburg i sar. 2012, Perkins i Schaer 2016, Szentiványi i sar. 2020, Sándor i sar. 2021). Obe vrste su u nekoliko navrata pronađene i kod slepih miševa iz drugih porodica, uključujući i potkovičare (Garnham 1973,



Sándor i sar. 2021). Opis infekcije vrstom *P. melanipherus* kod *M. schreibersii* u Italiji predstavlja najraniji dokumentovani slučaj infekcije slepih miševa krvnim parazitima reda Heamosporida (Dionisi 1899). *Polychromophilus melanipherus* je u Evropi dokumentovan kod domaćina *M. schreibersii* iz Švajcarske, Portugala, Španije, Francuske, Italije, Sicilije, Hrvatske, Slovačke, Mađarske i Rumunije (Witsenburg i sar. 2012, Witsenburg i sar. 2015, Szentiványi i sar. 2020, Sándor i sar. 2021).

Životni ciklus *Polychromophilus* parazita (**Slika 6**) sastoji se od muških mikro- i ženskih makrogametocita koji plivaju slobodno u krvi slepog miša, koje sa svojim obrokom krvi unosi beskrilna muva. Gametociti sazrevaju u srednjem crevu muve i postaju mikro- i makrogameti. Gameti se spajaju i formiraju zigot, koji se dalje razvija u ookinet, koji prolazi u zid srednjeg creva muve i tamo se razvije u oocistu. Kada oocista sazri, iz nje se oslobađaju pokretni sporozoiti i migriraju u pljuvačne žlezde muve, odakle se dalje prenose u slepog miša, prilikom sledećeg hranjenja muve (Gardner i Molyneux 1988). U slepom mišu sporozoiti migriraju u različite organe (pluća, jetru, bubrege, koštanu srž) i tamo sazrevaju u šizonte. Nakon nepoznatog broja aseksualnih ciklusa reprodukcije, šizonti pucaju i oslobađaju brojne merozoite u krvotok domaćina slepog miša. Ovi merozoiti inficiraju eritrocite i tamo se razvijaju u polne gametocite, koje će uneti muve prilikom hranjenja krvlju (Mer i Goldblum 1947, Garnham 1966, Liao i sar. 1977).



**Slika 6.** Životni ciklus *Polychromophilus* krvnog parazita, sa seksualnim ciklusom koji se odvija u telu beskrilne muve i aseksualnim ciklusom u telu slepom miša (delovi slike preuzeti iz Mer i Goldblum 1947, Garnham 1966, Liau i sar. 1977, Schaer i sar. 2013)

## 1.7 Genetička varijabilnost i molekularni markeri

Genetička varijabilnost ili diverzitet je mera koja pokazuje koliki je dugoročni potencijal neke populacije da se adaptira na promene sredine i održi u životu. Poređenje genetičke varijabilnosti unutar i između populacija se često koristi u populacionoj genetici. Kako bi se otkrili faktori koji utiču na genetičku varijaciju unutar i između populacija parazita, rade se uporedne studije više parazitskih vrsta istovremeno, studije ko-strukture njihovih populacija, kao i uporedne studije između domaćina i njihovih parazita (Criscione 2008). Studije odnosa domaćin-parazit su učinile napredno proučavanje nesrodnih taksona moguće, i donele napredak u biomedicinskim i evolucionim istraživanjima (Whiteman i sar. 2007). Uvid u genetiku parazita može nam omogućiti dodatni nivo informacija o domaćinovim migracijama i kontaktima sa drugim vrstama (Olival i sar. 2013).

Genetička varijabilnost i struktura populacija ektoparazita slepih miševa relativno retko je proučavana do sada, a naročito su retke ovakve studije na uzorcima sa Balkana, važnog centra biodiverziteta (Kryštufek i Reed 2004). Genetička varijabilnost unutar vrste, na populacijskom nivou, se često procenjuje na osnovu haploidnih lokusa, najčešće koristeći mitohondrijsku DNK. Mitohondrijska DNK se nasleđuje uniparentalno, pa je zbog toga odlikuju visoke stope mutacija. Markeri mitohondrijske DNK neretko su prvi izbor za preliminarne analize genetičke varijabilnosti divljih populacija (Goodall-Copestake i sar. 2012), razlikovanje blisko srodnih vrsta, procenu bogatstva vrsta u celom životinjskom carstvu kao i za filogenetske analize srodnosti među vrstama (Hebert i sar. 2003, Clare i sar. 2011). S druge strane, upravo zbog istih gorepomenutih osobina mitohondrijske DNK, njeni markeri nisu informativni za analizu protoka gena i stukturiranost populacija do koje je došlo u bliskoj prošlosti (Balloux 2010, Moussy i sar. 2012, Đan i sar. 2014).

Većina do sada objavljenih i dostupnih studija o genetičkoj strukturi i diverzitetu vrsta muva iz familije Nycteribiidae poreklom su sa tropskih ili orijentalnih vrsta slepih miševa (Dittmar i sar. 2006, Hosokawa i sar. 2012, Olival 2012, Tortosa i sar. 2013, Dietrich i sar. 2016, Ramasindrazana i sar. 2018, Bennett i sar. 2020, Qiu i sar. 2020). Među evropskim vrstama slepih miševa, populaciona struktura je analizirana kod beskrilnih muva poreklom sa domaćina *Myotis bechsteinii* (van Schaik i sar. 2015, van Schaik i sar. 2018) i *M. schreibersii* (Witsenburg i sar. 2015), i sekvence mitohondrijskih gena dostupne su u banci gena GenBank ([www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/)). Za grinje iz familije Spinturnicidae, poreklom sa evropskih vrsta slepih miševa, dostupne su sekvence različitih mitohondrijskih gena i mikrosatelita (Bruyndonckx i sar. 2009b, Bruyndonckx i sar. 2009a, van Schaik i sar. 2011, Baulechner i sar. 2013, van Schaik i sar. 2014). Nedavno objavljena opsežna studija učinila je dostupnim mnoge sekvence različitih beskrilnih muva i grinja slepih miševa (McKee i sar. 2019). Sa teritorije Srbije su, pre ove studije, od ektoparazita slepih miševa bile su dostupne samo sekvence mitohondrijskih gena krpelja (Burazerović i sar. 2015, Burazerović 2017), dok druge grupe ektoparazita slepih miševa nisu nikada ranije bile istraživane upotrebom genetičkih markera.

Uvid u genetičku strukturu populacija ektoparazita može omogućiti bolju procenu rizika širenja patogena. Istovremeno takve analize mogu biti od značaja i za očuvanje samih domaćina, ugroženih vrsta slepih miševa.

## 2 CILJEVI

Predmet ove doktorske disertacije je analiza genetičkog diverziteta i strukture populacija beskrilnih muva iz familije Nycteribiidae i grinja iz familije Spinturnicidae, koje parazitiraju na dve vrste slepih miševa – evropski dugokrilaš *Miniopterus schreibersii* i veliki potkovičar *Rhinolophus ferrumequinum*. Ove dve domaćinske vrste se mogu naći u odvojenim ili u deljenim podzemnim skloništima. U skladu sa tim, postavljeni su sledeći ciljevi:

- Identifikovanje vrsta ektoparazita prisutnih na dve domaćinske vrste i procena stepena njihove specifičnosti prema vrsti domaćina;
- Kvantitativna analiza inficiranosti domaćina ektoparazitima;
- Analiza molekularnog diverziteta i strukturiranosti populacija vrsta ektoparazita kod oba domaćina na osnovu analize varijabilnosti DNK sekvenci odabranih gena;
- Analiza prisustva krvnog parazita, izazivača bolesti slične malariji, *Polychromophilus sp.*, u beskrilnim muvama, procena njihovog genetičkog diverziteta u populaciji domaćina;
- Komparativna analiza molekularnog diverziteta i strukturiranosti populacija izabranog domaćina (*M. schreibersii*) i njegovih ektoparazita.

### 3 MATERIJAL I METODE

#### 3.1 Prikupljanje uzoraka









Prikupljeni su ektoparaziti sa 168 jedinki evropskog dugokrilaša, *Miniopterus schreibersii*, i sa 73 jedinke velikog potkovičara, *Rhinolophus ferrumequinum*, tokom leta i jeseni 2017. i 2018. godine, na osam lokaliteta u Srbiji i jednom u Bosni i Hercegovini (**Slika 7, Tabela 1**). Na četiri lokaliteta, u momentu uzorkovanja, bile su prisutne obe domaćinske vrste (lokaliteti 4, 5, 7 i 8). Na preostala četiri lokaliteta (lokaliteti 1, 2, 3 i 6), iako je poznato od ranije da ta skloništa koriste obe domaćinske vrste (Stanković i sar. 2018), u momentu uzorkovanja nisu bile prisutne istovremeno. Lokalitet br. 9 je sklonište koje koristi isključivo vrsta veliki potkovičar. Slepí miševi su hvatani standardnim hiropteroškim mrežama na ulazu u podzemna skloništa u sumrak prilikom izletanja. Svaki slepi miš je stavljan u zasebnu, čistu pamučnu vrećicu kako bi se izbegla kontaminacija parazitima sa drugih jedinki. Beskrilne muve i grinje su prikupljane pincetama sa krzna i letnih membrana svakog slepog miša, pažljivo i detaljno ga pregledajući u različitim položajima. Svi paraziti sa jedne jedinke domaćina stavljeni su zajedno u bočicu sa 99 % alkoholom, a naknadno u laboratoriji razdvajani u pojedinačne mikro-tube. Ciljane vrste slepih miševa su markirane krilnim prstenovima sa jedinstvenim brojem (Centar za markiranje divljih životinja, Prirodnjački muzej u Beogradu) na osnovu koga su šifrovani i uzorci parazita skinuti sa njih. Uzet je uzorak tkiva letne membrane slepih miševa, alatkom za biopsiju kružnog promera 3 mm, za dalje genetičke analize domaćina. Svi slepi miševi su pušteni nepovređeni neposredno po procesuiranju. Hvatanje i prstenovanje slepih miševa sprovedeno je u skladu sa dozvolama izdatim od relevantnih vlasti obe države (**Prilog 1**), i u skladu sa etičkim i bezbednosnim protokolima.

#### 3.2 Identifikacija vrsta i procena specijalizovanosti ektoparazita za domaćinsku vrstu

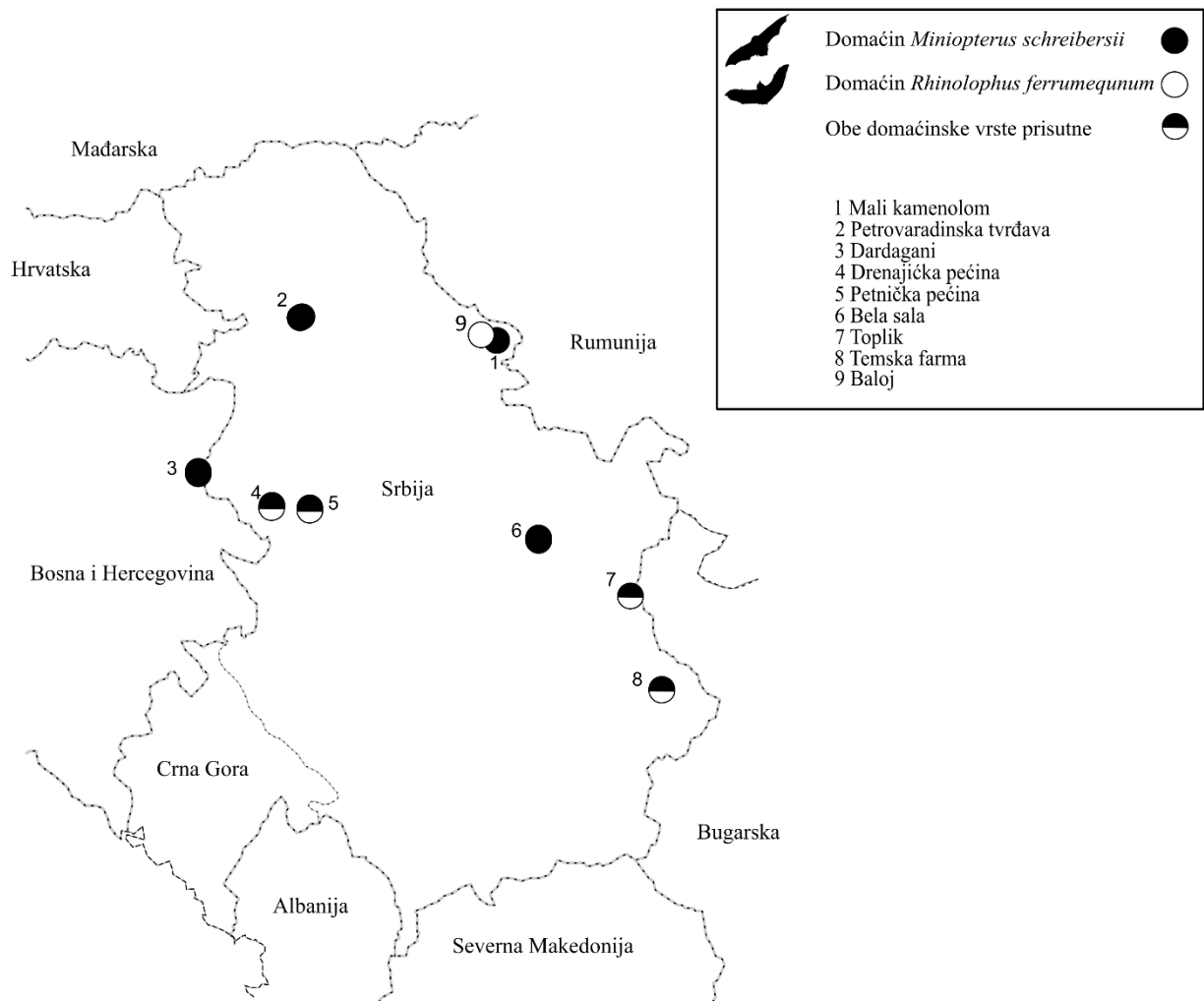
Beskrilne muve su morfološki identifikovane do nivoa vrste, prema ključu za identifikaciju (Theodor 1967), a potom je identifikacija potvrđena genetički (Pejić i sar. 2021). Manji uzorak grinja identifikovan je isključivo molekularnom metodom – poređenjem sekvenci DNK sa drugim dostupnim sekvencama deponovanim u bazi GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) koristeći NCBI BLAST alatku, dok ostatak grinja nije identifikovan do nivoa vrste, te se navodi kao familija Spinturnicidae (**Tabela 1**).

Beleženo je koje vrste parazita su pronađene na svakoj od vrsta slepih miševa, kako bi se analizirala specijalizovanost, odnosno specifičnost ektoparazita ka domaćinskoj vrsti.

**Tabela 1.** Prikupljanje uzoraka: Broj jedinki slepih miševa domaćina, *M. schreibersii* i *R. ferrumequinum* prikazani siluetama slepih miševa, uhvaćenih na osam lokaliteta u Srbiji i jednom u Bosni i Hercegovini (BiH), i broj jedinki ektoparazita prikupljenih sa njih

Lokalitet uzorkovanja	 <i>Myotis schreibersii</i>	 <i>Nycteribia schmidlii</i>	 <i>Penicillidia conspicua</i>	 <i>Penicillidia dufourii</i>	 <i>Spinturnicidae</i>	 <i>Rhinolophus ferrumequinum</i>	 <i>Phthiridium biarticulatum</i>	 <i>Spinturnicidae</i>
1 Mali kamenolom	51	45	21	1	78	NA	NA	NA
2 Petrovaradinska tvrđava	7	10	4	0	9	NA	NA	NA
3 Dardagani (BiH)	11	13	5	3	71	NA	NA	NA
4 Drenajička pećina	17	15	8	0	27	18	4	29
5 Petnička pećina	19	19	14	0	7	5	7	14
6 Bela sala	32	48	10	1	61	NA	NA	NA
7 Toplik	29	32	2	0	104	16	38	35
8 Temska farma	2	28	7	0	7	19	19	113
9 Baloj	NA	NA	NA	NA	NA	15	15	9
$\Sigma$	168	210	71	5	364	73	83	200

Vrednost u tabeli 0 – lokaliteti gde je prisutna domaćinska vrsta, ali ektoparazitska vrsta nije pronađena. NA – lokaliteti gde nije pronađena domaćinska vrsta slepog miša



**Slika 7.** Lokaliteti uzorkovanja ektoparazita gde su nađene domaćinske vrste slepih miševa *Miniopterus schreibersii* (crno-ispunjeni kružići), *Rhinolophus ferrumequinum* (prazni kružići), ili obe vrste (polu-ispunjeni kružići)

### 3.3 Kvantitativna analiza inficiranosti domaćina odabranim ektoparazitima

Kvantitativni parametri infekcije – intenzitet, prevalenca (P), srednji intenzitet infekcije (MI) i srednja abundanca (MA), su izračunati za svaku pojedinačnu vrstu ektoparazita, kao i zbirno za sve vrste unutar jedne familije ektoparazita, za svakog domaćina. Intenzitet se definiše kao broj jedinki određene vrste parazita na jednoj jedinki domaćina. Prevalenca se definiše kao odnos broja inficiranih jedinki domaćina u odnosu na ukupan broj pregledanih jedinki domaćina. Srednji intenzitet infekcije je ukupan broj pronađenih parazita neke vrste u odnosu na broj inficiranih jedinki domaćina, a srednja abundanca je ukupan broj parazita određene vrste u odnosu na ukupan broj pregledanih domaćina (Bush i sar. 1997).

Sve analize su rađene u Quantitative Parasitology Web (QP Web) (Reiczigel i sar. 2019). Za prevalencu je izračunata i vrednost donjeg i gornjeg praga intervala poverenja (95 %) (Klaschka i Reiczigel 2021). Za srednju inficiranost i srednju abundancu, interval poverenja je izračunat koristeći Bootstrap BC metod, sa 2000 ponavljanja. Za interval poverenja srednje vrednosti grupisanja (MC) (eng. *mean crowding*), korištena je ista metoda, ali sa 5.000 iteracija bootstrap-a. Poređene su vrednosti parametara infekcije za različite grupe ektoparazita nađenih na jednoj domaćinskoj vrsti i izračunati dodatni parametri poput Poulininog indeksa







diskrepancije ( $P_{id}$ ), negativnog binomijalnog eksponenta  $k$  ( $NBE_k$ ) i Spearmanovog koeficijenta opsega korelacije (na osnovu 5.000 Monte Carlo replikacija). Poređene su vrednosti za istu grupu parazita pronađenih na različitim domaćinama, i tom prilikom su prevalencije svake od domaćinskih vrsta poređene Fišerovim egzaktnim testom i  $X^2$  testom. Vrednosti srednje abundance i srednjeg intenziteta infekcije za svaku domaćinsku vrstu, poređene su dvostranim bootstrap t-testovima, sa 1.000 ponavljanja.

### 3.4 Molekularne analize DNK ektoparazita

#### 3.4.1 Izolacija i umnožavanje fragmenata DNK ektoparazita

Jedan deo beskrilnih muva i grinja je odabran kao reprezentativan uzorak svih pronađenih vrsta sa svih lokaliteta, te je izolovana njihova DNK za dalje molekularne analize i sekvencirani su fragmenati dva mitohodrijska gena (**Tabela 2**).

**Tabela 2.** Broj sekvenciranih fragmenata gena za svaku od analiziranih ektoparazitskih vrsta, po lokalitetima uzorkovanja

Domaćin	<i>Miniopterus schreibersii</i>				<i>Rhinolophus ferrumequinum</i>	
Ektoparazit	 <i>Nycteribia schmidlii</i>	 <i>Penicillidia conspicua</i>	 <i>Penicillidia dufouri</i>	 <i>Spinurnix psi</i>	 <i>Phthiridium biarticulatum</i>	 <i>Eynhovenia euryalis</i>
Gen	<i>COI</i>	<i>COI</i>	<i>COI</i>	<i>16S rRНК</i>	<i>COI</i>	<i>16S rRНК</i>
Lokalitet uzorkovanja						
1 Mali kamenolom	14	6	1	18	NA	NA
2 Petrovaradinska tvrđava	9	4	0	9	NA	NA
3 Dardagani (BiH)	12	4	3	20	NA	NA
4 Drenajićka pećina	11	4	0	18	4	19
5 Petnička pećina	12	5	0	2	7	13
6 Bela sala	16	4	1	20	NA	NA
7 Toplik	15	2	0	17	20	19
8 Temska farma	17	4	0	7	19	20
9 Baloj	NA	NA	NA	NA	13	8
$\Sigma$	106	33	5	111	63	79

Vrednost „0“ – lokaliteti gde je prisutna domaćinska vrsta, ali ektoparazitska vrsta nije pronađena. NA – lokaliteti gde nije pronađena domaćinska vrsta slepog miša

DNK beskrilnih muva izolovana je pomoću Mag-Bind Blood&Tissue DNA HDQ komercijalnog kita za izolaciju (Omega Bio-tek, SAD), prema uputstvima i protokolu proizvođača. Segment gena za subjedinicu 1 citohrom oksidaze (*COI*), dug 710 bp, amplifikovan je koristeći standardni prajmerski par korišten za barkoding životinja, LCO1490

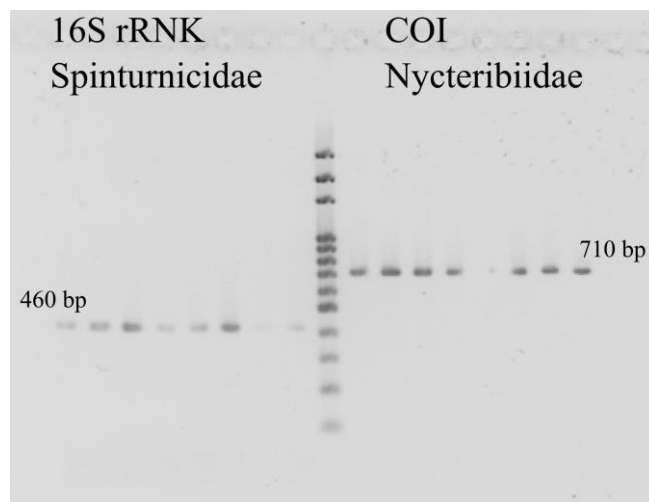


i HCO2198 (Folmer i sar. 1994). PCR reakcija je pripremljena u zapremini od 10  $\mu$ l, koja je sadržala 1  $\mu$ l DNK, 0.2  $\mu$ M svakog prajmera, Qiagen multiplex PCR master miks do finalne koncentracije od 3 mM MgCl<sub>2</sub> (Qiagen, Nemačka), i dvostruko-destilovanu vodu do finalne željene zapremine. Uslovi PCR reakcije podrazumevali su korak inicijalne denaturacije na 95 °C u trajanju od 5 min, praćen sa 40 ciklusa denaturacije u trajanju od 30 s na 95 °C, anilinga prajmera 60 s na 47 °C i elongacije 30 s na 60 °C, i potom korak finalne elongacije u trajanju od 30 min na 60 °C.

Cele jedinke grinja su smrvljene pomoću plastičnog tučka za jednokratnu upotrebu u 1.5 ml mikro-tubi i preko noći inkubirane u digestivnom puferu koji sadrži proteinazu K (Strauss 1993), nakon čega je izolovana DNK pomoću Quick-DNA Miniprep komercijalnog kita (Zymo Research, SAD), prema protokolu proizvođača. Fragment mitohindijskog gena za malu subjedinicu ribozomalne RNK (*16S* rRNK), dug 460 bp, umnožen je korišćenjem prajmerskog para *16S+1/16S-1* (Mangold i sar. 1998). Kao i za *COI* gen kod muva, uslovi PCR reakcije podrazumevali su inicijalnu denaturaciju na 95 °C u trajanju od 5 min, a potom 40 ciklusa: denaturacije u trajanju od 30 s na 95 °C, anilinga prajmera 60 s na 47 °C i elongacije 30 s na 60 °C, te finalnu elongaciju u trajanju od 30 min na 60 °C. Sva umnožavanja su urađena na 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems, SAD) mašini. PCR reakcija je pripremljena u zapremini od 10  $\mu$ l, sadržući 1  $\mu$ l DNK, 0.2  $\mu$ M svakog prajmera, Qiagen multiplex PCR master miks do finalne koncentracije od 3 mM MgCl<sub>2</sub> (Qiagen, Nemačka), i dvostruko-destilovanu vodu do finalne željene zapremine.

### 3.4.2 Reakcija prečišćavanja i sekvenciranja fragmenata DNK ektoparazita

Produkti PCR reakcija su vizualizovani posle elektroforeze na 1.5 % agaroznom gelu (**Slika 8**), bojenom Gel Red bojom (Biotium), a potom prečišćeni prateći ExoI-SAP protokol: 4  $\mu$ l PCR produkta i 1  $\mu$ l miksa za čišćenje (egzonukleaza I (*E. coli*) 2000 U/ $\mu$ l (New England BioLabs, SAD), alkalna fosfataza račića - Shrimp Alkaline Phosphatase –1U/ $\mu$ l (Affymetrix, SAD), destilovana voda Aquadest (VWR, SAD)), zagreva se 15 min na 37 °C i 15 min na 80 °C.



**Slika 8.** Agarozni gel sa produktima PCR reakcije, 460 bp dugim fragmentom *16S* rRNK kod jedinki grinja familije Spinturnicidae, i 710 bp dugim fragmentom *COI* kod predstavnika beskrilnih muva familije Nycteribiidae. U sredini je molekularni lenjir za dužinu (eng. *ladder*)

Reakcije sekvenciranja su izvođene u zapremini od 10  $\mu$ l, koja je sadržala 1  $\mu$ l prečišćene DNK (koncentracije 20 ng/ $\mu$ l), 0.2  $\mu$ M forward prajmera (istog onog koji je korišten prilikom amplifikacije), 1  $\mu$ l Big Dye Terminator 5X pufera za sekvenciranje (Applied Biosystems, SAD), 0.5  $\mu$ l half Big Dye Terminator reagensa za sekvenciranje (Sigma, SAD) i 0.5  $\mu$ l Big Dye Terminator v3.1 reagensa za sekvenciranje RR-100 (Applied Biosystems, SAD). Umnožavanje *COI* gena za reakciju sekvenciranja je urađeno prema sledećem temperaturnom profilu: Inicijalna denaturacija 60 s na 96 °C, praćena sa 15 ciklusa koji se sastoje od 10 s na 96 °C, 5 s na 45 °C i 75 s na 60 °C, praćeno sa još 5 ciklusa koji se sastoje od 10 s na 96 °C, 5 s na 45 °C i 2 min na 60 °C. Umnožavanje *16S* rRNK za reakciju sekvenciranja urađeno je prema sledećem temperaturnom profilu: inicijalna denaturacija u trajanju od 60 s na 96 °C, praćena sa 25 ciklusa od po 10 s na 96 °C, 5 s na 47 °C i 4 min na 60 °C. Sekvenciranje je urađeno ABI Prism 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, SAD) aparatu, na Zoološkom institutu i muzeju, Univerzitet u Grajsvaldu, Nemačka.

### 3.4.3 Analiza sekvenci DNK ektoparazita

Analizom hromatogramskih zapisa proveravan je kvalitet sekvenci, koje su potom isečene kako bi se zadržali samo delovi sekvence koji su visokog kvaliteta. Dobijene sekvence gena su poravnate i izmenjene pomoću CodoneCodeAligner 4.2.7 ([www.codoncode.com](http://www.codoncode.com)) ili pomoću Clustal W algoritma implementiranog u Mega v.6 (Tamura i sar. 2013). Finalne dužine sekvenci za svaki od gena/vrsta date su u **Tabeli 9**. Jedinственe sekvence dobijene u ovoj studiji, deponovane su u GenBank bazu, sa pristupnim brojevima prikazanim u **Prilogu 2**.

Određivanje osnovnih parametara molekularnog diverziteta nukleotidnih sekvenci koji podrazumeva: broj haplotipova, diverzitet haplotipova (Hd), broj polimorfniх mesta, broj nukleotidnih razlika (k), nukleotidni diverzitet ( $\pi$ ), urađeno je u programima DnaSP6 (Rozas i sar. 2017) i ARLEQUIN v.3.5.2.2 (Excoffier i Lischer 2010). Sekvence su grupisane u haplotipove pomoću DnaSP6, a odnosi između mreže haplotipova su analizirani pomoću *Median-joining* algoritma i vizualizovani u PopART v1.7 (Bielт i sar. 1999), primenjujući automatski predložena podešavanja (default,  $\epsilon=0$ ). Isti softver je korišten i za prikazivanje diverziteta haplotipova na svakom od lokaliteta. Dodatno, koristeći se prethodno objavljenim i dostupnim sekvencama u bazi GenBank (Bruyndonckx i sar. 2009a, Tortosa i sar. 2013, McKee i sar. 2019), kao iz **Priloga 3**, prošireni setovi podataka su analizirani i nove *Median-joining* mreže konstruisane u PopART 1.7 za svaku vrstu ektoparazita. Analiza evolutivne divergencije između sekvenci proširenog seta podataka urađena je u MEGA v.6 programu (Tamura i sar. 2013), koristeći Maximum Composite Likelihood model (Tamura i sar. 2004).

Prostorno-eksplicitno Bajesovsko grupisanje jedinki, za svaku vrstu, primenjeno je korišćenjem programskog paketa Geneland 4.9.2 (Guillot i sar. 2005), u R programskom jeziku (R Core Team), kako bi se izbeglo *a priori* definisanje populacija. Ova analiza omogućava grupisanje jedinki u geografski i genetički diferencirane klastere, te tako određuje prostorni obrazac distribucije molekularnog diverziteta. Model se zasniva na otkrivanju geografskih diskontinuiteta i grupiše jedinke u K broj klastera tako da se maksimalno smanji Hardy-Vajnbergov disekvilibrjum unutar svake od grupa. Model za svaku jedinku uzima u obzir genetičke podatke zajedno sa podacima o geografskim koordinatama. Primenjena su podešavanja modela sa nezavisnim učestalostima alela (eng. *uncorrelated model*), sa ukupno 1.000.000 iteracija, u 10 nezavisnih ponavljanja, i brojem potencijalnih klastera (grupa ili populacija) K od 1 do 10. Zapisivani su parametri pri svakoj stotoj iteraciji, a na kraju je odbačeno 30 % iteracija kao *burn-in*. Rezultati ove analize prikazani su geografskom mapom na kojoj su interpolirane posteriorne verovatnoće za pripadnost jedinki svakom od predloženih klastera. Dodatno, prostorno-eksplicitni Bajesovski metod grupisanja je proveren i u programu BAPS v.6 (Corier i sar. 2008), na osnovu geografskih koordinata uzorkovanja svake jedinke i

bez *a priori* dodeljivanja pripadnosti nekoj populaciji. U BAPS-u je maksimalni broj grupa podešen da varira od 1 do 10 (k), sa po 10 ponavljanja za svaku vrednost k, a rezultati su bili uprosečeni na osnovu verovatnoće „*likelihood scor*“ vrednosti. Opcija „*Spatial clustering*“ je korištena kako bi se utvrdio najverovatniji broj klastera. Kod vrsta kod kojih se pokaže prisustvo prostorno i genetički definisanih klastera, osnovni parametri molekularnog diverziteta određeni su u okviru programa DnaSP v.6 i ARLEQUIN, a genetička diferencijacija između definisanih grupa je testirana analizom molekularne varijanse (AMOVA), te poređenjem  $\Phi_{st}$  vrednosti na osnovu prosečnog broja razlika i vrednostima statističke značajnosti tih razlika. Vrednosti  $\Phi_{st}$  indeksa fiksacije variraju od 0 do 1, gde nula predstavlja potpunu panmiksiju, odnosno dve populacije koje se slobodno mešaju i razmnožavaju, a vrednost 1 znači da je celokupnu genetičku varijabilnost moguće objasniti strukturom populacije – da između dve populacije ne postoji razmena genetičkog materijala. Do struktuiranosti populacije dolazi usled nenasumičnog parenja između grupa, često usled njihove fizičke razdvojenosti, koje biva praćeno genetičkim driftom frekvencija alela u svakoj od grupa. Jedna od mera diferencijacije populacije usled postojanja struktuiranosti je i  $F_{st}$  vrednost (odnosno  $\Phi_{st}$  kada se govori o markerima mtDNK). Ovaj parameter pokazuje koliko su dve jedinke iz iste populacije međusobno bliže, u poređenju sa ukupnom populacijom, odnosno predstavlja prosečan broj međusobnih razlika između dve jedinke uzorkovane iz različitih ili iz iste subpopulacije. *Pairwise* razlika unutar populacije se izračunava kao suma međusobnih razlika podeljena sa brojem parova, i pristrasna je kada se radi o malom uzorku ili kada postoje velike razlike u brojnosti između populacija.

Analiza demografske istorije setova sekvenci ispitivanih gena kod obe ektoparazitske grupe urađena je poređenjem distribucije parova nukleotidnih razlika (eng. *mismatch distribution*). *Mismatch* analiza je urađena u ARLEQUIN v.3.5.2.2 (Excoffier i Lischer 2010) kako bi se utvrdilo postojanje potencijalnih istorijskih populacionih fluktuacija kod svake od ektoparazitskih vrsta, pod nultom hipotezom da uočeni podaci odgovaraju modelu nagle ekspanzije. Značajnost preklapanja uočene *mismatch* distribucije sa predviđenom, procenjuje se na osnovu sume kvadratnih devijacija (SSD - *sum od the squared deviations*) i Harpendingovog indeksa (*r - Raggedness index*). Niska i statistički neznačajna vrednost *r* ukazuje na ekspanziju populacije, dok je značajna vrednost *r* ( $p < 0.05$ ) dokaz za odbacivanje modela nagle ekspanzije. Dodatno, *mismatch* grafikoni su izrađeni u DnaSP6 softveru (Rozas i sar. 2017) kako bi se utvrdilo da li populacije pokazuju znakove ekspanzije prostornog areala ili stacionarnu populacionu istoriju (Tajima 1989). Unimodalnu distribuciju pokazuju populacije koje su u prošlosti pretrpele naglu demografsku ekspanziju, dok multimodalnu *mismatch* distribuciju pokazuju populacije koje imaju stabilnu veličinu populacije (Rogers i Harpending 1992).

Dva testa neutralnosti, koji se zasnivaju na distribuciji učestalosti alela, Fuov  $F_s$  i Tajimim D test, za istraživanje demografskih promena u prošlosti, takođe su urađeni u DnaSP v.6 (Rozas i sar. 2017). Oba ova pokazatelja imaju statistički značajne negativne vrednosti ukoliko postoji skorašnji populacioni rast, odnosno ukoliko deluje pozitivna, ili negativna direkcionalna selekcija. Ukoliko deluje balansna selekcija D vrednost biće pozitivna.

### 3.5 Molekularna detekcija krvnih parazita iz roda *Polychromophilus* sp. iz DNK beskrilnih muva

3.5.1 Umnožavanje fragmenata gena krvnog parazita *Polychromophilus* sp. iz prethodno izolovane DNK beskrilnih muva

Prethodno izolovana DNK 215 beskrilnih muva (**Tabela 3**) je testirana na prisustvo DNK parazita iz roda *Polychromophilus*, koji može biti prisutan bilo u tkivima muve, bilo u nesvarenoj krvi domaćina na kome su se hranile muve. Molekularna detekcija krvnih parazita rađena je umnožavanjem parcijalnih sekvenci dva mtDNK gena te njihovim kasnijim sekvenciranjem. Inicijalno je umnožen gen za citohrom b (*cytb*) približno 600 bp dužine, koristeći prajmerski par 3932F i DW4 (Perkins i Schall 2002) prema temperaturnom protokolu kao u **Prilogu 4**.

**Tabela 3.** Tabela uzoraka izolovane DNK beskrilnih muva iz Srbije i Bosne i Hercegovine koja je molekularnim metodama testirana na prisustvo krvnog parazita iz roda *Polychromophilus*

Vrsta slepog miša domaćina muve	Vrsta beskrilne muve	Broj uzoraka	Lokalitet uzorkovanja (broj muva po lokalitetu)
<i>Miniopterus schreibersii</i>	<i>Nycteribia schmidlii</i>	133	Mali kamenolom (20) Drenajićka pećina (16) Bela sala (20) Toplik (20) Dardagani (13) Petnička pećina (16) Temska farma (19) Petrovaradinska tvrđava (9)
	<i>Penicillidia conspicua</i>	14	Drenajićka pećina (2) Dardagani (4) Petnička pećina (3) Petrovaradinska tvrđava (5)
	<i>Penicillidia dufourii</i>	3	Dardagani (3)
<i>Rhinolophus ferrumequinum</i>	<i>Phthiridium biarticulatum</i>	65	Drenajićka pećina (4) Toplik (20) Petnička pećina (7) Temska farma (19) Balaj (15)
$\Sigma$		215	

Za uzorke kod kojih je potvrđena infekcija parazitom *Polychromophilus* umnožavanjem fragmenta ovog gena, umnožen je i drugi gen, za subjedinicu 1 citohrom oksidaze (*cox1*), dužine 950 bp. Radi razlikovanja sekvenci gena citohrom oksidaze 1 kod beskrilnih muva (*COI*), za isti taj gen kod vrsta roda *Polychromophilus* će u ostatku teksta, analiza i tabela biti korištena skraćenica *cox1*.

PCR reakcije su pripremljene sa TopTaq Master Mix (Qiagen, Nemačka) komercijalnim kitom koji sadrži 10x koncentrovani CoralLoad pufer za lakše nalivanje na agarozni gel i vizualizaciju. PCR reakcija je pripremljena u finalnoj zapremini od 20 µl (10 µl TopTaq mix, 2 µl CoralLoad pufera, po 1 µl svakog prajmera 10 µM koncentracije, 2-4 µl DNK i voda u varijabilnom odnosu, zavisno od koncentracije DNK). Korišteni prajmeri dati su u **Tabeli 4** i praćeni su prethodno objavljeni protokoli (Perkins i Schall 2002, Martinsen i sar. 2008). Gen *cox1* je umnožen iz dva dela, koristeći *nested* (“ugnežđenu”) PCR reakciju: za spoljašnju reakciju je korišten prajmerski par *cox1*-out-F/R, za nested prvi deo reakcije *cox1*-in-F/mid-R, a za nested drugi deo reakcije *cox1*-mid-F/in-R, prema temperaturnim protokolima kao u **Prilogu 4**. Rađena su najmanje dva nezavisna pokušaja umnožavanja sekvenci gena po uzorku i pozitivna kontrola je bila uključena u sve PCR reakcije.

**Tabela 4.** Pregled odabranih gena, prajmera za njihovo umnožavanje, te njihovih sekvenci i navoda studija iz kojih su preuzeti, za molekularno detektovanje *Polychromophilus* sp. iz DNK beskrilnih muva

Gen	Prajmer	Sekvenca (5' -> 3')	Referenca
Citohrom b ( <i>cytb</i> )	3932F	GGGTTATGTATTACCTTGGGGTC	(Perkins i Schall 2002)
	DW4	TGTTTGCTTGGGAGCTGTAATCATAATGTG	
Citohrom c oksidaza 1 ( <i>cox1</i> )	<i>Cox1</i> -R-out	AGGAATACGTCTAGGCATTACATTAAATCC	(Martinsen i sar. 2008)
	<i>Cox1</i> -R-in	GTATTTTCTCGTAATGTTTTACCAAAGAA	
	<i>Cox1</i> -F-out	CTATTTATGGTTTTTCATTTTTATTTGGTA	
	<i>Cox1</i> -F-in	ATGATATTTACARTTCAYGGWATTATTATG	
	<i>Cox1</i> -mid-F	TTATTCTGGTTTTTTGGTCATCCAG	
	<i>Cox1</i> -mid-R	CTGGATGACCAAAAAACCAGAATAA	

Elektroforeza na 1 % agaroznom gelu je korištena za analizu PCR produkata, koji su vizualizovani pomoću SYBR Safe boje aktivirane UV svetlom i slikani na uređaju Bio-Rad Chemi-Doc. Pošto je očekivana dužina produkata bila od 300 bp do 1.000 bp, korišten je marker za dužinu DNK od 1 kb.

### 3.5.2 Prečišćavanje produkata i sekvenciranje fragmenata gena *Polychromophilus* sp. krvnog parazita

PCR produkti koji su bili očekivane dužine i vidljivi na gelu, prečišćeni su koristeći MinElute PCR purification Kit (Qiagen) ili NucleoSpin Gel i PCR Clean-up kit (Macherey-Nagel, UK), prema uputstvu proizvođača. Uzorci su razblaženi sa 12 µl ili 24 µl elucionog pufera u zavisnosti od jačine trake na agaroznom gelu. Uzorci razblaženi sa 24 µl su podeljeni na dva pod-uzorka. 5 µM Primer rastvora je dodato u 10-12 µl prečišćene DNK. PCR produkti su sekvencirani metodom po Sangeru, najčešće u jednom smeru, osim u slučajevima kada je bilo dovoljno dostupnog PCR produkta da se uradi sekvenciranje u oba smera, i tako potvrdi tačnost sekvenci. Sekvenciranje je urađeno od strane LGC Genomics (Berlin, Nemačka).

### 3.5.3 Analiza sekvenci DNK krvnog parazita *Polychromophilus* sp.

Dobijene sekvence su proveravane i editovane u softveru Geneious Prime 2021.1 (<https://www.geneious.com>). Kvalitet svake pojedinačne sekvence je ručno proveren, a početak i kraj sekvence koji su lošijeg kvaliteta su isečeni. Sekvence koje su umnožene u oba smera su spojene, kao i sekvence umnožavane iz dva dela. Finalne sekvence za svaki od gena su poravnate koristeći MUSCLE algoritam (Edgar 2004), a potom još jednom proverene pre daljih analiza. Dvostruki nukleotidni vrhovi (dvostruki vrhovi koji su veći ili jednaki od 40 % visine vrha na nekoj nukleotidnoj poziciji) na elektroferogramima sekvenci dobrog kvaliteta su tumačeni kao dokaz infekcije mešanih haplotipova. Pozicija dvostrukih vrhova poklapala se polimorfnim mestima u sekvencama, a nukleotidne baze koje su ih sačinjavale odgovarale su drugim detektovanim haplotipovima, te je zbog toga isključena mogućnost da ovi dvostruki vrhovi predstavljaju grešku u sekvenciranju. Krajevi sekvenci su isečeni tako da je finalna dužina analiziranih gena *cytb* i *cox1* bila 579 bp, odnosno 945 bp. Jedinствене sekvence dobijene u ovoj studiji, deponovane su u GenBank bazu, sa pristupnim brojevima OQ357633-42 (**Prilog 2**). Kao i kod ektoparazita, određeni su osnovni parametri molekularnog diverziteta nukleotidnih sekvenci u programu DnaSP6 (Rozas i sar. 2017). Sekvence dobrog kvaliteta i bez dvosmislenih baza za gene *cytb* (n=13) i *cox1* (n=17) korištene su za konstruisanje mreže haplotipova *Median-joining* metodom u softveru PopART v.1.7 (Biel et al. 1999), i obeležene kako prema lokalitetima, tako i prema vrsti beskrilne muve iz koje je *Polychromophilus* izolovan.

Kako bi se uporedili haplotipovi dobijeni u ovoj studiji sa prethodno objavljenim i dostupnim sekvencama za *cytb* i *cox1* gene u bazi GenBank (**Prilog 5**), prošireni setovi podataka su analizirani i nove *Median-joining* mreže konstruisane u PopART 1.7 i obeležene prema zemlji porekla sekvenci. Prošireni setovi sadržali su 119 sekvenci za fragment gena *cytb* (479 bp), i 51 sekvencu za fragment gena *cox1* (768 bp). Analiza evolutivne divergencije između sekvenci proširenog seta podataka urađena je u MEGA v.6 programu (Tamura i sar. 2013), koristeći Maximum Composite Likelihood model (Tamura i sar. 2004).

## 3.6 Molekularne analize DNK odabrane domaćinske vrste – *Miniopterus schreibersii*

### 3.6.1 Izolacija DNK i umnožavanje fragmenata gena *M. schreibersii*

Uzorci tkiva letne membrane krila odabrane vrste domaćina, *M. schreibersii*, po pet jedinki sa svakog lokaliteta uzorkovanja, su inkubirani preko noći u digestivnom puferu koji sadrži proteinazu K (Strauss 1993), nakon čega je izolovana ukupna DNK sa Quick-DNA Miniprep komercijalnim kitom (Zymo Research, SAD), prema protokolu proizvođača. Za

analizu mitohondrijske DNK, umnožen je fragment gena za citohrom b, tRNK prolin, tRNK treonin, te fragment hipervarijabilnog regiona 1 (*HVI*) kontrolnog regiona. Radi jednostavnije terminologije, sva četiri umnožena fragmenta označavaćemo kao *HVI*, prema najdužem fragmentu gena iz ove grupe. Umnožavanje je rađeno koristeći prajmere C i E (Wilkinson i Chapman 1991). PCR reakcija je pripremljena u zapremini od 20  $\mu$ l, i sadržala je: 2.5  $\mu$ l Dream Taq pufera, 1.5  $\mu$ l dinukleotida, po 1  $\mu$ l svakog 0.2  $\mu$ M prajmera, 1  $\mu$ l  $MgCl_2$ , 0.2  $\mu$ l Dream Taq polimeraze, te 2  $\mu$ l DNK i dvostruko-destilovanu vodu do finalne željene zapremine. Uslovi PCR reakcije podrazumevali su 40 ciklusa: 30 s na 94 °C, 60 s na 56 °C i 60 s na 72 °C, praćenih sa 5 min na 72 °C. Uzorci sa lokaliteta Petnička pećina sekvencirani su u Mađarskoj u sklopu većeg projekta<sup>2</sup> i prekogranične saradnje sa kolegama sa Univerziteta u Pečuju.

Usled poteškoća u dobijanju specifične željene trake na gelu, uspešnost PCR reakcija nije bila potpuna. Nakon sekvenciranja i odbacivanja sekvenci nedovoljne dužine i kvaliteta čitanja, u finalnom setu sekvenci za dalju analizu dobili smo 23 sekvence domaćina vrste *Miniopterus schreibersii*, i to sa lokaliteta: Mali kamenolom 3, Petrovaradinska tvrđava 5, Drenajička pećina 5, Petnička pećina 5, Bela sala 2, Toplik 2 i Temska 1 sekvenca. Na žalost, nijedan uzorak sa lokaliteta Dardagani nije rezultovao kvalitetnom sekvencom, tako da je taj lokalitet izuzet iz daljih genetičkih analiza domaćina.

### 3.6.2 Analiza sekvenci DNK *M. schreibersii*

Kao i kod analize sekvenci DNK parazita, pre svega je proveravan kvalitet, a potom su krajevi sekvenci lošijeg kvaliteta odbacivani. Poravnavanje i editovanje sekvenci je rađeno u program CodoneCodeAligner 4.2.7 ([www.codoncode.com](http://www.codoncode.com)). Finalna dužina sekvenci iznosila je 553 bp.

U programima DnaSP6 (Rozas i sar. 2017) i ARLEQUIN v.3.5.2.2 (Excoffier i Lischer 2010) su izračunati osnovni parametri molekularnog diverziteta nukleotidnih sekvenci, koje su potom grupisane u haplotipove. Odnosi unutar mreže haplotipova su analizirani pomoću *Median-joining* algoritma i vizualizovani u PopART v1.7 (Biel et al. 1999), primenjujući automatski predložena podešavanja (default,  $\epsilon=0$ ). Prošireni set podataka koji je pored sekvenci dobijenih u ovoj studiji uključio i prethodno objavljene i dostupne sekvence iz GenBank baze (Bilgin et al. 2006, Bilgin et al. 2008, Furman et al. 2009, Ramos Pereira et al. 2009), kao iz **Priloga 6**, je analiziran, i nova mreža haplotipova je konstruisana takođe u PopART 1.7 softveru. Analiza evolutivne divergencije između sekvenci proširenog seta podataka urađena je u MEGA v.6 programu (Tamura et al. 2013), koristeći Maximum Composite Likelihood model (Tamura et al. 2004).

## 3.7 Poređenje genetičkog diverziteta odabrane domaćinske vrste slepog miša *M. schreibersii* i njegovih ektoparazita

U programu ARLEQUIN 3.5.2 urađeno je pairwise poređenje genetičke diferencijacije ( $\Phi_{st}$ ) između svih populacija (lokaliteta) i procenjen nivo značajnosti ovih poređenja, za odabranu vrstu domaćina, *M. schreibersii*, jednu vrstu muve (*N. schmidlii*) i jednu vrstu grinje (*S. psi*). Za poređenje genetičkih distanci domaćina i parazita korišten je parcijalni Mantel test (10.000 permutacija) u programu GenAlEx v6.5, sa korekcijama za geografsku udaljenost, po formuli  $\Phi_{st} / (1 - \Phi_{st})$ . Geografske distance između lokaliteta/populacija predstavljaju logaritmovane vrednosti najkraćih putanja vazдушnom linijom između dva lokaliteta uzorkovanja, izraženih u kilometrima.

---

<sup>2</sup> *Lloviu virus in Central i Eastern Europe*. Zahvalnost Dorottya Györössy i Görföl Tamás

## 4 REZULTATI

### 4.1 Identifikacija vrsta i specijalizovanost ektoparazita za vrstu domaćina

Posmatrajući ukupne brojeve prikupljenih jedinki beskrilnih muva i grinja, sa obe domaćinske vrste slepih miševa (**Tabela 1**), dolazi se do zaključka da su oba domaćina bila više parazitirana grinjama, sa 56 % kod *M. schreibersii*, odnosno 71 % kod *R. ferrumequinum* (**Slika 9**), nego beskrilnim muvama.

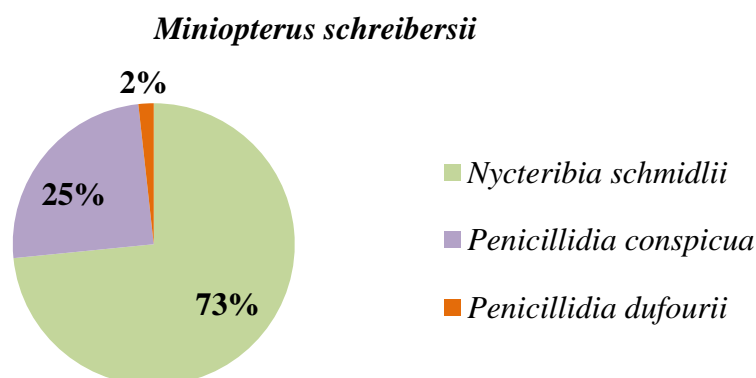
#### *Miniopterus schreibersii*

#### *Rhinolophus ferrumequinum*



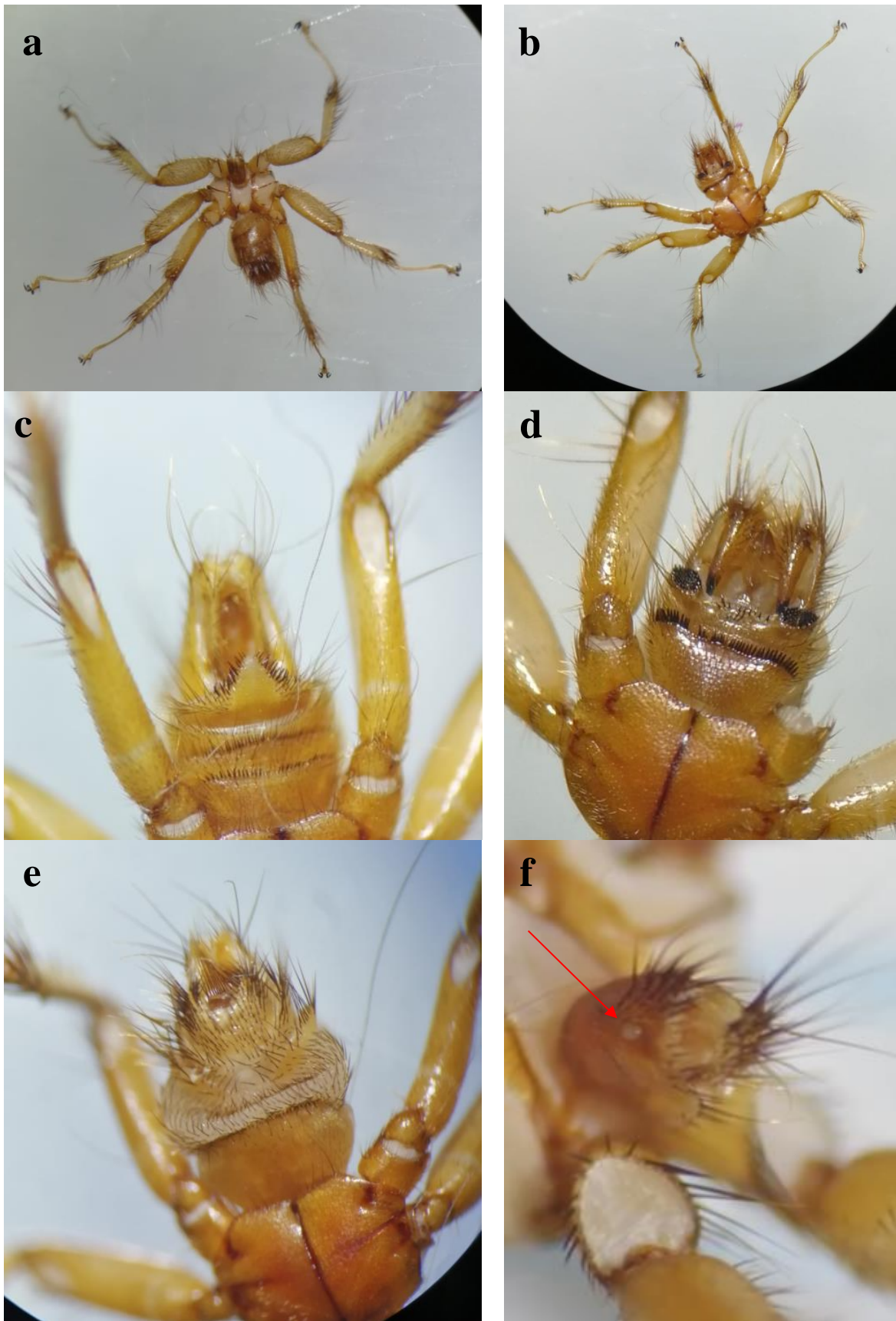
**Slika 9.** Procentualna zastupljenost ektoparazita iz familija Nycteribiidae i Spinturnicidae kod dve vrste slepih miševa domaćina, *Miniopterus schreibersii* i *Rhinolophus ferrumequinum*

Morfološki su identifikovane sve prikupljene jedinice beskrilnih muva familije Nycteribiidae, te je zaključeno da su tri vrste parazitirale domaćinsku vrstu *M. schreibersii*: *Nycteribia schmidlii*, *Penicillidia conspicua*, *P. dufourii* (**Slika 10**), a samo jedna vrsta muve, *Phthiridium biarticulatum* je pronađena na drugoj domaćinskoj vrsti *R. ferrumequinum*. Molekularna identifikacija dela uzorka muva potrebnih za dalje genetičke analize se poklapala sa morfološkom identifikacijom (**Tabela 2**). Nekoliko važnih karaktera za identifikaciju vrsta roda *Penicillidia* prikazano je na **Slici 11**. Na **Slici 12**, dat je pregled svih identifikovanih vrsta beskrilnih muva ove studije.

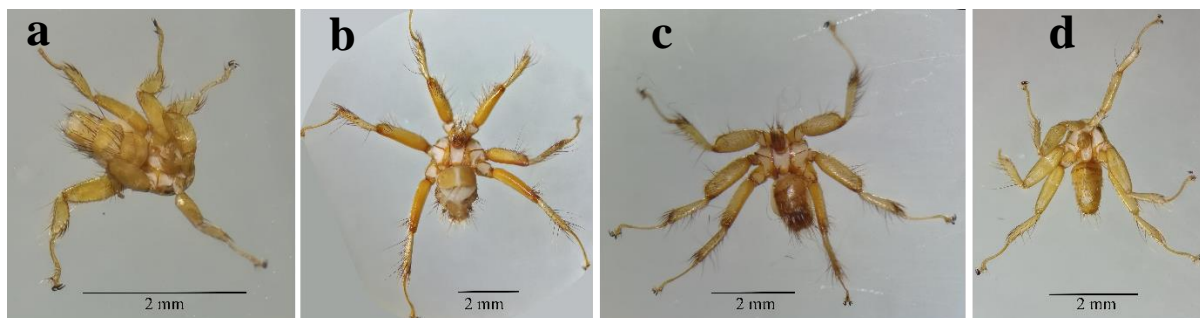


**Slika 10.** Procentualna zastupljenost vrsta beskrilnih muva u ukupnom uzorku Nycteribiidae koje su parazitirale na domaćinu *Miniopterus schreibersii*





**Slika 11.** Morfološka identifikacija beskrilnih muva **a** *Penicillidia dufourii* dorzalno; **b** *Penicillidia dufourii* ventralno; **c** *Penicillidia conspicua*, mužjak; **d** *Penicillidia dufourii*, mužjak; **e** *Penicillidia dufourii*, ženka; **f** Ocela na glavi muva roda *Penicillidia*

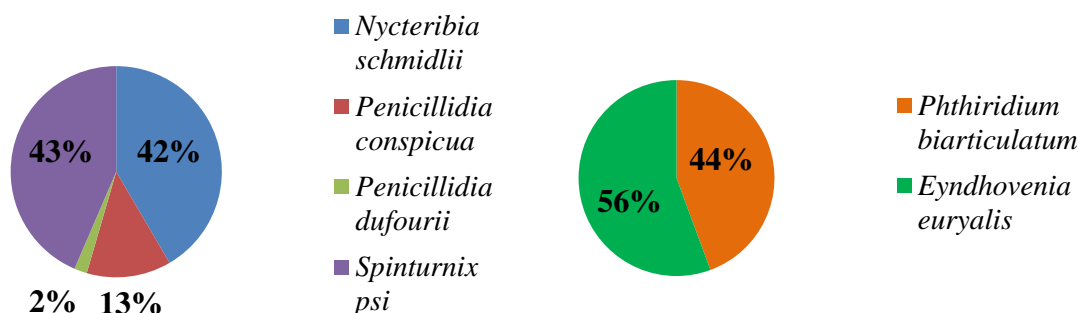


**Slika 12.** Vrste beskrilnih muva identifikovane u ovoj studiji **a** *Nycteribia schmidlii*; **b** *Penicillidia conspicua*; **c** *Penicillidia dufourii*; **d** *Phthiridium biarticularum*

Jedan deo prikupljenog uzorka grinja je molekularno identifikovan do nivoa vrste (**Tabela 2**). *Spinturnix psi* je jedina vrsta grinje nađena na domaćinu *M. schreibersii*. Druga vrsta domaćina, *R. ferrumequinum*, bila je parazitirana takođe isključivo jednom vrste grinje, *Eyndhovenia euryalis*. Nijedna parazitska vrsta nije nađena na obe istraživane domaćinske vrste (**Slika 13**).

#### *Miniopterus schreibersii*

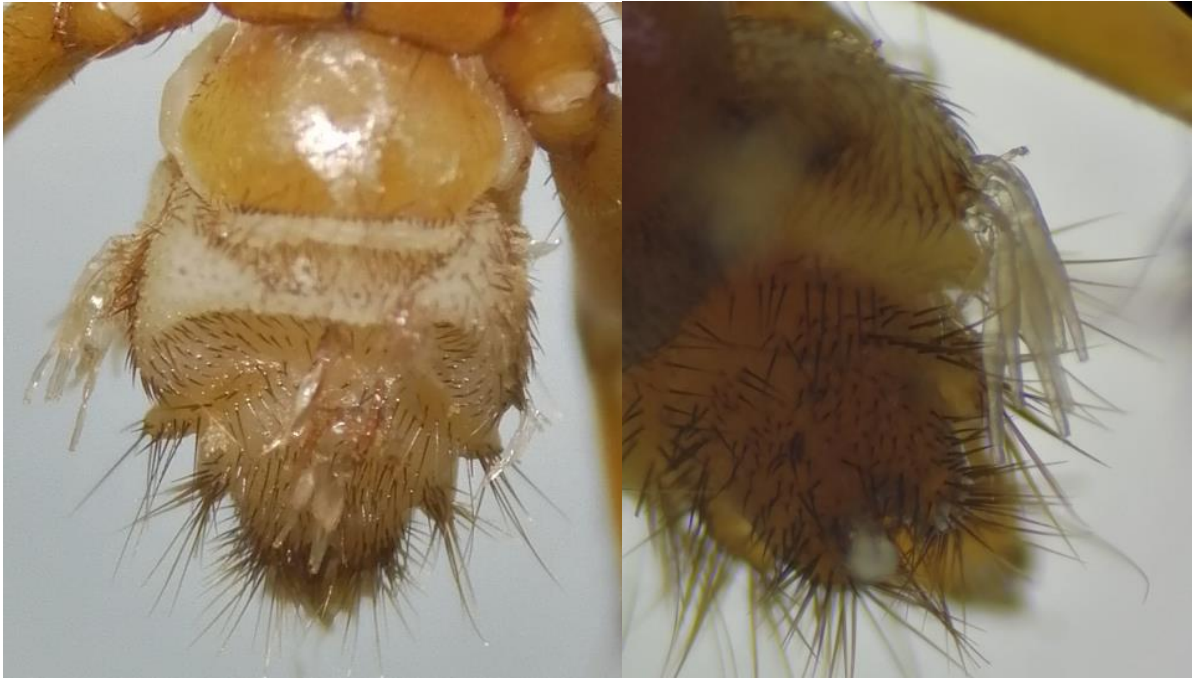
#### *Rhinolophus ferrumequinum*



**Slika 13.** Procentualna zastupljenost vrsta ektoparazita na delu uzorka beskrilnih muva i grinja koje su molekularno identifikovane

#### 4.2 Prisustvo hiperparazitske gljivice na muvama

*Arthrorhynchus* sp. hiperparazitska gljivica (**Slika 14**) pronađena je na 15 od ukupno 369 jedinki četiri vrste muva, dajući prevalencu od 4 %. Sve muve inficirane ovom gljivicom pripadale su jednoj vrsti muve, *P. conspicua*, unutar koje je prevalenca infekcije iznosila 21 %. Gljivice su poslate na dalju analizu i identifikaciju do nivoa vrste u mikološku laboratoriju Univerziteta u Gentu, Belgija.



**Slika 14.** Talusi gljivice *Arthrorhynchus* sp. (Laboulbeniales, Ascomycota) na abdomenu beskrilne muve *Penicillidia conspicua*

#### **4.3 Kvantitativna analiza inficiranosti domaćina ektoparazitima**

4.3.1 Poređenje kvantitativnih parametara infekcije dve vrste slepih miševa domaćina ektoparazitima iz familija Nycteribiidae i Spinturnicidae

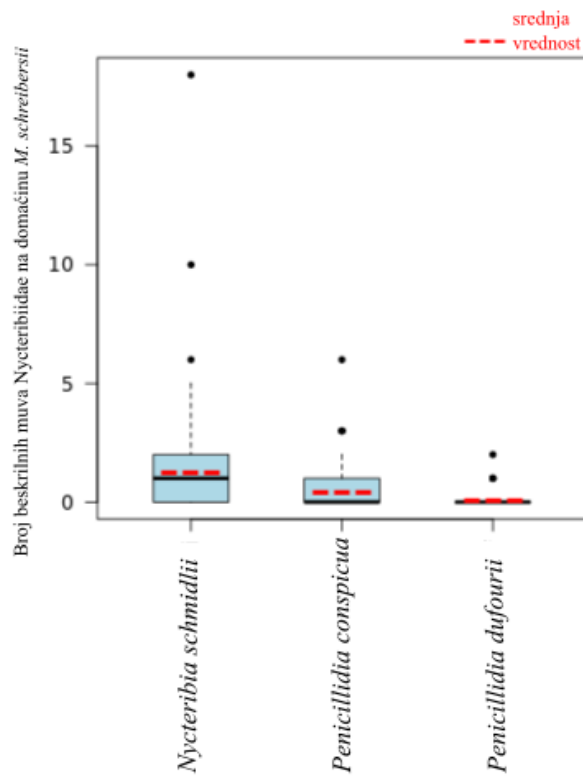
Ukupno su prikupljene 933 jedinke parazita. Od toga 369 jedinki beskrilnih muva i 564 jedinki grinja, sa dve vrste domaćina, slepih miševa vrste *M. schreibersii* (168 jedinki) i *R. ferrumequinum* (73 jedinke). U **Tabeli 5** dat je pregled kvantitativnih parametara infekcije za svaku vrstu muva pojedinačno, i zbirno za grinje iz familije Spinturnicidae, za svaku domaćinsku vrstu.

**Tabela 5.** Kvantitativni parametri infekcije dve vrste slepih miševa ektoparazitima

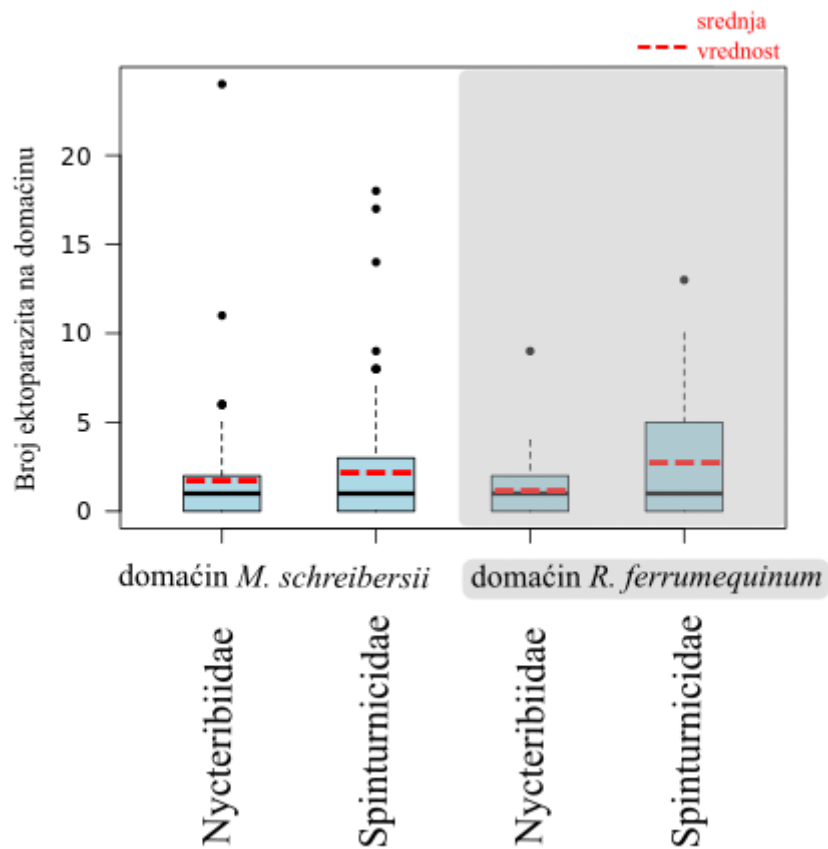
Domaćin	Vrsta ektoparazita	N <sub>tot</sub>	N <sub>z</sub>	P %	MI	MA	MC	P <sub>id</sub>	NBEk
<i>Miniopterus schreibersii</i>	<i>N. schmidlii</i>	168	99	58.9 (51.1-66.4)	2.12 (1.82-2.73)	1.25 (1.02-1.64)	4.22 (2.64-7.96)	0.62 (0.562-0.705)	1.1413 p=0.416
	<i>P. conspicua</i>		51	30.4 (23.5-37.9)	1.39 (1.2-1.71)	0.423 (0.31-0.565)	1.93 (1.47-3.08)	0.762 (0.703-0.818)	1.052 p=0.826
	<i>P. dufourii</i>		4	2.4 (0.7-6.0)	1.25 (1-1.5)	0.03 (0.006-0.065)	1.4 (1-1.67)	0.974 (0.944-0.988)	0.06 <sup>¥</sup>
	Spinturnicidae		117	69.6 (62.3-76.3)	3.11 (2.68-3.75)	2.17 (1.81-2.69)	5.75 (4.41-8.04)	0.588 (0.54-0.65)	1.028 p=0.936
<i>Rhinolophus ferrumequinum</i>	<i>Ph. biarticulatum</i>	73	48	65.8 (54.2-76.4)	1.73 (1.44-2.27)	1.14 (0.877-1.53)	2.73 (1.87-4.91)	0.534 (0.447-0.655)	3.115 p=0.663
	Spinturnicidae		53	72.6 (61.1-81.9)	3.77 (3.02-4.58)	2.74 (2.14-3.51)	5.97 (5.01-7.44)	0.563 (0.499-0.654)	0.982 p=0.495

N<sub>tot</sub> – ukupni broj pregledanih domaćina; N<sub>z</sub> – broj zaraženih domaćina odgovarajućom vrstom ektoparazita; P % - prevalenca; MI – srednji intenzitet infekcije; MA – srednja abundanca; MC – srednja vrednost grupisanja; P<sub>id</sub> – Paulinin indeks diskrepancije; NBEk - negativni binomijalni eksponent k, p vrednost X<sup>2</sup> testa. U zagradama su navedeni intervali poverenja (95 %). <sup>¥</sup>-mali uzorak, nije moguće izračunati p-vrednost

Od 168 pregledanih jedinki domaćina vrste *M. schreibersii*, 99 jedinki je bilo zaraženo muvama vrste *N. schmidlii* (P=58.9 %), 51 vrstom *P. conspicua* (P=30.4 %) i četiri jedinke domaćina bile su zaražene muvama vrste *P. dufourii* (P=2.4 %).



Slika 15. Box plot grafik broja jedinki tri vrste beskrilnih muva na domaćinu *M. schreibersii*



Slika 16. Box plot grafik inficiranosti dve vrste slepih miševa domaćina ektoparazitima iz familija Nycteribiidae i Spinturnicidae

Od 73 pregledanih jedinki domaćina vrste *R. ferrumequinum*, 48 jedinki je bilo zaraženo muvama vrste *Ph. biarticulatum* (65.8 %), što je ujedno i jedina vrsta beskrilne muve pronađena na ovom domaćinu. Grinjama iz familije Spinturnicidae zaraženo je bilo 53 jedinke ove vrste domaćina, te prevalenca infekcije iznosi 72.6 %, a srednji intenzitet infekcije 3.77 (**Tabela 5**). Spearmanov koeficijent opsega korelacije iznosio je 0.16 ( $p=0.172$ ), na osnovu 5.000 Monte Carlo replikacija.

Ukoliko posmatramo sve vrste beskrilnih muva kao jedinstvenu grupu, familiju Nycteribiidae, ukupno je zaraženo 122 od 168 jedinki domaćina *M. schreibersii*, odnosno prevalenca infekcije muvama je 72.6 %. Srednja vrednost intenziteta infekcije iznosi 2.34 (**Tabela 6**). Grinjama iz familije Spinturnicidae zaraženo je bilo 117 jedinki ove vrste domaćina, te prevalenca infekcije iznosi 69.6 % a srednji intenzitet infekcije 3.11 (**Tabela 5**, **Tabela 6**). Prevalenca je, kod ovog domaćina, niža za grinje, ali je srednji intenzitet infekcije viši.

**Tabela 6.** Kvantitativni parametri infekcije domaćina vrste *Miniopterus schreibersii* ektoparazitima dveju familija Nycteribiidae i Spinturnicidae

ektoparaziti	$N_z/N_{tot}$	P %	MI	MA	MC	$P_{id}$	NBEk
Nycteribiidae	122/168	72.6 (65.3-79)	2.34 (2.05- 2.98)	1.7 (1.43- 2.19)	4.9 (2.94- 10.6)	0.536 (0.474- 0.637)	1.717 $p=0.036$
Spinturnicidae	117/168	69.6 (62.3- 76.3)	3.11 (2.68- 3.75)	2.17 (1.81- 2.69)	5.75 (4.41- 8.04)	0.588 (0.54- 0.65)	1.028 $p=0.936$

$N_{tot}$  – ukupni broj pregledanih domaćina;  $N_z$  – broj zaraženih domaćina; P % - prevalenca; MI – srednji intenzitet infekcije; MA – srednja abundanca; MC – srednja vrednost grupisanja;  $P_{id}$  – Paulinin indeks diskrepancije; NBEk - negativni binomijalni eksponent k, p vrednost  $X^2$  testa. U zagradama su navedeni intervali poverenja (95 %)

Spearmanov koeficijent opsega korelacije iznosio je -0.05,  $p=0.525$  (na osnovu 5.000 Monte Carlo replikacija).

#### 4.3.2 Poređenje inficiranosti dveju vrsta slepih miševa domaćina, *M. schreibersii* i *R. ferrumequinum* beskrilnim muvama iz familije Nycteribiidae

U **Tabeli 7** dat je uporedni pregled kvantitativnih parametara infekcije dve domaćinske vrste slepih miševa beskrilnim muvama iz familije Nycteribiidae. Poređenjem prevalenci infekcije ove dve vrste domaćina beskrilnim muvama iz familije Nycteribiidae Fišerovim egzaktnim testom, dobijena je dvostrana p vrednost  $p=0.286$ , a bezuslovnim egzaktnim testom  $p=0.290$ . Dvostrani bootstrap t-test poređenja srednjih abundanci pokazao je postojanje statistički značajnih razlika ( $p<0.05$ ), kao i dvostrani t-test poređenja srednjih intenziteta ( $p<0.05$ ). Oba parametra bila su značajno veća kod *M. schreibersii*. Poređenje srednjih vrednosti grupisanja, za propisani nivo alfa ( $\alpha=0.05$ ), nije dalo statistički značajnu vrednost. Poređenje intervala poverenja za Paulinin indeks diskrepancije pokazalo je da razlika između ove dve domaćinske vrste za infekciju beskrilnim muvama nije značajna. Srednji intenziteti infekcije nisu se statistički značajno razlikovali među domaćinskim vrstama ( $p=0.263$ ).



**Tabela 7.** Kvantitativni parametri infekcije dve vrste slepih miševa beskrilnim muvama iz familije Nycterbiidae

Vrsta domaćin	N <sub>tot</sub>	N <sub>z</sub>	N <sub>n</sub>	P %	MI (±SD)	MA (±SD)	MC (i.p.)	P <sub>id</sub> (i.p.)
<i>M. schreibersii</i>	168	122	46	72.6	2.344 (2.459)	1.702 (2.341)	4.9 (2.86- 10.9)	0.536 (0.47- 0.667)
<i>R. ferrumequinum</i>	73	48	25	65.8	1.729 (1.333)	1.137 (1.357)	2.73 (1.83- 5.42)	0.534 (0.432- 0.657)

N<sub>tot</sub> – ukupni broj pregledanih domaćina; N<sub>z</sub> – broj zaraženih domaćina; N<sub>n</sub> – broj nezaraženih domaćina; P% – prevalenca; MI – srednji intenzitet infekcije; MA – srednja abundanca; MC – srednja vrednost grupisanja; P<sub>id</sub> – Paulinin indeks diskrepancije. U zagradama su navedene vrednosti standardne devijacije (±SD) ili opseg intervala poverenja (i.p.) od 95 %

#### 4.3.3 Poređenje inficiranosti dveju vrsta slepih miševa domaćina, *M. schreibersii* i *R. ferrumequinum* grinjama iz familije Spinturnicidae

U **Tabeli 8** dat je uporedni pregled kvantitativnih parametara infekcije dve domaćinske vrste slepih miševa grinjama iz familije Spinturnicidae. Poređenjem prevalenci infekcije ove dve vrste domaćina grinjama iz familije Spinturnicidae putem X<sup>2</sup> testa, nije dobijena statistički značajna razlika (p=0.757). Razlike među vrstama upoređene dvostrukim t-testom sa 1.000 replikacija nisu bile statistički značajne ni za srednje abundance (p=0.176), niti za srednje intenzitete infekcije (p=0.187). Srednje vrednosti grupisanja, za propisani nivo alfa (α=0.05), takođe se nisu statistički značajno razlikovale. Poređenje intervala poverenja za Paulinin indeks diskrepancije pokazalo je da razlika između ove dve domaćinske vrste za infekciju grinjama nije značajna (p>0.05).

**Tabela 8.** Kvantitativni parametri infekcije dve vrste slepih miševa grinjama iz familije Spinturnicidae

Vrsta domaćin	N <sub>tot</sub>	N <sub>z</sub>	N <sub>n</sub>	P %	MI (±SD)	MA (±SD)	MC (i.p.)	P <sub>id</sub> (i.p.)
<i>M. schreibersii</i>	168	117	51	69.6	3.11 (2.879)	2.167 (2.796)	5.75 (4.23- 8.43)	0.588 (0.527- 0.65)
<i>R. ferrumequinum</i>	73	53	20	72.6	3.77 (2.907)	2.74 (2.995)	5.97 (4.89- 7.71)	0.563 (0.483- 0.644)

N<sub>tot</sub> – ukupni broj pregledanih domaćina; N<sub>z</sub> – broj zaraženih domaćina; N<sub>n</sub> – broj nezaraženih domaćina; P % – prevalenca; MI – srednji intenzitet infekcije; MA – srednja abundanca; MC – srednja vrednost grupisanja; P<sub>id</sub> – Paulinin indeks diskrepancije. U zagradama su navedene vrednosti standardne devijacije (±SD) ili opseg intervala poverenja (i.p.) od 95 %

#### 4.4 Molekularne analize DNK ektoparazita

Sve sekvence DNK generisane u ovoj studiji su poređenjem sa dostupnim sekvencama u GenBank bazi dale najviše vrednosti poklapanja identiteta sa vrstama beskrilnih muva u skladu sa prethodnom morfološkom identifikacijom (*N. schmidlii*, *P. conspicua*, *P. dufourii*, *Ph. biarticulatum*). Vrste grinja iz ove studije su poređenjem sa dostupnim sekvencama iz baze







pokazale poklapanje identiteta sa vrstom *S. psi* (grinje sa domaćina *M. schreibersii*), odnosno *E. euryalis* (grinja sa domaćina *R. ferrumequinum*).

Pokazatelji molekularnog polimorfizma DNK za odabrane mitohodrijske gene *COI* (muve) i *16S* rRNK (grinje), zajedno sa brojem sekvenci korištenih u analizama i njihovim dužinama za svaku vrstu prikazani su u **Tabeli 9**. Jedinственe sekvence su deponovane u GenBank bazu (pristupni brojevi: *N. schmidlii*: MZ380293-MZ380313; *P. conspicua*: MZ396953-MZ396964; *P. dufourii*: MZ389896-MZ389898; *S. psi*: MZ390121-MZ390126; *Ph. biarticulatum*: MZ396965-MZ396970; *E. euryalis*: MZ389890-MZ389895; **Prilog 2**). Kod beskrilnih muva, najveći broj pronađenih haplotipova bio je 21 za vrstu *N. schmidlii*, a najmanji tri kod vrste *P. dufourii* (**Slika 17. a**, **Slika 21. a**, **Tabela 9**). Najveće vrednosti diverziteta haplotipova ( $H_d$ ) i nuklearnog diverzitet ( $\pi$ ) su detektovane kod vrste *P. conspicua* ( $H_d=0.722$ ;  $p=0.003$ ), a najmanje kod *Ph. biarticulatum* ( $H_d=0.289$ ;  $p=0.002$ ). Po šest haplotipova je detektovano kod obe vrste grinje (**Tabela 9**), od kojih su po pet haplotipova svake vrste bili novodetektovani. Vrednosti diverziteta haplotipova i nukleotida su bile veće kod *E. euryalis* ( $H_d=0.147$ ;  $p\leq 0.001$ ) nego kod *S. psi* ( $H_d=0.122$ ;  $p\leq 0.001$ ) (**Tabela 9**).

I kod muva i kod grinja, mreže haplotipova su imale zvezdastu topologiju, sa kracima koji se šire od jednog, najbrojnijeg haplotipa ( $H_1$ ), koji čini najveći udeo u uzorku (npr. 51.5 % kod *P. conspicua*, do 93.7 % kod *S. psi*).



**Tabela 9.** Osnovni parametri molekularnog diverziteta nukleotidnih sekvenci ektoparazita slepih miševa iz Srbije i Bosne i Hercegovine

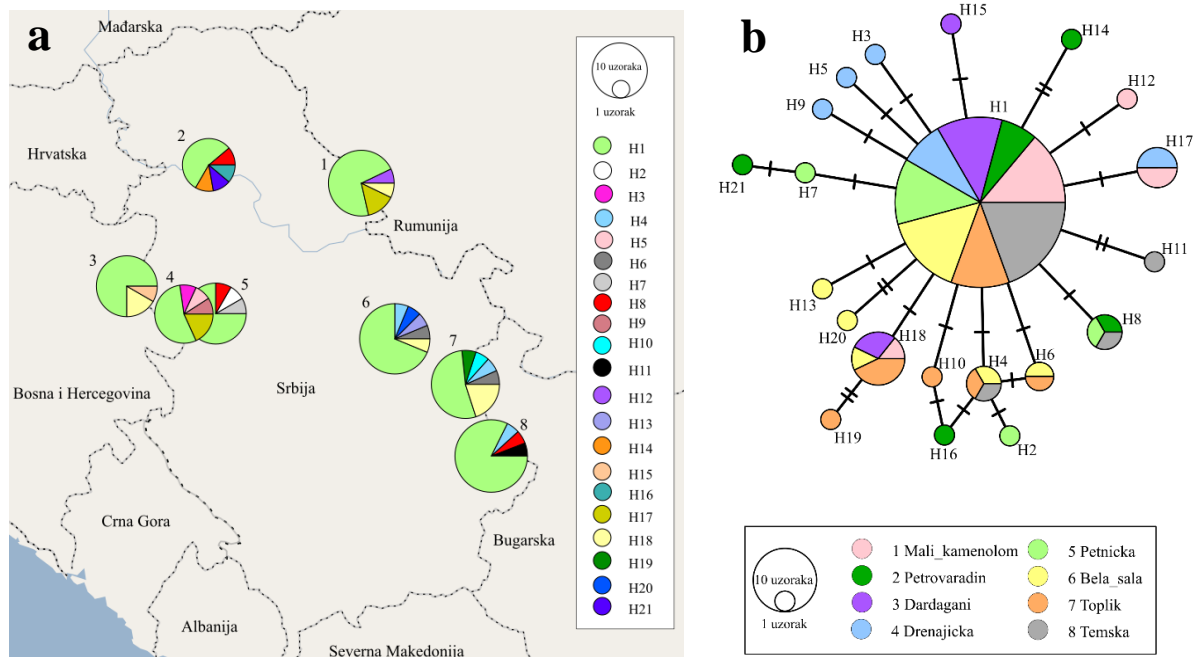
Vrsta domaćin	<i>Miniopterus schreibersii</i>				<i>Rhinolophus ferrumequinum</i>	
	<i>Nycteribia schmidlii</i> 	<i>Penicillidia conspicua</i> 	<i>Penicillidia dufourii</i> 	<i>Spinurnix psi</i> 	<i>Phthiridium biarticulatum</i> 	<i>Eymphovenia euryalis</i> 
Broj lokaliteta uzorkovanja	8	8	8	8	5	5
Gen	<i>COI</i>	<i>COI</i>	<i>COI</i>	<i>16S</i>	<i>COI</i>	<i>16S</i>
Dužina sekvence (bp)	585	589	579	354	626	341
Broj sekvenci	106	33	5	111	63	79
Broj haplotipova	21	12	3	6	6	6
Diverzitet haplotipova - Hd ( $\pm$ SD)	0.535 (0.059)	0.722 (0.080)	0.700 (0.218)	0.122 (0.043)	0.289 (0.073)	0.147 (0.054)
Nukleotidni diverzitet $-\pi$ ( $\pm$ SD)	0.00132 (0.0002)	0.00251 (0.00047)	0.00207 (0.00084)	0.00035 (0.00013)	0.00179 (0.00049)	0.00044 (0.00017)
Prosečan broj nukleotidnih razlika.	0.772	1.473	1.200	0.125	1.121	0.151
Broj polimorfnih mesta	21	10	3	5	9	5
Parsimonski informativna mesta	7	7	0	2	6	1

Vrednosti standardne devijacije ( $\pm$ SD) za diverzitet haplotipova (Hd) i nukleotidni diverzitet ( $\pi$ ) su date u zagradama

## 4.5 Genetički diverzitet, bogatstvo haplotipova i struktura populacija ektoparazita na domaćinu *Miniopterus schreibersii*

### 4.5.1 Beskrilna muva *Nycteribia schmidlii*

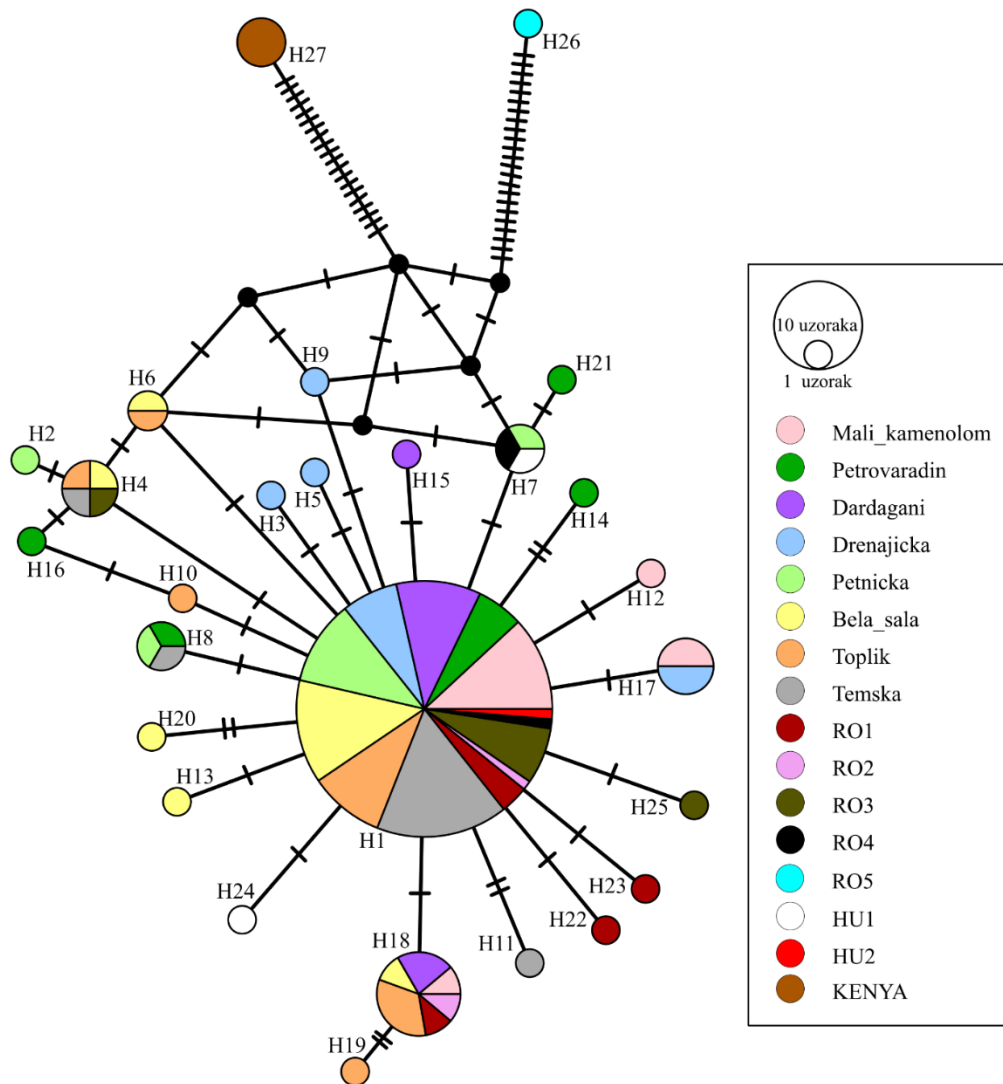
U setu od 106 sekvenci fragmenta gena za *COI* mtDNK vrste beskrilne muve *N. schmidlii* koja je parazitirala na domaćinu *M. schreibersii*, detektovan je 21 različit haplotip (**Slika 17. a**), obeležen sa H1-H21. Ukupan broj polimorfnih mesta bio je 21, od čega 7 informativnih. Jedan haplotip (H1) bio je najčešći, čineći skoro 68 % od ukupnog uzorka i prisutan na svih osam lokaliteta uzorkovanja (**Slika 17. a**). Haplotip H18 doprineo je sa 6.6%, odnosno imalo ga je sedam jedinki na ukupno četiri lokaliteta (Mali kamenolom, Bela sala, Toplik, i Dardagani). Haplotip H17 imalo je četiri jedinke (po dve u Drenajićkoj pećini i Malom kamenolomu). H4 i H8 doprineli su svaki sa 2.83 % (po jedna jedinka na lokalitetima H4: Bela sala, Toplik, Temska - svi u istočnoj Srbiji, odnosno H8: Temska, Petnička pećina, Petrovaradin), H6 sa 1.88 % (po jedna jedinka na lokalitetima Bela sala i Toplik u istočnoj Srbiji), a preostalih 15 haplotipova (H2, H3, H5, H7, H9, H10-16, H19-21) bili su predstavljeni svaki sa po jednom sekvencom, odnosno svaki je doprinio sa 0.92 % ukupnom uzorku (**Slika 17. a**). Lokaliteti sa najvećim diverzitetom haplotipova bili su Bela sala i Toplik, sa po šest haplotipova. *Median-joining* mreža haplotipova pokazuje zvezdastu topologiju, sa najzastupljenijim haplotipom H1 koji zauzima centralnu poziciju, a od koga polaze svi ostali haplotipovi, koji se razlikuju za jedan ili dva mutaciona koraka (**Slika 17. b**).



**Slika 17. a** Mapa numerisanih lokaliteta uzorkovanja (kao u **Tabeli 1**) vrste *Nycteribia schmidlii* sa distribucijom haplotipova; **b** *Median-joining* mreža 21 haplotipa *COI* mtDNK vrste *N. schmidlii* detektovanih u ovoj studiji. Crtice na granama predstavljaju broj nukleotidnih promena između dva haplotipa

Kada su ovom setu podataka dodate dostupne sekvence *COI* gena vrste *N. schmidlii* iz GenBank baze (**Prilog 3**), u proširenom setu podataka dobijena je 131 sekvenca, dugačka 585 bp, te je detektovano ukupno 27 haplotipova (21 haplotip originalno iz ove studije i H22-H27 brojevi koji su dodeljeni postojećim haplotipovima dostupnim u bazi, kao u **Prilogu 3**). Najudaljeniji od centra mreže haplotipova bili su H26 i H27, jedan uzorkovan u Rumuniji, a

drugi u Keniji. Oni su se značajno razlikovali od ostalih, i to za 27 i 20 nukleotidnih promena od hipotetičkog prelaznog haplotipa (nedostajući haplotip koji nije uzorkovan) (**Slika 18**). Preostali haplotipovi proširenog seta, poreklom sa četiri lokaliteta u Rumuniji i dva lokaliteta u Mađarskoj bili su koherentni sa podacima ove studije, i delili su haplotipove H1, H4, H7 i H18 sa uzorcima ove studije, te dodali nove haplotipove H22-H25 sa po jednom nukleotidnom razlikom u odnosu na centralni haplotip H1. Haplotipovi H2-3, H5-6, H8-17, H19-21 su originalni doprinos ove studije, objavljeni po prvi put u GenBank bazi.



**Slika 18.** Median-joining mreža haplotipova *COI* gena vrste *Nycteribia schmidlii* proširenog seta podataka ove studije i dodatih dostupnih sekvenci iz GenBank baze (**Prilog 3**). Crtice na granama predstavljaju broj nukleotidnih promena između haplotipova

Divergencija između sekvence haplotipa H26 i ostalih sekvenci bila je u opsegu 4.6 – 5.3 %, a divergencija između sekvence haplotipa H27 i ostatka sekvenci bila je 4 – 4.7 %. Haplotipovi H26 i H27 su se međusobno razlikovali za 5.3 %. Opseg divergencije između svih drugih sekvenci vrste *N. schmidlii* ovog seta podataka bio je 0.2 – 0.9 % (**Prilog 7. a**).

Analizom 106 *COI* mtDNK sekvenci iz ove studije u softveru Geneland nije detektovano substrukturiranje populacije, a najveća vrednost za verovatnoću strukturiranja (*likelihood score*) podržala je postojanje jedinstvene populacije. Isti rezultat dobijen je u BAPS softveru (**Prilog 8. a**), te su sve dalje analize rađene na ovom setu sekvenci kao celini.

Analiza *mismatch* distribucije pokazala je unimodalnu distribuciju, što je u skladu sa modelom nagle demografske ekspanzije (**Prilog 9. a** desno), a ne sa modelom populacije konstantne veličine (**Prilog 9. a** levo). Vrednost Harpendingovog indeksa  $r$ , bila je 0.0699 i statistički neznačajna, kao i SSD vrednosti za model demografske ekspanzije, i model prostorne ekspanzije (**Tabela 10**), što ukazuje da se populaciona ekspanzija desila u prošlosti. Fuova  $F_s$  vrednost ( $F_s = -25.626$ ,  $p < 0.05$ ) i Tadžimina  $D$  vrednost ( $D = -2.337$ ,  $p < 0.001$ ), budući da su obe negativne i statistički značajne, podržavaju scenario recentnog rasta populacije vrste *N. schmidlii*.

**Tabela 10.** Parametri *mismatch* distribucije i testova neutralnosti

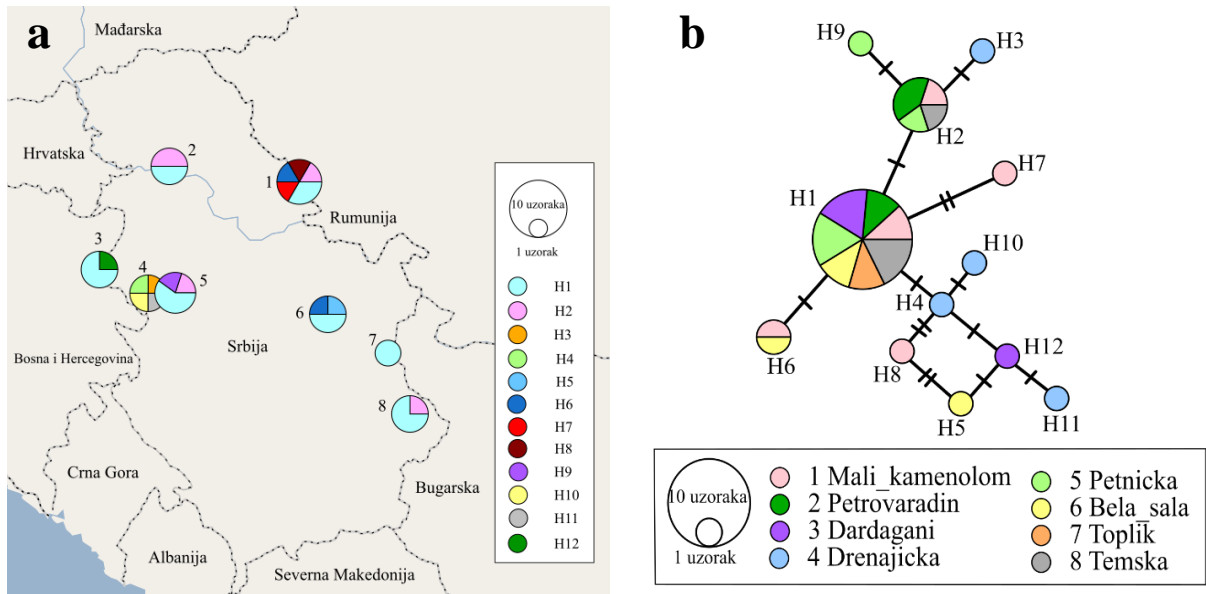
Vrste ektoparazita	Distribucija	Fuov $F_s$ (p)	Tadžimin $D$ (p)	Demografska ekspanzija SSD (p)	Prostorna ekspanzija SSD (p)	Harpendingov index, $r$ (p)
<i>Nycteribia schmidlii</i>	Unimodalna	-25.626 (p<0.05)	-2.33689 (p<0.01)	0.00002 (n.s.)	0.00002 (n.s.)	0.06995 (n.s)
<i>Penicillidia conspicua</i>	Unimodalna	-7.127 (n.s.)	-1.24704 (n.s.)	0.00966 (n.s.)	0.00646 (n.s.)	0.02110 (n.s.)
<i>Spinturinx psi</i>	Unimodalna	-7.945 (p<0.05)	-1.81570 (p<0.01)	0.02920 (p<0.05)	0.00010 (p<0.5)	0.58866 (p<0.001)
<i>Phthiridium biarticulatum</i>	Multimodalna	-0.451 (n.s.)	-1.10901 (n.s.)	0.10917 (p<0.05)	0.01094 (p<0.5)	0.46306 (p<0.001)
<i>Eyndhovenia euryalis</i>	Unimodalna	-7.496 (p<0.05)	-1.88636 (p<0.05)	0.04175 (p<0.05)	0.00024 (p<0.05)	0.52467 (p<0.001)

n.s. vrednost nije statistički značajna

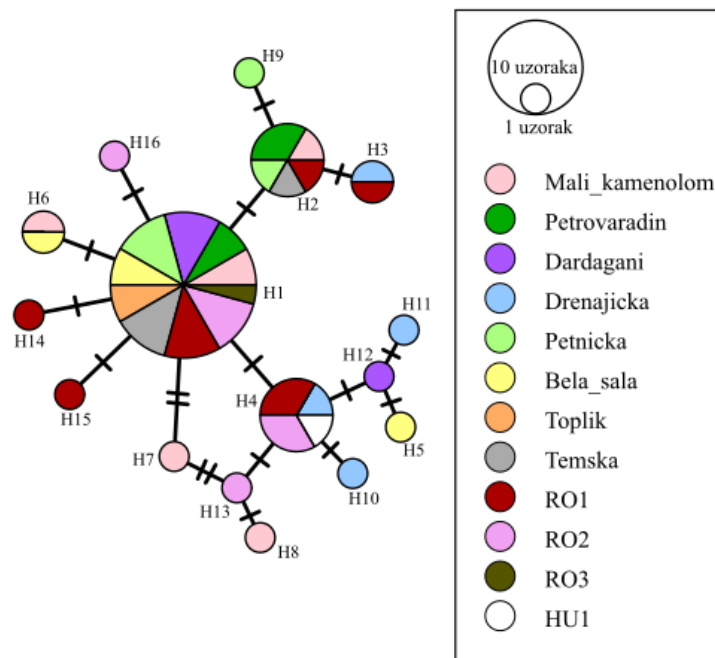
#### 4.5.2 Beskrilna muva *Penicillidia conspicua*

U ovoj studiji je na manjem setu od 33 *COI* mtDNK sekvence beskrilne muve vrste *P. conspicua* nađene na *M. schreibersii* domaćinu, analizom je dobijeno ukupno 12 haplotipova (**Slika 19. a**), nazvanih H1-H12. Ukupni broj polimorfnih mesta bio je deset, od čega sedam informativnih (**Tabela 9**). Najzastupljeniji haplotip, H1, činio je 51.5 % (17 sekvenci), koji je nađen na svim lokalitetima uzorkovanja, osim u Drenajičkoj pećini (**Slika 19. a**). Haplotip H2 činio je 15.1 % ukupnog uzorka (dve jedinke iz Petrovaradinske tvrđave i po jedna sa lokaliteta Mali kamenolom, Petnička pećina, Temska farma). Haplotip H6 imale su dve jedinke, jedna iz lokaliteta Mali kamenolom, jedna iz Bele sale (**Slika 19. a**). Svi ostali haplotipovi (H3-5, H7-12) doprinosili su sa po jednom sekvencom, odnosno 3 % (**Slika 19. b**). Lokalitet sa najvećim diverzitetom haplotipova, pet, bio je Mali kamenolom (**Slika 18. a**). *Median-joining* mreža haplotipova (**Slika 19. b**) nema tipičnu zvezdastu topologiju, već gotovo linearanu, sa haplotipovima koji proizilaze jedan iz drugog, a ne iz centralnog, najzastupljenijeg haplotipa. Haplotipovi se razlikuju za jednu ili dve nukleotidne promene od najbližeg susednog haplotipa, a haplotipovi H5 i H8 imaju dva moguća scenarija porekla (**Slika 19. b**). U proširenom setu podataka kada su dodate dostupne sekvence *COI* iz GenBank baze za ovu vrstu (**Prilog 3**), bilo je ukupno 51 sekvenca, dužine 548 bp. *Median-joining* mreža haplotipova otkrila je da su haplotipovi H1-H4 deljeni između lokaliteta u Rumuniji, Mađarskoj i Srbiji, te pokazala

dotatne haplotipove (H13-H16) koji se razlikuju za jednu ili dve nukleotidne promene od najčešćeg haplotipa H1 (**Slika 20**). Haplotipovi H5-12 su jedinstveni doprinos ove studije, po prvi put objavljeni u GenBank bazi. Mreža haplotipova proširenog seta sekvenci rešava poreklo haplotipa H5 koji jasno sada nedvosmisleno proizilazi iz H12, a haplotip H8 i dalje može da nastane na dva moguća načina – preko H4 i H13, ili preko H7. Opseg divergencije između svih sekvenci proširenog seta bio je između 0.2 – 0.9 % (**Prilog 7. b**).



**Slika 19. a** Mapa numerisanih lokaliteta uzorkovanja (kao u **Tabeli 1**) vrste *Penicillidia conspicua* sa distribucijom haplotipova; **b** Median-joining mreža 12 haplotipova *COI* mtDNK vrste *P. conspicua* detektovanih u ovoj studiji. Crtice na granama predstavljaju broj nukleotidnih promena između dva haplotipa



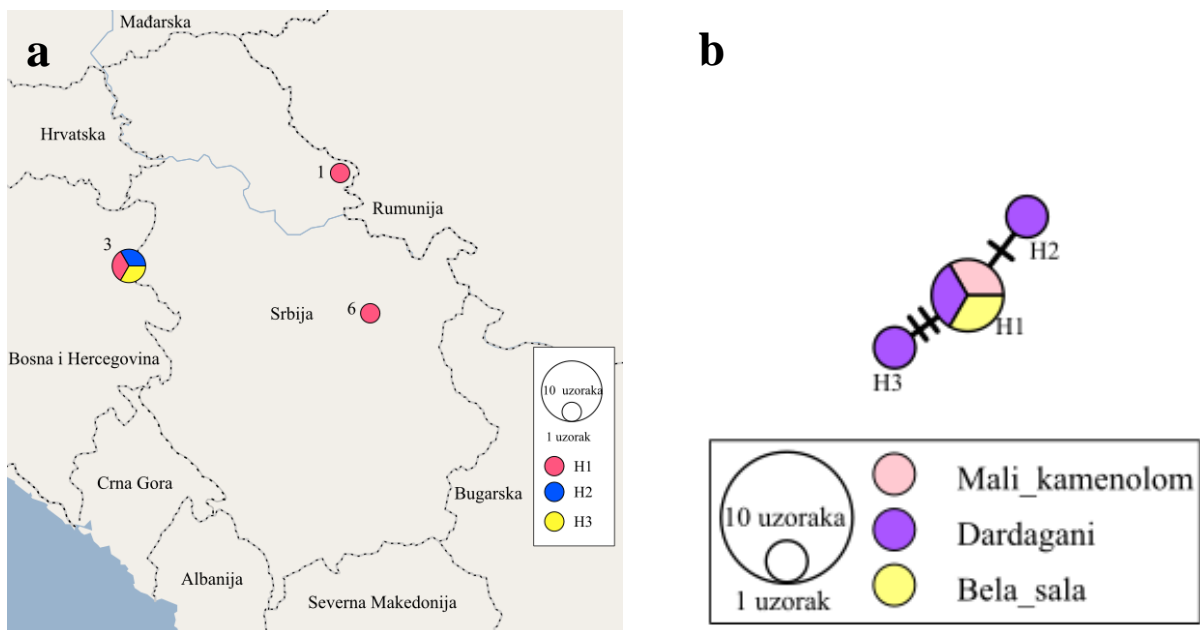
**Slika 20.** Median-joining mreža haplotipova *COI* gena vrste *Penicillidia conspicua* proširenog seta podataka ove studije i dodatnih dostupnih sekvenci iz GenBank baze (**Prilog 3**). Crtice na granama predstavljaju broj nukleotidnih promena između haplotipova

Geneland analizom ovog seta od 33 *COI* mtDNK sekvence vrste *P. conspicua* nije detektovano substrukturiranje populacije, a najveća vrednost za verovatnoću strukturiranja (likelihood score) podržala je postojanje jedinstvene populacije (**Prilog 10**). Isti rezultat dobijen je u BAPS softveru, te su sve dalje analize rađene na ovom setu sekvenci kao celini (**Prilog 8. b**).

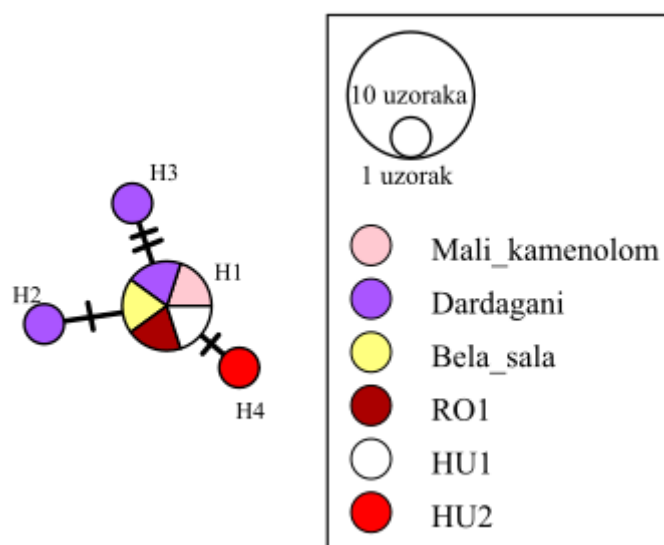
Analiza *mismatch* distribucije pokazala je unimodalnu distribuciju, sa dobijenim vrednostima koje su u skladu sa modelom nagle demografske ekspanzije (**Prilog 9. b** desno), a ne sa modelom populacije konstantne veličine (**Prilog 9. b** levo). Vrednost Harpendingovog indeksa  $r$ , bila je 0.0211 i statistički neznačajna, kao i SSD vrednosti za model demografske ekspanzije, i model prostorne ekspanzije (**Tabela 10**), ukazuju da se ekspanzija populacije desila u prošlosti. Fuova  $F_s$  vrednost ( $F_s = -7.127$ ) i Tadžimina  $D$  vrednost ( $D = -1.24704$ ) iako obe negativne, nisu statistički značajne, što ukazuje na recentni populacioni rast *P. conspicua*.

#### 4.5.3 Beskrilna muva *Penicillidia dufourii*

Samo pet jedinki vrste *P. dufourii* je sakupljeno sa domaćina vrste *M. schreibersii*, sa dva lokaliteta u Srbiji i jednog u BiH (**Slika 21. a**). Tri jedinke su imale haplotip H1, po jedna na svakom lokalitetu (Mali kamenolom, Bela sala i Dardagani), a H2 i H3 su bili prisutni samo kod po jedne jedinke sa lokaliteta Dardagani, u BiH (**Slika 21. b**). Lokalitet Dardagani ima je dakle najveći diverzitet haplotipova za ovu vrstu. Nakon spajanja sa dodatne tri *COI* sekvence iz GenBank baze (**Prilog 3**), u proširenom setu podataka dobijamo još jedan haplotip H4, uzorkovan iz jedinke iz Mađarske. Haplotip H1 prisutan je i kod jedinki iz Rumunije i Mađarske, a H2-3 su jedinstveni doprinosi ove studije, po prvi put objavljeni u GenBank bazi (**Slika 22**).



**Slika 21. a** Mapa numerisanih lokaliteta uzorkovanja (kao u **Tabeli 1**) vrste *Penicillidia dufourii* sa distribucijom haplotipova; **b** *Median-joining* mreža tri haplotipa *COI* mtDNK vrste *P. dufourii* detektovanih u ovoj studiji. Crtice na granama predstavljaju broj nukleotidnih promena između dva haplotipa



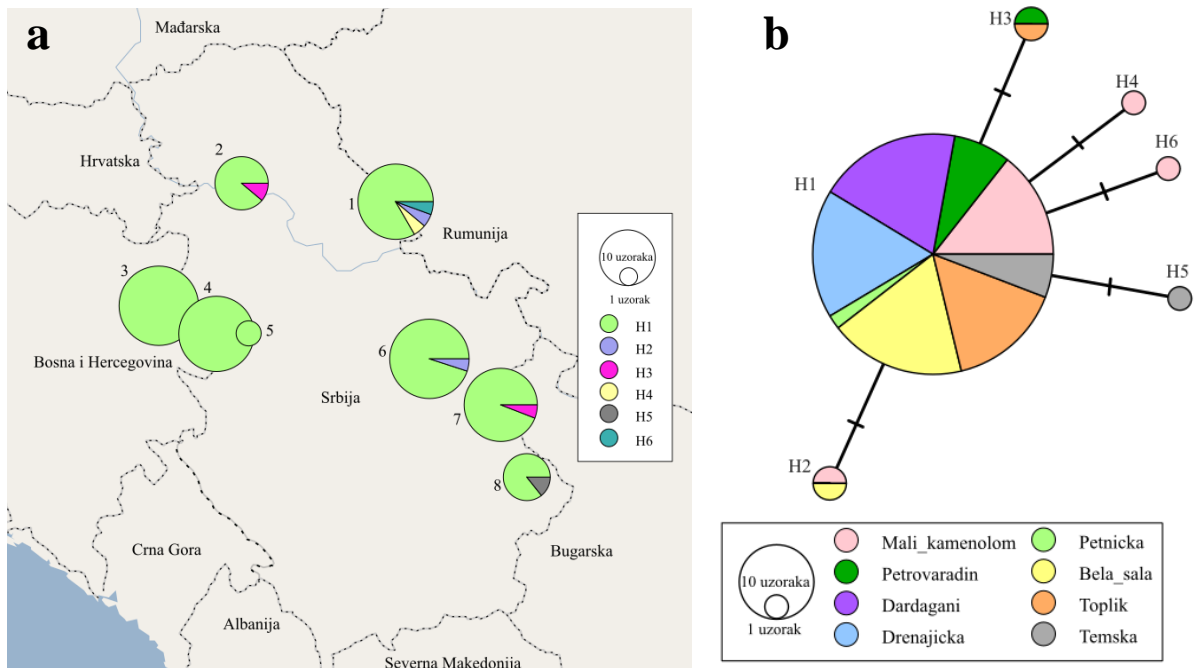
**Slika 22.** Median-joining mreža haplotipova *COI* gena vrste *Penicillidia dufourii* proširenog seta podataka ove studije i dodatih dostupnih sekvenci iz GenBank baze (**Prilog 3**). Crtice na granama predstavljaju broj nukleotidnih promena između haplotipova

Opseg divergencije između svih sekvenci proširenog seta iznosio je 0.2 – 0.5 % (**Prilog 7. c**). Zbog malog uzorka sekvenci ove vrste, druge analize (substrukturnost, *mismatch* distribucija, testovi neutralnosti) nisu rađene.

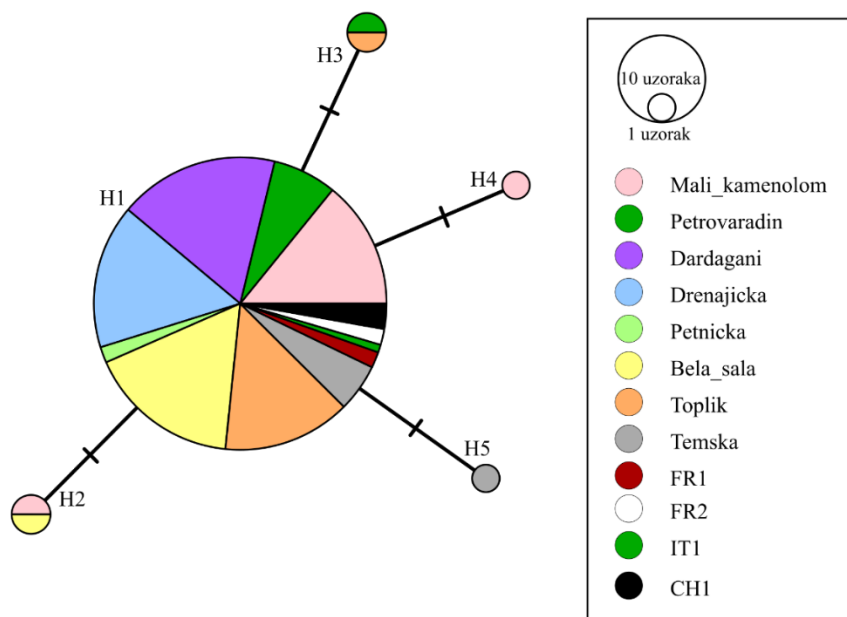
#### 4.5.4 Grinja *Spinturnix psi*

U setu od 111 sekvenci mtDNK za *16S* rRNK gen kod grinje *S. psi*, detektovano je šest haplotipova, koji su označeni sa H1-H6. Najčešće prisutan na svim lokalitetima uzorkovanja bio je haplotip H1 sa čak 93.7 % od totalnog uzorka (**Slika 23. a**). Svi ostali haplotipovi bili su prisutni kod jedne ili dve jedinke. Svi uzorci prikupljeni na tri lokaliteta (Dardagani, Drenajička pećina, Petnička pećina), sva tri u zapadnom delu regije uzorkovanja, imala su prisutan isključivo haplotip H1 (**Slika 23. a**). Ova vrsta grinje ima najniže vrednosti diverziteta haplotipova i nukleotidnog diverziteta od svih analiziranih ektoparazitskih vrsta u ovoj studiji (**Tabela 9**). Najveći diverzitet haplotipova, četiri, bio je na lokalitetu Mali kamenolom (**Slika 23. a**). Median-joining mreža haplotipova ima zvezdastu topologiju, sa H1 koji zauzima centralnu poziciju u mreži i okružen je ostalim, manje čestim haplotipovima koji se od H1 razlikuju za po jedan mutacioni korak. Kada su uzorku dodate sekvence dostupne u GenBank bazi (**Prilog 3**), izgled mreže haplotipova je bio gotovo identičan prethodnom (**Slika 23**). Usled trimovanja i poravnavanja sekvenci, prošireni set podataka brojao je 119 sekvenci, dužine 313 bp umesto prethodnih 354 bp, što je rezultovalo gubitkom haplotipa H6 u proširenom setu, te se na **Slici 24** vidi pet haplotipova. Najčešći haplotip ove studije H1, takođe je prisutan među sekvencama poreklom iz Francuske, Italije i Švajcarske, a preostali haplotipovi H2-5 jedinstveni su doprinosi ove studije, po prvi put objavljeni u GenBank bazi. Divergencija između svih sekvenci proširenog seta podataka bila je 0.3 – 0.6 % (**Prilog 7. d**).





**Slika 23.** a Mapa numerisanih lokaliteta uzorkovanja (kao u **Tabeli 1**) vrste *Spinturnix psi* sa distribucijom haplotipova; b *Median-joining* mreža šest haplotipova *16S* rRNK vrste *S. psi* detektovanih u ovoj studiji. Crtice na granama predstavljaju broj nukleotidnih promena između dva haplotipa



**Slika 24.** *Median-joining* mreža haplotipova *16S* rRNK gena vrste *Spinturnix psi* proširenog seta podataka ove studije i dodatih dostupnih sekvenci iz GenBank baze (**Prilog 3**). Crtice na granama predstavljaju broj nukleotidnih promena između haplotipova

Analizom 111 sekvenci *16S* rRNK grinja *S. psi* u softveru Geneland nije detektovano substrukturiranje populacije, jer je najveća podržanost dobijena za postojanje jedne jedinstvene populacije. Isti rezultat dobili smo i u BAPS softveru (**Prilog 8. c**), te su sve dalje analize rađene na ovom setu podataka u celosti, kao na jedinstvenoj grupi.

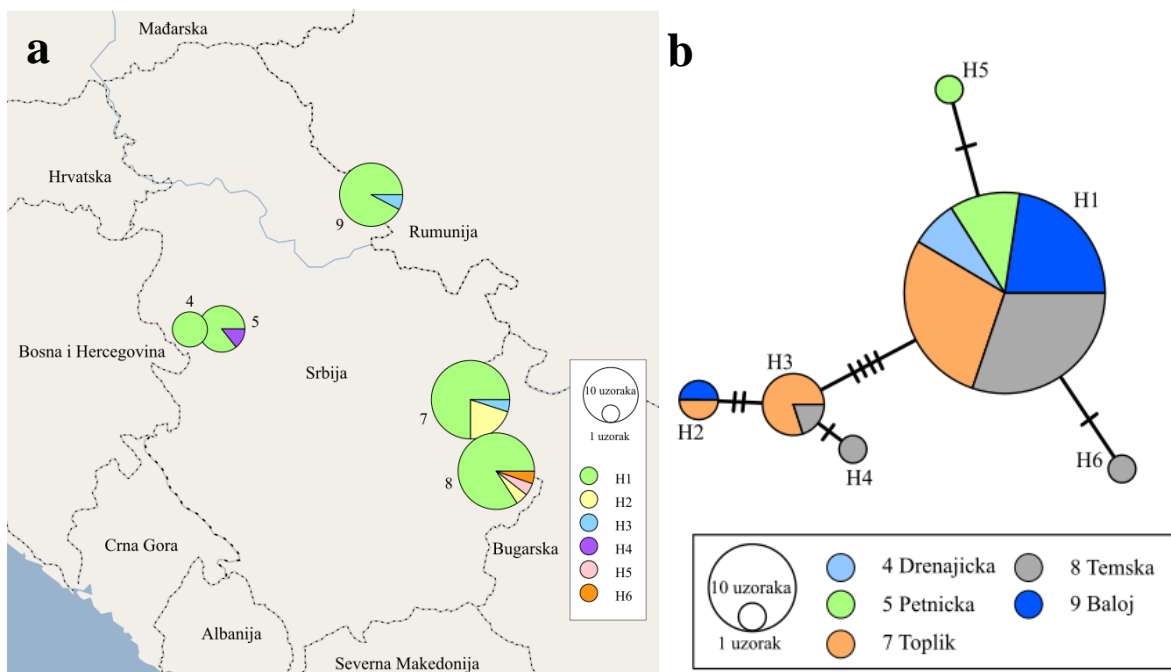


Grafik *mismatch* analize distribucije je unimodalan što u teoriji ukazuje na naglu demografsku ekspanziju. Međutim, grafik je pokazao savršeno preklapanje uočenih i očekivanih vrednosti (crvena puna i zelena isprekidana linija) za oba scenarija – kada je veličina populacije konstantna i kada je veličina populacije promenljiva (**Prilog 9. c**, levo i desno). Vrednosti Harpendingovog  $r$  indeksa ( $r=0.5887$ ,  $p<0.001$ ), i vrednosti SSD za demografski kao i za prostorni model ekspanzije bile su značajne, što ukazuje na konstantnu veličinu populacije u prošlosti. Vrednosti testova neutralnosti,  $F_u$ -ov  $F_s$  ( $F_s=-7.945$ ,  $p<0.05$ ) i Tadžimin  $D$  ( $D=-1.8157$ ,  $p<0.01$ ) (**Tabela 10**) su obe bile negativne i značajne, što podržava scenario skorašnjeg populacionog rasta za ovu vrstu grinje.

#### 4.6 Genetički diverzitet, bogatstvo haplotipova i struktura populacija ektoparazita na domaćinu *Rhinolophus ferrumequinum*

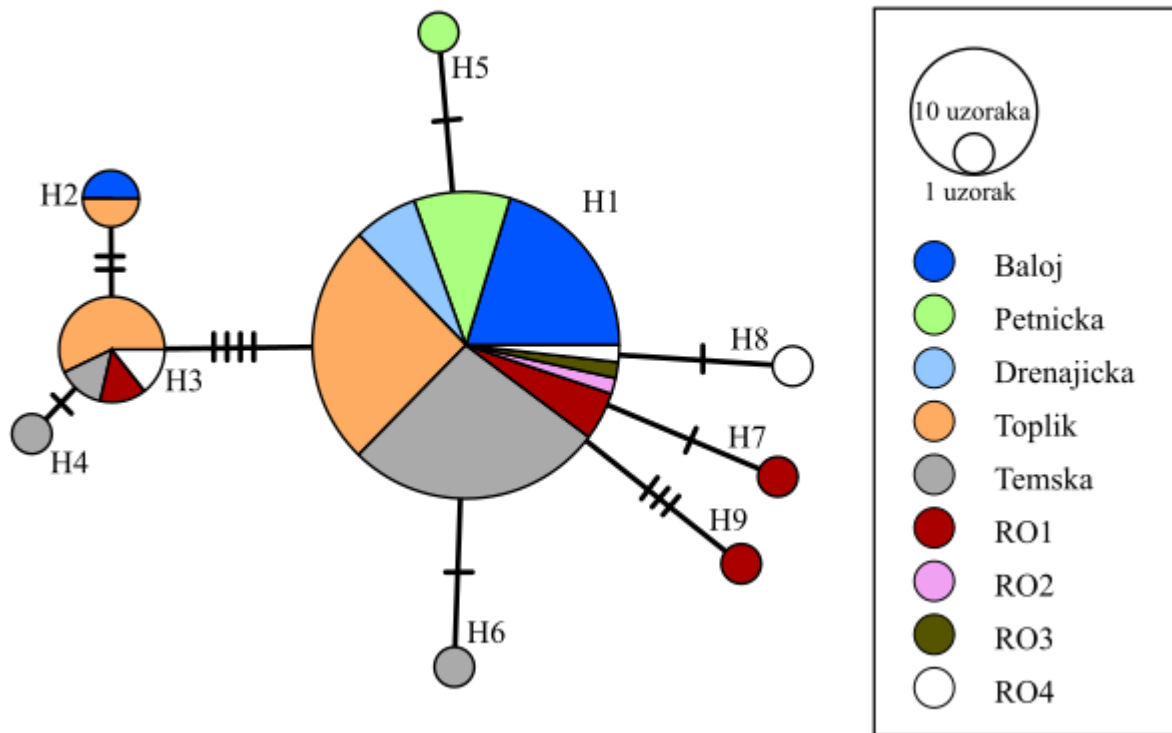
##### 4.6.1 Beskrilna muva *Phthiridium biarticulatum*

Na uzorku od 63 *COI* sekvence mtDNK vrste domaćina *Ph. biarticulatum*, detektovano je šest haplotipova (H1-H6), od kojih je H1 bio najzastupljeniji (84.13 %) i prisutan na svim lokalitetima uzorkovanja (**Slika 25. a**), potom H2 sa 7.94 % (jedna jedinka sa lokaliteta Temska i četiri jedinke sa lokaliteta Toplik), te H3 sa 3.17 % (jedna jedinka sa lokaliteta Mali kamenolom i jedna sa lokaliteta Toplik) (**Slika 25. a**). Haplotipovi H4-6 bili su predstavljeni sa po jednom sekvencom, tj. sa 1.59 % svaki. Lokalitet sa najvećim diverzitetom haplotipova bila je Temska (**Slika 25. a**). Ukupan broj polimorfni mesta bio je pet, od kojih su dva bila informativna. U *Median-joining* mreži haplotipova H1 zauzima centralnu poziciju, a od njega polaze H5 i H6 sa po jednom mutacionom promenom, te H3 koji se razlikuje za četiri nukleotidne promene. H3 predstavlja drugi centar ove mreže haplotipova, budući da od njega proizilaze još dva haplotipa, H2 i H4 (**Slika 25. b**).



**Slika 25. a** Mapa numerisanih lokaliteta uzorkovanja (kao u **Tabeli 1**) vrste *Phthiridium biarticulatum* sa distribucijom haplotipova; **b** *Median-joining* mreža šest haplotipova *COI* mtDNK vrste *Phthiridium biarticulatum* detektovanih u ovoj studiji. Crtice na granama predstavljaju mutacione korake između dva haplotipa

Jedanaest sekvenci dostupnih u GenBank bazi (**Prilog 3**) je dodato sekvencama ove studije, formirajući tako prošireni set podataka od 74 *COI* sekvence, 627 bp dužine. *Median-joining* mrežom haplotipova pokazano je da šest sekvenci sa četiri lokaliteta u Rumuniju dele naš haplotip H1, dve sekvence dele H3, a dodatni haplotipovi H7-H9 nastaju promenama iz H1. Haplotipovi H2, H4-H6 jedinstveni su doprinos ove studije GenBank bazi. Opšti izgled mreže haplotipova ove vrste izgleda gotovo nepromenjeno u proširenom setu podataka (**Slika 26**).



**Slika 26.** *Median-joining* mreža haplotipova *COI* gena vrste *Phthiridium biarticulatum* proširenog seta podataka ove studije i dodatnih dostupnih sekvenci iz GenBank baze (**Prilog 3**). Crtice na granama predstavljaju broj nukleotidnih promena između haplotipova

Divergencija između svih sekvenci proširenog seta podataka za ovu vrstu iznosila je 0.2 – 1.5 % (**Prilog 7. e**).

Geneland analizom 63 sekvence *COI* mtDNK gena uzoraka iz Srbije dobijena je najveća podrška za postojanje jedinstvene populacije (60 %). BAPS softver je međutim podržao struktuiranje u dva klastera (**Prilog 8. d**), prema kome su haplotipovi H1, H5 i H6 činili klaster 1, a haplotipovi H2, H3 i H4 su pripadali klasteru 2. Ove razlike rezultat su različitih algoritama u pozadini ova dva softvera, pri čemu je BAPS mnogo više osetljiv prema diverzitetu haplotipova (Latch i sar. 2006). Urađena je analiza varijanse AMOVA kako bi bile identifikovane komponente varijanse između hipotetičkih subpopulacija (**Tabela 11**). Rezultati ukazuju da većina genetičke varijabilnosti (98.6 %) potiče od varijabilnosti između jedinki unutar populacije, dok varijabilnost unutar klastera praktično ne postoji (**Tabela 11**). Genetička varijabilnost između klastera je veoma niska, sa 2.37 %, što potvrđuje da ne postoji prostorno grupisanje populacija ove vrste.

*Mismatch* analiza distribucije za ovu vrstu, pokazala je multimodalnu distribuciju (**Prilog 9. d**) što u teoriji ukazuje na stabilnu veličinu populacije u prošlosti. Kao i u slučaju grinje *S. psi*, grafici za scenario populacije konstantne veličine, i scenario populacije promenljive veličine, bili su identični (**Prilog 9. d**, levo i desno). Vrednost Harpendingovog indeksa  $r=0.4631$ , ( $p<0.001$ ), i SSD vrednosti pozitivne i statistički značajne za oba modela (demografske i prostorne ekspanzije) (**Tabela 10**) takođe potvrđuju da nije bilo populacione ekspanzije u prošlosti. Vrednosti testova neutralnosti Fuov Fs ( $F_s=-0.451$ ,  $p=0.431$ ) i Tadžimin D ( $D=-1.109$ ,  $p=0.127$ ), budući da su obe negativne, ali i statistički neznačajne – ukazuju na recentni rast populacije beskrilne muve *Ph. biarticulatum*, ali bez statističke podržanosti.

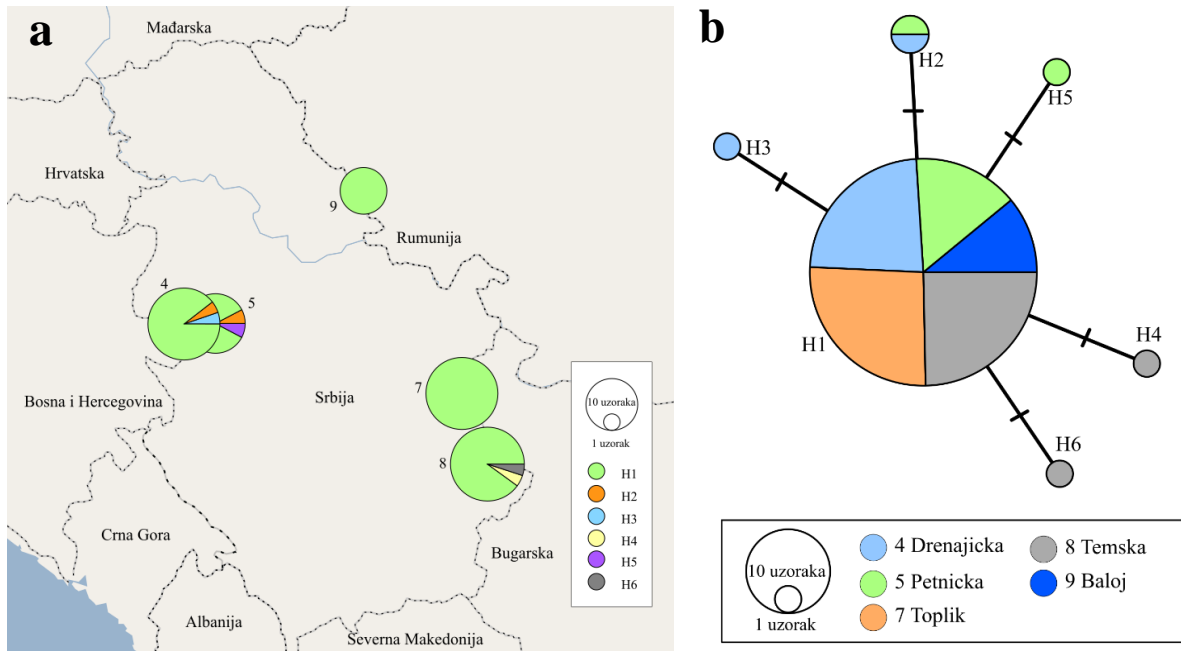
**Tabela 11.** Analiza molekularne varijanse za vrstu beskrilne muve *Phthiridium biarticulatum*

Izvor varijacije	Suma kvadrata	Komponente varijanse	Procenat varijanse
Između klastera	1.443	0.013	2.376
Između populacija unutar klastera	0.971	-0.006	-1.039
Unutar populacija	32.348	0.558	98.663
Total	37.762	0.565	

Dobijeni su parametri prosečne F-statistike na svim lokusima - indeksi fiksacije: FSC: -0.011 ( $p=0.305$ ); FST: 0.013 ( $p=0.325$ ) i FCT: 0.024 ( $p=0.343$ ).

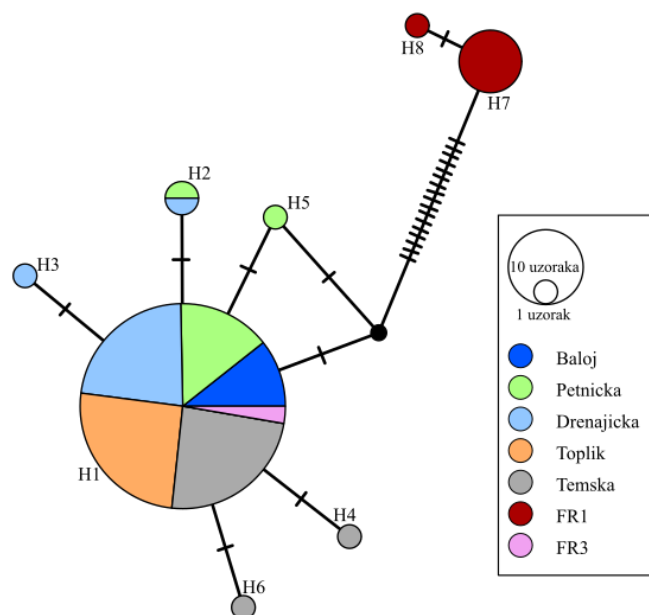
#### 4.6.2 Grinja *Eyndhovenia euryalis*

Na setu podataka od 79 sekvenci *16S* rRNK, dužine 341 bp, za vrstu grinje *E. euryalis* detektovano je šest haplotipova (H1-H6), pet polimorfnih mesta, od kojih samo jedno informativno. Haplotip H1 je bio najzastupljeniji u uzorku sa čak 92.4 %. Haplotip H2 doprineo je sa 2.5 %, a ostali (H3-6) su bili predstavljeni sa po jednom sekvencom, odnosno sa 1.27 % (**Slika 27. a**). *Median-joining* mreža haplotipova ima je zvezdastu strukturu, sa najčešćim H1 u sredini, a ostalim haplotipovima koji se razlikuju za po jednu nukleotidnu promenu oko njega (**Slika 27. b**).



**Slika 27. a** Mapa numerisanih lokaliteta uzorkovanja (kao u **Tabeli 1**) vrste *Eyndhovenia euryalis* sa distribucijom haplotipova; **b** *Median-joining* mreža šest haplotipova *16S* rRNK vrste *E. euryalis* detektovanih u ovoj studiji. Crtice na granama predstavljaju broj nukleotidnih promena između dva haplotipa

Nakon dodavanja deset sekvenci dostupnih u GenBank bazi (**Prilog 3**) u proširenom setu podataka (89 sekvenci), ukupna dužina analiziranih sekvenci bila je 329 bp. Sekvence sa francuskog lokaliteta FR3 delile su najčešći haplotip H1. Haplotipovi ove studije H2-H6 po prvi put su zabeleženi, odnosno nisu ranije objavljeni. Druga dva haplotipa H7 i H8 sa francuskog lokaliteta FR1 su se, pak, razlikovala za 17 nukleotidnih promena od pretpostavljenog nedostajućeg haplotipa (*median vector*) koji proizilazi iz H5 ili H1, a međusobno su H7 i H8 imale samo jednu nukleotidnu promenu (**Slika 28**). Divergencija između sekvenci kojima je predstavljen H7 i ostatka sekvenci kretala se u opsegu 5.8 – 6.1 %, a divergencija između sekvenci H8 i svih ostalih sekvenci bila je 5.8 – 6.4 %. Divergencija između H7 i H8 iznosila je svega 0.3 %, dok je divergencija između svih ostalih sekvenci međusobno iznosila 0.3 – 0.6 % (**Prilog 7. f**).



**Slika 28.** Median-joining mreža haplotipova *16S* rRNK gena vrste *Eynndhovenia euryalis* proširenog seta podataka ove studije i dodatih dostupnih sekvenci iz GenBank baze (**Prilog 3**). Crtice na granama predstavljaju broj nukleotidnih promena između haplotipova

Geneland analizom 79 sekvenci, kao i BAPS softverom (**Prilog 8. e**), nije detektovano substrukuiranje populacije, te je set podataka tretiran kao jedinstvena populacija. *Mismatch* analiza distribucije pokazala je unimodalnu distribuciju, u teoriji ukazujući na naglu demografsku ekspanziju u prošlosti. Posmatrane vrednosti se u potpunosti preklapaju sa očekivanim vrednostima na graficima, i u slučaju konstantne veličine populacije, i u slučaju promenljive veličine populacije (**Prilog 9. e**, levo i desno). Vrednost Harpendingovog indeksa iznosila je  $r=0.5247$  ( $p<0.001$ ), a SSD vrednosti su takođe bile statistički značajne i za model demografske, i za model prostorne ekspanzije (**Tabela 10**). Rezultat ukazuje da nije bilo ekspanzije populacije ove vrste u prošlosti. Vrednosti testova neutralnosti Fuov Fs ( $F_s=-7.496$ ,  $p<0.05$ ) i Tadžimin D ( $D=-1.886$ ,  $p<0.05$ ), budući da su obe negativne, i statistički značajne, podržavaju scenario recentnog rasta populacije za vrstu *E. euryalis*.

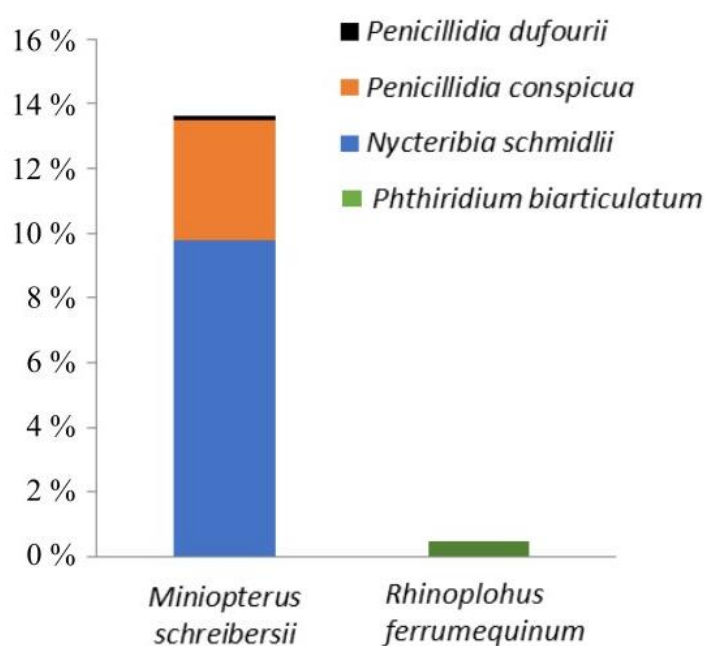
#### 4.7 Infekcija muva iz familije Nycteribiidae krvnim parazitom iz roda *Polychromophilus*

Od ukupno 215 jedinki beskrilnih muva i četiri vrste familije Nycteribiidae, prikupljenih sa dve vrste domaćina slepih miševa (*M. schreibersii* i *R. ferrumequinum*), prisustvo infekcije parazitom *Polychromophilus* je potvrđeno kod 33 jedinke muva (**Tabela 12**), što odgovara prevalenci od 15.3 %. Zduženo, muve iz roda *Penicillidia* (nađene na *M. schreibersii* domaćinu) pokazale su najvišu prevalencu sa 64.7 % (11 od 17 zaraženih). Prevalenca infekcije vrste *Nycteribia schmidlii* (domaćin *M. schreibersii*) bila je 15.8 % (21 od 133 jedinke su bile pozitivne). Samo je jedna muva vrste *Phthiridium biarticulatum* (domaćin *R. ferrumequinum*) bila pozitivna na prisustvo infekcije (1.5 %) (**Slika 29**).

**Tabela 12.** Broj muva pozitivnih na prisustvo infekcije *Polychromophilus* krvnim parazitom u odnosu na ukupan broj skeniranih muva, po lokalitetima uzorkovanja

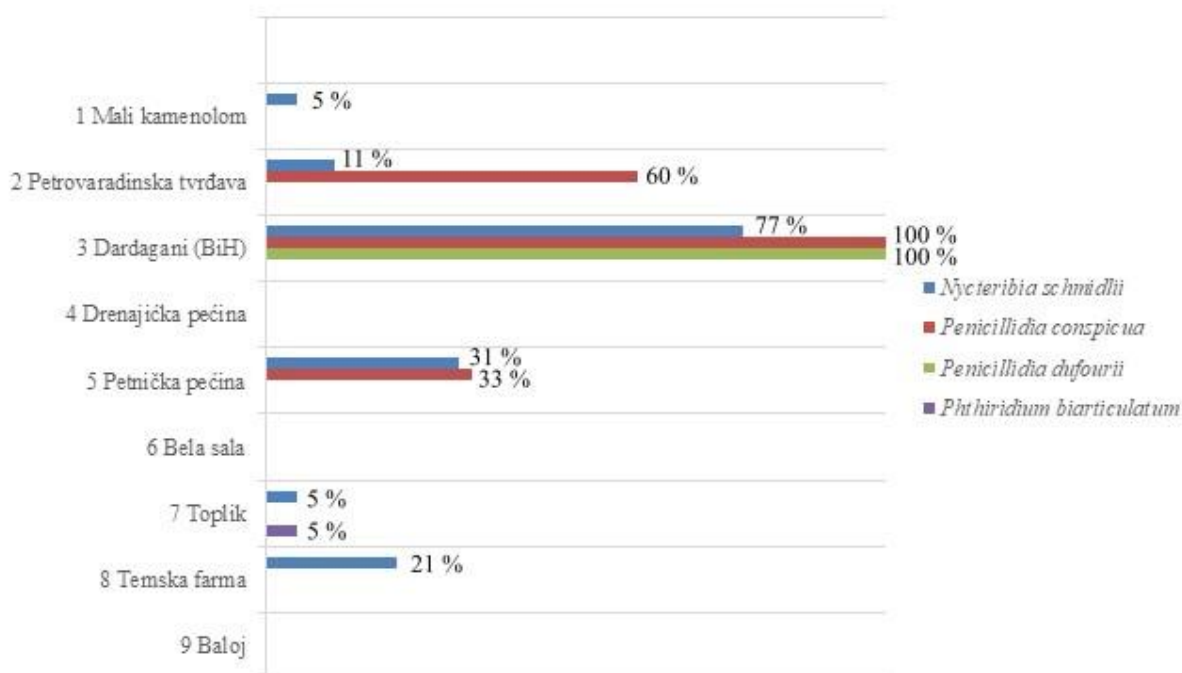
Vrsta domaćin Vrste beskrilnih muva/ lokaliteti	<i>M. schreibersii</i>			<i>R. ferrumequinum</i>	Mešovita infekcija	Ukupno po lokalitetu
	<i>N. schm</i>	<i>P. con</i>	<i>P. duf</i>	<i>Ph. biar</i>		
1 Mali kamenolom	1/20	-	-	-	1/1	1/20
2 Petrovaradinska tvrđava	1/9	3/5	-	-	0/4*	4/14
3 Dardagani (BiH)	10/13	4/4	3/3	-	11/17	17/20
4 Drenajička pećina	0/16	0/2	-	0/4	-	0/22
5 Petnička pećina	5/16	1/3	-	0/7	2/5	5/26
6 Bela sala	0/20	-	-	-	-	0/20
7 Toplik	1/20	-	-	1/20	1/2*	2/40
8 Temska farma	4/19	-	-	0/19	0/4	4/38
9 Baloj	-	-	-	0/15	-	0/15
Ukupno po vrsti	21/133	8/14	3/3	1/65	15/33	33/215

\* jedan uzorak po lokalitetu nije mogao biti umnožen dovoljno dobro da bi se odredilo da li je u pitanju mešovita infekcija. *N. schm* – *Nycteribia schmidlii*, *P. con* – *Penicillidia conspicua*, *P. duf* – *Penicillidia dufourii*, *Ph. biar* – *Phthiridium biarticulatum*.



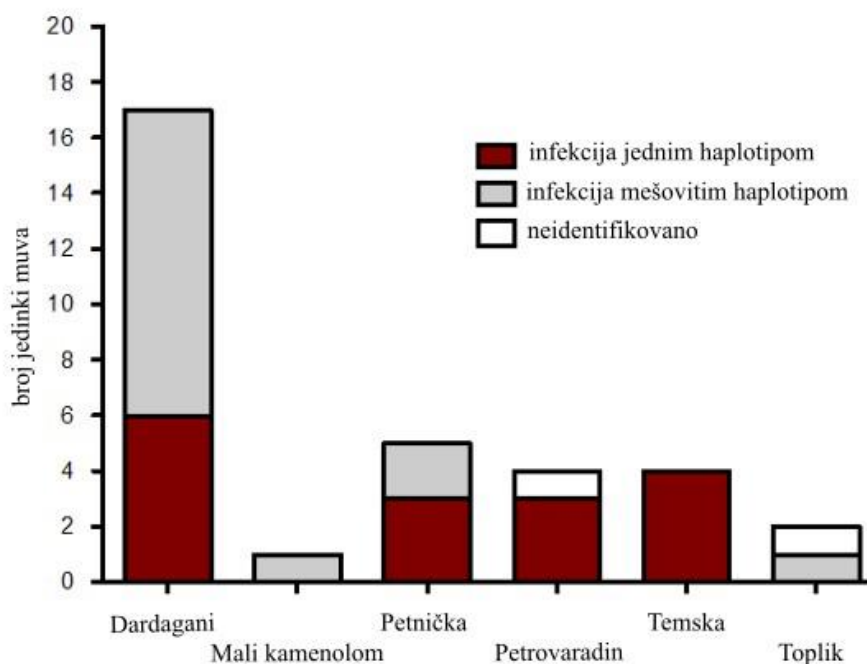
**Slika 29.** Prisustvo infekcije *Polychromophilus* krvnim parazitom, po vrstama muva i slepih miševa

Muve inficirane *Polychromophilus* parazitom nađene su na šest od devet lokaliteta uzorkovanja (Slika 30). Najveću prevalencu imao je lokalitet Dardagani, 85 %, odnosno 17 od 20 prikupljenih muva bilo je inficirano. Sledeći lokalitet po vrednosti prevalencije bila je Petrovaradinska tvrđava, sa 28.6 % (Tabela 12). Ostali lokaliteti imali su manje prevalencije infekcije. Lokalitet Toplik imao je svega dve *Polychromophilus* pozitivne muve – jednu poreklom iz sistema *N. schmidlii/M. schreibersii*, a drugu iz sistema *Ph. biarticulatum/R. ferrumequinum*. Na lokalitetima Bela sala, Drenajićka pećina i Baloj, nije bilo muva inficiranih ovim parazitom (Slika 30).



**Slika 30.** Prevalenca infekcije beskrilnih muva iz familije Nycteribiidae krvnim parazitom *Polychromophilus*, po lokalitetima uzorkovanja

Poređenjem sa referentnim sekvencama dostupnim u GenBank bazi, koristeći NCBI BLAST alatku, sve sekvence u ovoj studiji odgovarale su vrsti *Polychromophilus melanipherus*. Kod 15 uzorka, uočeni su dvostruki vrhovi, ukazujući na infekciju mešovitim *Polychromophilus* haplotipovima u jednom ili oba sekvencirana gena (Tabela 12). Deset uzoraka je bilo zaraženo isključivo *Polychromophilus melanipherus* istog haplotipa, dakle jednostrukom infekcijom (Slika 31). Nasuprot tome, mešovite infekcije potvrđene su kod svih vrsta muva koje su nađene na *M. schreibersii* domaćinu.



**Slika 31.** Zastupljenost infekcija jednim haplotipom i mešovitim haplotipovima *Polychromophilus melanipherus* po lokalitetima. Neidentifikovano – sekvence nisu dovoljno dobre da bi se odredilo da li je u pitanju mešovita infekcija

#### 4.7.1 Molekularne analize DNK krvnog parazita *Polychromophilus melanipherus*

Pokazatelji molekularnog polimorfizma DNK fragmenata gena *cytb* i *cox1* krvnog parazita *P. melanipherus*, zajedno sa brojem sekvenci korištenih u analizama i njihovim dužinama prikazani su u **Tabeli 13**. Jedinствене sekvence su deponovane u GenBank bazu (**Prilog 2**). Za gen *cytb* detektovano je prisustvo četiri haplotipa, a za gen *cox1* pet haplotipova. Vrednosti diverziteta haplotipova ( $H_d$ ) za oba gena su približne i iznose 0.731 (*cytb*), odnosno 0.757 (*cox1*), ali se vrednosti nuklearnog diverziteta ( $\pi$ ) razlikuju (**Tabela 13**).

*Mismatch* analiza distribucije pokazala je multimodalnu distribuciju, u teoriji ukazujući na stabilnu veličinu populacije u prošlosti. Posmatrane vrednosti u slučaju oba gena, bolje odgovaraju očekivanim vrednostima na graficima za populacije promenljive veličine (**Prilog 9. f i 9. g** desno). Vrednosti Harpendingovog indeksa iznosile su  $r=0.214$  (*cytb*), odnosno  $r=0.437$  (*cox1*), budući da su pozitivne i da nisu statistički značajne (**Tabela 13**) ukazuju na ekspanziju populacije u prošlosti. Vrednosti testova neutralnosti Fuov Fs i Tadžimin D, za oba gena bile su pozitivne i nisu statički značajne, što znači da se ovi geni nalaze pod uticajem balansne selekcije te da nije bilo skorašnjeg populacionog rasta.



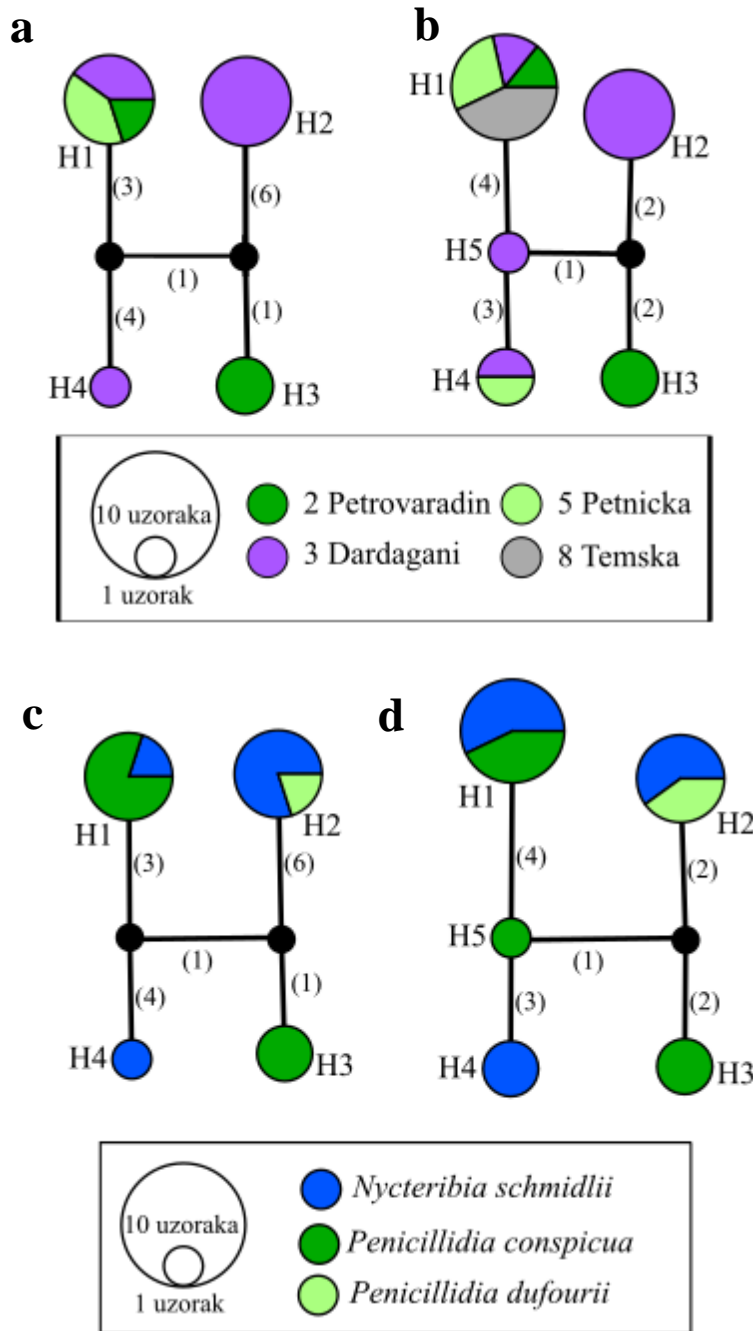
**Tabela 13.** Osnovni parametri molekularnog diverziteta nukleotidnih sekvenci i parametri *mismatch* distribucije i testova neutralnosti krvnog parazita *Polychromophilus*

	<i>cytb</i>	<i>cox1</i>
Broj sekvenci	13	17
Dužina sekvence (bp)	579	945
Broj haplotipova	4	5
Diverzitet haplotipova - Hd ( $\pm$ SD)	0.731 (0.079)	0.757 (0.071)
Nukleotidni diverzitet $-\pi$ ( $\pm$ SD)	0.00912 (0.0009)	0.00482 (0.0004)
Prosečan broj nukleotidnih razlika	5.28	4.56
Broj polimorfnih mesta	13	12
Parsimonski informativna mesta	10	12
Distribucija	multimodalna	multimodalna
Fuov Fs (p)	4.170 (n.s.)	3.02 (n.s.)
Tadžimin D (p)	1.074 (n.s.)	1.067 (n.s.)
Harpendingov index, r (p)	0.214 (n.s.)	0.437 (n.s.)

Vrednost (p) se odnosi na statističku značajnost koja je  $<0.05$ . n.s. – nije statistički značajna vrednost

#### 4.7.2 Genetički diverzitet i bogatstvo haplotipova *Polychromophilus*

U setu od 13 sekvenci fragmenta mtDNK gena *cytb* *P. melanipherus*, ukupne dužine nakon obrade 579 bp, detektovana su četiri različita haplotipa, obeležena sa H1-H4. Haplotipovi H1 i H2 bili su predstavljeni sa po pet sekvenci, s tim što je H1 prisutan na tri lokaliteta (Dardagani, Petnička pećina i Petrovaradinska tvrđava), a H2 samo na jednom lokalitetu (Dardagani) (**Slika 32. a**). Treći haplotip H3 predstavljen je sa dve sekvence, obe poreklom od jedinki sa Petrovaradinske tvrđave, a četvrti H4 sa jednom sekvencom poreklom sa lokaliteta Dardagani (**Slika 32. a**). U *Median-joining* mreži haplotipova centralnu poziciju zauzimaju dva nezabeležena hipotetička haplotipa koja se međusobno razlikuju za jednu nukleotidnu promenu, u odnosu na koje se naši haplotipovi razlikuju za 3, 6, 1 i 4 promena (**Slika 32. a**). Drugi analizirani mitohondrijski gen, *cox1*, predstavljen setom od 17 sekvenci, dužine 945 bp, analizom je dao pet haplotipova. Najzastupljeniji, H1 prisutan je na četiri lokaliteta (Petrovaradinska tvrđava, Dardagani, Petnička pećina i Temska) i predstavljen sa sedam sekvenci, a potom H2 sa pet sekvenci (prisutan samo na lokalitetu Dardagani). Haplotipovi H3 i H4 su predstavljeni sa po dve sekvence, a H5 sa jednom (**Slika 32. b**). U *Median-joining* mreži haplotipova ovog gena, centar takođe predstavlja neidentifikovani hipotetički haplotip, ili alternativno, haplotip H5, od koga se granaju haplotipovi H1 i H2, sa četiri, odnosno dve, nukleotidne promene, i haplotipovi H3 i H4 sa dve, odnosno tri promene (**Slika 32. b**).



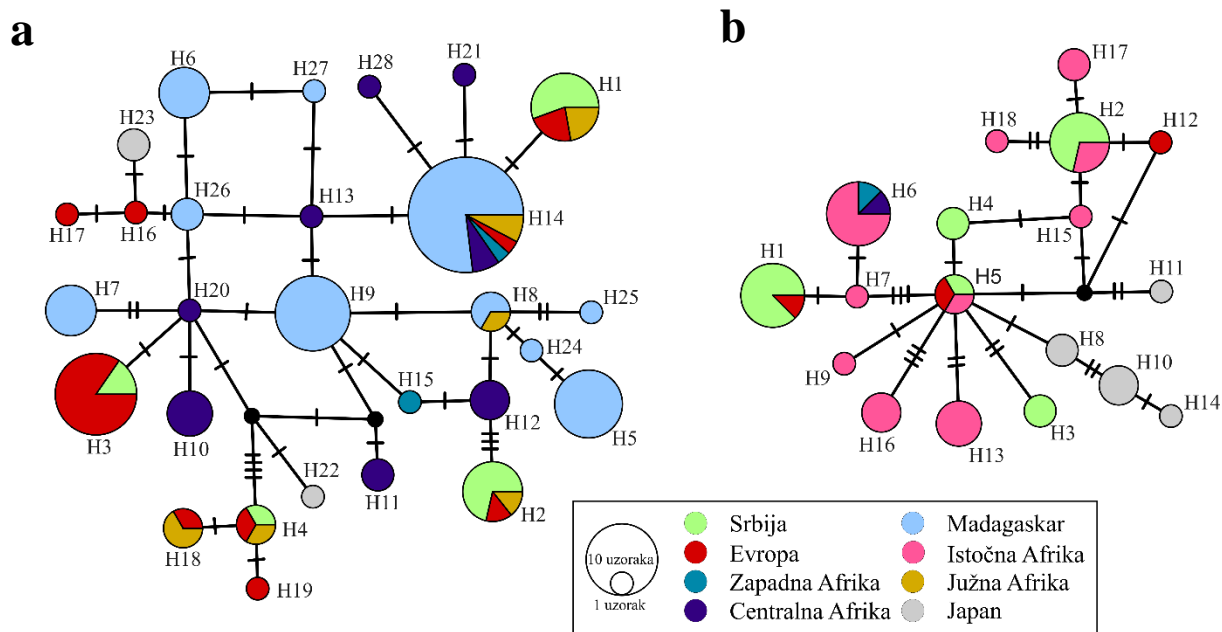
**Slika 32.** Median-joining mreža haplotipova vrste *Polychromophilus melanipherus* prema lokalitetu uzorkovanja (**a-b**) i prema vrsti muve domaćina (**c-d**) za gene *cytb* (**a, c**) i *cox1* (**b, d**). Brojevi u zagradama na granama predstavljaju broj nukleotidnih promena između haplotipova

Ukoliko se uporede mreže haplotipova za ova dva gena, može se uočiti apsolutno poklapanje u strukturi i zastupljenosti po lokalitetima (**Slika 32. a i b**), te da sva četiri haplotipa prisutna u mreži gena *cytb* imaju svoje odgovarajuće parove u mreži haplotipova za gen *cox1*. Haplotip H5 za gen *cox1* nema svog parnjaka među haplotipovima za gen *cytb*. Ne postoji očigledno grupisanje haplotipova prema vrsti muve domaćina kod koje je *Polychromophilus* detektovan, ni prema *cytb* ni prema *cox1* genu (**Slika 32. c i d**).

Uspelo je umnožavanje samo jedne kratke sekvence fragmenta gena *cox1* (432 bp, iako visokog kvaliteta) za infekciju *Polychromophilus*-om detektovanu kod beskrilne muve

prikupljene sa *R. ferrumequinum* domaćina. Ova sekvenca predstavlja mešovitu infekciju haplotipovima H1 i H4, i nije prikazana na mrežama haplotipova, a pohranjena je u GenBank bazu pod pristupnim brojem OQ357642 (**Prilog 2**).

Analizom proširenog seta za gen *cytb* *P. melanipherus* (**Prilog 5**) i njegove mreže haplotipova uočava se da su H1, H2 i H4 iz ove studije takođe prisutni na lokalitetima u Evropi i Južnoj Americi, a H3 samo u Evropi (**Slika 33. a, Prilog 5**). Ovi dodatni haplotipovi, iako u najvećoj meri poreklom iz Afrike dopunjavaju mrežu haplotipova našeg seta sekvenci, bez prevelikog broja nukleotidnih promena između sebe i ekstremnih razlika.



**Slika 33.** Median-joining mreža haplotipova vrste *Polychromophilus melanipherus*, proširenog seta podataka ove studije i dodatnih dostupnih sekvenci iz GenBank baze (**Prilog 5**) za **a** gen *cytb*; **b** gen *cox1*. Crtice na granama predstavljaju broj nukleotidnih promena između haplotipova

Analizom mreže haplotipova proširenog seta sekvenci za gen *cox1* uočava se da se H1 iz seta sekvenci ove studije, našao među sekvencama iz Evrope, a H2 među sekvencama iz Istočne Afrike (**Slika 33. b, Prilog 5**), dok H3 i H4 nisu prethodno detektovani i ostaju jedinstveni za Srbiju. Haplotip H5 iz ove studije našao se i u Evropi (Švajcarska, **Prilog 5**) i u Istočnoj Africi (Kenija; **Prilog 5**), te postao novi svojevrsni centar zvezdaste mreže od koga polaze ostali, novi haplotipovi (**Slika 33. b**). Novi najzastupljeniji haplotip je H6 prisutan u Centralnoj, Zapadnoj i Istočnoj Africi.

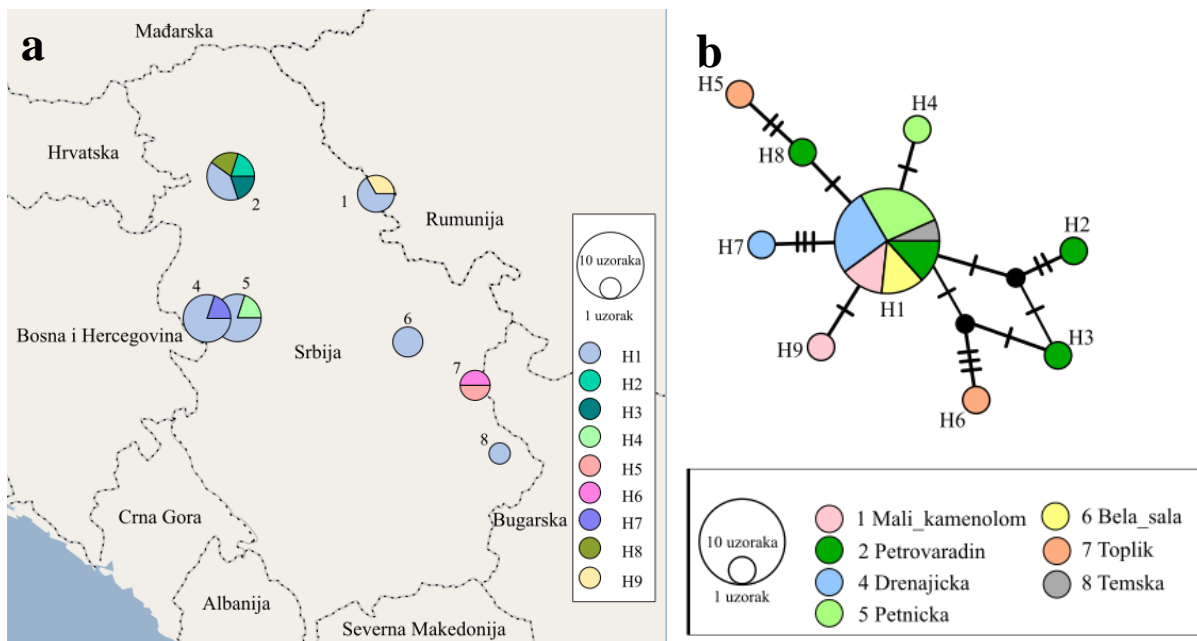
Divergencija između sekvenci različitih haplotipova proširenog seta za gen *cytb* kreće se u opsegu od 4.1 do 58.9 % (**Prilog 7. h**) i najveća je između H18, H19 i H8. Divergencija između sekvenci haplotipova za gen *cox1* bila je 4.3 – 70.6 % (**Prilog 7. g**) i najveće su bile razlike između H6 (Evropa, istočna i zapadna Afrika) i H13 (istočna Afrika).

#### 4.8 Genetički diverzitet i bogatstvo haplotipova odabrane domaćinske vrste *M. schreibersii*

Pokazatelji molekularnog polimorfizma DNK za set od 23 sekvence gena *HVI* (553 bp) kod domaćinske vrste *M. schreibersii* su sledeći: Vrednosti diverziteta haplotipova  $Hd=0.585 \pm 0.122$ , vrednosti nuklearnog diverziteta  $\pi=0.00277 \pm 0.00082$ , prosečna vrednost nukleotidnih razlika  $k=1.53$ . Ukupan broj polimorfnih mesta bio je 13, od čega četiri informativnih.

*Mismatch* analiza distribucije pokazala je multimodalnu distribuciju, u teoriji ukazujući na stabilnu veličinu populacije. Posmatrane vrednosti bolje odgovaraju očekivanim vrednostima na grafiku za populaciju konstantne veličine (**Prilog 9. h** levo). Vrednost Harpendingovog indeksa iznosila je  $r=0.096$  (n.s.), budući da je pozitivna i da nije statistički značajna ukazuju na ekspanziju populacije u prošlosti. Vrednosti testova neutralnosti Fuov  $F_s=-4.044$  ( $p<0.05$ ) i Tajdimin  $D=-2.111$  ( $p<0.05$ ), su obe negativne i statistički značajne što ukazuje na skorašnji populacioni rast.

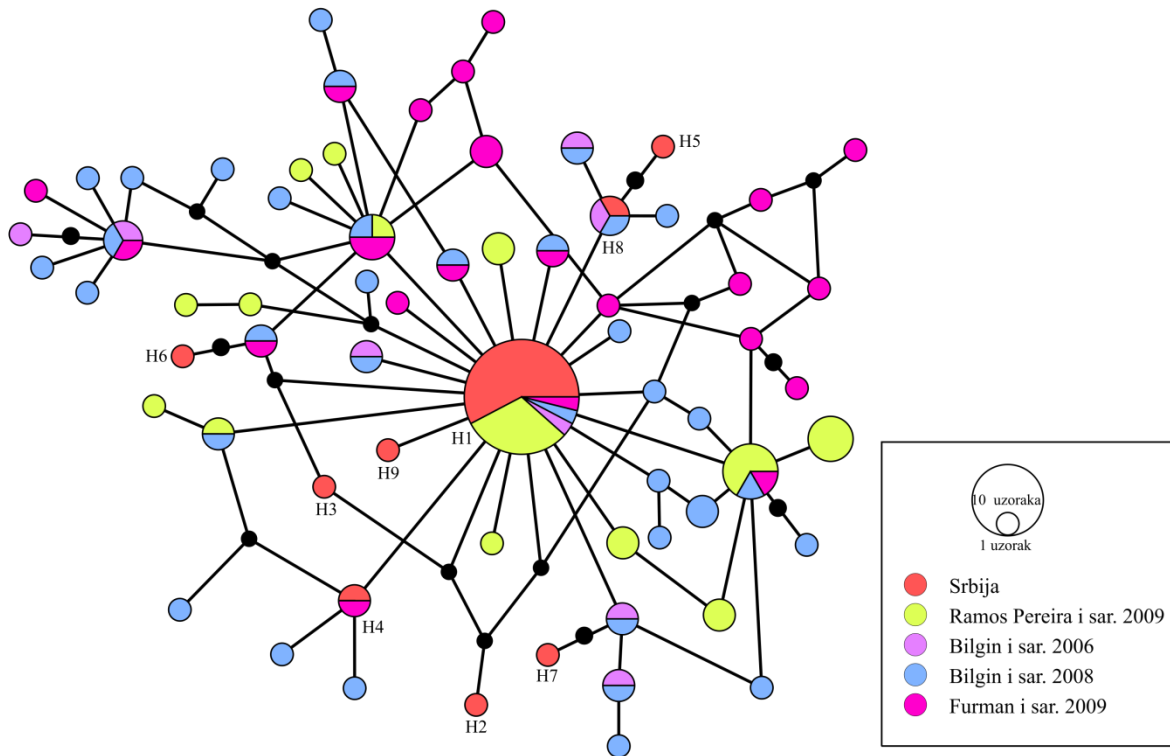
Na istom setu sekvenci, detektovano je devet različitih haplotipova (**Slika 34. b**), obeleženih sa H1-H9. Haplotip H1 bio je najčešći, zastupljen sa ~65 % u ukupnom uzorku i prisutan na šest lokaliteta uzorkovanja (**Slika 34. b**). Svi ostali haplotipovi (H2-H9) bili su predstavljeni sa po jednom sekvencom (**Slika 34. b**). Najveći diverzitet haplotipova (četiri) zabeležen je na Petrovaradinskoj tvrđavi (**Slika 34. a**). *Median-joining* mreža haplotipova pokazuje zvezdastu topologiju, sa najzastupljenijim haplotipom H1 koji zauzima centralnu poziciju, a od koga polaze svi ostali haplotipovi, koji se razlikuju za jedan do tri mutaciona koraka (**Slika 34. b**).



**Slika 34. a** Mapa numerisanih lokaliteta uzorkovanja (kao u **Tabeli 1**, sa izuzetom lokalitetom br.3) vrste domaćina *Miniopterus schreibersii* sa distribucijom haplotipova; **b** *Median-joining* mreža devet haplotipova *HVI* gena vrste *M. schreibersii*. Crtice na granama predstavljaju broj nukleotidnih promena između dva haplotipa

Nakon dodavanja 98 sekvenci dostupnih u GenBank bazi (**Prilog 6**) u proširenom setu podataka (121 sekvenca), ukupna dužina analiziranih sekvenci bila je 434 bp. Ukupan broj haplotipova raste na 66, od čega je čak 45 predstavljeno sa po jednom sekvencom (**Slika 35**). Zbog izuzetno velikog broja lokaliteta u studijama koje su prethodno objavile ove sekvence (Bilgin i sar. 2006,

Bilgin i sar. 2008, Furman i sar. 2009, Ramos Pereira i sar. 2009) za koje nisu uvek date precizne koordinate, **Slika 35** je kodirana bojama prema radovima iz kojih sekvence potiču, a šire odrednice lokacija su date u **Prilogu 6**. Oznake na slici su pojednostavljene zbog velikog broja haplotipova, tako da prikazuju samo numeraciju haplotipova nađenih u Srbiji. Najzastupljeniji haplotip u Srbiji, H1, prethodno je objavljen sa teritorije Portugalije, jugoistočne Evrope i Turske. Šest haplotipova (H2-3, H5-7, H9) jedinstveni su za Srbiju, odnosno nisu prethodno detektovani. Haplotip H4 zabeležen je prethodno sa teritorije Turske (Furman i sar. 2009), a haplotip H8 iz jugoistočne Evrope i Male Azije (Bilgin i sar. 2006, Bilgin i sar. 2008). Divergencija između sekvenci proširenog seta kretala se u opsegu od 0.2 – 2.2 %.



**Slika 35.** Median-joining mreža haplotipova *HVI* regiona vrste domaćina *M. schreibersii* proširenog seta podataka ove studije i dodatnih dostupnih sekvenci iz GenBank baze (**Prilog 6**). Crni kružići predstavljaju dve bazne promene između haplotipova, a linije koje povezuju različite haplotipove predstavljaju jednu nukleotidnu promenu

#### 4.9 Poređenje genetičkog diverziteta odabrane domaćinske vrste slepog miša *M. schreibersii* i njegovih ektoparazita

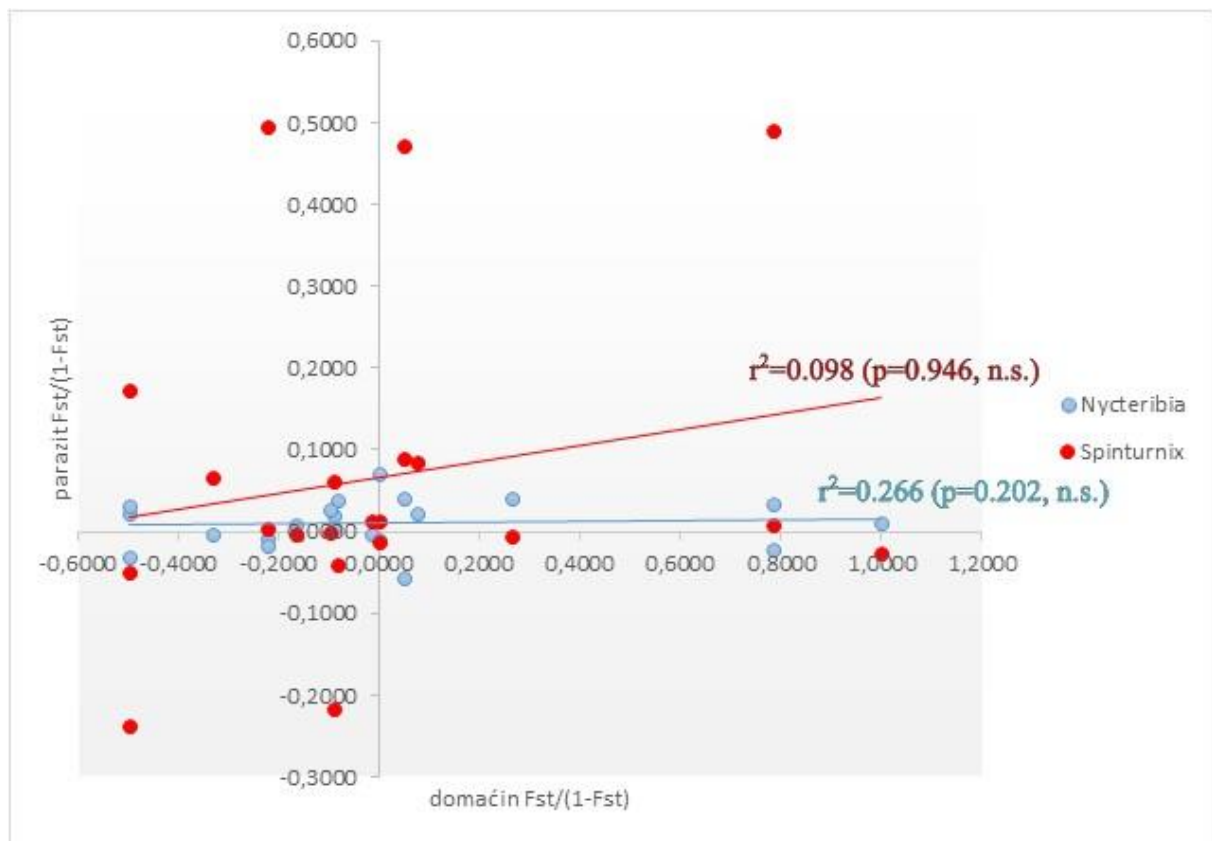
Sve tri vrste, domaćin i dva tipa parazita (najčešće prisutna vrsta muve – *N. schmidlii* i grinja *S. psi*) pokazali su negativne ili niske vrednosti pairwise  $\Phi_{st}$  diferencijacije (**Tabela 14**) (srednja vrednost *M. schreibersii* -0.14107; *N. schmidlii* 0.00892; *S. psi* 0.038075). Jedine statistički značajne vrednosti razlika dobijene su za *N. schmidlii* za lokalitete Dardagani i Drenajička, Drenajička i Toplik, te Toplik i Temska (**Tabela 14**, vrednosti označene zvezdicom\*). Negativne vrednosti pairwise genetičkih razlika dobijaju se svaki put kada su unutarpopulacijske razlike veće od izmeđupopulacijskih razlika (što je recimo slučaj kada na jednom lokalitetu imamo tri haplotipa, a na drugom lokalitetu samo jedan haplotip). Dodatno, usled neuspešnih sekvenci za *HVI* gen domaćina sa lokaliteta Dardagani, ovaj lokalitet morao je biti izbačen i iz matrica beskrilne muve i grinje kada su se poredile genetičke razlike između domaćina i parazita. Lokalitet je zadržan jedino u slučaju poređenja genetičkih razlika muve i

grinje međusobno. Rezultate treba tumačiti sa oprezom, jer je za validne analize potrebno imati najmanje pet jedinki po lokalitetu, što u uzorku nije uvek bio slučaj.

**Tabela 14.** Pairwise  $\Phi_{st}$  vrednosti za vrstu domaćina, parazitsku muvu i parazitsku grinju

<i>Miniopterus schreibersii</i>								
Domaćin $\Phi_{st}$	1 M.kam	2 Petr	3 Dar	4 Dre	5 Petn	6 Bel	7 Top	8 Tem
1 Mali kamenolom	-		-					
2 Petrovaradin	-0.090	-	-					
3 Dardagani	-	-	-	-	-	-	-	-
4 Drenajička	-0.104	0.044	-	-				
5 Petnička	-0.104	0.044	-	-0.111	-			
6 Bela sala	-0.200	-0.017	-	-0.290	-0.290	-		
7 Toplik	0.208	0.069	-	0.440	0.440	0.500	-	
8 Temska	-1.000	-0.500	-	-1.000	-1.000	0.000	0.000	-
<i>Nycteribia schmidlii</i>								
Parazit muva	1 M.kam	2 Petr	3 Dar	4 Dre	5 Petn	6 Bel	7 Top	8 Tem
1 Mali kamenolom	-							
2 Petrovaradin	0.037	-						
3 Dardagani	-0.029	0.024	-					
4 Drenajička	0.004	0.040	0.050*	-				
5 Petnička	0.019	-0.059	0.024	0.026	-			
6 Bela sala	0.008	-0.003	0.030	-0.007	-0.018	-		
7 Toplik	0.039	0.022	0.073*	-0.022	0.033	0.009	-	
8 Temska	0.022	-0.004	0.038	0.031	-0.032	-0.011	0.065*	-
<i>Spinturnix psi</i>								
Parazit grinja	1 M.kam	2 Petr	3 Dar	4 Dre	5 Petn	6 Bel	7 Top	8 Tem
1 Mali kamenolom	-							
2 Petrovaradin	-0.042	-						
3 Dardagani	0.067	0.097	-					
4 Drenajička	0.059	0.083	0.000	-				
5 Petnička	-0.274	0.321	0.000	0.000	-			
6 Bela sala	-0.004	0.013	0.000	0.005	0.331	-		
7 Toplik	-0.006	0.078	0.014	0.008	0.330	-0.027	-	
8 Temska	-0.053	0.063	0.168	0.149	-0.313	0.013	-0.013	-

Zvezdica \* označava statističku značajnost  $p < 0.05$



**Slika 36.** Parcijalni Mantel-test između pairwise genetičkih distanci domaćinske vrste *M. schreibersii*, beskrilne muve iz familije Nycteribiidae i grinje iz familije Spinturnicidae, ispravljene na osnovu geografskih distanci

Parcijalni Mantelov test nije otkrio statistički značajnu korelaciju između genetičkih distanci domaćina i beskrilne muve *N. schmidlii*, nakon uklanjanja efekta geografske varijabilnosti ( $r^2=0.098$ ;  $\beta=0.0012$ ;  $p=0.946$ ) (**Slika 36**). Parcijalni Mantel test između genetičkih distanci domaćina i grinje je takođe rezultovao neznačajnom korelacijom ( $r^2=0.266$ ;  $\beta=0.115$ ;  $p=0.202$ ), ali se nazire trend rasta razlika u genetičkim distancama kod grinja sa porastom razlika u genetičkim distancama kod domaćina (**Slika 36**). Veliki broj pairwise  $\Phi_{st}$  vrednosti za domaćinsku vrstu, parazitsku muvu i parazitsku grinju ima negativnu vrednost, što ukazuje na veću varijabilnost haplotipova unutar pojedinih lokaliteta nego između lokaliteta. Ovaj problem vezan je za veličinu uzorka, tako da bi šira analiza dala bolju sliku o stvarnom odnosu genetičkih distanci kod domaćina i njegovih parazita.

## 5 DISKUSIJA

### 5.1 Identifikacija vrsta i specijalizovanost ekto parazita za vrstu domaćina

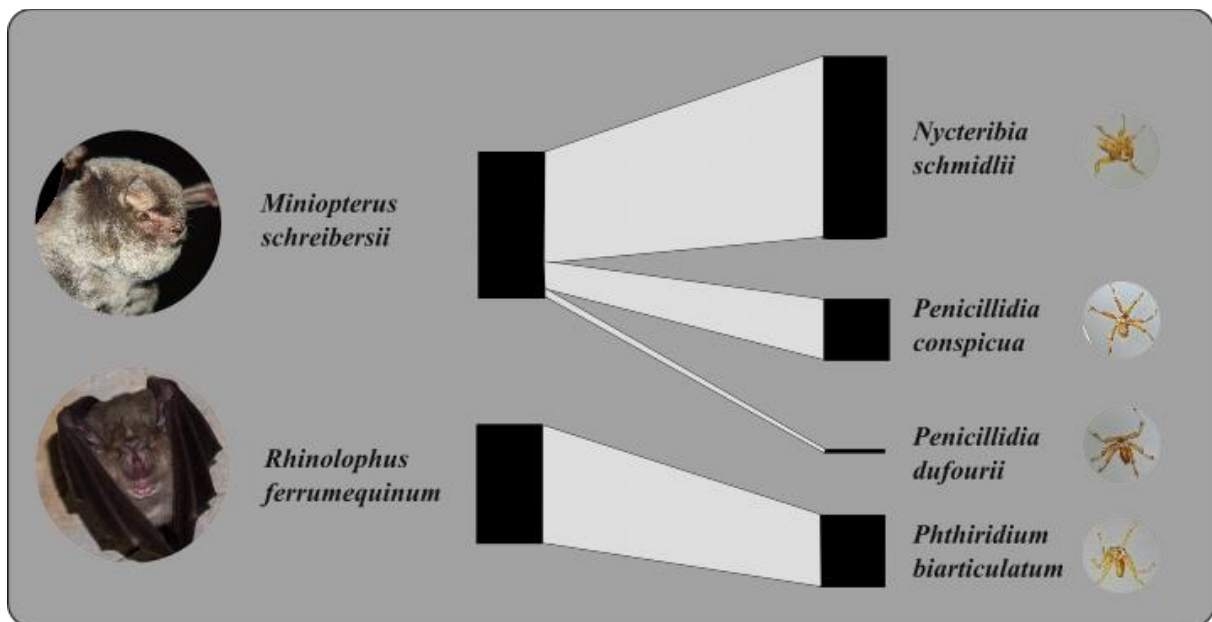
U ovoj studiji, upotrebom mtDNK markera, zabeležene su četiri vrste ekto parazita na domaćinu *Miniopterus schreibersii*: beskrlne muve *Nycteribia schmidlii*, *Penicillidia conspicua*, *Penicillidia dufourii* i grinja *Spinturnix psi*. Na domaćinu *Rhinolophus ferrumequinum* zabeležene su dve vrste ekto parazita: beskrlna muva *Phthiridium biarticulatum* i grinja *Eyndhovenia euryalis*. Sve ekto parazitske vrste nađene su na svojim primarnim domaćinima i nije bilo slučajeva unakrsne infekcije između dve domaćinske vrste, uprkos tome što su one imale priliku za kontakt unutar istog skloništa, ili su koristile ista skloništa, u različito doba godine. Za sve vrste beskrlnih muva familije Nycteribiidae morfološka identifikacija poklapala se sa molekularnom identifikacijom kod svih jedinki čija je DNK bila sekvencirana. Mora se napomenuti da za određene rodove iz ove studije nije bilo blisko srodnih sestrinskih vrsta prisutnih u uzorku, što je olakšalo morfološku identifikaciju.

Rezultati studije koju ukazuju na visoku specifičnost ekto parazita i domaćina nisu neočekivani, ali su pomalo iznenađujući imajući u vidu brojne nalaze ekto parazitskih vrsta na sekundarnim, ili slučajnim, domaćinima (Estrada-Peña i sar. 1991, Lanza 1999, Krištofik i Danko 2012, Postawa i Furman 2014; Ivanova-Aleksirova i sar. 2022), uključujući i podatke za svih šest vrsta ekto parazita proučavanih ovde, na obe domaćinske vrste (detaljan pregled kod Szentiványi i sar. 2016, Burazerović i sar. 2018). Iako je ukupna zastupljenost jedinki ekto parazita nalaženih na ne-primarnim domaćinima često izuzetno niska, bilo je očekivano da budu nađeni barem sporadični slučajevi unakrsne infekcije, imajući u vidu blisku vezu dve domaćinske vrste na većini lokaliteta. U studiji koja je kvantifikovala specifičnost prema domaćinskoj vrsti za ekto parazite slepih miševa centralnog Balkana (Burazerović i sar. 2018), otkrivena je visoka specifičnost za sve vrste proučavane ovde, > 90 %, sa izuzetkom vrste beskrlne muve *P. dufourii*. Kada se posmatraju domaćinske vrste *M. schreibersii* i *R. ferrumequinum*, beležene su veoma niske vrednosti stope unakrsnih infekcija ekto parazitima (npr. 1.205 jedinki *S. psi* nađeno je na domaćinu *M. schreibersii*, a svega dve jedinke *S. psi* na domaćinu *R. ferrumequinum*). Međutim, drugi autori primetili su izražen porast stope unakrsne infekcije kada su kolonije obe domaćinske vrste prisutne u nekom skloništu (Estrada-Peña i sar. 1991, Krištofik i Danko 2012). Treba naglasiti da je moguća i razmena ekto parazita između vrsta proučavanih u ovoj studiji i drugih vrsta koje koriste ista skloništa, a koje nisu uključene. Na primer, *P. dufourii*, vrsta beskrlne muve najmanje zastupljena u uzorku, smatra se muvom specijalizovanom za velike večernjake – vrste slepih miševa *Myotis myotis* i *Myotis blythii*, ili nekada potpuno nespecifična ka domaćinu (Imaz i sar. 1999). Često se javlja na mnogim kavernikolnim vrstama slepih miševa, uključujući i *M. schreibersii*, kao što je bio slučaj i u našoj studiji (Postawa i Furman 2014). Slično, *R. ferrumequinum* deli mnoge svoje ekto parazite, uključujući i vrste beskrlne muve i grinje detektovane u našoj studiji, sa većinom drugih evropskih vrsta iz familije potkovičara Rhinolophidae (Hutson 1984, Imaz i sar. 1999). Odsustvo unakrsne infekcije koje smo primetili takođe može da služi kao poziv na oprez, budući da mnogi paraziti pokazuju određen stepen morfološke varijabilnosti. Mnoge vrste familije Nycteribiidae pokazuju veliku plastičnost morfoloških karaktera te je u nekim slučajevima teško razlikovati blisko srodne vrste (Theodor 1967). Istraživanja u kojima se paraziti identifikuju samo na osnovu morfologije mogu da precene stopu slučajnih infekcija kroz pogrešnu identifikaciju vrsta. U slučajevima kada su referentne molekularne sekvence dostupne, jednostavnim sekvenciranjem fragmenata mtDNK (*barkoding*), kao što je urađeno u



ovoj studiji, može se potvrditi identitet vrste, čime se povećava pouzdanost rezultata analize specifičnosti vrste ektoparazita prema domaćinu.

Različite strategije specijalizacije parazita i afiniteti prema domaćinskim vrstama su prisutni čak i kod blisko srodnih vrsta istog roda (Christe i sar. 2003). Kod vrsta slepih miševa sa sličnim ekološkim odlikama, kao što su *M. schreibersii* i *R. ferrumequinum*, šansa da se razmenjuju ektoparaziti je povećana, bez obzira na to što nisu u pitanju filogenetski srodne domaćinske vrste (Estrada-Peña i sar. 1991, Bruyndonckx i sar. 2009). Pećine koje oni koriste kao podzemna skloništa mesta su na kojima tokom vremena dolazi do nakupljanja kako većeg broja jedinki beskrilnih muva, tako i većeg broj vrsta slepih miševa (Patterson i sar. 2007). Dodatno, pored direktnog transfera ektoparazita prilikom bliskog kontakta među domaćinima, indirektna transmisija putem puparijuma (lutki) koje su deponovane na zidove skloništa omogućava beskrilnim muvama da prelaze sa jedinke na jedinku domaćina, ali i sa vrste na vrstu domaćina koji koriste isto sklonište, čak i ako nisu u njemu prisutni u isto doba godine. Zbog ove osobine bilo je očekivano da će broj slučajnih nalaza vrsta beskrilnih muva na sebi nespecifičnoj domaćinskoj vrsti biti veći, međutim u ovoj studiji nije nađen niti jedan (Slika 37).



**Slika 37.** Prikaz specifičnosti svih vrsta beskrilnih muva ove studije prema vrsti domaćina

Slično tome, iako je grinjama neophodan blizak fizički kontakt između domaćina za uspešnu prelazak, a takvih prilika je bilo u nekoliko mešovitih klastera *M. schreibersii* i *R. ferrumequinum* primećenih na lokalitetima u Srbiji, nijedan slučaj grinja nađenih na netipičnoj vrsti domaćina nije zabeležen u ovoj studiji. Izostanak češćih slučajeva slučajne unakrsne infekcije u ovoj studiji potencijalno ukazuje da su vrste obe familije ektoparazita proučavanih ovde visoko adaptirane i imaju izražene preferencije ka svojim primarnim vrstama domaćina, uprkos okolnostima unutar skloništa koja im pružaju priliku da promene domaćina. Eksperimentalni dokazi u korist snažne preferencije prema primarnom domaćinu, i prednost u preživljavanju koju ona donosi, nađeni su na primeru nekoliko vrsta roda *Spinturnix* (Giorgi i sar. 2004), a kompetitivna ekskluzija je predložena kao objašnjenje zašto nikada nije primećeno da se različite vrste grinja pojavljuju unutar iste kolonije jedne domaćinske vrste slepih miševa (Bruyndonckx i sar. 2009).

Mnoge vrste litofilnih slepih miševa su neretko spremne da formiraju mešovite grupe (klastere), što potencijalno ukazuje na to da su njihovi paraziti dovoljno specijalizovani za jednu

domaćinsku vrstu, tako da udruživanje sa drugim vrstama slepih miševa ne povećava rizik izlaganju novim parazitima. Formiranje većih klastera može doneti prednost takvim jedinkama/vrstama zbog socijalne termoregulacije (Kerth 2008). Sa druge strane, upravo zbog toga što su njihovi paraziti usko-specijalizovani i verovatno visoko-imunokompatibilni sa svojim primarnim domaćinskim vrstama (Dick i Patterson 2007), svaki potencijalni prelazak parazita na novog domaćina može predstavljati još veći rizik za populacije nove domaćinske vrste zbog izlaganja drugačijim infektivnim bakterijama, gljivicama, virusima ili krvnim parazitima (Witsenburg i sar. 2015, Szentiványi i sar. 2019, McKee i sar. 2021, Sándor i sar. 2021). Slučajne unakrsne infekcije, koliko god bile retke, možda nisu važne sa aspekta uspostavljanja novih vijabilnih populacija tog ektoparazita na novoj domaćinskoj vrsti, ali jesu važne sa aspekta zdravlja i imunološkog statusa domaćina (Alcala i sar. 2017).

## 5.2 Prisustvo hiperparazitske gljivice na muvama

Hiperparazitska gljivica iz roda *Arthrorhynchus* sp. pronađena je kod 4 % ukupnog uzorka svih vrsta beskrilnih muva, što je u skladu sa prevalencama opisanim u prethodno objavljivanim studijama, koje su se kretale od 2 do 9 % (Blackwell 1980, Haelewaters i sar. 2017, Szentiványi i sar. 2018, Walker i sar. 2018). Razlog ovim relativno niskim stopama infekcije leži u činjenici da se askospore gljivica prenose u direktnom kontaktu dve muve na domaćinu slepom mišu (Haelewaters i sar. 2020). Budući da su sve muve inficirane gljivicom pripadale domaćinskoj vrsti muve *P. conspicua*, to prevalencu infekcije ove vrste diže na 21 % (15 od 71 jedinki), što je takođe u skladu sa prevalencama infekcije objavljenim za ovu vrstu muve u drugim studijama, 23.1 % (Haelewaters i sar. 2017), koja je obično bila najviše inficirana gljivicama od svih pregledanih vrsta muva (Szentiványi i sar. 2018). Što se tiče specijalizovanosti vrste gljivice ka vrsti muve, *A. eucampsipodae* je uvek do sada bila nalažena isključivo u asocijaciji sa muvom *N. schmidlii*, a vrsta gljivice *A. nycteribiae* na *P. conspicua* i *P. dufourii* (Szentiványi i sar. 2018). Vrlo je moguće da će se u budućnosti ispostaviti da je svaka od njih zapravo kompleks više vrsta, koje se grupišu prema svojoj preferenciji ka domaćinskoj vrsti (Haelewaters i sar. 2020).

Hiperparazitizam je česta pojava u prirodi, ali ga je lako prevideti, što ima za posledicu da se vrlo malo zna o funkcionalnim ulogama i ključnim ekološkim i fiziološkim interakcijama između domaćina i njihovih hiperparazita. Interesantno je da su ove gljivice inicijalno opisane kao parazitske biljke, a par godina kasnije kao akantocfalni crvi. Talusi ovih gljivica su komplikovani za proučavanje: mikroskopskih su veličina, nije ih moguće gajiti u kulturi, čvrstih su i otpornih ćelija (kako bi izdržali trenje na telu domaćina), i vrlo su raznoliki (Haelewaters i sar. 2020). Na jednom domaćinu može koegzistirati više vrsta gljivica iz ove familije, a isto tako i više morfotipova jedne iste vrste. Izolacija DNK je teška i trebalo bi da se radi iz samo jednog talusa (kako bi se izbeglo nehوتيčno uzorkovanje više vrsta). Pigment melanin prisutan u ćelijskim zidovima može da ometa amplifikaciju željenih gena (Haelewaters i sar. 2018). Iz svih navedenih razloga, kao i zbog činjenice da proučavanje ovih slučajno otkrivenih stanovnika na delu uzorka beskrilnih muva naše studije nije predviđeno u okviru ove disertacije, zaražene muve su poslate u Belgiju grupi istraživača koja ekskluzivno proučava gljivice ove familije na dalje analize.

## 5.3 Kvantitativna analiza inficiranosti

Oba domaćina bila su parazitirana sa većim brojem jedinki grinja nego jedinki beskrilnih muva, što je očekivano imajući u vidu veličinu, prostornu nišu i ponašanje obe grupe ektoparazita. Budući da beskrilne muve žive na krznu i aktivno trče preko čitavog tela domaćina, kao i da su relativno krupne, domaćin aktivnim timarenjem može da ukloni sa sebe

neki broj ovih muva (Giorgi i sar. 2004). Dodatno, da bi se razmnožavale muve moraju da privremeno napuste domaćina. Grinje, pak, nikada ne napuštaju domaćina, višestuko su sitnije i čvrsto prijanjaju za letne membrane krila i repa domaćina (Rudnick 1961), gde su i teže dostupne za uklanjanje timarenjem. Zbog svega navedenog, ne iznenađuje rezultat da su obe domaćinske vrste, sa 56 % kod *M. schreibersii* i 71 % kod *R. ferrumequinum*, bile više parazitirane grinjama nego beskrilnim muvama. Takođe je moguće da postoji kompeticija za resurse između muva i grinja na jedinkama domaćina, koje iako žive u različitim nišama (krzno nasuprot kožne membrane), ipak se hrane krvlju i limfom. Autori Postawa i Furman (2014) su kod populacija *M. schreibersii* u Turskoj primetili veću abundancu muva u populacijama domaćina gde nije bilo grinja.

Veličina kolonija populacija domaćina pozitivno je korelisana sa prevalencom i intenzitetom infekcije parazitima (Patterson i Ruckstuhl 2021, Czenze i Broders 2011), a pretpostavka da će domaćinska vrsta *M. schreibersii* biti ozbiljnije parazitirana i sa većim diverzitetom parazitskih vrsta od drugog proučavanog domaćina *R. ferrumequinum* potvrđena je rezultatima ove studije. Statistički značajna razlika dobijena je samo između parametara srednja abundanca i srednji intenzitet infekcije za infekciju beskrilnim muvama, sa većim vrednostima oba parametra za domaćinsku vrstu *M. schreibersii* (**Tabela 7**), dok razlika u inficiranosti dveju vrsta domaćina grinjama iz familije Spinturnicidae nije bila statistički značajna. Kod druge vrste roda *Spinturnix* Lučan (2006) je otkrio da postoji korelacija između srednje abundance grinja i veličine kolonije domaćina, alisamo do sredine avgusta, kada nastupa period rojenja i selidbe domaćina. Obzirom da se ova studija nije bavila sezonskom dinamikom brojnosti grinja kod *M. schreibersii*, potrebna su dodatna istraživanja kako bi se utvrdilo da li i kod ove vrste postoji sličan trend. Ukupni broj jedinki muva na domaćinu *M. schreibersii* bio je veći, a takođe je veći bio i broj vrsta beskrilnih muva na ovom domaćinu, tri, u poređenju sa jednom vrstom nađenom na domaćinu *R. ferrumequinum*. U većim kolonijama domaćina, verovatnoća da će jedinka nekog ektoparazita sresti partnera za razmnožavanje se povećava, povećavajući tako i stopu reprodukcije. Očekivano je da će domaćinske vrste koje formiraju guste skupine i koje se udružuju u masivne kolonije biti najviše inficirane parazitima (Orlova i sar. 2018, Szentiványi i sar. 2019). Migratorni potencijal vrste domaćina takođe može da doprinese razmeni ektoparazita. Za vrstu *M. schreibersii* koja je sposobna za letove na duge distance, samim tim što pokriva širi geografski region i što dolazi u kontakt sa drugim slepim miševima na svom putu, mogao bi se očekivati veći diverzitet parazita nego što je to slučaj sa sedentarnim vrstama, poput *R. ferrumequinum* (Presley 2011, Wright i sar. 2020). Visok nivo migracija i protoka gena između različitih populacija parazita koje dolaze u kontakt zahvaljujući svojim domaćinima održava nivo genetičkog diverziteta visokim (Matthee 2020).

#### **5.4 Parametri molekularnog diverziteta, struktura populacija i analiza haplotipova ektoparazita**

Diverzitet haplotipova (Hd) gena *COI* kod beskrilnih muva (**Tabela 9**, *Nycteribia schmidlii*, *Penicillidia conspicua*, *Penicillidia dufourii*, *Phthiridium biarticulatum*) je primetno veći za vrste muva poreklom sa domaćina *M. schreibersii* (0.535, 0.722 i 0.7, respektivno) nego za vrstu poreklom sa domaćina *R. ferrumequinum* (0.289), dok su vrednosti nukleotidnog diverziteta ( $\pi$ ) približne za sve četiri vrste muva. Ovo se može objasniti boljom povezanošću populacija domaćina vrste *M. schreibersii*, koje sezonski migriraju i menjaju skloništa na širem geografskom prostoru u poređenju sa drugom domaćinskom vrstom. Čak i ako ne dolazi do protoka gena između jedinki domaćina, njihove muve mogu doći u kontakt, bilo direktno, bilo preko istog skloništa korištenog u različito doba godine, održavajući na taj način visoke vrednosti Hd. Među grinjama, genetički diverzitet (Hd,  $\pi$ ) ispitivanog gena *16S rRNA* bio je

približno jednako nizak kod obe vrste sa oba domaćina (**Tabela 9**, *Spinturnix psi* i *Eyndhovenia euryalis*). Međutim, visoko konzervativna priroda fragmenata sekvenci ovog gena otežava poređenje diverziteta unutar vrste (De Rojas i sar. 2002). Intenzitet infekcije grinjama značajno fluktuirala tokom godišnjeg ciklusa domaćina, sa vrhuncem u vreme koćenja domaćina i minimumom u vreme zimske hibernacije. Ova dinamika u mnogome oblikuje genetičku strukturu populacija parazita, koje praktično prolaze kroz usko grlo svake zime, što je naročito primetno na primeru manjih kolonija slepih miševa (van Schaik i sar. 2014). Opadanje brojnosti u procesu uskog grla može biti sporo ili brzo, a redukcija veličine populacije može biti trajna ili privremena. Bilo koje smanjenje brojnosti ima potencijal da umanjí genetički diverzitet, ali brzo smanjenje obično ima ozbiljnije i dugotrajnije posledice od postepenog smanjenja (Beebee i Rowe 2004). Postepene promene dozvoljavaju prirodnoj selekciji da pročisti štetne alele, dok nagli gubitak jedinki neke populacije može da vodi i ka fiksaciji štetnih alela putem slučajnosti. Efekat uskog grla takođe zavisi od finalne veličine populacije i od njegovog trajanja. Kratkoročni efekat uskog grla, koji nije previše snizio broj reprodukujućih jedinki, praćen brzim oporavkom populacije, može da uopšte ne utiče na genetički diverzitet. Što duže traje efekat uskog grla, sve više alela biva izgubljeno, i sve je ozbiljniji gubitak diverziteta (Beebee i Rowe 2004). Takva populaciona dinamika takođe smanjuje šanse da se novi retki haplotipovi održe u populaciji, i na taj način može delimično da objasni ukupan nizak genetički diverzitet uočen kod obe vrste grinja u našoj studiji. Kada populacije postanu veoma male ili ostanu izolovane od imigranata tokom više generacija, dolazi do genetičkog problema. Inbriding, odnosno razmnožavanje među srodnicima, može dovesti do gubitka heterozigotnosti i akumulacije blago štetnih alela. Ovi aleli, potom, u malim populacijama, mogu biti slučajno fiksirani putem genetičkog drifta, i akumulirani tokom vremena, tako da sve više povećavaju genetičko opterećenje te populacije (opadanje fitnesa u poređenju sa optimalnim genotipom). Svi ovi efekti zajedno objašnjavaju nizak nivo genetičkog diverziteta uočen kod grinja obe vrste slepih miševa domaćina ove studije.

Ni kod jedne ovde proučavane vrste ektoparazita nismo dobili struktuiranost populacija, nego su svi uzorkovani lokaliteti/kolonije pripadali jedinstvenim populacijama. Jedina naznaka razdvajanja koja je dobijena, ali ne i statistički potvrđena, odnosila se na vrstu muve *Ph. biarticulatum* kod koje su se dva lokaliteta iz zapadne Srbije (Drenajčka i Petnička) grupisala odvojeno od lokaliteta na severu i istoku zemlje (Baloj, Toplik, Temska). Ukoliko bismo pokušali da objasnimo ovu naznaku razdvajanja, ona bi ležala u činjenici da u centralnoj Srbiji možda nema adekvatnih skloništa ove vrste - ne postoje pećinska staništa jer podloga nije karstna, a manjka i informacija o alternativnim skloništimá u ljudskim građevinama koje bi vrsta eventualno mogla da koristi. Domaćinska vrsta *R. ferrumequinum* ima mali areal aktivnosti – dovodeći do toga da imamo ekskluzivne haplotipove sa jedne i druge strane „barijere“, odnosno centralne Srbije. Treba naglasiti da su u prošlosti, pre 1990. godine, u ovom delu zemlje postojala rudarska okna koje je ova vrsta redovno koristila, ali ona odavno nisu u funkciji, i nisu dostupna kao skloništa slepim miševima, zbog čega nema recentnih nalaza jedinki ove vrste iz ovog dela Srbije (Paunović i sar. 2020).

Zvezdasta topologija mreža haplotipova kod svih vrsta ektoparazita proučavanih ovde (u malo izmenjenom obliku kod vrste *P. conspicua*), kao i najzastupljeniji H1 kod svake od vrsta, ukazuje na to da sve uzorkovane populacije analiziranih vrsta potiču iz zajedničkog glacijalnog refugijuma. Za vrste muva *N. schmidlii* i *P. conspicua* na osnovu parametara *mismatch* analize i SSD vrednosti zaključujemo da je u prošlosti došlo do njihove nagle demografske ekspanzije, a kod *N. schmidlii* takođe i do statistički podržanog recentnog rasta populacije. Ponovo su u pitanju vrste muva sa domaćina *M. schreibersii*, koji je i sam mobilniji i mnogobrojniji u kolonijama u poređenju sa drugom domaćinskom vrstom *R. ferrumequinum*. Treća vrsta muve sa ovog domaćina, *P. dufourii* je izuzeta iz ovih analiza zbog male veličine uzorka. Muva poreklom sa domaćina *R. ferrumequinum*, *Ph. biarticulatum*, kao i obe vrste

grinja, sa oba domaćina, pokazuju parametre konstantne veličine populacije u prošlosti i negiraju ekspanziju. Predpostavljamo da sedentarno ponašanje domaćinske vrste *R. ferrumequinum*, privrženost istim skloništima tokom čitavog života, i prelaženje distanci od svega nekoliko kilometara utiču i na stabilnost veličine populacija njegovih ektoparazitskih muva. Obe vrste grinja, *S. psi* i *E. euryalis*, u analizama pokazuju parametre recentnog rasta populacija, što je u skladu sa njihovom sezonskom dinamikom i gorepomenutim problemom „bottleneck“ procesa (van Schaik i sar. 2014) i „efektom osnivača“ od strane manjeg broja jedinki koje će potom dovesti do populacionog rasta.

Poređenjem ovde detektovanih sekvenci sa prethodno nađenim otkriveno je da su populacije vrsta beskrilnih muva verovatno deo većih, jedinstvenih populacija svake od vrsta, budući da dele iste haplotipove sa sekvencama poreklom iz Rumunije i Mađarske, bez obzira sa koje domaćinske vrste potiču. Haplotipovi grinja iz naše studije poklapaju se sa sekvencama poreklom iz Francuske (*E. euryalis*, *S. psi*), Italije i Švajcarske (*S. psi*), što ukazuje, ili da postoji protok gena, ili da je u pitanju zajedničko poreklo ovih haplotipova, koji su se onda kao najbrojniji održali u populacijama. Poređenje sa sekvencama dostupnim u GenBank bazi otvorilo je i nekoliko interesantnih pitanja. Kod muve *N. schmidlii*, većina haplotipova je veoma slična (H1-H25), a divergencija sekvenci niska, 0.2 – 0.9 % (**Prilog 7**). Imajući u vidu potvrđene migracije domaćina *M. schreibersii* na duge distance u Evropi (Wright i sar. 2020), nije iznenađujuće što su isti haplotipovi gena *COI* poreklom sa četiri lokaliteta u Rumuniji i dva lokaliteta u Mađarskoj pronađeni i u našoj studiji. Šta više, podaci dobijeni markiranjem slepih miševa ove vrste u Srbiji, koji su potom pronađeni u Rumuniji potvrđuju konekciju populacija u Srbiji i Rumuniji (Budinski i sar. 2018). Dve prethodno objavljene *COI* sekvence vrste *N. schmidlii* su, pak, dale dva haplotipa koja su se značajno razlikovala od svih ostalih: H26 poreklom od *M. schreibersii* iz Rumunije, divergencija u odnosu na ostale sekvence od 4.4 – 5.1 % (McKee i sar. 2019) i H27 poreklom od druge dve vrste roda *Miniopterus*, *M. africanus* i *M. inflatus* iz Kenije (Tortosa i sar. 2013), divergencija od ostalih sekvenci 3.9 – 4.6 % (**Prilog 7**). Divergencija sekvenci unutar iste vrste za gen *COI* kod životinja retko je veća od 2 % (Hebert i sar. 2003), ukazujući na činjenicu da možda kod ove vrste beskrilne muve postoji značajan, a prethodno neobjavljen diverzitet, kao i potencijalne kriptične linije širom geografskog areala ove vrste, koje bi trebalo dodatno istražiti. Kod vrste grinje *E. euryalis*, naš haplotip H1 za gen *16S rRNA* poklapao se sa jednom jedinom sekvencom iz baze, i to poreklom sa domaćina *R. ferrumequinum* sa Korzike, Francuska. Drugi prethodno objavljeni haplotipovi, H7 i H8, poreklom su sa drugih vrsta slepih miševa, sredozemnog potkovičara *Rhinolophus euryale* i riđeg večernjaka *Myotis emarginatus*, i značajno su se razlikovali od haplotipova dobijenih u našoj studiji (divergencija sekvenci 5.7 – 6.3 % (**Prilog 7**)), što ukazuje na potencijalno postojanje kriptičkog diverziteta unutar ove vrste. Sekvence gena *16S rRNA* su u ranijim studijama korištene za razlikovanje vrsta roda krpelja *Ixodes* (Caporale i sar. 1995). Kod njih, sekvence različitih vrsta su se razlikovale za do 12.8 % (u proseku oko 6 %), a varijacija unutar iste vrste bila je manja od 0.3 %. Slični nivoi divergencije sekvenci nađeni su i kod drugih grupa beskičmenjaka (Kornobis i sar. 2010). Divergencija sekvenci koje su dale haplotipove H7 i H8 i svih ostalih sekvenci ove studije bila je mnogo veća nego što bi se moglo očekivati unutar iste vrste. Interesantno je da je vrsta grinje *E. euryalis* predstavljena dvema morfološki-opisanim podvrstama, *E. e. euryalis* (Canestrini, 1884) koja primarno parazitira na domaćinima vrste *R. euryale*, i *E. e. oudemansi* (Eyndhoven, 1941), koja primarno parazitira na domaćinima vrste *R. ferrumequinum* (Imaz i sar. 1999). S toga, kao što je navedeno od strane autora studije koja je prvobitno objavila ove haplotipove (Bruyndonckx i sar. 2009), kako bi se razrešili odnosi unutar ove kriptične linije potrebna su dalja istraživanja, tokom kojih će se sistematski prikupljati grinje sa obe vrste domaćina iz familije potkovičara, sa lokaliteta gde one žive u simpatriji, i potom ih molekularno okarakterisati.

## 5.5 Infekcija muva iz familije Nycteribiidae krvnim parazitom iz roda *Polychromophilus*

Detektovali smo prisustvo DNK krvnog parazita *Polychromophilus* sp. u 15 % svih ispitanih beskrilnih muva. Vrste roda *Penicillidia*, iako zastupljene sa manjim brojem jedinki u celokupnom uzorku, imale su veće stope infekcije (64.7 % za rod *Penicillidia*: *P. conspicua* 57 %, *P. dufourii* 100 %) nego vrsta muve *N. schmidlii* (15.8 %). Samo je jedna muva vrste *Ph. biarticulatum* bila pozitivna na prisustvo *Polychromophilus* sp. Sve infekcije *Polychromophilus* parazitom molekularno su identifikovane kao *P. melanipherus*. Naši rezultati ukazuju da je *M. schreibersii*, zajedno sa svojim beskrilnim mrvama čest domaćin parazita *Polychromophilus* u Srbiji i istočnom delu Bosne i Hercegovine. Vrste slepih miševa iz familije Minipteridae širom sveta imaju najveću stopu uočenih vrsta zaraženih beskrilnim mrvama, koje pak nose svoje mikroparazite (Szentiványi i sar. 2019), uključujući i infekcije *Polychromophilus* sp. (Sándor i sar. 2021). Naša pretpostavka je da vrste roda *Penicillidia* imaju veće stope infekcije zbog svog većeg tela, i verovatno većih i češćih obroka krvi slepog miša domaćina. Takođe značajnu ulogu u osobinama životne istorije ovih muva igra i stepen specijalizacije prema vrsti domaćina. Jedna tropska vrsta roda *Penicillidia*, *P. fulvida*, često je u asocijaciji sa vrstama slepih miševa iz filogenetski udaljenih familija, što je čini vrstom generalistom, ili poliksenom vrstom (Verrett i sar. 2022). Protok gena između populacija ove vrste muve koja parazitira na različitim domaćinima je olakšan zbog činjenice da različite vrste slepih miševa domaćina dele isto sklonište (Verrett i sar. 2022). Iako su *P. conspicua* i *P. dufourii* opisane kao monoksena i oligoksena vrsta, obe su ipak nalažene na ne-primarnim vrstama domaćina češće nego što je to slučaj sa mrvom *N. schmidlii*. Muva *P. dufourii* je specijalizovana za dve vrste velikih večernjaka (*M. myotis* i *M. blythii*), ali je takođe često nalažena na domaćinu *M. schreibersii*. Zanimljivo je da su Sándor i sar. (2021) detektovali prisustvo *Polychromophilus melanipherus* kod muve *P. dufourii* kada su one bile prikupljene sa slepih miševa vrste *M. schreibersii*, a prisustvo *Polychromophilus murinus* kada su muve bile prikupljene sa slepih miševa vrsta *M. myotis* i *M. blythii*. Budući da je ova vrsta muve *Penicillidia* sposobna da bude vektor obema evropskim vrstama roda *Polychromophilus*, kao i da ne ispoljavaju visoku specifičnost za vrstu domaćina, može se pretpostaviti da su ove muve potencijalno sposobne da budu vektor parazita iz reda Haemosporida i kada im se ukaže prilika preskoče granice vrste.

U skloništima koje koristi više vrsta slepih miševa (npr. četiri lokaliteta ove studije su deljena između vrsta *M. schreibersii* i *R. ferrumequinum*) beskrilne muve mogu lako prelaziti između jedinki slepih miševa iste vrste, ili čak između jedinki različitih vrsta. S toga, ukoliko su inficirane *Polychromophilus* parazitom, ove muve potencijalno mogu preneti bilo koju od dve vrste krvnih parazita Haemosporida na ne-specifičnu vrstu domaćina slepog miša (Sándor i sar. 2021). U skorašnjoj studiji iz Bugarske (Ivanova-Aleksirova i sar. 2022), infestacija sekundarnog domaćina od strane beskrilnih muva bila je prilično česta u skloništima koja su deljena između više vrsta slepih miševa. Iako u ovoj studiji nije uočena pojava prelaženja muva sa primarnog domaćina (Pejić i sar. 2021), očigledno je da se ono ipak dešava, iako retko. Čak i jedna jedina muva, zaražena *Polychromophilus* sp. parazitom bila bi dovoljna da prenese *P. melanipherus* ne na jedinku vrste *M. schreibersii*, nego na neku drugu vrstu slepog miša, ili *P. murinus* na domaćina slepog miša koji nije iz familije večernjaka.

Naši podaci ukazuju da je infekcija *Polychromophilus* parazitom kod vrste domaćina *R. ferrumequinum* i beskrilnih muva prikupljenih sa njega retka, ili odsutna na istraživanim lokalitetima, budući da je detektovana kod samo jedne jedinke muve. Ipak, vrste roda *Rhinolophus* koje dele skloništa sa vrstama roda *Miniopterus* redovno su izložene beskrilnim mrvama sa *Miniopterus* vrsta, te tako imaju priliku da se zaraze *P. melanipherus* parazitom. Bez fizičke barijere koja bi sprečila muve da menjaju domaćine, moglo bi se očekivati da se *Polychromophilus* nađe na netipičnom domaćinu mnogo češće. Da li je *R. ferrumequinum* nekompatibilan domaćin, ili je neka vrsta beskrilne muve manje podoban vektor za *P.*

*melanipherus*, pitanja su koja tek treba istražiti. Treba napomenuti da detekcija parazita *Polychromophilus* u ukupnoj genomskoj DNK muva može predstavljati, ili pravu infekciju (*Polychromophilus* uspešno kompletira svoj seksualni ciklus u muvi-domaćinu), ili može da bude detektovan iz ostataka obroka prethodnog hranjenja muve krvlju slepog miša. Jedino disekcijom pljuvačnih žlezda beskrilnih muva i utvrđivanjem prisustva faze sporozoita krvnog parazita u njima može se sa sigurnošću govoriti o pravoj infekciji muve *Polychromophilus*-om. Infekcije muva poreklom sa domaćina *M. schreibersii* u našoj studiji možemo tumačiti kao prave infekcije, budući da su i *Miniopterus*, i obe njegove muve *Nycteribia* i *Penicillidia* od ranije, i u više navrata, potvrđeni domaćini *P. melanipherus* parazita. Infekciju muve *Ph. biarticulatum* ovim krvnim parazitom treba tumačiti sa oprezom.

Dok su vrste familije Miniopteridae česti domaćini parazitu *Polychromophilus* na raznim geografskim širinama, vrste familije Rhinolophidae su retko domaćini, sa samo nekoliko detekcija do sada (Adam i Liao 1973, Borner i sar. 2016). Na evropskim uzorcima do sada proveravanim, sve *P. melanipherus* infekcije detektovane su na domaćinu *M. schreibersii* i njemu asociranim muvama. *Polychromophilus murinus* je detektovan kod sedam evropskih vrsta iz familije večernjaka Vespertilionidae i tri vrste iz familije potkovičara, uključujući i *R. ferrumequinum*, i muve asocirane sa ovim vrstama slepih miševa (Sándor i sar. 2021). Koliko je poznato, ova studija po prvi put prijavljuje slučaj detektovanja vrste *P. melanipherus* (bez saznanja o tome da li potiče od prave infekcije ili iz zaostalog obroka krvi) kod beskrilne muve *Ph. biarticulatum* sa domaćina *R. ferrumequinum*.

Infekcije parazitom *Polychromophilus* prisutne su na šest od devet lokaliteta na kojima su uzorkovani, i ukazuju na efikasnu transmisiju među jedinkama vrste *M. schreibersii* i njihovih beskrilnih muva. Infekcija nije detektovana na tri lokaliteta, i to na jednom koji služi kao ekskluzivno sklonište vrste *M. schreibersii*, jednom koje je ekskluzivno za vrstu *R. ferrumequinum*, i jednom koje je bilo deljeno. Toplik, lokalitet na kome je nađena jedina *Ph. biarticulatum* muva pozitivna na *Polychromophilus*, imao je nisku stopu infekcije, sa još samo jednom pozitivnom muvom, vrste *N. schmidlii*, poreklom sa *M. schreibersii* domaćina. Sekvence gena *cox1* *Polychromophilus*-a umnoženog iz DNK *Ph. biarticulatum* muve iz Toplika, predstavlja infekciju mešovitim haplotipovima (H1 i H4) koji su takođe detektovani kod beskrilnih muva domaćina *M. schreibersii* sa više lokaliteta. Jedna od opcija je da se, budući da obe vrste slepih miševa dele ovo sklonište, muva *Ph. biarticulatum* hranila na domaćinu *M. schreibersii*, pre nego što se vratila na *R. ferrumequinum* domaćina, te je DNK parazita *Polychromophilus* poreklom iz tog obroka krvi detektovana zahvaljujući umnožavanju u reakciji PCR.

Postojeći podaci o prstenovanju slepih miševa u Srbiji i njihovim nalazima daju nam informacije o kretanju slepih miševa (Budinski i sar. 2018, Pejić i sar. 2018b). Zanimljiv je lokalitet - Dardagani, sa druge strane državne granice Srbije nalazi se u Bosni i Hercegovini, kod Zvornika. U pitanju je napušteni podzemni krečnjački kamenolom iz vremena antičkog Rimskog carstva, i kod beskrilnih muva sa ovog lokaliteta smo detektovali najveću prevalencu infekcije *Polychromophilus*-om. Tamo se mogu naći porodiljske kolonije vrsta *M. schreibersii* i *M. myotis*, sa manjim brojem *M. cappaccinii*, kao i hibernacijske kolonije *M. schreibersii*, *R. ferrumequinum* i *R. euryale*. Kretanja vrste *M. schreibersii* zabeležena su između ovog lokaliteta i lokaliteta Petrovaradinska tvrđava iz ove studije (Presetnik i sar. 2017, Pejić i Budinski 2018), koji je drugi lokalitet po prevalenci infekcije *Polychromophilus*. Takođe, zabeležena je migracija slepih miševa između Dardagana i Čebića pećine u zapadnoj Srbiji. Čebića pećina je relativno blizu (<15 km) druga dva istraživana lokaliteta ove studije – Drenajičke i Petničke pećine, i migracije vrste *M. schreibersii* su prethodno zabeležene između te tri pećine međusobno, kao i sa skloništem u Petrovaradinskoj tvrđavi (Pejić i Budinski 2021). Sa druge strane, ne postoje podaci o tome kakva je veza kamenoloma Dardagani sa drugim skloništim dublje u teritoriji Bosne i Hercegovine. Petrovaradinska tvrđava je veoma važno

sklonište slepih miševa, koje se prati od 1950-ih godina u Srbiji (Mirić 1960). Ono što je najinteresantnije je veza koju ova tvrđava ima sa više od deset skloništa u Srbiji, udaljenim u svim pravcima 10 do 100 km (Pejić i sar. 2018a). Relativno visoka prevalenca infekcije primećena kod muva domaćina *M. schreibersii* sa lokaliteta Temska farma, koja je zapravo porodijska kolonija druge domaćinske vrste *R. ferrumequinum*, sa svega nekoliko jedinki *M. schreibersii* koje su tamo uhvaćene.

Rezultati prethodnih istraživanja (Ramasindrazana i sar. 2018, Szentiványi i sar. 2020) koja su se bavila ispitivanjem prisustva infektivnih mikroorganizama u ektoparazitima slepih miševa pokazali su da je prevalenca infekcija *Polychromophilus*-om u muvama uvek bila niža nego stopa infekcije dobijena iz krvi domaćina, što može da bude ili zbog manjeg opterećenja parazitom, ili zbog niže koncentracije DNK parazita, izolovane iz ektoparazita. Takođe treba uzeti u obzir i životni vek muve spram životnog veka domaćina, kao i reprezentativnost uzorka. U Rumuniji i Bugarskoj, 20 % krpelja i 62 % beskrilnih muva poreklom sa *Polychromophilus*-pozitivnih slepih miševa, takođe su bili pozitivni na testu (Sándor i sar. 2021). Pregledanjem mikroskopskih preparata razmaza krvi domaćina često se može potceniti prevalenca infekcije krvnim parazitima, jer je teško detektovati niske nivoe infekcije (Megali i sar. 2011). Nedostatak korištenja ektoparazita umesto krvi domaćina je to što usled velike mobilnosti muva, infekcija detektovana u njima se ne može povezati sa jednom jedinkom domaćina, nego se odnosi na celu koloniju te vrste slepih miševa (Szentiványi i sar. 2020).

Beskrilne muve mogu se koristiti za pretragu (*screening*) i drugih mikroparazita kojima služe kao vektor, ili mogu da prenose, kao što su bakterija *Bartonella*, *Lloviu* virus, protozoa *Trypanosoma*, ili gljivica *Pseudogymnoascus*. Nedavno su muve *N. schmidlii* proveravane na prisustvo *Lloviu* virusa, čija se RNK našla kod ovih insekata (4/320), ali samo kao pasivna transmisija od već pozitivnog domaćina slepog miša i bez aktivne viralne replikacije (Kemenesi i sar. 2022). Potencijal korištenja ektoparazita koji se hrane krvlju za donošenje zaključaka o opterećenju patogenima i njihovoj transmisiji u populacijama slepih miševa je veliki, dokle god su svi svesni ograničenja koje ova metoda ima i tumače rezultate sa pažnjom.

## 5.6 Genetički diverzitet i bogatstvo haplotipova *Polychromophilus*

Analiza sekvenci gena *cytb* i *cox1* *P. melanipherus* u ovoj studiji otkrila je visok diverzitet haplotipova. Distribucija jedinstvenih haplotipova ukazuje na dobro povezanu populaciju domaćinske vrste slepog miša *M. schreibersii* kao i njegovih beskrilnih muva. Potpuno poklapanje svih detektovanih *cytb* haplotipova ove studije sa sekvencama poreklom iz raznih evropskih država, i čak i Južne Afrike, kao i potpuno poklapanje tri od pet haplotipova gena *cox1* (H1, H2 i H5) sa prethodno objavljenim sekvencama iz Evrope i Istočne Afrike je u skladu sa zaključkom autora Duval i sar. (2012) da je *P. melanipherus* široko rasprostranjen i da cirkuliše između domaćinskih vrsta porodice Miniapteridae bez geografskog diferenciranja (ili potencijalno kao kompleks vrsta).

Petnaest uzoraka kod kojih je detektovana infekcija mešovitim haplotipovima mogu biti rezultat hranjenja muve na dve različite jedinice slepog miša koji su bili zaraženi različitim haplotipovima *Polychromophilus*-a. Većina mešoviti haplotipova detektovana je sa lokaliteta sa visokom prevalencom infekcije. Mešoviti haplotipovi su samo dva puta pre opisani za infekciju *Polychromophilus* (Duval i sar. 2012, Sándor i sar. 2021), dok su infekcije mešovitim haplotipovima česte kod krvnog parazita *Hepaticystis*, još jednog taksona iz reda Haemosporidia koji inficira slepe miševе i druge sisare (Thurber i sar. 2013, Schaer i sar. 2017, 2018). Međutim, *Hepaticystis* paraziti se prenose posredstvom vrsta komaraca roda *Culicoides* (Ceratopogonidae), privremenih hematofagnih ektoparazita (Garnham 1966). Visok udeo infekcija mešoviti haplotipova u našem uzorku ukazuje da su ove jedinice slepih miševa u više navrata zaražavane različitim haplotipovima *Polychromophilus*-a koga prenose različite



jedinke muva. Ili, alternativno, svaka jedinka muve se hranila na različitim inficiranim jedinkama slepih miševa (inficiranih različitim haplotipovima) i u tom procesu razvila infekciju mešovitim haplotipovima. Buduća istraživanja mogla bi da uporede infekcije *Polychromophilus*-om/haplotipove poreklom iz uzorka krvi slepog miša i iz njegove beskrilne muve. Analiza haplotipova *Polychromophilus*-a može nam pomoći da razumemo interakcije između slepih miševa i njihovih beskrilnih muva kao i moguću transmisiju između slepih miševa različitih skloništa.

## 5.7 Genetički diverzitet i bogatstvo haplotipova odabrane vrste domaćina *M. schreibersii*

Uočena vrednost diverziteta haplotipova na uzorku sekvenci gena *HVI* vrste *M. schreibersii* je relativno visoka, i slična vrednosti dobijenoj na uzorku beskrilnih muva ovog domaćina, dok je vrednost nuklearnog diverziteta niža. Na osnovu *mismatch* analize zaključujemo da je u prošlosti populacija ove vrste imala stabilnu veličinu, a da je u skorijoj istoriji došlo do populacionog rasta. Zvezdasta morfologija mreže haplotipova i dominantna zastupljenost jednog haplotipa (H1) svedoče o mogućem poreklu iz jedinstvenog glacijalnog refugijuma. Ono što je interesantno je da je visok broj “ekskluzivnih” haplotipova, odnosno haplotipova koji su prisutni samo na po jednom lokalitetu uzorkovanja, tako da praktično svaka od pećina ima jedinstven haplotip: Mali kamenolom H9, Petrovaradinska tvrđava H2, H3 i H8, Drenajićka pećina H7, Petnička pećina H4, Toplik H5 i H6. Budući da smo analizom struktuiranosti populacije dobili najveću podržanost za postojanje jedinstvene populacije, ekskluzivnost haplotipova najverovatnije je rezultat nedovoljne veličine uzorka, a ne realna slika populacione strukture, naročito imajući u vidu migratorni potencijal ove vrste i prilike za protok gena barem unutar geografski bliskih lokaliteta unutar iste regije. Lokalitet najbogatiji haplotipovima bila je Petrovaradinska tvrđava, što ponovo potvrđuje ranije podatke dobijene monitoringom, zasnovane na prstenovanju slepih miševa, o vezi ovog i mnoštva drugih lokaliteta u Srbiji (Pejić i sar. 2018).

Poređenjem u ovoj studiji dobijenih, sa prethodno objavljenim sekvencama gena *HVI* ove vrste slepog miša, najčešće prisutan haplotip u našoj studiji (H1) je takođe najčešće prisutan u celom uzorku, uključujući Portugaliju, jugoistočnu Evropu i Tursku. Činjenica da je ovaj haplotip tako široko rasprostranjen, govori u prilog jedinstvenoj metapopulaciji vrste *M. schreibersii* na prostoru celog areala (Gürün i sar. 2019). Haplotip H4 iz ove studije prethodno je pronađen na lokalitetu u Turskoj, a H8 na teritoriji jugoistočne Evrope i Male Azije. Svi ostali haplotipovi iz ove studije (H2, H3, H5, H6, H7 i H9) jedinstveni su za Srbiju, odnosno nisu prethodno detektovani na drugim lokalitetima, i predstavljaju jedinstven doprinos ove studije poznavanju genetičkog diverziteta *Miniopterus schreibersii*. Dobijena divergencija između sekvenci naših i sekvenci proširenog seta odgovara prosečnim stopama divergencije unutar jedne kičmenjačke vrste (Miller-Butterworth i sar. 2003).

## 5.8 Poređenje genetičkog diverziteta odabrane vrste domaćina *M. schreibersii* i njegovih ektoparazita

Poređenje genetičke varijabilnosti unutar i između populacija se često koristi u primenjenoj populacionoj genetici. Iako je u prethodnim analizama u programima Geneland i BAPS dobijeno da ne postoji struktuiranost ni za jednu od proučavanih vrsta iz ove studije, izračunate su matrice *pairwise* genetičkih distanci za domaćina *M. schreibersii*, i parazite *N. schmidlii* i *S. psi*. Rezultati su pokazali negativne vrednosti na više mesta u matricama, koje ukazuju da je unutarpopulaciona varijabilnost bila veća od međupopulacione. Da bi se uporedio značaj asocijacije matrica *pairwise* genetičkih distanci *M. schreibersii* i njegovih ektoparazita, urađen je parcijalni Mantel test. Poređenje parametara genetičke varijanse između domaćinske

vrste i ektoparazita dveju grupa parcijalnim Mantel testom nije dalo statistički značajnu korelaciju ni između *M. schreibersii* i muve *Nycteribia schmidlii*, ni između *M. schreibersii* i grinje *Spinturnix psi*. Kod poređenja sa *S. psi* može se primetiti trend da sa porastom genetičkih razlika kod domaćina, rastu genetičke razlike u populacijama grinja. Ovo se može objasniti činjenicom da grinje nikad ne napuštaju domaćina slepog miša, samim tim su zavisnije od njega, nego što je to slučaj kod beskrlnih muva, koje ipak u nekom momentu moraju da napuste domaćina kako bi položile predlutku na zid skloništa. Tako sredinski faktori koji menjaju genetički diverzitet domaćina istovremeno utiču i na genetički diverzitet grinje. S druge strane, ovde prikazani rezultati upućuju na nepostojanje veze između genetičkog diverziteta beskrlne muve i njenog domaćina. Pored osobina životne istorije koje utiču na genetičku strukturu, i drugi faktori, poput različitih filogenetskih istorija mogu dovesti do razlika u genetičkom diverzitetu poređenih vrsta. Prilikom tumačenja ovih rezultata treba biti oprezan zbog ograničenja nametnutih prirodom seta podataka ove studije. Budući da se radi o uzorcima iz prirodnih populacija, teško je imati savršeno izbalansiran uzorak koji ispunjava sve kriterijume potrebne za statistički podržane analize. Dodatno, kod sve tri vrste imamo podatke dobijene sekvenciranjem različitih mitohondrijskih gena, a preporučljivo je koristiti iste genetičke markere za domaćina i parazita, kada god je to moguće, kako bi se dobilo najviše informacija o njihovoj interakciji u prošlosti (Light i Hafner 2008).

Na populacionom nivou, genetička struktura parazita u bliskoj je vezi sa osobinama životne istorije, kako samog parazita, tako i domaćina, kao i sa socijalnom organizacijom domaćinske vrste. Na dinamiku koadaptacija između domaćina i parazita veoma utiču stopa disperzije (samim tim i protok gena), i genetički drift (van Schaik i sar. 2014). Zato smo želeli da poređenjem strukture populacija i genetičkog diverziteta domaćinske vrste, i dveju vrsta ektoparazita koji pripadaju različitim grupama, beskrlnim muvama i grinjama, i imaju različite osobine životne istorije, reprodukcije i prenošenja, ispitamo da li ovi faktori utiču na dinamiku domaćin-parazit. Mogućnosti su brojne, od toga da paraziti imaju izraženiju strukturu populacija od domaćina (postoji protok gena domaćina, ali ne i parazita) (McCoy i sar. 2005), da domaćin i parazit imaju strukture koje se u potpuno poklapaju, do toga da je veći protok gena između parazita, koji onda ima jedinstvenu populaciju, dok je domaćinska vrsta ipak podeljena na subpopulacije (Gómez-Díaz i sar. 2007). Ipak, i u slučajevima kada postoji uporediv stepen protoka gena i između domaćina i između parazita, genetički drift može značajno da utiče na to kakav će konačni ishod biti, i da poremeti koevolucionu dinamiku (Nuismer i sar. 2010). Budući da je odabrana domaćinska vrsta sklona obrazovanju velikih i gustih kolonija, kao i da je sposobna za migracije na srednje velike udaljenosti, nismo ni očekivali da će imati izraženu genetičku strukturu, pogotovo ne na teritoriji Srbije, kada je pokazano da čak i na mnogo većim distancama ima uniforman genetički diverzitet na osnovu nuklearnih markera – mikrosatelita, odnosno pokazuje struktuiranje na potezu jugoistočna Evropa – Anatolija na osnovu mtDNK markera (Bilgin i sar. 2008, Gürün i sar. 2019). Ipak, zanimalo nas je da li će genetička struktura populacija njegovih parazita pratiti ovaj obrazac, ili će pak, postojati određen stepen diferencijacije među kolonijama različitih geografskih regija gde je uzorkovano. Poređenje parametara genetičkog diverziteta (matrica pairwise genetičkih distanci) između domaćinske vrste i ektoparazita dveju grupa parcijalnim Mantel testom nije dalo statistički značajne korelacije. Kod poređenja sa *S. psi* može se primetiti trend da sa porastom genetičkih razlika kod domaćina, rastu genetičke razlike u populacijama grinja. Ovo se može objasniti činjenicom da grinje nikad ne napuštaju domaćina slepog miša, samim tim su zavisnije od njega, nego što je slučaj kod beskrlnih muva, koje ipak u nekom momentu moraju da napuste domaćina kako bi položile predlutku na zid skloništa. Tako sredinski faktori koji menjaju genetički diverzitet domaćina istovremeno utiču in a genetički diverzitet grinje. S druge strane, ovde prikazani rezultati upućuju na nepostojanje veze između genetičkog diverziteta beskrlne muve i njenog domaćina. Pored osobina životne istorije koje utiču na

genetičku strukturu, i drugi faktori, poput različitih filogenetskih istorija mogu dovesti do razlika u genetičkom diverzitetu poređenih vrsta.

## 6 ZAKLJUČCI

Morfološkom i molekularnom karakterizacijom parazita sa dve vrste domaćina slepih miševa koje dele sklonište, *M. schreibersii* i *R. ferrumequinum*, u ovoj studiji, nije pronađen nijedan slučaj unakrsne infekcije ektoparazitima između ova dva domaćina niti kod beskrilnih muva, niti kod grinja. Dobijeni rezultati ukazuju na izuzetno visoku specifičnost prema domaćinu kod ovih ektoparazita, potvrđujući dodatno specijalizaciju vrsta u obe parazitske grupe ka svom primarnom domaćinu. U opsežnijim studijama i postojećoj literaturi govori se o značajno više preklapanja zajednice parazita između domaćinskih vrsta, pa je upotreba molekularnog barkodinga za potvrdu identiteta vrsta pokazala precizniju karakterizaciju stope ovih sekundarnih infekcija. Ujedno ovo je prva studija koja analizira genetički diverzitet beskrilnih muva i grinja slepih miševa u Srbiji. Detektovan je značajan set novih haplotipova za svih šest proučavanih ektoparazitskih vrsta koji doprinosi referentnoj bazi podataka sa sekvencama gena beskrilnih muva i grinja evropskih vrsta slepih miševa, što je značajno za buduće komparativne analize ektoparazitskih vrsta.

Kod 4 % pregledanih beskrilnih muva, odnosno kod 21 % pregledanih jedinki vrste *P. conspicua*, pronađeni su talusi hiperparazitske gljivice iz roda *Arthrorhynchus* sp., što je u skladu sa prevalencama u prethodno objavljivanim studijama. Očekuje se dobijanje interesantnih rezultata u daljim istraživanjima ove pojave, uključujući i sliku o tome kako su vrste gljivica iz familije Laboulbeniales specijalizovane ka vrstama beskrilnih muva, dodajući još jedan nivo odnosa domaćin – parazit u proučavani sistem.

Kvantitativnom analizom inficiranosti dve domaćinske vrste ektoparazitima pokazano je da je parazitiranost grinjama bila veća nego parazitiranost beskrilnim muvama, što se može objasniti određenim osobinama njihove životne istorije, a naročito reproduktivnim ponašanjem. U skladu sa postavljenom hipotezom, domaćinska vrsta koja formira veće i kompaktnije kolonije, i migrira na veće distance, *M. schreibersii*, imala je veći intenzitet infekcije i diverzitet vrsta beskrilnih muva koje na njoj parazitiraju.

Dobijeni parametri genetičkog diverziteta za vrste beskrilnih muva prikupljenih sa brojnijeg i mobilnijeg domaćina vrste *M. schreibersii*, bili su viši nego za vrste muva sa drugog proučavanog domaćina, *R. ferrumequinum*, što je u skladu sa početnim očekivanjima. Ovaj obrazac, međutim, nije primećen kod grinja, što se delimično može objasniti ograničenom moći upotrebe fragmenata sekvenci jednog gena na ovom nivou poređenja. Iako veličina grupe/kolonije domaćinske vrste, kao i njeno mobilnost, pozitivno utiču na intenzitet infekcije parazitima i njihov diverzitet, postoje i drugi faktori poput: specijalizacije za domaćina, osobine životne istorije parazita, kompeticije među vrstama parazita, vremena provedenog na domaćinu i van njega, i spoljašnjeg okruženja, koji takođe utiču na protok gena i posledično na genetički diverzitet ektoparazita (Matthee 2020). Imajući u vidu njihovu blisku vezu sa domaćinom, diverzitet vrsta i razlike u reproduktivnim osobinama životne istorije, beskrilne muve familije Nycteribiidae i grinje familije Spinturnicidae predstavljaju perspektivan komparativni sistem koji može da pomogne da se dinamika domaćin – parazit dodatno i detaljno istraži.

Rezultati ove studije doprinose novim saznanjima o prevalenci, distribuciji i genetičkom diverzitetu krvnog parazita *Polychromophilus melanipherus* kod evropskih vrsta slepih miševa i vektora, beskrilnih muva iz familije Nycteribiidae. Infekcija je zabeležena kod 32 jedinke beskrilnih muva koje su parazitirale na domaćinu *M. schreibersii*, i to pripadnicama sve tri vrste: *N. schmidlii*, *P. conspicua* i *P. dufourii*. Zabeležen je samo jedan slučaj infekcije

*P. melanipherus* kod vrste muve *Ph. biarticulatum*, koja je parazitirala na domaćinu *R. ferrumequinum*. Potvrđen je značaj upotrebe ektoparazita koji se hrane krvlju u neinvazivnom testiranju populacija slepih miševa na prisustvo infekcija, što predstavlja alternativni pristup u odnosu na klasične studije u kojima se uzorkuje krv domaćina.

Genetički diverzitet odabrane domaćinske vrste, *M. schreibersii*, na našem uzorku je srednje visok, sa parametrima približnim onima uočenim kod njegovih beskrilnih muva, i sa jedinstvenom populacijom bez uočenog struktuiranja, što je bilo i očekivano imajući u vidu biologiju vrste. Ova studija doprinela je sa šest novih, prethodno neobjavljenih haplotipova sa teritorije Srbije, a preostala tri haplotipa su se u potpunosti poklapala sa haplotipovima poreklom iz ostatka Evrope (uključujući i Portugaliju i Tursku) i Male Azije. Poređenje parametara genetičkih distanci populacija ove domaćinske vrste i dveju ektoparazitskih vrsta, muve *N. schmidlii* i grinje *S. psi* nije pokazalo statistički značajnu korelaciju. Bilo bi od značaja dodatno istražiti da li je razlog tome činjenica da korelacija realno ne postoji, ili je to rezultat dobijen usled ograničenja vezanih za veličinu uzorka.

Parazitske vrste svojim ukupnim brojem vrsta čine veliki deo biološkog diverziteta. One održavaju stabilnost i integritet ekosistema i doprinose njegovom funkcionisanju kroz kontrolisanje veličine populacija svojih domaćina (Haelewaters i sar. 2018). Sistemi domaćin-parazit su, zbog svoje kompleksnosti koja je posledica koevolucije, od posebnog značaja za evolutivnu ekologiju, a istraživanja na slepim miševima i njihovim parazitima važna su kako sa aspekta zaštite ugroženih vrsta slepih miševa i njihovih skloništa, tako i iz perspektive ljudskog zdravlja.

## 7 LITERATURA

- Adam, J.P., Landau, I. 1973: Developmental stages of *Polychromophilus* sp., a parasite of insectivorous bats from the Congo-Brazzaville, in the nycteribiid fly *Penicillidia fulvida* Bigot 1889.: Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 67, 5–6.
- Ahn, M., Anderson, D.E., Zhang, Q., Tan, C.W., Lim, B.L., Luko, K., Wen, M., Chia, W.N., Mani, S., Wang, L.C., Ng, J.H.J., Sobota, R.M., Dutertre, C.A., Ginhoux, F., Shi, Z.L., Irving, A.T., Wang, L.F. 2019: Dampened NLRP3-mediated inflammation in bats and implications for a special viral reservoir host.: Nature Microbiology 4, 789–799.
- Alcala, N., Jenkins, T., Christe, P., Vuilleumier, S. 2017: Host shift and cospeciation rate estimation from co-phylogenies.: Ecology Letters 20, 1014–1024.
- Alcalde, J.T., Jiménez, M., Brila, I., Vintulis, V., Voigt, C.C., Pētersons, G. 2021: Transcontinental 2200 km migration of a Nathusius' pipistrelle (*Pipistrellus nathusii*) across Europe.: Mammalia 85, 161–163.
- Altringham, J.D. 2011: Bats: From Evolution to Conservation.: Bats: From Evolution to Conservation, 1–352. New York, Oxford University Press.
- Balloux, F. 2010: The worm in the fruit of the mitochondrial DNA tree.: Heredity 104, 419–420.
- Balvín, O., Ševčík, M., Jahelkova, H., Tomáš, B., Orlava, M., Vilímová, J., Ondřej, B., Martin, Š., Helena, J., Tomáš, B., Maria, O., Jitka, V. 2012: Transport of bugs of the genus *Cimex* (Heteroptera: Cimicidae) by bats in western Palaearctic.: Vespertilio 16, 43–54.
- Bandelt, H.J., Forster, P., Röhl, A. 1999: *Median-joining* networks for inferring intraspecific phylogenies.: Molecular Biology and Evolution 16, 37–48.
- Baulechner, D., Becker, N.I., Encarnação, J.A. 2013: Host specificity in spinturnicid mites: do parasites share a long evolutionary history with their host?: Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research 51, 203–212.
- Beebe, T., Rowe, G. 2004: Population genetics. An introduction to molecular ecology, 111–142. New York, Oxford University Press.
- Bennett, A.J., Paskey, A.C., Kuhn, J.H., Bishop-Lilly, K.A., Goldberg, T.L. 2020: Diversity, transmission, and cophylogeny of ledanteviruses (Rhabdoviridae: Ledantevirus) and nycteribiid bat flies parasitizing angolan soft-furred fruit bats in Bundibugyo district, Uganda.: Microorganisms 8, 750.
- Bilgin, R., Gürün, K., Maracı, Ö., Furman, A., Hulva, P., Çoraman, E., Lučan, R.K., Bartonička, T., Horáček, I. 2012: Syntopic occurrence in Turkey supports separate species status for *Miniopterus schreibersii schreibersii* and *M. schreibersii pallidus* (Mammalia: Chiroptera):. Acta Chiropterologica 14, 279–289.
- Bilgin, R., Gürün, K., Rebelo, H., Puechmaile, 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?: Molecular Phylogenetics and Evolution 99, 323–336.
- Bilgin, R., Karataş, A., Çoraman, E., Disotell, T., Morales, J. 2008: Regionally and climatically restricted patterns of distribution of genetic diversity in a migratory bat species, *Miniopterus schreibersii* (Chiroptera: Vespertilionidae):. BMC Evolutionary Biology 8, 209.
- Bilgin, R., Karataş, A., Çoraman, E., Pandurski, I., Papadatou, E., Morales, J.C. 2006: Molecular taxonomy and phylogeography of *Miniopterus schreibersii* (Kuhl, 1817)

- (Chiroptera: Vespertilionidae), in the Eurasian transition.: Biological Journal of the Linnean Society 87, 577–582.
- Blackwell, M. 1980: Incidence, host specificity, distribution, and morphological variation in *Arthrorhynchus nycteribiae* and *A. eucampsipodae* (Laboulbeniomyces): Mycologia 72, 143.
- Borner, J., Pick, C., Thiede, J., Kolawole, O.M., Kingsley, M.T., Schulze, J., Cottontail, V.M., Wellinghausen, N., Schmidt-Chanasit, J., Bruchhaus, I., Burmester, T. 2016: Phylogeny of haemosporidian blood parasites revealed by a multi-gene approach.: Molecular Phylogenetics and Evolution 94, 221–231.
- Boyles, J.G., Johnson, J.S., Blomberg, A., Lilley, T.M. 2020: Optimal hibernation theory.: Mammal Review 50, 91–100.
- Bruyndonckx, N., Dubey, S., Ruedi, M., Christe, P. 2009a: Molecular cophylogenetic relationships between European bats and their ectoparasitic mites (Acari, Spinturnicidae): Molecular Phylogenetics and Evolution 51, 227–237.
- Bruyndonckx, N., Dubey, S., Ruedi, M., Christe, P. 2009b: Molecular phylogenetics and evolution molecular cophylogenetic relationships between European bats and their ectoparasitic mites (Acari, Spinturnicidae): Molecular Phylogenetics and Evolution 51, 227–237.
- Bruyndonckx, N., Henry, I., Christe, P., Kerth, G. 2009: Spatio-temporal population genetic structure of the parasitic mite *Spinturnix bechsteini* is shaped by its own demography and the social system of its bat host.: Molecular Ecology 18, 3581–3592.
- Bücs, S., Csósz, I., Jére, C., Bartha, C. 2015: New data regarding the status and distribution of Horseshoe bats (genus *Rhinolophus*) in karst areas of Southern Romania. In: Popa, L. O., Adam, C., Chişamera, G., Iorgu, E., Murariu, D., Popa, O. P. (eds.), International Zoological Congress of “Grigore Antipa” Museum, 350. Bucharest.
- Bücs, S.L., Csósz, I., Barti, L., Budinski, I., Pejić, B., Bogosavljević, J., Gönczi Vass, I., Szigeti, M., Bodea, F.V., Dumbravă, A., Jumanca, M., Jére, C. 2021: The bat fauna of the Banat region: migration and cross-border conservation.: Abstract book of the 13th Hungarian Bat Conference, 2021 Oct 15-17; Lakitelek, Hungary. Budapest (Hungary): Hungarian Biological Society, 5-6.
- Budinski, I., Pejić, B., Paunović, M., Karapandža, B., Josipović, J. 2018: Evropski dugokrilaš, *Miniopterus schreibersii*, Schreiber’s bent-winged bat. In: Stanković, D., Paunović, M., Raković, M. (eds.), Atlas migratornih ptica i slepih miševa Srbije, 513–522. Beograd, Ministarstvo zaštite životne sredine Republike Srbije, Ministarstvo kulture i informisanja Republike Srbije, Prirodnjački muzej u Beogradu.
- Burazerović, J. 2017: Rasprostranjenje, diverzitet i struktura zajednica ektoparazita litofilnih slepih miševa (Chiroptera) centralnog Balkana. Univerzitet u Beogradu.
- Burazerović, J., Čakić, S., Mihaljica, D., Sukara, R., Ćirović, D., Tomanović, S. 2015: Ticks (Acari: Argasidae, Ixodidae) parasitizing bats in the central Balkans.: Experimental and Applied Acarology 66, 281–291.
- Burazerović, J., Orlova, M., Obradović, M., Ćirović, D., Tomanović, S. 2018: Patterns of abundance and host specificity of bat ectoparasites in the Central Balkans.: Journal of Medical Entomology 55, 20–28.
- Bush, A.O., Lafferty, K.D., Lotz, J.M., Shostak, A.W. 1997: Parasitology meets ecology on its own terms: Margolis et al. revisited.: Journal of Parasitology 83, 575–583.
- Ćalić, J. 2015: Speleološki objekti Nacionalnog parka Đerdap. Donji Milanovac, JP “Nacionalni park Đerdap.”
- Calisher, C.H., Childs, J.E., Field, H.E., Holmes, K. V., Schountz, T. 2006: Bats : Important reservoir hosts of emerging viruses.: Clinical Microbiology Reviews 19, 531–545.
- Caporale, D.A., Rich, S.M., Spielman, A., Telford, S.R., Kocher, T.D. 1995: Discriminating

- between ixodes ticks by means of mitochondrial DNA sequences.: *Molecular Phylogenetics and Evolution* 4, 361–365.
- Christe, P., Giorgi, M.S., Vogel, P., Arlettaz, R. 2003: Differential species-specific ectoparasitic mite intensities in two intimately coexisting sibling bat species: resource-mediated host attractiveness or parasite specialization?: *Journal of Animal Ecology* 72, 866–872.
- Chumnandee, C., Pha-Obnga, N., Werb, O., Matuschewski, K., Schaer, J. 2021: Molecular characterization of *Polychromophilus* parasites of *Scotophilus kuhlii* bats in Thailand.: *Parasitology* 148, 495–499.
- Clare, E.L., Lim, B.K., Fenton, M.B., Hebert, P.D.N. 2011: Neotropical bats: Estimating species diversity with DNA barcodes.: *PLoS ONE* 6, 0022648.
- Combes, C. 2001: *Parasitism: The ecology and evolution of intimate interactions*, Chicago, University of Chicago Press.
- Corander, J., Sirén, J., Arjas, E. 2008: Bayesian spatial modeling of genetic population structure.: *Computational Statistics* 23, 111–129.
- Crichton, E.G., Krutzsch, P.H. 2000: *Reproductive biology of bats* Crichton, E. G., Krutzsch, P. H. (eds.): New York, Academic Press.
- Criscione, C.D. 2008: Parasite co-structure: broad scale and local scale approaches.: *Parasite Journal* 15, 439–443.
- Czenze, Z.J., Broders, H.G. 2011: Ectoparasite community structure of two bats (*Myotis lucifugus* and *M. septentrionalis*) from the maritimes of Canada.: *Journal of Parasitology Research* 2011, 341535.
- Đan, M., Maletić, V., Trbojević, I., Popović, D., Veličković, N., Burazerović, J., Ćirović, D. 2014: Genetic diversity and structuring of the grey wolf population from the Central Balkans based on mitochondrial DNA variation.: *Mammalian Biology* 79, 277–282.
- Dekeukeleire, D., Janssen, R., Haarsma, A.-J., Bosch, T., van Schaik, J. 2016: Swarming behaviour, catchment area and seasonal movement patterns of the Bechstein's bats: Implications for conservation.: *Acta Chiropterologica* 18, 349–358.
- Dick, C.W., Patterson, B.D. 2007: Against all odds: Explaining high host specificity in dispersal-prone parasites.: *International Journal for Parasitology* 37, 871–876.
- Dick, C.W., Patterson, B.D. 2006: Bat flies: Obligate ectoparasites of bats. In: Morand, S., Krasnov, B. R., R, P. (eds.), *Micromammals and Macroparasites*, 179–194. Tokyo, Springer Japan.
- Dick, C.W., Pospischil, R. 2015: Nycteribiidae (Bat flies). In: Mehlhorn, H. (ed.), *Encyclopedia of Parasitology*. Springer, Berlin, Heidelberg.
- Dietrich, M., Tjale, M.A., Weyer, J., Kearney, T., Seamark, E.C.J., Nel, L.H., Monadjem, A., Markotter, W. 2016: Diversity of *Bartonella* and *Rickettsia* spp. in bats and their blood-feeding ectoparasites from South Africa and Swaziland.: *PLoS ONE* 11, 0152077.
- Dietz, C., Kiefer, A. 2016: *Bats of Britain and Europe*, Bloomsbury publishing.
- Dionisi, A. 1899: Malaria in species of pipistrelle bats.: *Atti Societa Studi Malaria* 1, 133–173.
- Dittmar, K., Porter, M.L., Murray, S., Whiting, M.F. 2006: Molecular phylogenetic analysis of nycteribiid and streblid bat flies (Diptera: Brachycera, Calyptratae): Implications for host associations and phylogeographic origins.: *Molecular Phylogenetics and Evolution* 38, 155–170.
- Đurovic, P. 2018: Karst areas in Serbia. Retrieved November 4, 2022 from <https://www.asak.org.rs/karst/srkarst.html>.
- Duval, L., Mejean, C., Maganga, G.D., Makanga, B.K., Mangama Koumba, L.B., Peirce, M.A., Ariey, F., Bourgarel, M. 2012: The chiropteran haemosporidian *Polychromophilus melanipherus*: A worldwide species complex restricted to the family Miniopteridae.: *Infection, Genetics and Evolution* 12, 1558–1566.
- Duval, L., Robert, V., Csorba, G., Hassanin, A., Randrianarivelojosia, M., Walston, J., Nhim,

- T., Goodman, S.M., Arley, F. 2007: Multiple host-switching of Haemosporidia parasites in bats.: *Malaria Journal* 6, 157.
- Edgar, R.C. 2004: MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput.: *Nucleic Acids Research* 32, 1792–1797.
- Estrada-Peña, A., Serra-Cobo, J., Estrada-Peña, A., Serra-Cobo, J., Estrada-Peña, A., Serra-Cobo, J. 1991: The acarinia and nycteribidia zones of *Miniopterus schreibersii* Kuhl (Mammalia: Chiroptera) in the northeast of Spain.: *Folia parasitologica* 38, 345–354.
- Excoffier, L., Lischer, H.E.L. 2010: Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows.: *Molecular Ecology Resources* 10, 564–567.
- Fagundes, R., Antonini, Y., Aguiar, L.M.S. 2017: Overlap in cave usage and period of activity as factors structuring the interactions between bats and ectoparasites.: *Zoological Studies* 56, 22.
- Folmer, O., Black, M., Hoeh, W., Lutz, R., Vrijenhoek, R. 1994: DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates.: *Molecular marine biology and biotechnology* 3, 294–299.
- Fraser, E.E., McGuire, L.P. 2023: Prehibernation swarming in temperate bats: a critical transition between summer activity and hibernation.: *Canadian Journal of Zoology*, 0129.
- Furman, A., Çoraman, E., Bilgin, R., Karataş, A. 2009: Molecular ecology and phylogeography of the bent-wing bat complex (*Miniopterus schreibersii*) (Chiroptera: Vespertilionidae) in Asia Minor and adjacent regions.: *Zoologica Scripta* 38, 129–141.
- Furman, A., Postawa, T., Öztunç, T., Çoraman, E. 2010: Cryptic diversity of the bent-wing bat, *Miniopterus schreibersii* (Chiroptera: Vespertilionidae), in Asia Minor.: *BMC Evolutionary Biology* 10, 121.
- Gardner, R.A., Molyneux, D.H. 1988: *Polychromophilus murinus*: A malarial parasite of bats: life-history and ultrastructural studies.: *Parasitology* 96, 591–605.
- Gardner, S.L., Jimenez-Ruiz, A.F. 1982: Methods for the study of bat endoparasites. In: Kunz, T. H. (ed.), *Ecology of Bats*, 795–806. Springer New York, NY.
- Garnham, P.C. 1973: The zoogeography of *Polychromophilus* and description of a new species of a gregarine (*Lankesteria galliardi*): *Annales de parasitologie humaine et comparée* 48, 231–242.
- Garnham, P.C.C. 1966: *Malaria parasites and other haemosporidia*.: Blackwell Scientific.
- Gazaryan, S., Bücs, S., Çoraman, E. 2020: *Miniopterus schreibersii* (Schreiber's Bent-winged Bat), *Miniopterus schreibersii* (errata version published in 2021). The IUCN Red List of Threatened Species . Retrieved March 25, 2021 from <https://www.iucnredlist.org/species/81633057/195856522#geographic-range>.
- Giorgi, M.S., Arlettaz, R., Guillaume, F., Nusslé, S., Ossola, C., Vogel, P., Christe, P. 2004: Causal mechanisms underlying host specificity in bat ectoparasites.: *Oecologia* 138, 648–654.
- Godlevska, L. 2018: Ukraine. National Implementation Report to EUROBATS MOP8,.
- Gómez-Díaz, E., González-Solís, J., Peinado, M.A., Page, R.D.M. 2007: Lack of host-dependent genetic structure in ectoparasites of *Calonectris* shearwaters.: *Molecular Ecology* 16, 5204–5215.
- Goodall-Copestake, W.P., Tarling, G.A., Murphy, E.J. 2012: On the comparison of population-level estimates of haplotype and nucleotide diversity: A case study using the gene *cox1* in animals.: *Heredity* 109, 50–56.
- de Groot, M., Dumolein, I., Hiller, T., Sandor, A.D., Szentiványi, T., Schilthuizen, M., Aime, C., Verbeken, A., Haelewaters, D. 2020: On the fly: Tritrophic associations of bats, bat flies, and fungi.: *Journal of Fungi*, 6, 361.
- Guillot, G., Mortier, F., Estoup, A. 2005: GENELAND: A computer package for landscape



- genetics.: *Molecular Ecology Notes* 5, 712–715.
- 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.: *Journal of Mammalogy* 100, 1865-1878.
- Haelewaters, D., Dick, C.W., Cocherán Pittí, K.P., Dittmar, K., Patterson, B.D. 2020: Bats, bat flies, and fungi: Exploring uncharted waters.: 50 years of bat research. *Foundations and new frontiers: fascinating life sciences*, 349–371.
- Haelewaters, D., Hiller, T., Dick, C.W. 2018: Bats, bat flies, and fungi: A case of hyperparasitism.: *Trends in Parasitology* 34, 784–799.
- Haelewaters, D., Pfliegler, W.P., Szentiványi, T., Földvári, M., Sándor, A.D., Barti, L., Camacho, J.J., Gort, G., Estók, P., Hiller, T., Dick, C.W., Pfister, D.H. 2017: Parasites of parasites of bats: Laboulbeniales (Fungi: Ascomycota) on bat flies (Diptera: Nycteribiidae) in central Europe.: *Parasites and Vectors* 10, 96.
- Hart, B.L. 1992: Behavioral adaptations to pathogens and parasites: an ethological approach.: *J Parasitol.* 72, 256–265.
- Hebert, P.D.N., Ratnasingham, S., DeWaard, J.R. 2003: Barcoding animal life: Cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species.: *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 270, 96-99.
- Ter Hofstede, H.M., Fenton, M.B., Whitaker, J.O. 2004: Host and host-site specificity of bat flies (Diptera: Streblidae and Nycteribiidae) on Neotropical bats (Chiroptera):. *Canadian Journal of Zoology* 82, 616–626.
- Hosokawa, T., Nikoh, N., Koga, R., Satô, M., Tanahashi, M., Meng, X.Y., Fukatsu, T. 2012: Reductive genome evolution, host-symbiont co-speciation and uterine transmission of endosymbiotic bacteria in bat flies.: *ISME Journal* 6, 577–587.
- Humphrey, S.R. 1975: Nursery roosts and community diversity of Nearctic bats.: *Journal of Mammalogy* 56, 321–346.
- Hutson, A.M. 1984: Keds, flat-flies and bat-flies. Diptera, Hippoboscidae and Nycteribiidae. In: Fitton, M. G. (ed.), *Handbooks for the identification of British insects*, 44. London, Royal entomological society of London.
- Hutson, T., Spitzenberger, F., Juste, J., Aulagnier, S., Fernandes, M., Alcalde, J.T. 2007: *Rhinolophus ferrumequinum* (Greater Horseshoe Bat). Retrieved March 4, 2022 from <https://www.iucnredlist.org/species/19517/8948327>.
- Hutterer, R., Ivanova, T., Meyer-Cord, C., Rodrigues, L. 2005: Bat migrations in Europe.: *Naturschutz und Biologische Vielfalt* 28. Federal Agency for Nature Conservation in Germany.
- Imaz, E., Aihartza, J.R., Totorika, M.J. 1999: Ectoparasites on bats (Gamasida, Ixodida, Diptera) in Biscay (N Iberian peninsula):. *Miscellanea Zoologica* 22, 21–30.
- Ivanova-Aleksandrova, N., Dundarova, H., Boyko 2022: Ectoparasites of cave-dwelling bat species in Bulgaria.: *Proceedings of the Zoological Society* 75, 463-468.
- Jones, G., Teeling, E.C. 2006: The evolution of echolocation in bats.: *Trends in Ecology & Evolution* 21, 149–156.
- 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.: *Emerging Microbes and Infections* 7, 67–70.
- Kemenesi, G., Tóth, G.E., Mayora-Neto, M., Scott, S., Temperton, N., Wright, E., Mühlberger, E., Hume, A.J., Suder, E.L., Zana, B., Boldogh, S.A., Görföl, T., Estók, P., Lanszki, Z., Somogyi, B.A., Nagy, Á., Pereszlényi, C.I., Dudás, G., Földes, F., Kurucz, K., Madai, M.,

- Zeghib, S., Maes, P., Vanmechelen, B., Jakab, F. 2022: Isolation of infectious *Lloviu* virus from Schreiber's bats in Hungary.: *Nature Communications* 2022 13:1 13, 1–11.
- Kerth, G. 2008: Causes and consequences of sociality in bats.: *BioScience* 58, 737–746.
- Kerth, G., Keifer, A., Trappmann, C., Weishaar, M., Kiefer, A., Trappmann, C., Weishaar, M. 2003: High gene diversity at swarming sites suggest hot spots for gene flow in the endangered Bechstein's bat.: *Conservation Genetics* 4, 491–499.
- Kerth, G., Mayer, F., König, B. 2000: Mitochondrial DNA (mtDNA) reveals that female Bechstein's bats live in closed societies.: *Molecular Ecology* 9, 793–800.
- Klaschka, J., Reiczigel, J. 2021: On matching confidence intervals and tests for some discrete distributions: methodological and computational aspects.: *Computational Statistics* 36, 1775–1790.
- Korine, C. 2016: *Rousettus aegyptiacus*. The IUCN Red List of Threatened Species. Retrieved April 26, 2023 from <https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2016-2.RLTS.T29730A22043105.en>.
- Kornobis, E., PÁLsson, S., Kristjánsson, B.K., Svavarsson, J. 2010: Molecular evidence of the survival of subterranean amphipods (Arthropoda) during Ice Age underneath glaciers in Iceland.: *Molecular Ecology* 19, 2516–2530.
- Krasnov, B.R., Fortuna, M.A., Mouillot, D., Khokhlova, I.S., Shenbrot, G.I., Poulin, R. 2012: Phylogenetic signal in module composition and species connectivity in compartmentalized host-parasite networks.: *American Naturalist* 179, 501–511.
- Krištofik, J., Danko, Š. 2012: Arthropod ectoparasites (Acarina, Heteroptera, Diptera, Siphonaptera) of bats in Slovakia.: *Vespertilio* 16, 167–189.
- Kryštufek, B., Reed, J. 2004: Pattern and process in Balkan biodiversity — An overview. In: Griffiths, H. I., Kryštufek, B., Reed, J. M. (eds.), *Balkan biodiversity. Pattern and process in the European hotspot*, 1–8. Springer Netherlands.
- Kunz, T.H., Hood, W.R. 2000: Parental care and postnatal growth in the Chiroptera. In: Crichton, E. G., Krutzsch, P. H. (eds.), *Reproductive biology of bats*, 415–468. Academic Press, New York.
- Kyheröinen, E.M., Aulagnier, S., Dekker, J., Dubourg-Savage, M.-J., Ferrer, B., Gazaryan, S., Georgiakakis, P., Hamidovic, D., Harbusch, C., Haysom, K., Jahelková, H., Kervyn, T., Koch, M., Lundy, M., Marnell, F., Mitchell-Jones, A., Pir, J., Russo, D., Schofield, H., Syvertsen, P.O., Tsoar, A. 2019: Guidance on the conservation and management of critical feeding areas and commuting routes for bats.: EUROBATS.
- Lagunas-Rangel, F.A. 2020: Why do bats live so long?—Possible molecular mechanisms.: *Biogerontology* 21, 1–11.
- Landau, I., Rosin, G., Milgen, F., Leger, N., Mialhe, E. 1977: The schizogony of *Polychromophilus* (Haemoproteidae), cosmopolitan parasite of Microchiroptera.: *C R Acad Hebd Seances Acad Sci D*. 285, 1311–1313.
- Lanza, B. 1999: I parassiti dei pipistrelli (Mammalia, Chiroptera) della fauna italiana.: Torino, Museo regionale di scienze naturali.
- Latch, E.K., Dharmarajan, G., Glaubitz, J.C., Rhodes, O.E. 2006: Relative performance of Bayesian clustering software for inferring population substructure and individual assignment at low levels of population differentiation.: *Conservation Genetics* 7, 295–302.
- Light, J.E., Hafner, M.S. 2008: Codivergence in heteromyid rodents (Rodentia: Heteromyidae) and their sucking lice of the genus *Fahrenholzia* (Phthiraptera: Anoplura).: *Syst. Biol* 57, 449–465.
- Lively, C.M. 2001: Parasite-host interactions. In: Fox, C. W., Roff, D. A., Fairbairn, D. J. (eds.), *Evolutionary Ecology. Concepts and case studies*, 290–302. New York, Oxford University Press.
- Lourenço, S., Palmeirim, J.M. 2008: Which factors regulate the reproduction of ectoparasites

- of temperate-zone cave-dwelling bats?: *Parasitology Research* 104, 127–134.
- Lourenço, S.I., Palmeirim, J.M. 2008: How do ectoparasitic nycteribiids locate their bat hosts?: *Parasitology* 135, 1205–1213.
- Lu, M., Wang, X., Ye, H., Wang, H., Qiu, S., Zhang, H., Liu, Y., Luo, J., Feng, J. 2021: Does public fear that bats spread COVID-19 jeopardize bat conservation?: *Biological Conservation* 254, 108952.
- Lučan, R.K. 2006: Relationships between the parasitic mite *Spinturnix andegavinus* (Acari: Spinturnicidae) and its bat host, *Myotis daubentonii* (Chiroptera: Vespertilionidae): seasonal, sex- and age-related variation in infestation and possible impact of the parasit.: *Folia parasitologica* 53, 147–152.
- Lučan, R.K., Bandouchova, H., Bartonička, T., Pikula, J., Zahradnikova Jr, A., Zukal, J., Martinkova, N. 2016: Ectoparasites may serve as vectors for the white-nose syndrome fungus.: *Parasites & Vectors* 9, 16.
- Lutz, H.L., Patterson, B.D., Kerbis Peterhans, J.C., Stanley, W.T., Webala, P.W., Gnoske, T.P., Hackett, S.J., Stanhope, M.J. 2016: Diverse sampling of East African haemosporidians reveals chiropteran origin of malaria parasites in primates and rodents.: *Molecular phylogenetics and evolution* 99, 7–15.
- Mangold, A.J., Bargues, M.D., Mas-Coma, S. 1998: Mitochondrial 16S rDNA sequences and phylogenetic relationships of species of *Rhipicephalus* and other tick genera among Metastriata (Acari: Ixodidae).: *Parasitology Research* 84, 478–484.
- Marshall, A.G. 1982: Ecology of insects ectoparasitic on bats. In: Kunz, T. H. (ed.), *Ecology of bats*, 369–401. Springer, Boston, MA.
- Martinsen, E.S., Perkins, S.L., Schall, J.J. 2008: A three-genome phylogeny of malaria parasites (*Plasmodium* and closely related genera): evolution of life-history traits and host switches.: *Molecular phylogenetics and evolution* 47, 261–273.
- Matthee, C.A. 2020: The Influence of host dispersal on the gene flow and genetic diversity of generalist and specialist ectoparasites.: *African Zoology* 55, 119–126.
- McCoy, K.D., Boulinier, T., Tirard, C. 2005: Comparative host-parasite population structures: Disentangling prospecting and dispersal in the black-legged kittiwake *Rissa tridactyla*.: *Molecular Ecology* 14, 2825–2838.
- McKee, C.D., Bai, Y., Webb, C.T., Kosoy, M.Y. 2021: Bats are key hosts in the radiation of mammal-associated *Bartonella* bacteria.: *Infection, Genetics and Evolution* 89, 104719.
- McKee, C.D., Krawczyk, A.I., Sándor, A.D., Görföl, T., Földvári, M., Földvári, G., Dekeukeleire, D., Haarsma, A.-J., Kosoy, M.Y., Webb, C.T., Sprong, H. 2019: Host phylogeny, geographic overlap, and roost sharing shape parasite communities in European bats.: *Frontiers in Ecology and Evolution* 7, 00069.
- Megali, A., Yannic, G., Christe, P. 2011: Disease in the dark: Molecular characterization of *Polychromophilus murinus* in temperate zone bats revealed a worldwide distribution of this malaria-like disease.: *Molecular Ecology* 20, 1039–1048.
- Melaun, C., Werblow, A., Busch, M.W., Liston, A., Klimpel, Sven 2014: Bats as potential reservoir hosts for vector-borne diseases. In: Klimpel, S., Mehlhorn, H. (eds.), *Bats (Chiroptera) as vectors of diseases and parasites*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Mer, G., Goldblum, N. 1947: A haemosporidian of bats.: *Nature* 159, 1947.
- Miller-Butterworth, C.M., Jacobs, D.S., Harley, E.H. 2003: Strong population substructure is correlated with morphology and ecology in a migratory bat.: *Science* 424, 187–191.
- Mirić, Đ. 1960: Slepí miševi (Chiroptera) Petrovaradinske tvrđave.: *Bulletin du Museum d'histoire naturelle serie B*, 135–175.
- Mollentze, N., Streicker, D.G. 2020: Viral zoonotic risk is homogenous among taxonomic orders of mammalian and avian reservoir hosts.: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 117, 9423–9430.

- Moussy, C., Hosken, D.J., Mathews, F., Smith, G.C., Aegerter, J.N., Bearhop, S. 2012: Migration and dispersal patterns of bats and their influence on genetic structure.: *Mammal Review* 43, 183–195.
- Nardone, V., Cistrone, L., Di Salvo, I., Ariano, A., Migliozi, A., Allegrini, C., Ancillotto, L., Fulco, A., Russo, D. 2015: How to be a male at different elevations: ecology of intra-sexual segregation in the trawling bat *Myotis daubentonii*.: *PLOS ONE* 10, 0134573.
- Nuismer, S.L., Gomulkiewicz, R., Ridenhour, B.J. 2010: When is correlation coevolution?: *American Naturalist* 175, 525–537.
- Obame-Nkoghe, J., Rahola, N., Bourgarel, M., Yangari, P., Prugnolle, F., Maganga, G.D., Leroy, E.M., Fontenille, D., Ayala, D., Paupy, C. 2016: Bat flies (Diptera: Nycteribiidae and Streblidae) infesting cave-dwelling bats in Gabon: Diversity, dynamics and potential role in *Polychromophilus melanipherus* transmission.: *Parasites and Vectors* 9, 333.
- Olival, K.J. 2012: Evolutionary and ecological correlates of population genetic structure in bats. In: Gunnell, G. F., Simmons, N. B. (eds.), *Evolutionary History of Bats: Fossils, Molecules and Morphology*, 267–316. Cambridge University Press.
- Olival, K.J. 2016: To cull, or not to cull, bat is the question.: *EcoHealth* 13, 6–8.
- Olival, K.J., Dick, C.W., Simmons, N.B., Morales, J.C., Melnick, D.J., Dittmar, K., Perkins, S.L., Daszak, P., Desalle, R. 2013: Lack of population genetic structure and host specificity in the bat fly, *Cyclopodia horsfieldi*, across species of *Pteropus* bats in Southeast Asia.: *Parasites and Vectors* 6, 231.
- Orlova, M. V., Orlov, O.L., Kazakov, D. V., Zhigalin, A. V. 2018: Peculiarities of the seasonal biology of ectoparasites of the genus *Spinturnix* von Heyden, 1826 (Mesostigmata: Gamasina: Spinturnicidae) in the boreal zone of the Palearctic region.: *Biology Bulletin* 45, 359–367.
- Patterson, B.D., Dick, C.W., Dittmar, K. 2007: Roosting habits of bats affect their parasitism by bat flies (Diptera: Streblidae).: *Journal of Tropical Ecology* 23, 177–189.
- Patterson, J.E.H., Ruckstuhl, K.E. 2013: Parasite infection and host group size: a meta-analytical review.: *Parasitology* 140, 803–813.
- Paunović, M. 2004: Vernjickica cave - the important winter roost of bats (Mammalia, Chiroptera) in Serbia. *Srpska akademija nauka i umetnosti*.
- Paunović, M. 2016: Rasprostranjenje, ekologija i centri diverziteta slepih miševa (Mammalia, Chiroptera) u Srbiji.: Ph.D. thesis. University of Belgrade.
- Paunović, M., Karapandža, B., Budinski, I., Stamenković, S. 2020: Fauna slepih miševa (Mammalia, Chiroptera) Srbije. In: Petanović, R. (ed.), *Posebna izdanja, knjiga 693, Odeljenje hemijskih i bioloških nauka, knjiga 13*. Srpska akademija nauka i umetnosti, Prirodnački muzej u Beogradu.
- Pejić, B., Budinski, I. 2021: Neobične putanje Evropskog dugokrilaša, *Miniopterus schreibersii* iz i u podzemni kamenolom Dardagani. In: Mulaomerović, J. (ed.), *Drugi susreti ljubitelja šišmiša*, 20–21. Sarajevo, Centar za krš i speleologiju.
- Pejić, B., Budinski, I., Karapandža, B., Paunović, M. 2018a: More than 60 years of ringing *Miniopterus schreibersii* (Kuhl, 1817) in Serbia: Movements and longevity data. In: Mulaomerović, J. (ed.), *Regional Symposium “Conservation Status of Bats in Central Europe and Western Balkan.”* Sarajevo, 31.5.-1.6.2018, Centar za krš i speleologiju.
- Pejić, B., Budinski, I., Karapandža, B., Paunović, M. 2017: The first record of European free-tailed bat *Tadarida teniotis* (Rafinesque, 1814) in Serbia.: *Bulletin of the Natural History Museum* 44, 105–111.
- Pejić, B., Budinski, I., Paunović, M., Karapandža, B., Josipović, J. 2018b: Veliki potkovičar, *Rhinolophus ferrumequinum*, Greater horseshoe bat. In: Stanković, D., Paunović, M., Raković, M. (eds.), *Atlas migratornih ptica i slepih miševa Srbije*, 472–477. Beograd, Ministarstvo zaštite životne sredine Republike Srbije, Ministarstvo kulture i informisanja

- Republike Srbije, Prirodnjački muzej u Beogradu.
- Pejić, B., Budinski, I., van Schaik, J., Blagojević, J. 2022: Sharing roosts but not ectoparasites: high host-specificity in bat flies and wing mites of *Miniopterus schreibersii* and *Rhinolophus ferrumequinum* (Mammalia: Chiroptera) .: *Current Zoology* 68, 507–516.
- Perkins, S.L., Schaer, J. 2016: A modern menagerie of mammalian malaria.: *Trends in Parasitology* 32, 772–782.
- Perkins, S.L., Schall, J. 2002: A molecular phylogeny of malarial parasites recovered from cytochrome b gene sequences.: *Journal of Parasitology* 88, 972–978.
- Peterman, R., Schall, O. 2018: Germany. National Implementation Report to EUROBATS MOP8,.
- Piraccini, R. 2016: *Rhinolophus ferrumequinum* (Greater Horseshoe Bat), *Rhinolophus ferrumequinum*. The IUCN Red List of Threatened Species. Retrieved March 25, 2021 from <https://www.iucnredlist.org/species/19517/21973253>.
- Podlutzky, A.J., Khritankov, A.M., Ovodov, N.D., Austad, S.N. 2005: A New Field Record for Bat Longevity.: *The Journals of Gerontology: Series A* 60, 1366–1368.
- Poinar, G., Brown, A. 2012: The first fossil streblid bat fly, *Enischnomyia stegosoma* n. g., n. sp. (Diptera: Hippoboscoidea: Streblidae).: *Systematic Parasitology* 81, 79–86.
- Popa-Lisseanu, A.G., Voigt, C.C. 2009: Bats on the move.: *Journal of Mammalogy* 90, 1283–1289.
- Postawa, T., Furman, A. 2014: Abundance patterns of ectoparasites infesting different populations of *Miniopterus* species in their contact zone in Asia Minor.: *Acta Chiropterologica* 16, 387–395.
- Poulin, R. 2007: *Evolutionary Ecology of Parasites*. 8–40. Princeton University Press.
- Poulin, R., Krasnov, B.R., Morand, S. 2006: Patterns of host specificity in parasites exploiting small mammals.: *Micromammals and Macroparasites: From Evolutionary Ecology to Management*, 233–256.
- Presetnik, P., Budinski, I., Hodžić, M., Mulaomerović, J. 2017: *Miniopterus schreibersii* migration. 7. 5. 2016, Petrovaradin (Serbia) – 19. 2. 2017, Dardagani- Zvornik (Bosnia and Herzegovina).: *Hypsugo* II, 50–51.
- Presley, S.J. 2011: Interspecific aggregation of ectoparasites on bats: importance of hosts as habitats supersedes interspecific interactions.: *Oikos* 120, 832–841.
- Protected Bat Species | UNEP/EUROBATS: Retrieved November 4, 2022 from [https://www.eurobats.org/about\\_eurobats/protected\\_bat\\_species](https://www.eurobats.org/about_eurobats/protected_bat_species).
- Puechmaille, S.J., Allegrini, B., Benda, P., Gürün, K., Šrámek, J., Ibañez, C., Juste, J., Bilgin, R. 2014: A new species of the *Miniopterus schreibersii* species complex (Chiroptera: Miniopteridae) from the Maghreb region, North Africa.: *Zootaxa* 3794, 108–124.
- Qiu, Y., Kajihara, M., Nakao, R., Mulenga, E., Harima, H., Hang'ombe, B.M., Eto, Y., Changula, K., Mwizabi, D., Sawa, H., Higashi, H., Mweene, A., Takada, A., Simuunza, M., Sugimoto, C. 2020: Isolation of candidatus *Bartonella rousseti* and other bat-associated bartonellae from bats and their flies in Zambia.: *Pathogens* 9, 469.
- Ramasindrazana, B., Goodman, S.M., Dsouli, N., Gomard, Y., Lagadec, E., Randrianarivelosoa, M., Dellagi, K., Tortosa, P. 2018: *Polychromophilus* spp. (Haemosporida) in Malagasy bats: Host specificity and insights on invertebrate vectors.: *Malaria Journal* 17, 318.
- Ramasindrazana, B., Goodman, S.M., Gomard, Y., Dick, C.W., Tortosa, P. 2018: Hidden diversity of Nycteribiidae (Diptera) bat flies from the Malagasy region and insights on host-parasite interactions.: *Parasites & Vectors* 10, 630.
- Ramos Pereira, M.J., 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?: *Journal of Heredity* 100, 533–544.

- Ransome, R.D., Hutson, A.M. 2000: Action plan for the conservation of the greater horseshoe bat in Europe (*Rhinolophus ferrumequinum*).: Council of Europe Publishing.
- Rasoanoro, M., Goodman, S.M., Randrianarivelosoa, M., Rakotondratsimba, M., Dellagi, K., Tortosa, P., Ramasindrazana, B. 2021: Diversity, distribution, and drivers of *Polychromophilus* infection in Malagasy bats.: *Malaria Journal* 20, 157.
- Reckardt, K., Kerth, G. 2009: Does the mode of transmission between hosts affect the host choice strategies of parasites? Implications from a field study on bat fly and wing mite infestation of Bechstein's bats.: *Nordic Society Oikos* 118, 183–190.
- Reckardt, K., Kerth, G. 2007: Roost selection and roost switching of female Bechstein's bats (*Myotis bechsteinii*) as a strategy of parasite avoidance.: *Behavioral Ecology* 154, 581–588.
- Reiczigel, J., Marozzi, M., Fábíán, I., Rózsa, L. 2019: Biostatistics for Parasitologists - A Primer to Quantitative Parasitology.: *Trends in parasitology* 35, 277–281.
- Rodrigues, L., Bach, L., Dubourg-Savage, M.-J.J., Goodwin, J., Harbusch, C. 2008: Guidelines for consideration of bats in wind farm projects.: *EUROBATS Publication Series* 1, 51.
- 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?: *Journal of Zoology* 274, 116–125.
- Rodrigues, L., Ramos Pereira, M.J., Rainho, A., Palmeirim, J.M. 2010: Behavioural determinants of gene flow in the bat *Miniopterus schreibersii*.: *Behavioral Ecology and Sociobiology* 64, 835–843.
- Rogers, A.R., Harpending, H. 1992: Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences.: *Molecular Biology and Evolution* 9, 552–569.
- De Rojas, M., Mora, M., Ubeda, J., Cutillas, C., Navajas, M., Guevara, D. 2002: Phylogenetic relationships in rhinonyssid mites (Acari: Rhinonyssidae) based on ribosomal DNA sequences: Insights for the discrimination of closely related species.: *Parasitology Research* 88, 675–681.
- Rossiter, S.J., Jones, G., Ransome, R.D., Barratt, E.M. 2002: Relatedness structure and kin-biased foraging in the greater horseshoe bat (*Rhinolophus ferrumequinum*).: *Behavioral Ecology and Sociobiology* 51, 510–518.
- Roskopf, S.P., Held, J., Gmeiner, M., Mordmüller, B., Matsiégui, P.B., Eckerle, I., Weber, N., Matuschewski, K., Schaer, J. 2018: *Nycteria* and *Polychromophilus* parasite infections of bats in Central Gabon.: *Infection, Genetics and Evolution* 68, 30–34.
- Rosyadi, I., Shimoda, H., Takano, A., Yanagida, T., Sato, H. 2022: Isolation and molecular characterization of *Polychromophilus* spp. (Haemosporida: Plasmodiidae) from the Asian long - fingered bat (*Miniopterus fuliginosus*) and Japanese large - footed bat (*Myotis macrodactylus*) in Japan.: *Parasitology Research* 121, 2547–2559.
- Rozas, J., Ferrer-Mata, A., Sanchez-DelBarrio, J.C., Guirao-Rico, S., Librado, P., Ramos-Onsins, S.E., Sanchez-Gracia, A. 2017: DnaSP 6: DNA sequence polymorphism analysis of large data sets.: *Molecular Biology and Evolution* 34, 3299–3302.
- Ruczyński, I., Nicholls, B., Macleod, C.D., Racey, P.A. 2010: Selection of roosting habitats by *Nyctalus noctula* and *Nyctalus leisleri* in Białowież Forest — Adaptive response to forest management?: *Forest Ecology and Management* 259, 1633–1641.
- Rudnick, A. 1961: A revision of the mites of the family Spinturnicidae (Acarina).: *The Quarterly Review of Biology* 36, 296–297.
- Safi, K., Kerth, G. 2007: Comparative analyses suggest that information transfer promoted sociality in male bats in the temperate zone.: *The American naturalist* 170, 465–472.
- Sándor, A.D., Corduneanu, A., Péter, Á., Mihalca, A.D., Barti, L., Csósz, I. 2019: Bats and ticks : host selection and seasonality of bat - specialist ticks in eastern Europe.: *Parasites & Vectors* 12, 605.

- Sándor, A.D., Földvári, M., Krawczyk, A.I., Sprong, H., Corduneanu, A., Barti, L., Görföl, T., Estók, P., Kováts, D., Szekeres, S., László, Z., Hornok, S., Földvári, G. 2018: Eco-epidemiology of novel *Bartonella* genotypes from parasitic flies of insectivorous bats.: *Microbial Ecology* 76, 1076–1088.
- Sándor, A.D., Péter, Á., Corduneanu, A., Barti, L., Csősz, I., Kalmár, Z., Hornok, S., Kontschán, J., Mihalca, A.D. 2021: Wide distribution and diversity of malaria-related haemosporidian parasites (*Polychromophilus* spp.) in bats and their ectoparasites in Eastern Europe.: *Microorganisms* 9, 230.
- Schaer, J., McMichael, L., Gordon, A.N., Russell, D., Matuschewski, K., Perkins, S.L., Field, H., Power, M. 2018: Phylogeny of *Hepatocystis* parasites of Australian flying foxes reveals distinct parasite clade.: *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife* 7, 207–212.
- Schaer, J., Perkins, S.L., Decher, J., Leendertz, F.H., Fahr, J., Weber, N., Matuschewski, K. 2013: High diversity of West African bat malaria parasites and a tight link with rodent *Plasmodium* taxa.: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110, 17415–17419.
- Schaer, J., Perkins, S.L., Ejotre, I., Vodzak, M.E., Matuschewski, K., Reeder, D. 2017: Epauletted fruit bats display exceptionally high infections with a *Hepatocystis* species complex in South Sudan.: *Scientific Reports* 7, 6928.
- van Schaik, J., Bruyndonckx, N., Kerth, G., Christe, P. 2011: Isolation and characterisation of microsatellite loci for two species of spinturnicid bat wing mites (*Spinturnix myoti* and *Spinturnix bechsteini*).: *Acarologia* 51, 127–131.
- van Schaik, J., Dekeukeleire, D., Kerth, G. 2015: Host and parasite life history interplay to yield divergent population genetic structures in two ectoparasites living on the same bat species.: *Molecular Ecology* 24, 2324–2335.
- van Schaik, J., Dekeukeleire, D., Kerth, S., Gazaryan, S., Natradze, I., Kerth, G. 2018: Comparative phylogeography of a vulnerable bat and its ectoparasite reveals dispersal of a non-mobile parasite among distinct evolutionarily significant units of the host.: *Conservation Genetics* 19, 481–494.
- van Schaik, J., Kerth, G., Bruyndonckx, N., Christe, P. 2014: The effect of host social system on parasite population genetic structure: comparative population genetics of two ectoparasitic mites and their bat hosts.: *BMC Evolutionary Biology* 14, 18.
- Seneviratne, S.S., Fernando, H.C., Udagama-Randeniya, P. V. 2009: Host specificity in bat ectoparasites: A natural experiment.: *International Journal for Parasitology* 39, 995–1002.
- Senior, P., Butlin, R.K., Altringham, J.D. 2005: Sex and segregation in temperate bats.: *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 272, 2467–2473.
- Sheldon, B.C., Verhulst, S. 1996: Ecological immunology: Costly parasite defences and trade-offs in evolutionary ecology.: *Trends in Ecology and Evolution* 11, 317–321.
- Simmons, N.B. 2005: An Eocene Big Bang for bats.: 307, 527–528.
- Simmons, N.B., Cirranello, A.L. 2022: Bat species of the world: A taxonomic and geographic database. Retrieved November 4, 2022 from <https://batnames.org/>.
- Speakman, J.R., Racey, P.A. 1989: Hibernation ecology of the pipistrelle bat: energy expenditure, water requirements and mass loss, implications for survival and the function of winter emergence flights.: *The Journal of Animal Ecology* 58, 797.
- Stanković, D., Paunović, M., Raković, M. 2018: Atlas migratornih ptica i slepih miševa Srbije.: Beograd, Prirodnjački muzej u Beogradu.
- Strauss, W.M. 1993: Preparation of genomic DNA from mammalian tissue.: *Current Protocols in Immunology* 8, 8–10.
- Szentiványi, T., Christe, P., Glaizot, O. 2019: Bat flies and their microparasites: Current knowledge and distribution.: *Frontiers in Veterinary Science* 6, 115.

- Szentiványi, T., Estók, P., Földvári, M. 2016: Checklist of host associations of European bat flies (Diptera: Nycteribiidae, Streblidae): *Zootaxa* 4205, 101–126.
- Szentiványi, T., Estók, P., Pigeault, R., Christe, P., Glaizot, O. 2020: Effects of fungal infection on the survival of parasitic bat flies.: *Parasites and Vectors* 13, 23.
- Szentiványi, T., Haelewaters, D., Pfliegler, W.P., Clément, L., Christe, P., Glaizot, O. 2018: Laboulbeniales (Fungi: Ascomycota) infection of bat flies (Diptera: Nycteribiidae) from *Miniopterus schreibersii* across Europe.: *Parasites and Vectors* 11, 395.
- Szentiványi, T., Markotter, W., Dietrich, M., Clément, L., Ançay, L., Brun, L., Genzoni, E., Kearney, T., Seamark, E., Estók, P., Christe, P., Glaizot, O. 2020: Host conservation through their parasites: Molecular surveillance of vector-borne microorganisms in bats using ectoparasitic bat flies.: *Parasite* 27, 2020069.
- Szubert-Kruszyńska, A., Stańczak, J., Cieniuch, S., Podsiadły, E., Postawa, T., Michalik, J. 2018: *Bartonella* and *Rickettsia* infections in haematophagous *Spinturnix myoti* mites (Acari: Mesostigmata) and their bat host, *Myotis myotis* (Yangochiroptera: Vespertilionidae), from Poland.: *Microbial Ecology* 77, 759-768.
- Tajima, F. 1989: Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism.: *Genetics Society of America* 123, 585–595.
- Tamura, K., Nei, M., Kumar, S. 2004: Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method.: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 11030–11035.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., Kumar, S. 2013: MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0.: *Molecular Biology and Evolution* 30, 2725–2729.
- Theodor, O. 1967: An illustrated catalogue of the Rothschild collection of Nycteribiidae (Diptera) in the British Museum (Natural History): London, British Museum (Natural History).
- Thurber, M.I., Ghai, R.R., Hyeroba, D., Weny, G., Tumukunde, A., Chapman, C.A., Wiseman, R.W., Dinis, J., Steeil, J., Greiner, E.C., Friedrich, T.C., O'Connor, D.H., Goldberg, T.L. 2013: Co-infection and cross-species transmission of divergent *Hepatocystis* lineages in a wild African primate community.: *International journal for parasitology* 43, 613–619.
- Tortosa, P., Dsouli, N., Gomard, Y., Ramasindrazana, B., Dick, C.W., Goodman, S.M. 2013: Evolutionary history of Indian ocean Nycteribiid bat flies mirroring the ecology of their hosts.: *PLoS ONE* 8, 0075215.
- Veith, M., Beer, N., Kiefer, A., Johannesen, J., Seitz, A. 2004: The role of swarming sites for maintaining gene flow in the brown long-eared bat (*Plecotus auritus*): *Heredity* 93, 342–349.
- Verrett, T.B., Webala, P.W., Patterson, B.D., Dick, C.W. 2022: Remarkably low host specificity in the bat fly *Penicillidia fulvida* (Diptera: Nycteribiidae) as assessed by mitochondrial *COI* and nuclear *28S* sequence data.: *Parasites & Vectors* 15, 392.
- Voigt, C.C., Kingston, T. 2015: Bats in the anthropocene. In: Voigt, C.C., Kingston, T. (eds.) *Bats in the Anthropocene: Conservation of Bats in a Changing World*, 1-9. Springer International Publishing.
- Walker, M.J., Dorrestein, A., Camacho, J.J., Meckler, L.A., Silas, K.A., Hiller, T., Haelewaters, D. 2018: A tripartite survey of hyperparasitic fungi associated with ectoparasitic flies on bats (Mammalia: Chiroptera) in a neotropical cloud forest in Panama.: *Parasite* 25, 19.
- Webber, Q.M.R., Willis, C. 2016: Sociality, Parasites, and Pathogens in Bats. In: Ortega, J. (ed.), *Sociality in Bats*, 1–301. Cham, Springer International Publishing Switzerland.
- Whitaker, J.O., Ritzi, C.M.C.M., Dick, C.W. 2009: Collecting and preserving ectoparasites for ecological study. In: Kunz, T. H., Parson, S. (eds.), *Ecological and behavioral methods for the study of bats*, 806–827. Baltimore, Maryland, The Johns Hopkins University Press.



- Whiteman, N.K., Kimball, R.T., Parker, P.G. 2007: Co-phylogeography and comparative population genetics of the threatened Galápagos hawk and three ectoparasite species: Ecology shapes population histories within parasite communities.: *Molecular Ecology* 16, 4759–4773.
- Wilkinson, G.S., Adams, D.M. 2019: Recurrent evolution of extreme longevity in bats.: *Biology Letters* 15, 0860.
- Wilkinson, G.S., Carter, G.G., Bohn, K.M., Caspers, B.A., Chaverri, G., Farine, D.R., Günther, L., Kerth, G., Knörnschild, M., Mayer, F., Nagy, M., Ortega, J., Patriquin, K.J. 2018: Kinship, association and social complexity in bats.: *Behavioral Ecology and Sociobiology* 73, 7.
- Wilkinson, G.S., Chapman, A.M. 1991: Length and sequence variation in evening bat D-loop mtDNA.: *Genetics* 128, 607–617.
- Witsenburg, F. 2014: The role of bat flies (Nycteribidae) in the ecology and evolution of the blood parasite *Polychromophilus* (Apicomplexa: Haemosporida). University of Lausanne.
- Witsenburg, F., Clément, L., López-Baucells, A., Palmeirim, J., Pavlinić, I., Scaravelli, D., Ševčík, M., Dutoit, L., Salamin, N., Goudet, J., Christe, P. 2015: How a haemosporidian parasite of bats gets around: the genetic structure of a parasite, vector and host compared.: *Molecular Ecology* 24, 926–940.
- Witsenburg, F., Salamin, N., Christe, P. 2012: The evolutionary host switches of *Polychromophilus*: a multi-gene phylogeny of the bat malaria genus suggests a second invasion of mammals by a haemosporidian parasite.: *Malaria Journal* 11, 53.
- Witsenburg, F., Schneider, F., Christe, P. 2014: Epidemiological traits of the malaria-like parasite *Polychromophilus murinus* in the Daubenton's bat *Myotis daubentonii*.: *Parasites & Vectors* 7, 566.
- Witsenburg, F., Fardo, Schneider, F., Christe, P. 2015: Signs of a vector's adaptive choice: On the evasion of infectious hosts and parasite-induced mortality.: *Oikos* 124, 668–676.
- Wright, P.G.R., Newton, J., Agnelli, P., Budinski, I., Di Salvo, I., Flaquer, C., Fulco, A., Georgiakakis, P., Martinoli, A., Mas, M., Mazija, M., Mucedda, M., Papadatou, E., Petrov, B., Rodrigues, L., Mathews, F., Russo, D. 2020: Hydrogen isotopes reveal evidence of migration of *Miniopterus schreibersii* in Europe.: *BMC Ecology* 20, 52.
- Zhang, G., Cowled, C., Shi, Z., Huang, Z., Bishop-Lilly, K.A., Fang, X., Wynne, J.W., Xiong, Z., Baker, M.L., Zhao, W., Tachedjian, M., Zhu, Y., Zhou, P., Jiang, X., Ng, J., Yang, L., Wu, L., Xiao, J., Feng, Y., Chen, Y., Sun, X., Zhang, Y., Marsh, G.A., Cramer, G., Broder, C.C., Frey, K.G., Wang, L.F., Wang, J. 2013: Comparative analysis of bat genomes provides insight into the evolution of flight and immunity.: *Science* 339, 456–460.

## **8 PRILOZI**

### **Prilog 1.** Lista dozvola za istraživanje slepih miševa u Srbiji i Bosni i Hercegovini SRBIJA

Dozvole br. 353-02-502/2017-17, br. 353-01-1432/2017-04 i br. 353-01-675/2018-04, izdate od strane Ministarstva za zaštitu životne sredine Republike Srbije.

### BOSNA I HERCEGOVINA

Dozvola br. 13-O-2/17, u skladu sa Mišljenjem Ministarstva za prostorno uređenje, građevinarstvo i ekologiju Vlade Republike Srpske broj 15.04-052-8793/16 od 28.12.2016. godine, Odobrenjem Federalnog Ministarstva turizma i okoliša broj 04-23-1469/16 od 10.1.2016. godine te Saglasnosti Ministarstva spoljne trgovine i ekonomskih odnosa broj 08-3-28-2225-5/16 od 3.2.2017. godine.

**Prilog 2.** Jedinstvene sekvence gena submitovane u GenBank bazu kao doprinos ove studije

Tabela prístupnih brojeva iz GenBank baze, za jedinštvene sekvence subjedinice 1 citohrom oksidaze (*COI*) beskrilnih muva i male subjedinice ribozomalne RNK (*16S rRNK*) grinja, sakupljenih sa dve domaćinske vrste slepih miševa. Oznake lokaliteta: 1 Mali kamenolom, 2 Petrovaradinska tvrđava, 3 Dardagani, 4 Drenajička pećina, 5 Petnička pećina, 6 Bela sala, 7 Toplik, 8 Temska farma, 9 Baloj

Redni broj	GenBank pristupni broj	Vrsta domaćina	Vrsta parazita	Gen	Haplotip	Lokalitet uzorkovanja
1	MZ380293	<i>Miniopterus schreibersii</i>	<i>Nycteribia schmidlii</i>	<i>COI</i>	H1	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8
2	MZ380294	<i>Miniopterus schreibersii</i>	<i>Nycteribia schmidlii</i>	<i>COI</i>	H2	5
3	MZ380295	<i>Miniopterus schreibersii</i>	<i>Nycteribia schmidlii</i>	<i>COI</i>	H3	4
4	MZ380296	<i>Miniopterus schreibersii</i>	<i>Nycteribia schmidlii</i>	<i>COI</i>	H4	6, 7, 8
5	MZ380297	<i>Miniopterus schreibersii</i>	<i>Nycteribia schmidlii</i>	<i>COI</i>	H5	4
6	MZ380298	<i>Miniopterus schreibersii</i>	<i>Nycteribia schmidlii</i>	<i>COI</i>	H6	6, 7
7	MZ380299	<i>Miniopterus schreibersii</i>	<i>Nycteribia schmidlii</i>	<i>COI</i>	H7	5
8	MZ380300	<i>Miniopterus schreibersii</i>	<i>Nycteribia schmidlii</i>	<i>COI</i>	H8	2, 5, 8
9	MZ380301	<i>Miniopterus schreibersii</i>	<i>Nycteribia schmidlii</i>	<i>COI</i>	H9	4
10	MZ380302	<i>Miniopterus schreibersii</i>	<i>Nycteribia schmidlii</i>	<i>COI</i>	H10	7
11	MZ380303	<i>Miniopterus schreibersii</i>	<i>Nycteribia schmidlii</i>	<i>COI</i>	H11	8
12	MZ380304	<i>Miniopterus schreibersii</i>	<i>Nycteribia schmidlii</i>	<i>COI</i>	H12	1
13	MZ380305	<i>Miniopterus schreibersii</i>	<i>Nycteribia schmidlii</i>	<i>COI</i>	H13	6
14	MZ380306	<i>Miniopterus schreibersii</i>	<i>Nycteribia schmidlii</i>	<i>COI</i>	H14	2
15	MZ380307	<i>Miniopterus schreibersii</i>	<i>Nycteribia schmidlii</i>	<i>COI</i>	H15	3
16	MZ380308	<i>Miniopterus schreibersii</i>	<i>Nycteribia schmidlii</i>	<i>COI</i>	H16	2
17	MZ380309	<i>Miniopterus schreibersii</i>	<i>Nycteribia schmidlii</i>	<i>COI</i>	H17	1, 4
18	MZ380310	<i>Miniopterus schreibersii</i>	<i>Nycteribia schmidlii</i>	<i>COI</i>	H18	1, 3, 6, 7
19	MZ380311	<i>Miniopterus schreibersii</i>	<i>Nycteribia schmidlii</i>	<i>COI</i>	H19	7
20	MZ380312	<i>Miniopterus schreibersii</i>	<i>Nycteribia schmidlii</i>	<i>COI</i>	H20	6
21	MZ380313	<i>Miniopterus schreibersii</i>	<i>Nycteribia schmidlii</i>	<i>COI</i>	H21	2
22	MZ396953	<i>Miniopterus schreibersii</i>	<i>Penicillidia conspicua</i>	<i>COI</i>	H1	1, 2, 3, 5, 6, 7, 8
23	MZ396954	<i>Miniopterus schreibersii</i>	<i>Penicillidia conspicua</i>	<i>COI</i>	H2	1, 2, 5, 8
24	MZ396955	<i>Miniopterus schreibersii</i>	<i>Penicillidia conspicua</i>	<i>COI</i>	H3	4
25	MZ396956	<i>Miniopterus schreibersii</i>	<i>Penicillidia conspicua</i>	<i>COI</i>	H4	4
26	MZ396957	<i>Miniopterus schreibersii</i>	<i>Penicillidia conspicua</i>	<i>COI</i>	H5	6

27	MZ396958	<i>Miniopterus schreibersii</i>	<i>Penicillidia conspicua</i>	COI	H6	1, 6
28	MZ396959	<i>Miniopterus schreibersii</i>	<i>Penicillidia conspicua</i>	COI	H7	1
29	MZ396960	<i>Miniopterus schreibersii</i>	<i>Penicillidia conspicua</i>	COI	H8	1
30	MZ396961	<i>Miniopterus schreibersii</i>	<i>Penicillidia conspicua</i>	COI	H9	5
31	MZ396962	<i>Miniopterus schreibersii</i>	<i>Penicillidia conspicua</i>	COI	H10	4
32	MZ396963	<i>Miniopterus schreibersii</i>	<i>Penicillidia conspicua</i>	COI	H11	4
33	MZ396964	<i>Miniopterus schreibersii</i>	<i>Penicillidia conspicua</i>	COI	H12	3
34	MZ389896	<i>Miniopterus schreibersii</i>	<i>Penicillidia dufourii</i>	COI	H1	1, 3, 6
35	MZ389897	<i>Miniopterus schreibersii</i>	<i>Penicillidia dufourii</i>	COI	H2	3
36	MZ389898	<i>Miniopterus schreibersii</i>	<i>Penicillidia dufourii</i>	COI	H3	3
37	MZ390121	<i>Miniopterus schreibersii</i>	<i>Spinturnix psi</i>	16S	H1	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8
38	MZ390122	<i>Miniopterus schreibersii</i>	<i>Spinturnix psi</i>	16S	H2	1, 6
39	MZ390123	<i>Miniopterus schreibersii</i>	<i>Spinturnix psi</i>	16S	H3	2, 7
40	MZ390124	<i>Miniopterus schreibersii</i>	<i>Spinturnix psi</i>	16S	H4	1
41	MZ390125	<i>Miniopterus schreibersii</i>	<i>Spinturnix psi</i>	16S	H5	8
42	MZ390126	<i>Miniopterus schreibersii</i>	<i>Spinturnix psi</i>	16S	H6	1
43	MZ396965	<i>Rhinolophus ferrumequinum</i>	<i>Phthiridium biarticulatum</i>	COI	H1	4, 5, 7, 8, 9
44	MZ396966	<i>Rhinolophus ferrumequinum</i>	<i>Phthiridium biarticulatum</i>	COI	H2	7, 9
45	MZ396967	<i>Rhinolophus ferrumequinum</i>	<i>Phthiridium biarticulatum</i>	COI	H3	7, 8
46	MZ396968	<i>Rhinolophus ferrumequinum</i>	<i>Phthiridium biarticulatum</i>	COI	H4	8
47	MZ396969	<i>Rhinolophus ferrumequinum</i>	<i>Phthiridium biarticulatum</i>	COI	H5	5
48	MZ396970	<i>Rhinolophus ferrumequinum</i>	<i>Phthiridium biarticulatum</i>	COI	H6	8
49	MZ389890	<i>Rhinolophus ferrumequinum</i>	<i>Eyndhovenia euryalis</i>	16S	H1	4, 5, 7, 8, 9
50	MZ389891	<i>Rhinolophus ferrumequinum</i>	<i>Eyndhovenia euryalis</i>	16S	H2	4, 5
51	MZ389892	<i>Rhinolophus ferrumequinum</i>	<i>Eyndhovenia euryalis</i>	16S	H3	4
52	MZ389893	<i>Rhinolophus ferrumequinum</i>	<i>Eyndhovenia euryalis</i>	16S	H4	8
53	MZ389894	<i>Rhinolophus ferrumequinum</i>	<i>Eyndhovenia euryalis</i>	16S	H5	5
54	MZ389895	<i>Rhinolophus ferrumequinum</i>	<i>Eyndhovenia euryalis</i>	16S	H6	8
55	OQ357633	<i>Nycteribia schmidlii</i>	<i>Polychromophilus melanipherus</i>	cytb	H1	2, 3, 5
56	OQ357634	<i>Penicillidia conspicua</i>	<i>Polychromophilus melanipherus</i>	cytb	H2	3
57	OQ357635	<i>Nycteribia schmidlii</i>	<i>Polychromophilus melanipherus</i>	cytb	H3	2
58	OQ357636	<i>Penicillidia conspicua</i>	<i>Polychromophilus melanipherus</i>	cytb	H4	3
59	OQ357637	<i>Nycteribia schmidlii</i>	<i>Polychromophilus melanipherus</i>	cox1	H1	2, 3, 5, 8
60	OQ357638	<i>Penicillidia conspicua</i>	<i>Polychromophilus melanipherus</i>	cox1	H2	3
61	OQ357639	<i>Nycteribia schmidlii</i>	<i>Polychromophilus melanipherus</i>	cox1	H3	2

62	OQ357640	<i>Penicillidia conspicua</i>	<i>Polychromophilus melanipherus</i>	<i>cox1</i>	H4	3, 5
63	OQ357641	<i>Penicillidia conspicua</i>	<i>Polychromophilus melanipherus</i>	<i>cox1</i>	H5	3
64	OQ357642	<i>Phthiridium biarticulatum</i>	<i>Polychromophilus melanipherus</i>	<i>cox1</i>	mixed	7

---

**Prilog 3.** Sekvence iz GenBank baze, iz prethodno objavljenih studija, korićenih kao dodatak sekvencama ove studije

Tabela prístupnih brojeva iz GenBank baze za korištene sekvence subjediniice 1 citohrom oksidaze (COI) beskrilnih muva i male subjediniice ribozomalne rRNK (16S rRNK) grinja, objavljenih u drugim studijama

Redni broj	GenBank pristupni broj	Autori studije	Vrsta slepog miša domaćina	Vrsta ektoparazita	Gen	Oznaka lokaliteta uzorkovanja	Oznaka haplotipa
1	MK140156.1	McKee i sar. 2019	<i>Miniopterus schreibersii</i>	<i>Nycteribia schmidlii</i>	COI	Rumunija1	H22
2	MK140141.1	McKee i sar. 2019	<i>Miniopterus schreibersii</i>	<i>Nycteribia schmidlii</i>	COI	Rumunija1	H1
3	MK140151.1	McKee i sar. 2019	<i>Miniopterus schreibersii</i>	<i>Nycteribia schmidlii</i>	COI	Rumunija1	H23
4	MK140143.1	McKee i sar. 2019	<i>Miniopterus schreibersii</i>	<i>Nycteribia schmidlii</i>	COI	Rumunija1	H1
5	MK140154.1	McKee i sar. 2019	<i>Miniopterus schreibersii</i>	<i>Nycteribia schmidlii</i>	COI	Rumunija1	H18
6	MK140142.1	McKee i sar. 2019	<i>Myotis oxygnathus</i>	<i>Nycteribia schmidlii</i>	COI	Rumunija1	H1
7	MK140139.1	McKee i sar. 2019	<i>Myotis daubentonii</i>	<i>Nycteribia schmidlii</i>	COI	Rumunija2	H1
8	MK140155.1	McKee i sar. 2019	<i>Myotis daubentonii</i>	<i>Nycteribia schmidlii</i>	COI	Rumunija2	H18
9	MK140145.1	McKee i sar. 2019	<i>Miniopterus schreibersii</i>	<i>Nycteribia schmidlii</i>	COI	Rumunija3	H1
10	MK140144.1	McKee i sar. 2019	<i>Miniopterus schreibersii</i>	<i>Nycteribia schmidlii</i>	COI	Rumunija3	H1
11	MK140138.1	McKee i sar. 2019	<i>Miniopterus schreibersii</i>	<i>Nycteribia schmidlii</i>	COI	Rumunija3	H1
12	MK140137.1	McKee i sar. 2019	<i>Miniopterus schreibersii</i>	<i>Nycteribia schmidlii</i>	COI	Rumunija3	H1
13	MK140136.1	McKee i sar. 2019	<i>Miniopterus schreibersii</i>	<i>Nycteribia schmidlii</i>	COI	Rumunija3	H1
14	MK140149.1	McKee i sar. 2019	<i>Miniopterus schreibersii</i>	<i>Nycteribia schmidlii</i>	COI	Rumunija3	H25
15	MK140153.1	McKee i sar. 2019	<i>Miniopterus schreibersii</i>	<i>Nycteribia schmidlii</i>	COI	Rumunija3	H4
16	MK140140.1	McKee i sar. 2019	<i>Miniopterus schreibersii</i>	<i>Nycteribia schmidlii</i>	COI	Rumunija3	H1
17	MK140146.1	McKee i sar. 2019	<i>Miniopterus schreibersii</i>	<i>Nycteribia schmidlii</i>	COI	Rumunija4	H1
18	MK140147.1	McKee i sar. 2019	<i>Miniopterus schreibersii</i>	<i>Nycteribia schmidlii</i>	COI	Rumunija4	H7
19	MK140130.1	McKee i sar. 2019	<i>Miniopterus schreibersii</i>	<i>Nycteribia schmidlii</i>	COI	Rumunija5	H26
20	MK140148.1	McKee i sar. 2019	<i>Miniopterus schreibersii</i>	<i>Nycteribia schmidlii</i>	COI	Mađarska1	H7
21	MK140150.1	McKee i sar. 2019	<i>Miniopterus schreibersii</i>	<i>Nycteribia schmidlii</i>	COI	Mađarska1	H24
22	MK140135.1	McKee i sar. 2019	<i>Miniopterus schreibersii</i>	<i>Nycteribia schmidlii</i>	COI	Mađarska2	H1
23	KF021502.1	Tortosa i sar. 2013	<i>Miniopterus africanus</i>	<i>Nycteribia schmidlii</i>	COI	Kenija	H27
24	KF021503.1	Tortosa i sar. 2013	<i>Miniopterus inflatus</i>	<i>Nycteribia schmidlii</i>	COI	Kenija	H27
25	KF021504.1	Tortosa i sar. 2013	<i>Miniopterus africanus</i>	<i>Nycteribia schmidlii</i>	COI	Kenija	H27
26	MK140176.1	McKee i sar. 2019	<i>Miniopterus schreibersii</i>	<i>Penicillidia conspicua</i>	COI	Rumunija1	H15

27	MK140179.1	McKee i sar. 2019	<i>Miniopterus schreibersii</i>	<i>Penicillidia conspicua</i>	COI	Rumunija1	H3
28	MK140170.1	McKee i sar. 2019	<i>Miniopterus schreibersii</i>	<i>Penicillidia conspicua</i>	COI	Rumunija1	H1
29	MK140171.1	McKee i sar. 2019	<i>Miniopterus schreibersii</i>	<i>Penicillidia conspicua</i>	COI	Rumunija1	H1
30	MK140174.1	McKee i sar. 2019	<i>Miniopterus schreibersii</i>	<i>Penicillidia conspicua</i>	COI	Rumunija1	H1
31	MK140165.1	McKee i sar. 2019	<i>Miniopterus schreibersii</i>	<i>Penicillidia conspicua</i>	COI	Rumunija1	H4
32	MK140166.1	McKee i sar. 2019	<i>Miniopterus schreibersii</i>	<i>Penicillidia conspicua</i>	COI	Rumunija1	H4
33	MK140180.1	McKee i sar. 2019	<i>Miniopterus schreibersii</i>	<i>Penicillidia conspicua</i>	COI	Rumunija1	H2
34	MK140177.1	McKee i sar. 2019	<i>Miniopterus schreibersii</i>	<i>Penicillidia conspicua</i>	COI	Rumunija1	H14
35	MK140162.1	McKee i sar. 2019	<i>Miniopterus schreibersii</i>	<i>Penicillidia conspicua</i>	COI	Rumunija2	H4
36	MK140173.1	McKee i sar. 2019	<i>Miniopterus schreibersii</i>	<i>Penicillidia conspicua</i>	COI	Rumunija2	H1
37	MK140175.1	McKee i sar. 2019	<i>Miniopterus schreibersii</i>	<i>Penicillidia conspicua</i>	COI	Rumunija2	H16
38	MK140178.1	McKee i sar. 2019	<i>Myotis oxygnathus</i>	<i>Penicillidia conspicua</i>	COI	Rumunija2	H13
39	MK140167.1	McKee i sar. 2019	<i>Miniopterus schreibersii</i>	<i>Penicillidia conspicua</i>	COI	Rumunija2	H1
40	MK140169.1	McKee i sar. 2019	<i>Miniopterus schreibersii</i>	<i>Penicillidia conspicua</i>	COI	Rumunija2	H1
41	MK140163.1	McKee i sar. 2019	<i>Miniopterus schreibersii</i>	<i>Penicillidia conspicua</i>	COI	Rumunija2	H4
42	MK140168.1	McKee i sar. 2019	<i>Miniopterus schreibersii</i>	<i>Penicillidia conspicua</i>	COI	Rumunija3	H1
43	MK140164.1	McKee i sar. 2019	<i>Miniopterus schreibersii</i>	<i>Penicillidia conspicua</i>	COI	Mađarska1	H4
44	MK140181.1	McKee i sar. 2019	<i>Myotis myotis</i>	<i>Penicillidia dufourii</i>	COI	Rumunija1	H1
45	MK140182.1	McKee i sar. 2019	<i>Miniopterus schreibersii</i>	<i>Penicillidia dufourii</i>	COI	Mađarska1	H1
46	MK140183.1	McKee i sar. 2019	<i>Myotis blythii</i>	<i>Penicillidia dufourii</i>	COI	Mađarska2	H4
47	EU784898.1	Bruyndonckx i sar. 2009	<i>Miniopterus schreibersii</i>	<i>Spinturnix psi</i>	16S	Francuska1	H1
48	EU784896.1	Bruyndonckx i sar. 2009	<i>Myotis capaccinii</i>	<i>Spinturnix psi</i>	16S	Francuska2	H1
49	EU784897.1	Bruyndonckx i sar. 2009	<i>Myotis capaccinii</i>	<i>Spinturnix psi</i>	16S	Francuska2	H1
50	EU784893.1	Bruyndonckx i sar. 2009	<i>Miniopterus schreibersii</i>	<i>Spinturnix psi</i>	16S	Francuska1	H1
51	EU784893.1	Bruyndonckx i sar. 2009	<i>Miniopterus schreibersii</i>	<i>Spinturnix psi</i>	16S	Švajcarska	H1
52	EU784893.1	Bruyndonckx i sar. 2009	<i>Miniopterus schreibersii</i>	<i>Spinturnix psi</i>	16S	Italija	H1
53	EU784894.1	Bruyndonckx i sar. 2009	<i>Miniopterus schreibersii</i>	<i>Spinturnix psi</i>	16S	Švajcarska	H1
54	EU784895.1	Bruyndonckx i sar. 2009	<i>Miniopterus schreibersii</i>	<i>Spinturnix psi</i>	16S	Švajcarska	H1
55	MK140105.1	McKee i sar. 2019	<i>Rhinolophus euryale</i>	<i>Phthiridium biarticulatum</i>	COI	Rumunija1	H1
56	MK140110.1	McKee i sar. 2019	<i>Rhinolophus euryale</i>	<i>Phthiridium biarticulatum</i>	COI	Rumunija1	H9
57	MK140106.1	McKee i sar. 2019	<i>Rhinolophus mehelyi</i>	<i>Phthiridium biarticulatum</i>	COI	Rumunija1	H1
58	MK140115.1	McKee i sar. 2019	<i>Rhinolophus euryale</i>	<i>Phthiridium biarticulatum</i>	COI	Rumunija1	H3
59	MK140114.1	McKee i sar. 2019	<i>Rhinolophus blasii</i>	<i>Phthiridium biarticulatum</i>	COI	Rumunija1	H7
60	MK140107.1	McKee i sar. 2019	<i>Rhinolophus blasii</i>	<i>Phthiridium biarticulatum</i>	COI	Rumunija1	H1
61	MK140108.1	McKee i sar. 2019	<i>Rhinolophus ferrumequinum</i>	<i>Phthiridium biarticulatum</i>	COI	Rumunija2	H1

62	MK140111.1	McKee i sar. 2019	<i>Myotis capaccinii</i>	<i>Phthiridium biarticulatum</i>	COI	Rumunija3	H1
63	MK140116.1	McKee i sar. 2019	<i>Rhinolophus mehelyi</i>	<i>Phthiridium biarticulatum</i>	COI	Rumunija4	H3
64	MK140112.1	McKee i sar. 2019	<i>Rhinolophus mehelyi</i>	<i>Phthiridium biarticulatum</i>	COI	Rumunija4	H1
65	MK140113.1	McKee i sar. 2019	<i>Rhinolophus mehelyi</i>	<i>Phthiridium biarticulatum</i>	COI	Rumunija4	H8
66	EU784846.1	Bruyndonckx i sar. 2009	<i>Rhinolophus euryale</i>	<i>Eyndhovenia euryalis</i>	16S	Francuska1	H7
67	EU784847.1	Bruyndonckx i sar. 2009	<i>Rhinolophus euryale</i>	<i>Eyndhovenia euryalis</i>	16S	Francuska1	H7
68	EU784849.1	Bruyndonckx i sar. 2009	<i>Myotis emarginatus</i>	<i>Eyndhovenia euryalis</i>	16S	Francuska1	H7
69	EU784849.1	Bruyndonckx i sar. 2009	<i>Myotis emarginatus</i>	<i>Eyndhovenia euryalis</i>	16S	Francuska1	H7
70	EU784848.1	Bruyndonckx i sar. 2009	<i>Myotis emarginatus</i>	<i>Eyndhovenia euryalis</i>	16S	Francuska1	H7
71	EU784850.1	Bruyndonckx i sar. 2009	<i>Myotis emarginatus</i>	<i>Eyndhovenia euryalis</i>	16S	Francuska1	H7
72	EU784851.1	Bruyndonckx i sar. 2009	<i>Rhinolophus euryale</i>	<i>Eyndhovenia euryalis</i>	16S	Francuska1	H7
73	EU784852.1	Bruyndonckx i sar. 2009	<i>Rhinolophus euryale</i>	<i>Eyndhovenia euryalis</i>	16S	Francuska1	H8
74	EU784853.1	Bruyndonckx i sar. 2009	<i>Rhinolophus ferrumequinum</i>	<i>Eyndhovenia euryalis</i>	16S	Francuska3	H1
75	EU784853.1	Bruyndonckx i sar. 2009	<i>Rhinolophus ferrumequinum</i>	<i>Eyndhovenia euryalis</i>	16S	Francuska3	H1



**Prilog 4.** Temperaturni protokoli PCR reakcija za umnožavanje *cytb* i *cox1* gena *Polychromophilus* sp. parazita

Gen	Prajmerski par	Tip PCR reakcije	Inicijalna denaturacija	Broj ciklusa	Denaturacija	Aniling	Aniling, drugi korak	Elongacija	Finalna elongacija
<i>cytb</i>	3932F/DW4	standardna	90°, 240 s	35	90°, 60 s	48°, 15 s		68°, 60 s	68°, 600 s
<i>cox1</i>	cox1-out-F/R	spoljašnja	96°, 120 s	35	92°, 30 s	53°, 15 s	48°, 10 s	68°, 40 s	68°, 180 s
	cox1-in-F/mid-R	nested	90°, 20 s	35	90°, 20 s	50°, 15 s		68°, 45 s	68°, 600 s
	cox1-mid-F/in-R	nested	90°, 20 s	35	90°, 20 s	50°, 15 s		68°, 45 s	68°, 600 s

**Prilog 5.** Sekvence vrste *Polychromophilus melanipherus* iz GenBank baze, iz prethodno objavljenih studija, korićenih kao dodatak sekvencama ove studije

Tabela prístupnih brojeva iz GenBank baze za korištene sekvence gena citohrom b (*cytb*) i subjedinice 1 citohrom oksidaze (*cox1*) krvnog parazita *Polychromophilus melanipherus*, objavljenih u drugim studijama. Sekvence sa oznakom <sup>a</sup> odgovaraju u potpunosti sekvencama dobijenim u ovoj studiji

Broj	GenBank pristupni broj	Autori studije	Vrsta domaćina	Gen	Originalni lokalitet	Ime lokaliteta prema ovoj studiji	Kod haplotipa prema ovoj studiji
1	AY762067	Duval i sar. 2004 Neobjavljeno	-	<i>cytb</i>	Madagaskar	Madagaskar	H6
2	AY762068	Duval i sar. 2004 Neobjavljeno	-	<i>cytb</i>	Madagaskar	Madagaskar	H6
3	AY762069	Duval i sar. 2004 Neobjavljeno	-	<i>cytb</i>	Madagaskar	Madagaskar	H7
4	AY762070	(Duval i sar. 2007)	<i>Miniopterus manavi</i>	<i>cytb</i>	Madagaskar	Madagaskar	H8
5	AY762071	(Duval i sar. 2007)	-	<i>cytb</i>	Madagaskar	Madagaskar	H9
6	AY762074	(Duval i sar. 2007)	-	<i>cytb</i>	Madagaskar	Madagaskar	H5
7	JQ995284	(Duval i sar. 2012)	<i>Miniopterus inflatus</i>	<i>cytb</i>	Gabon	Centralna Afrika	H10
8	JQ995285	(Duval i sar. 2012)	<i>Miniopterus inflatus</i>	<i>cytb</i>	Gabon	Centralna Afrika	H11
9	JQ995286	(Duval i sar. 2012)	<i>Miniopterus inflatus</i>	<i>cytb</i>	Gabon	Centralna Afrika	H12

10	JQ995287	(Duval i sar. 2012)	<i>Miniopterus inflatus</i>	cytb	Gabon	Centralna Afrika	H13
11	JQ995288	(Duval i sar. 2012)	<i>Miniopterus inflatus</i>	cytb	Gabon	Centralna Afrika	H14
12	KF159681	(Schaer i sar. 2013)	<i>Miniopterus villiersi</i>	cytb	Gvineja	Zapadna Afrika	H15
13	KF159699	(Schaer i sar. 2013)	<i>Miniopterus villiersi</i>	cytb	Gvineja	Zapadna Afrika	H14
14	KJ131270 <sup>a</sup>	(Witsenburg i sar. 2015)	<i>Miniopterus schreibersii</i>	cytb	Hrvatska, Portugal, Španija, Švajcarska, Italija, Slovačka, Francuska	Evropa	H1 <sup>a</sup>
15	KJ131271	(Witsenburg i sar. 2015)	<i>Miniopterus schreibersii</i>	cytb	Hrvatska, Portugal, Španija, Švajcarska, Italija, Slovačka, Francuska	Evropa	H16
16	KJ131272 <sup>a</sup>	(Witsenburg i sar. 2015)	<i>Miniopterus schreibersii</i>	cytb	Hrvatska, Portugal, Španija, Švajcarska, Italija, Slovačka, Francuska	Evropa	H4 <sup>a</sup>

17	KJ131273 <sup>a</sup>	(Witsenburg i sar. 2015)	<i>Miniopterus schreibersii</i>	<i>cytb</i>	Hrvatska, Portugal, Španija, Švajcarska, Italija, Slovačka, Francuska	Evropa	H2 <sup>a</sup>
18	KJ131274	(Witsenburg i sar. 2015)	<i>Miniopterus schreibersii</i>	<i>cytb</i>	Hrvatska, Portugal, Španija, Švajcarska, Italija, Slovačka, Francuska	Evropa	H17
19	KJ131275 <sup>a</sup>	(Witsenburg i sar. 2015)	<i>Miniopterus schreibersii</i>	<i>cytb</i>	Hrvatska, Portugal, Španija, Švajcarska, Italija, Slovačka, Francuska	Evropa	H3 <sup>a</sup>
20	KJ131276	(Witsenburg i sar. 2015)	<i>Miniopterus schreibersii</i>	<i>cytb</i>	Hrvatska, Portugal, Španija, Švajcarska, Italija, Slovačka, Francuska	Evropa	H18

21	KJ131277	(Witsenburg i sar. 2015)	<i>Miniopterus schreibersii</i>	cytb	Hrvatska, Portugal, Španija, Švajcarska, Italija, Slovačka, Francuska	Evropa	H19
22	KU182361	(Obame-Nkoghe i sar. 2016)	<i>Nycteribia schmidlii</i>	cytb	Gabon	Centralna Afrika	H10
23	KU182362	(Obame-Nkoghe i sar. 2016)	<i>Nycteribia schmidlii</i>	cytb	Gabon	Centralna Afrika	H10
24	KU182363	(Obame-Nkoghe i sar. 2016)	<i>Nycteribia schmidlii</i>	cytb	Gabon	Centralna Afrika	H20
25	KU182364	(Obame-Nkoghe i sar. 2016)	<i>Nycteribia schmidlii scotti</i>	cytb	Gabon	Centralna Afrika	H12
26	KU182365	(Obame-Nkoghe i sar. 2016)	<i>Nycteribia schmidlii scotti</i>	cytb	Gabon	Centralna Afrika	H12
27	KU182366	(Obame-Nkoghe i sar. 2016)	<i>Nycteribia schmidlii</i>	cytb	Gabon	Centralna Afrika	H11
28	KU182367	(Obame-Nkoghe i sar. 2016)	<i>Nycteribia schmidlii</i>	cytb	Gabon	Centralna Afrika	H21
29	KU182368	(Obame-Nkoghe i sar. 2016)	<i>Penicillidia fulvida</i>	cytb	Gabon	Centralna Afrika	H14
30	LC668428	(Rosyadi i sar. 2022)	<i>Miniopterus fuliginosus</i>	cytb	Japan	Japan	H22
31	LC668429	(Rosyadi i sar. 2022)	<i>Miniopterus fuliginosus</i>	cytb	Japan	Japan	H23
32	LC668430	(Rosyadi i sar. 2022)	<i>Miniopterus fuliginosus</i>	cytb	Japan	Japan	H23

33	MH744503	(Ramasindrazana i sar. 2018)	<i>Miniopterus mahafaliensis</i>	<i>cytb</i>	Madagaskar	Madagaskar	H5
34	MH744504	(Ramasindrazana i sar. 2018)	<i>Miniopterus mahafaliensis</i>	<i>cytb</i>	Madagaskar	Madagaskar	H5
35	MH744505	(Ramasindrazana i sar. 2018)	<i>Miniopterus mahafaliensis</i>	<i>cytb</i>	Madagaskar	Madagaskar	H5
36	MH744506	(Ramasindrazana i sar. 2018)	<i>Miniopterus griffithsi</i>	<i>cytb</i>	Madagaskar	Madagaskar	H5
37	MH744507	(Ramasindrazana i sar. 2018)	<i>Miniopterus mahafaliensis</i>	<i>cytb</i>	Madagaskar	Madagaskar	H8
38	MH744508	(Ramasindrazana i sar. 2018)	<i>Miniopterus griveaudi</i>	<i>cytb</i>	Madagaskar	Madagaskar	H24
39	MH744509	(Ramasindrazana i sar. 2018)	<i>Miniopterus gleni</i>	<i>cytb</i>	Madagaskar	Madagaskar	H9
40	MH744511	(Ramasindrazana i sar. 2018)	<i>Miniopterus gleni</i>	<i>cytb</i>	Madagaskar	Madagaskar	H25
41	MH744512	(Ramasindrazana i sar. 2018)	<i>Miniopterus manavi sensu lato</i>	<i>cytb</i>	Madagaskar	Madagaskar	H9
42	MH744513	(Ramasindrazana i sar. 2018)	<i>Miniopterus manavi sensu lato</i>	<i>cytb</i>	Madagaskar	Madagaskar	H9
43	MH744514	(Ramasindrazana i sar. 2018)	<i>Miniopterus griveaudi</i>	<i>cytb</i>	Madagaskar	Madagaskar	H9
44	MH744515	(Ramasindrazana i sar. 2018)	<i>Miniopterus griveaudi</i>	<i>cytb</i>	Madagaskar	Madagaskar	H9
45	MH744517	(Ramasindrazana i sar. 2018)	<i>Miniopterus griveaudi</i>	<i>cytb</i>	Madagaskar	Madagaskar	H9
46	MH744518	(Ramasindrazana i sar. 2018)	<i>Miniopterus gleni</i>	<i>cytb</i>	Madagaskar	Madagaskar	H14
47	MH744519	(Ramasindrazana i sar. 2018)	<i>Miniopterus griffithsi</i>	<i>cytb</i>	Madagaskar	Madagaskar	H14
48	MH744520	(Ramasindrazana i sar. 2018)	<i>Paratriaenops furculus</i>	<i>cytb</i>	Madagaskar	Madagaskar	H26
49	MH744521	(Ramasindrazana i sar. 2018)	<i>Miniopterus gleni</i>	<i>cytb</i>	Madagaskar	Madagaskar	H26
50	MH744522	(Ramasindrazana i sar. 2018)	<i>Miniopterus griveaudi</i>	<i>cytb</i>	Madagaskar	Madagaskar	H6
51	MH744523	(Ramasindrazana i sar. 2018)	<i>Miniopterus griveaudi</i>	<i>cytb</i>	Madagaskar	Madagaskar	H6
52	MH744524	(Ramasindrazana i sar. 2018)	<i>Miniopterus griveaudi</i>	<i>cytb</i>	Madagaskar	Madagaskar	H27

53	MH744525	(Ramasindrazana i sar. 2018)	<i>Miniopterus griveaudi</i>	cytb	Madagaskar	Madagaskar	H6
54	MH744526	(Ramasindrazana i sar. 2018)	<i>Miniopterus manavi sensu lato</i>	cytb	Madagaskar	Madagaskar	H7
55	MH744527	(Ramasindrazana i sar. 2018)	<i>Nycteribia stylidiopsis</i>	cytb	Madagaskar	Madagaskar	H5
56	MH744528	(Ramasindrazana i sar. 2018)	<i>Penicillidia leptothrinax</i>	cytb	Madagaskar	Madagaskar	H7
57	MH744529	(Ramasindrazana i sar. 2018)	<i>Penicillidia leptothrinax</i>	cytb	Madagaskar	Madagaskar	H9
58	MH744530	(Ramasindrazana i sar. 2018)	<i>Penicillidia leptothrinax</i>	cytb	Madagaskar	Madagaskar	H9
59	MH744531	(Ramasindrazana i sar. 2018)	<i>Penicillidia leptothrinax</i>	cytb	Madagaskar	Madagaskar	H9
60	MK098848	(Rosskopf i sar. 2018)	<i>Miniopterus minor</i>	cytb	Gabon	Centralna Afrika	H10
61	MK098849	(Rosskopf i sar. 2018)	<i>Miniopterus minor</i>	cytb	Gabon	Centralna Afrika	H28
62	MT996236 <sup>a</sup>	(Sándor i sar. 2021)	<i>Miniopterus schreibersi</i>	cytb	Rumunija	Evropa	H1 <sup>a</sup>
63	MT996237 <sup>a</sup>	(Sándor i sar. 2021)	<i>Miniopterus schreibersi</i>	cytb	Rumunija	Evropa	H3 <sup>a</sup>
64	MW007671 <sup>a</sup>	(Szentiványi i sar. 2020)	<i>Nycteribia schmidlii</i>	cytb	Južna Afrika	Južna Afrika	H4 <sup>a</sup>
65	MW007672	(Szentiványi i sar. 2020)	<i>Nycteribia schmidlii</i>	cytb	Južna Afrika	Južna Afrika	H18
66	MW007673	(Szentiványi i sar. 2020)	<i>Nycteribia schmidlii</i>	cytb	Južna Afrika	Južna Afrika	H18
67	MW007674 <sup>a</sup>	(Szentiványi i sar. 2020)	<i>Nycteribia schmidlii</i>	cytb	Južna Afrika	Južna Afrika	H1 <sup>a</sup>
68	MW007675 <sup>a</sup>	(Szentiványi i sar. 2020)	<i>Nycteribia schmidlii</i>	cytb	Južna Afrika	Južna Afrika	H1 <sup>a</sup>
69	MW007676 <sup>a</sup>	(Szentiványi i sar. 2020)	<i>Nycteribia schmidlii</i>	cytb	Južna Afrika	Južna Afrika	H2 <sup>a</sup>
70	MW007677	(Szentiványi i sar. 2020)	<i>Miniopterus natalensis</i>	cytb	Južna Afrika	Južna Afrika	H8
71	MW007678	(Szentiványi i sar. 2020)	<i>Miniopterus natalensis</i>	cytb	Južna Afrika	Južna Afrika	H14

72	MW007679	(Szentiványi i sar. 2020)	<i>Miniopterus natalensis</i>	cytb	Južna Afrika	Južna Afrika	H14
73	MW007680 <sup>a</sup>	(Szentiványi i sar. 2020)	<i>Nycteribia schmidlii</i>	cytb	Mađarska	Evropa	H3 <sup>a</sup>
74	MW007681 <sup>a</sup>	(Szentiványi i sar. 2020)	<i>Nycteribia schmidlii</i>	cytb	Mađarska	Evropa	H3 <sup>a</sup>
75	MW007682 <sup>a</sup>	(Szentiványi i sar. 2020)	<i>Nycteribia schmidlii</i>	cytb	Italija	Evropa	H3 <sup>a</sup>
76	MW007683 <sup>a</sup>	(Szentiványi i sar. 2020)	<i>Nycteribia schmidlii</i>	cytb	Italija	Evropa	H3 <sup>a</sup>
77	MW007684 <sup>a</sup>	(Szentiványi i sar. 2020)	<i>Nycteribia schmidlii</i>	cytb	Italija	Evropa	H3 <sup>a</sup>
78	MW007685	(Szentiványi i sar. 2020)	<i>Nycteribia schmidlii</i>	cytb	Španija	Evropa	H14
79	MW007686 <sup>a</sup>	(Szentiványi i sar. 2020)	<i>Miniopterus schreibersi</i>	cytb	Mađarska	Evropa	H3 <sup>a</sup>
80	MW007687 <sup>a</sup>	(Szentiványi i sar. 2020)	<i>Miniopterus schreibersi</i>	cytb	Italija	Evropa	H3 <sup>a</sup>
81	MW007688 <sup>a</sup>	(Szentiványi i sar. 2020)	<i>Miniopterus schreibersi</i>	cytb	Italija	Evropa	H3 <sup>a</sup>
82	MW007689 <sup>a</sup>	(Szentiványi i sar. 2020)	<i>Miniopterus schreibersi</i>	cytb	Španija	Evropa	H3 <sup>a</sup>
83	MW039207	(Rasoanoro i sar. 2021)	<i>Miniopterus sp.</i>	cytb	Madagaskar	Madagaskar	H9
84	MW039208	(Rasoanoro i sar. 2021)	<i>Miniopterus griveaudi</i>	cytb	Madagaskar	Madagaskar	H14
85	MW039209	(Rasoanoro i sar. 2021)	<i>Miniopterus ambohitrensis</i>	cytb	Madagaskar	Madagaskar	H14
86	MW039210	(Rasoanoro i sar. 2021)	<i>Miniopterus gleni</i>	cytb	Madagaskar	Madagaskar	H14
87	MW039211	(Rasoanoro i sar. 2021)	<i>Miniopterus gleni</i>	cytb	Madagaskar	Madagaskar	H14
88	MW039212	(Rasoanoro i sar. 2021)	<i>Miniopterus gleni</i>	cytb	Madagaskar	Madagaskar	H14
89	MW039213	(Rasoanoro i sar. 2021)	<i>Miniopterus gleni</i>	cytb	Madagaskar	Madagaskar	H14
90	MW039214	(Rasoanoro i sar. 2021)	<i>Miniopterus gleni</i>	cytb	Madagaskar	Madagaskar	H14
91	MW039215	(Rasoanoro i sar. 2021)	<i>Miniopterus gleni</i>	cytb	Madagaskar	Madagaskar	H14



92	MW039216	(Rasoanoro i sar. 2021)	<i>Miniopterus gleni</i>	<i>cytb</i>	Madagaskar	Madagaskar	H14
93	MW039217	(Rasoanoro i sar. 2021)	<i>Miniopterus gleni</i>	<i>cytb</i>	Madagaskar	Madagaskar	H14
94	MW039218	(Rasoanoro i sar. 2021)	<i>Miniopterus gleni</i>	<i>cytb</i>	Madagaskar	Madagaskar	H14
95	MW039219	(Rasoanoro i sar. 2021)	<i>Miniopterus gleni</i>	<i>cytb</i>	Madagaskar	Madagaskar	H14
96	MW039220	(Rasoanoro i sar. 2021)	<i>Miniopterus gleni</i>	<i>cytb</i>	Madagaskar	Madagaskar	H14
97	MW039221	(Rasoanoro i sar. 2021)	<i>Miniopterus gleni</i>	<i>cytb</i>	Madagaskar	Madagaskar	H14
98	MW039222	(Rasoanoro i sar. 2021)	<i>Miniopterus gleni</i>	<i>cytb</i>	Madagaskar	Madagaskar	H14
99	MW039223	(Rasoanoro i sar. 2021)	<i>Miniopterus gleni</i>	<i>cytb</i>	Madagaskar	Madagaskar	H14
100	MW039224	(Rasoanoro i sar. 2021)	<i>Miniopterus gleni</i>	<i>cytb</i>	Madagaskar	Madagaskar	H14
101	MW039225	(Rasoanoro i sar. 2021)	<i>Miniopterus gleni</i>	<i>cytb</i>	Madagaskar	Madagaskar	H14
102	MW039226	(Rasoanoro i sar. 2021)	<i>Miniopterus ambohitrensis</i>	<i>cytb</i>	Madagaskar	Madagaskar	H5
103	MW039227	(Rasoanoro i sar. 2021)	<i>Miniopterus gleni</i>	<i>cytb</i>	Madagaskar	Madagaskar	H5
104	MW039228	(Rasoanoro i sar. 2021)	<i>Miniopterus gleni</i>	<i>cytb</i>	Madagaskar	Madagaskar	H5
105	MW039229	(Rasoanoro i sar. 2021)	<i>Miniopterus griveaudi</i>	<i>cytb</i>	Madagaskar	Madagaskar	H7
106	MW039230	(Rasoanoro i sar. 2021)	<i>Miniopterus ambohitrensis</i>	<i>cytb</i>	Madagaskar	Madagaskar	H7
1	JN990714	(Witsenburg i sar. 2012)	<i>Miniopterus schreibersii</i>	<i>cox1</i>	Švajcarska	Evropa	H12
2	JN990716 <sup>a</sup>	(Witsenburg i sar. 2012)	<i>Miniopterus schreibersii</i>	<i>cox1</i>	Švajcarska	Evropa	H1 <sup>a</sup>
3	JN990717 <sup>a</sup>	(Witsenburg i sar. 2012)	<i>Miniopterus schreibersii</i>	<i>cox1</i>	Švajcarska	Evropa	H5 <sup>a</sup>
4	MK098851	(Rosskopf i sar. 2018)	<i>Miniopterus minor</i>	<i>cox1</i>	Gabon	Centralna Afrika	H6

5	KF159795	(Schaer i sar. 2013)	<i>Miniopterus villiersi</i>	<i>cox1</i>	Gvineja	Zapadna Afrika	H6
6	KT750434	(Lutz i sar. 2016)	<i>Miniopterus sp.</i>	<i>cox1</i>	Tanzanija	Istočna Afrika	H6
7	KT750435	(Lutz i sar. 2016)	<i>Miniopterus sp.</i>	<i>cox1</i>	Tanzanija	Istočna Afrika	H16
8	KT750437	(Lutz i sar. 2016)	<i>Miniopterus rufus</i>	<i>cox1</i>	Kenija	Istočna Afrika	H6
9	KT750438	(Lutz i sar. 2016)	<i>Miniopterus rufus</i>	<i>cox1</i>	Kenija	Istočna Afrika	H9
10	KT750440	(Lutz i sar. 2016)	<i>Miniopterus rufus</i>	<i>cox1</i>	Kenija	Istočna Afrika	H6
11	KT750441	(Lutz i sar. 2016)	<i>Miniopterus rufus</i>	<i>cox1</i>	Kenija	Istočna Afrika	H15
12	KT750442 <sup>a</sup>	(Lutz i sar. 2016)	<i>Miniopterus rufus</i>	<i>cox1</i>	Kenija	Istočna Afrika	H5 <sup>a</sup>
13	KT750443	(Lutz i sar. 2016)	<i>Miniopterus rufus</i>	<i>cox1</i>	Kenija	Istočna Afrika	H6
14	KT750444	(Lutz i sar. 2016)	<i>Miniopterus rufus</i>	<i>cox1</i>	Kenija	Istočna Afrika	H6
15	KT750445	(Lutz i sar. 2016)	<i>Miniopterus rufus</i>	<i>cox1</i>	Kenija	Istočna Afrika	H6
16	KT750448	(Lutz i sar. 2016)	<i>Miniopterus natalensis</i>	<i>cox1</i>	Kenija	Istočna Afrika	H13
17	KT750452 <sup>a</sup>	(Lutz i sar. 2016)	<i>Miniopterus natalensis</i>	<i>cox1</i>	Kenija	Istočna Afrika	H2 <sup>a</sup>
18	KT750453	(Lutz i sar. 2016)	<i>Miniopterus natalensis</i>	<i>cox1</i>	Kenija	Istočna Afrika	H7
19	LC715187	(Rosyadi i sar. 2022)	<i>Miniopterus fuliginosus</i>	<i>cox1</i>	Japan	Japan	H8
20	LC715188	(Rosyadi i sar. 2022)	<i>Miniopterus fuliginosus</i>	<i>cox1</i>	Japan	Japan	H8
21	LC715189	(Rosyadi i sar. 2022)	<i>Miniopterus fuliginosus</i>	<i>cox1</i>	Japan	Japan	H11
22	LC715190	(Rosyadi i sar. 2022)	<i>Miniopterus fuliginosus</i>	<i>cox1</i>	Japan	Japan	H10
23	LC715191	(Rosyadi i sar. 2022)	<i>Miniopterus fuliginosus</i>	<i>cox1</i>	Japan	Japan	H14

24	LC715192	(Rosyadi i sar. 2022)	<i>Miniopterus fuliginosus</i>	<i>cox1</i>	Japan	Japan	H10
25	LC715193	(Rosyadi i sar. 2022)	<i>Miniopterus fuliginosus</i>	<i>cox1</i>	Japan	Japan	H10
26	KT750433	(Lutz i sar. 2016)	<i>Miniopterus sp.</i>	<i>cox1</i>	Tanzanija	Istočna Afrika	H17
27	KT750439	(Lutz i sar. 2016)	<i>Miniopterus rufus</i>	<i>cox1</i>	Kenija	Istočna Afrika	H16
28	KT750447	(Lutz i sar. 2016)	<i>Miniopterus natalensis</i>	<i>cox1</i>	Kenija	Istočna Afrika	H13
29	KT750449	(Lutz i sar. 2016)	<i>Miniopterus natalensis</i>	<i>cox1</i>	Kenija	Istočna Afrika	H16
30	KT750450 <sup>a</sup>	(Lutz i sar. 2016)	<i>Miniopterus natalensis</i>	<i>cox1</i>	Kenija	Istočna Afrika	H2 <sup>a</sup>
31	KT750451	(Lutz i sar. 2016)	<i>Miniopterus natalensis</i>	<i>cox1</i>	Kenija	Istočna Afrika	H13
32	KT750541	(Lutz i sar. 2016)	<i>Miniopterus sp.</i>	<i>cox1</i>	Tanzanija	Istočna Afrika	H18
33	KT750455	(Lutz i sar. 2016)	<i>Miniopterus natalensis</i>	<i>cox1</i>	Kenija	Istočna Afrika	H17
34	KT750456	(Lutz i sar. 2016)	<i>Miniopterus natalensis</i>	<i>cox1</i>	Kenija	Istočna Afrika	H13

---

**Prilog 6.** Sekvence vrste *Miniopterus schreibersii* iz GenBank baze, iz prethodno objavljenih studija, korićenih kao dodatak sekvencama ove studije

Tabela prístupnih brojeva iz GenBank baze za korišćene sekvence fragmenta gena za citohrom b (*cytb*), tRNK prolin, tRNK treonin, te fragment hipervarijabilnog regiona 1 (*HVI*) kontrolnog regiona vrste *Miniopterus schreibersii*, objavljenih u drugim studijama. Sekvence sa oznakom <sup>a</sup> odgovaraju u potpunosti sekvencama dobijenim u ovoj studiji

Redni broj	GenBank pristupni broj	Autori studije	Lokalitet uzorkovanja	Oznaka haplotipa
1	GQ149027.1	(Ramos Pereira i sar. 2009)	Portugal	H1 <sup>a</sup>
2	GQ149028.1	(Ramos Pereira i sar. 2009)	Portugal	H16
3	GQ149029.1	(Ramos Pereira i sar. 2009)	Portugal	H16
4	GQ149030.1	(Ramos Pereira i sar. 2009)	Portugal	H16
5	GQ149031.1	(Ramos Pereira i sar. 2009)	Portugal	H1 <sup>a</sup>
6	GQ149032.1	(Ramos Pereira i sar. 2009)	Portugal	H1 <sup>a</sup>
7	GQ149033.1	(Ramos Pereira i sar. 2009)	Portugal	H15
8	GQ149034.1	(Ramos Pereira i sar. 2009)	Portugal	H14
9	GQ149035.1	(Ramos Pereira i sar. 2009)	Portugal	H1 <sup>a</sup>
10	GQ149036.1	(Ramos Pereira i sar. 2009)	Portugal	H20
11	GQ149037.1	(Ramos Pereira i sar. 2009)	Portugal	H10
12	GQ149038.1	(Ramos Pereira i sar. 2009)	Portugal	H21
13	GQ149039.1	(Ramos Pereira i sar. 2009)	Portugal	H13
14	GQ149040.1	(Ramos Pereira i sar. 2009)	Portugal	H22
15	GQ149042.1	(Ramos Pereira i sar. 2009)	Portugal	H1 <sup>a</sup>
16	GQ149043.1	(Ramos Pereira i sar. 2009)	Portugal	H11
17	GQ149044.1	(Ramos Pereira i sar. 2009)	Portugal	H1 <sup>a</sup>
18	GQ149045.1	(Ramos Pereira i sar. 2009)	Portugal	H19
19	GQ149046.1	(Ramos Pereira i sar. 2009)	Portugal	H11
20	GQ149047.1	(Ramos Pereira i sar. 2009)	Portugal	H15
21	GQ149048.1	(Ramos Pereira i sar. 2009)	Portugal	H12
22	GQ149049.1	(Ramos Pereira i sar. 2009)	Portugal	H1 <sup>a</sup>

23	GQ149050.1	(Ramos Pereira i sar. 2009)	Portugal	H17
24	GQ149052.1	(Ramos Pereira i sar. 2009)	Portugal	H18
25	GQ149054.1	(Ramos Pereira i sar. 2009)	Portugal	H17
26	GQ149056.1	(Ramos Pereira i sar. 2009)	Portugal	H16
27	GQ149060.1	(Ramos Pereira i sar. 2009)	Portugal	H11
28	GQ149061.1	(Ramos Pereira i sar. 2009)	Portugal	H11
29	GQ149062.1	(Ramos Pereira i sar. 2009)	Portugal	H10
30	GQ149065.1	(Ramos Pereira i sar. 2009)	Portugal	H1 <sup>a</sup>
31	AY923064.1	(Bilgin i sar. 2006)	Jugoistočna Evropa	H1 <sup>a</sup>
32	AY923065.1	(Bilgin i sar. 2006)	Jugoistočna Evropa	H40
33	AY923067.1	(Bilgin i sar. 2006)	Jugoistočna Evropa	H39
34	AY923068.1	(Bilgin i sar. 2006)	Jugoistočna Evropa	H23
35	AY923069.1	(Bilgin i sar. 2006)	Jugoistočna Evropa	H8 <sup>a</sup>
36	AY923071.1	(Bilgin i sar. 2006)	Zapadna Anatolija	H32
37	AY923072.1	(Bilgin i sar. 2006)	Jugoistočna Evropa	H44
38	AY923073.1	(Bilgin i sar. 2006)	Zapadna Anatolija	H45
39	EU332355.1	(Bilgin i sar. 2008)	Bugarska	H39
40	EU332356.1	(Bilgin i sar. 2008)	Turska	H61
41	EU332357.1	(Bilgin i sar. 2008)	Turska	H12
42	EU332358.1	(Bilgin i sar. 2008)	Turska	H30
43	EU332359.1	(Bilgin i sar. 2008)	Turska	H57
44	EU332360.1	(Bilgin i sar. 2008)	Turska	H50
45	EU332361.1	(Bilgin i sar. 2008)	Turska	H56
46	EU332363.1	(Bilgin i sar. 2008)	Turska	H27
47	EU332364.1	(Bilgin i sar. 2008)	Turska	H55
48	EU332365.1	(Bilgin i sar. 2008)	Turska	H60
49	EU332366.1	(Bilgin i sar. 2008)	Turska	H54
50	EU332367.1	(Bilgin i sar. 2008)	Turska	H54
51	EU332368.1	(Bilgin i sar. 2008)	Turska	H49
52	EU332369.1	(Bilgin i sar. 2008)	Turska	H1 <sup>a</sup>
53	EU332370.1	(Bilgin i sar. 2008)	Turska	H14
54	EU332371.1	(Bilgin i sar. 2008)	Turska	H11

55	EU332372.1	(Bilgin i sar. 2008)	Turska	H46
56	EU332373.1	(Bilgin i sar. 2008)	Turska	H23
57	EU332374.1	(Bilgin i sar. 2008)	Turska	H24
58	EU332375.1	(Bilgin i sar. 2008)	Turska	H48
59	EU332376.1	(Bilgin i sar. 2008)	Turska	H53
60	EU332377.1	(Bilgin i sar. 2008)	Turska	H59
61	EU332378.1	(Bilgin i sar. 2008)	Turska	H8 <sup>a</sup>
62	EU332379.1	(Bilgin i sar. 2008)	Turska	H28
63	EU332380.1	(Bilgin i sar. 2008)	Turska	H47
64	EU332381.1	(Bilgin i sar. 2008)	Turska	H58
65	EU332382.1	(Bilgin i sar. 2008)	Turska	H40
66	EU332383.1	(Bilgin i sar. 2008)	Turska	H52
67	EU332384.1	(Bilgin i sar. 2008)	Turska	H66
68	EU332385.1	(Bilgin i sar. 2008)	Turska	H32
69	EU332386.1	(Bilgin i sar. 2008)	Turska	H65
70	EU332388.1	(Bilgin i sar. 2008)	Turska	H64
71	EU332389.1	(Bilgin i sar. 2008)	Turska	H63
72	EU332390.1	(Bilgin i sar. 2008)	Turska	H62
73	EU332391.1	(Bilgin i sar. 2008)	Turska	H44
74	EU332392.1	(Bilgin i sar. 2008)	Turska	H51
75	FJ028608.1	(Furman i sar. 2009)	Turska	H38
76	FJ028609.1	(Furman i sar. 2009)	Turska	H31
77	FJ028610.1	(Furman i sar. 2009)	Turska	H43
78	FJ028611.1	(Furman i sar. 2009)	Turska	H36
79	FJ028612.1	(Furman i sar. 2009)	Turska	H4 <sup>a</sup>
80	FJ028613.1	(Furman i sar. 2009)	Turska	H26
81	FJ028614.1	(Furman i sar. 2009)	Turska	H30
82	FJ028615.1	(Furman i sar. 2009)	Turska	H12
83	FJ028616.1	(Furman i sar. 2009)	Turska	H12
84	FJ028617.1	(Furman i sar. 2009)	Turska	H25
85	FJ028618.1	(Furman i sar. 2009)	Turska	H42
86	FJ028619.1	(Furman i sar. 2009)	Turska	H35

87	FJ028620.1	(Furman i sar. 2009)	Turska	H41
88	FJ028621.1	(Furman i sar. 2009)	Turska	H34
89	FJ028622.1	(Furman i sar. 2009)	Turska	H33
90	FJ028623.1	(Furman i sar. 2009)	Turska	H37
91	FJ028624.1	(Furman i sar. 2009)	Turska	H32
92	FJ028625.1	(Furman i sar. 2009)	Turska	H29
93	FJ028626.1	(Furman i sar. 2009)	Turska	H11
94	FJ028627.1	(Furman i sar. 2009)	Turska	H28
95	FJ028628.1	(Furman i sar. 2009)	Turska	H27
96	FJ028629.1	(Furman i sar. 2009)	Turska	H24
97	FJ028630.1	(Furman i sar. 2009)	Turska	H31
98	FJ028631.1	(Furman i sar. 2009)	Turska	H1 <sup>a</sup>

---







**Prilog 7. d** Procena stepena evolutivne divergencije između sekvenci fragmenta gena za malu ribozomalnu subjedinicu RNK (16S rRNK) kod vrste grinje *Spinturnix psi*. Prikazan je broj substitucija baza po mestu na sekvenci. Analize su rađene primenom Kimura 2-parametarskog modela [1]. U analizu je uključeno 6 nukleotidnih sekvenci, i ukupno 354 pozicije baznih parova nukleotida. Evolutivne analize su rađene u softveru MEGA6 [2].

Spsi_H1						
Spsi_H2	0,003					
Spsi_H3	0,003	0,006				
Spsi_H4	0,003	0,006	0,006			
Spsi_H5	0,003	0,006	0,006	0,006		
Spsi_H6	0,003	0,006	0,006	0,006	0,006	

**Prilog 7. e** Procena stepena evolutivne divergencije između sekvenci fragmenta gena za subjedinicu 1 citohrom oksidaze (*COI*) kod vrste beskrilne muve *Phthiridium biarticulatum*. Prikazan je broj substitucija baza po mestu na sekvenci. Analize su rađene primenom Kimura 2-parametarskog modela [1]. U analizu je uključeno 9 nukleotidnih sekvence, i ukupno 626 pozicija baznih parova nukleotida. Evolutivne analize su rađene u softveru MEGA6 [2].

Phbiar_H1									
Phbiar_H2	0,010								
Phbiar_H3	0,006	0,003							
Phbiar_H4	0,008	0,005	0,002						
Phbiar_H5	0,002	0,011	0,008	0,010					
Phbiar_H6	0,002	0,011	0,008	0,010	0,003				
Phbiar_H7	0,002	0,011	0,008	0,010	0,003	0,003			
Phbiar_H8	0,002	0,011	0,008	0,010	0,003	0,003	0,003		
Phbiar_H9	0,005	0,015	0,011	0,013	0,006	0,006	0,006	0,006	

**Prilog 7. f** Procena stepena evolutivne divergencije između sekvenci fragmenta gena za malu ribozomalnu subjedinicu RNK (16S rRNK) kod vrste grinje *Eyndhovenia euryalis*. Prikazan je broj substitucija baza po mestu na sekvenci. Analize su rađene primenom Kimura 2-parametarskog modela [1]. U analizu je uključeno 8 nukleotidnih sekvenci, i ukupno 329 pozicija baznih parova nukleotida. Evolutivne analize su rađene u softveru MEGA6 [2].

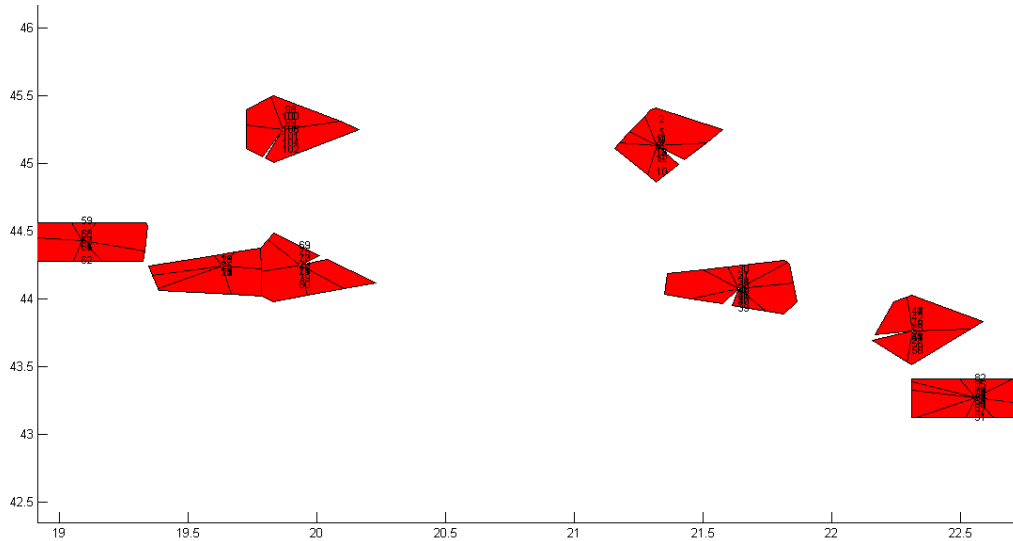
Eur_H1								
Eur_H2	0,003							
Eur_H3	0,003	0,006						
Eur_H4	0,003	0,006	0,006					
Eur_H5	0,003	0,006	0,006	0,006				
Eur_H6	0,003	0,006	0,006	0,006	0,006			
Eur_H7	0,057	0,060	0,060	0,060	0,057	0,060		
Eur_H8	0,060	0,057	0,063	0,063	0,060	0,063	0,003	



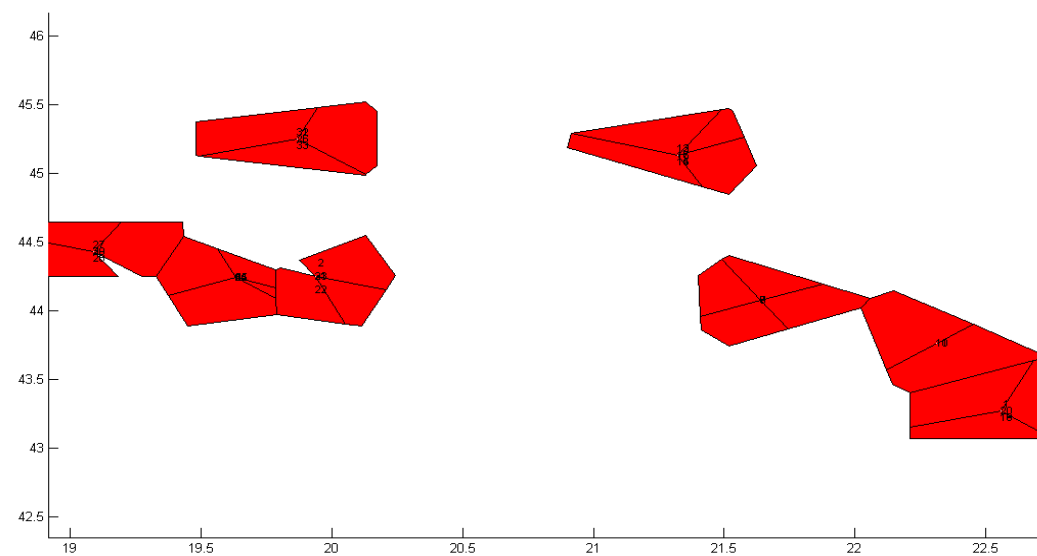


**Prilog 8.** Analiza strukturiranosti populacija ekto parazita u softveru BAPS

**Prilog 8. a** *Nycteribia schmidlii*



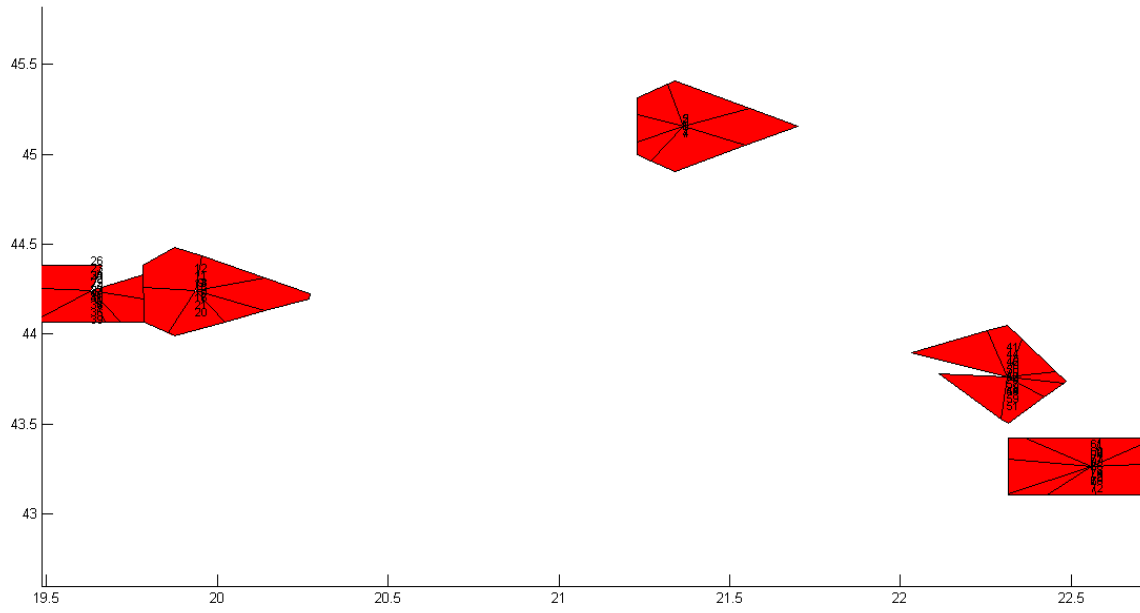
**Prilog 8. b** *Penicillidia conspicua*



**Prilog 8. c** *Spinturnix psi*



**Prilog 8. e** *Eyndhovenia euryalis*

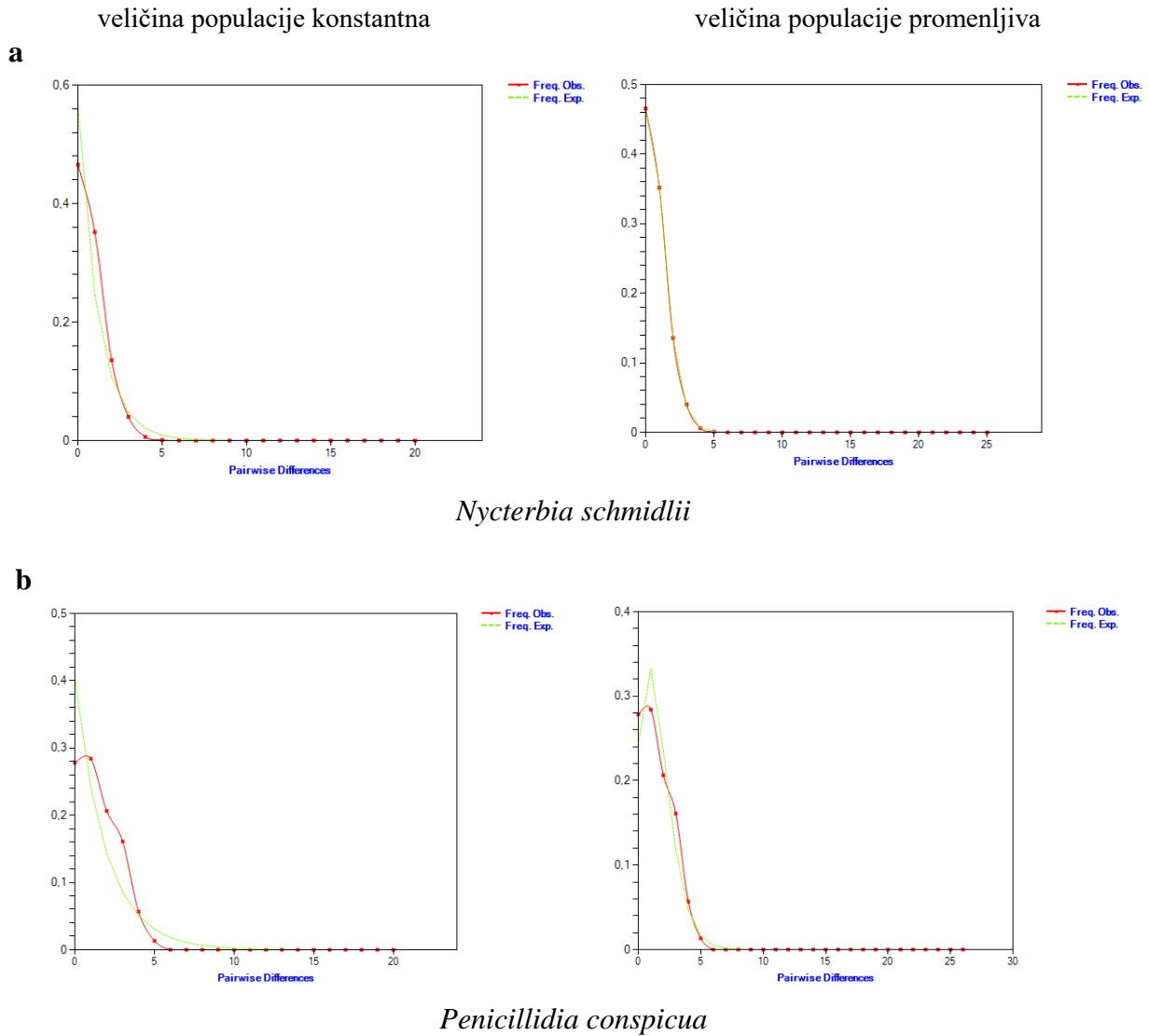


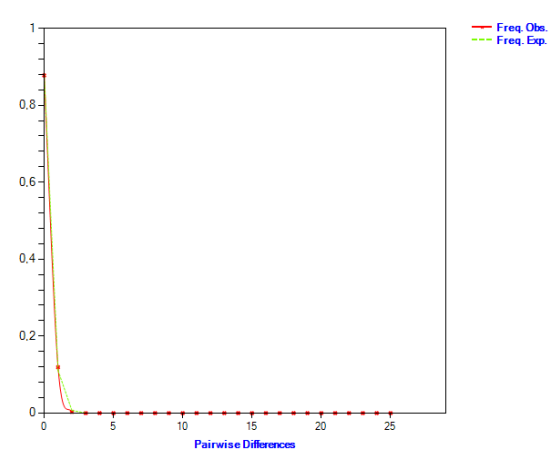
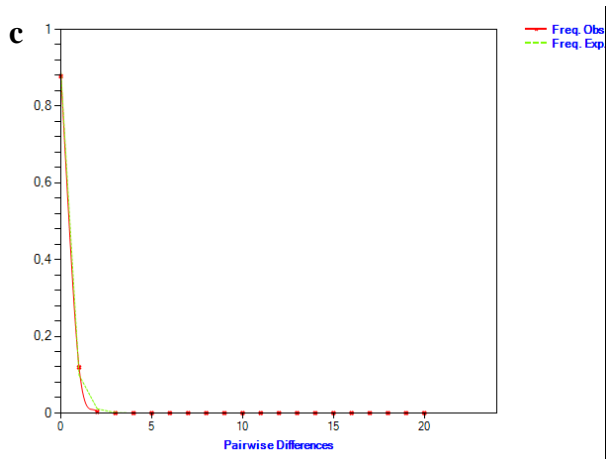


**Prilog 9.** Mismatch analiza distribucije parova nukleotidnih razlika

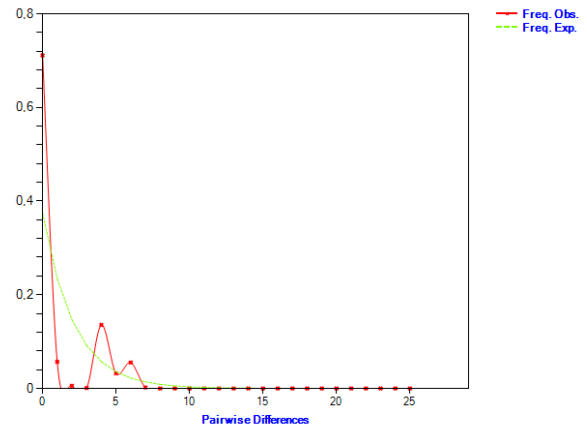
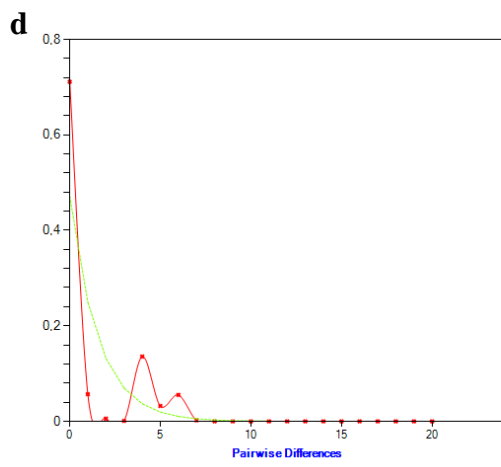
Mismatch grafikon leva kolona - konstantna veličina populacije; desna kolona - promenljiva veličina populacije (rast ili opadanje) za vrste: **a** *Nycteribia schmidlii*; **b** *Penicillidia conspicua*; **c** *Spinturnix psi*; **d** *Phthiridium biarticulatum*; **e** *Eyndhovenia euryalis*; **f** *Polychromophilus melanipherus cytb*; **g** *Polychromophilus melanipherus cox1*; **h** *Miniopterus schreibersii*

\*Puna crvena linija sa oznakom Freq. Obs. u legendi predstavlja uočene frekvencije, a zelena isprekidana linija sa oznakom Freq. Exp. predstavlja uočene frekvencije diferencijacije nukleotidnih parova

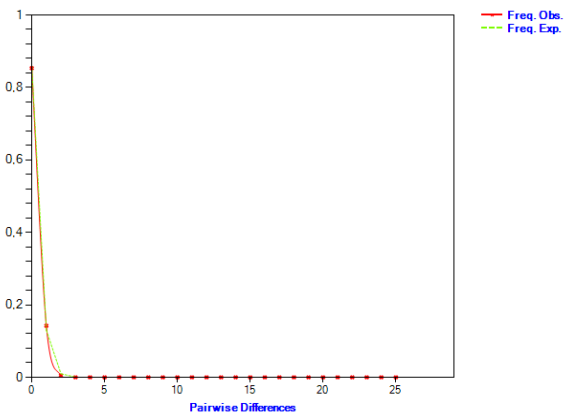
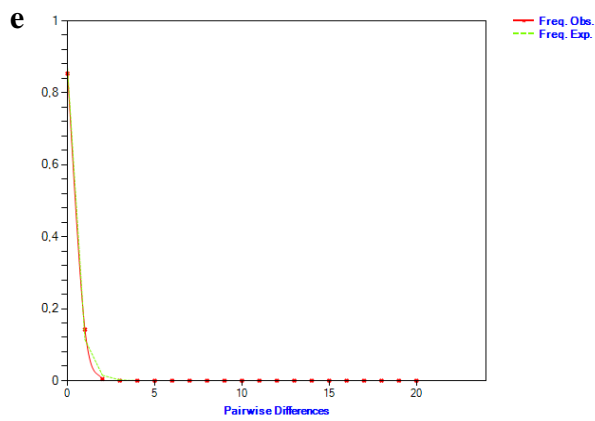




*Spinturnix psi*

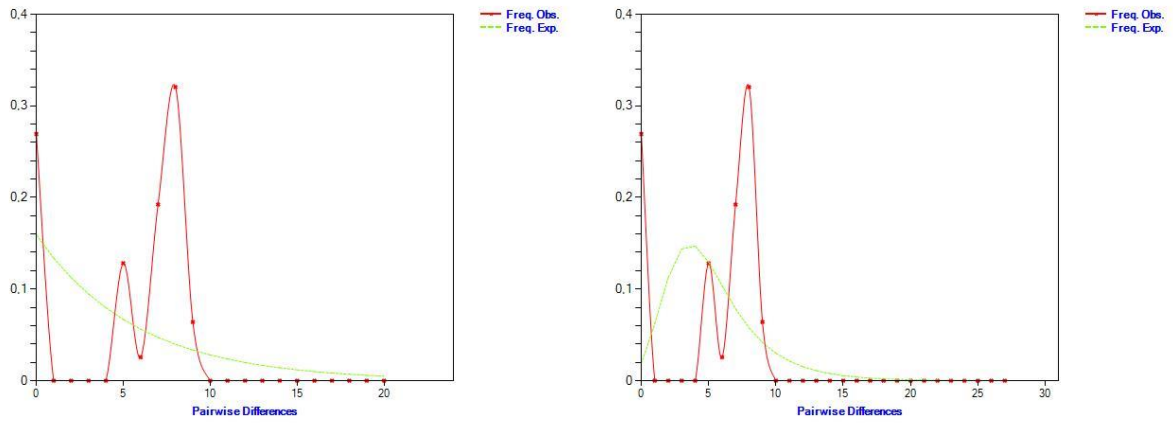


*Phthiridium biarticulatum*



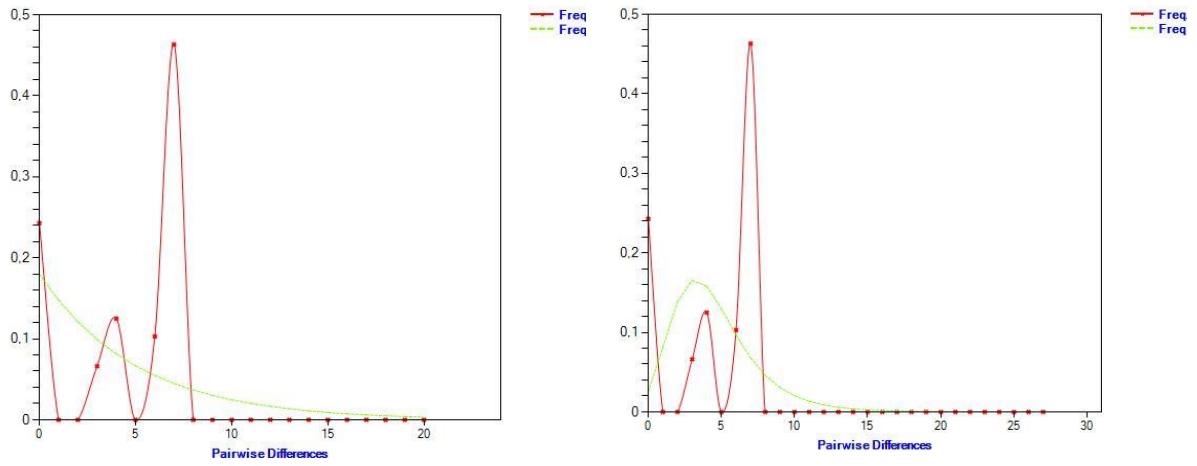
*Eyndhovenia euryalis*

**f**



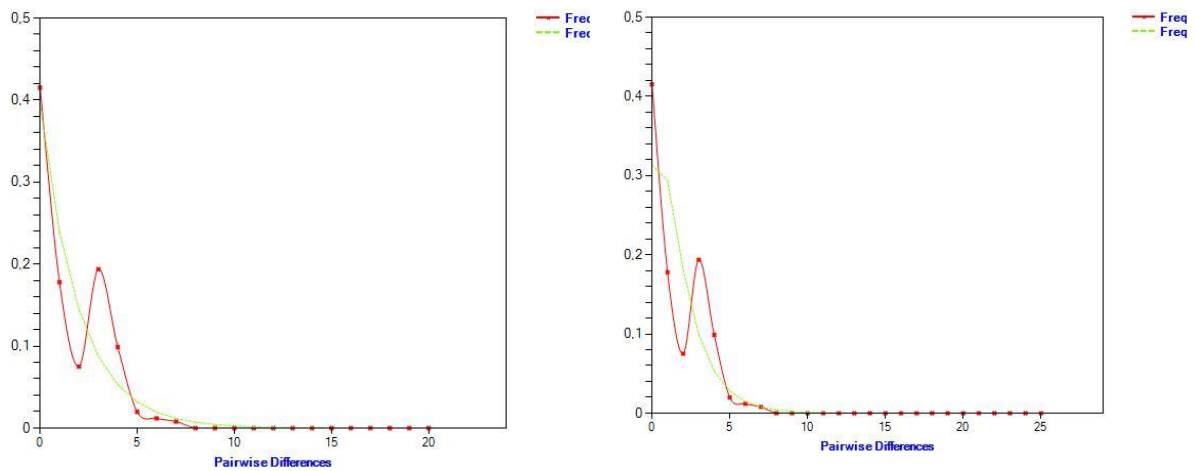
*Polychromophilus melanipherus*

**g**



*Polychromophilus melanipherus*

**h**



*Miniopterus schreibersii*

**Prilog 10.** Primer rezultata analize iz programa Geneland

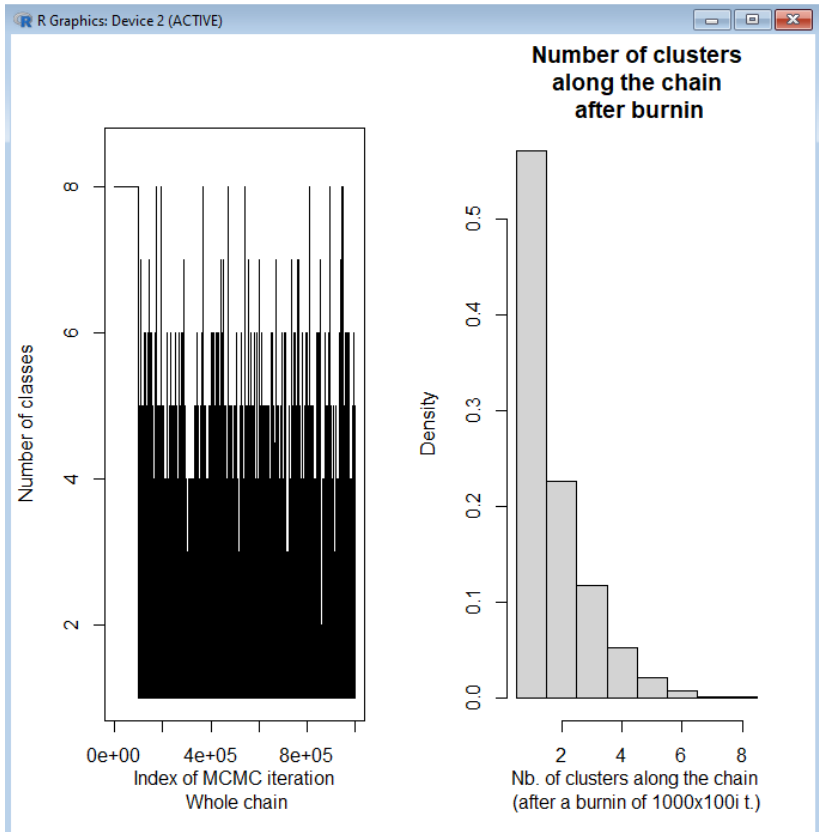
**a** Podržanost za najverovatniji broj populacija u procentima; **b** Najverovatniji broj klastera na grafiku; **c** Pripadnost jedinki sa svakog od lokaliteta uzorkovanja određenom klasteru. U slučaju postojanja klastera mapa bi izgledala kao „heat-map“ sa različitim nijansama; **d** Program daje mape pripadanja klasterima za svaki od zadatih scenarija, tj. od postojanja jednog, do deset klastera

**a**

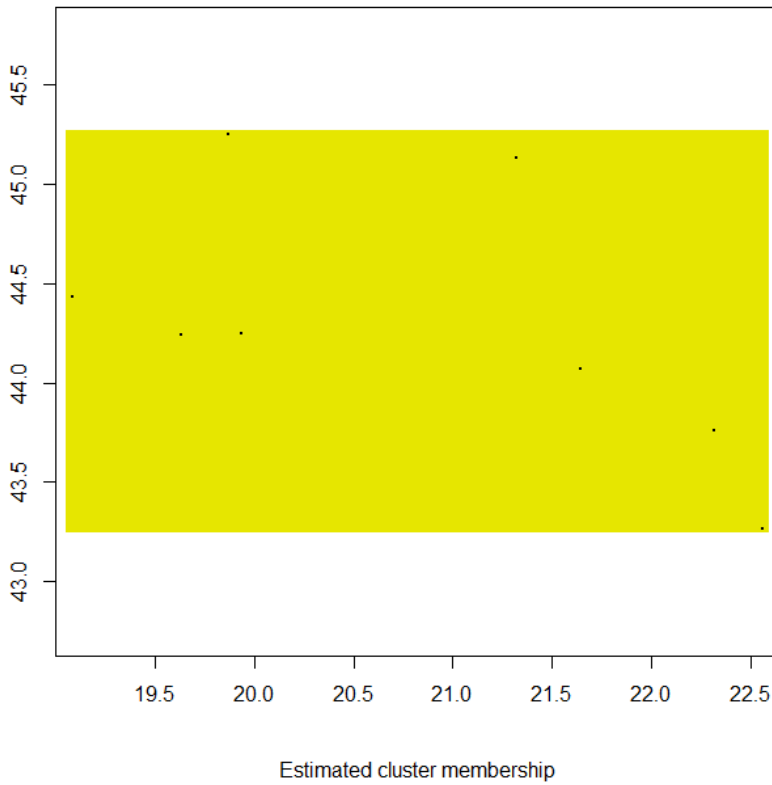
Run	Number of populations	Average log posterior probability	Select a run
1	1 ( 38.64 %)	-63.7837290712798	<input type="radio"/>
2	1 ( 38.05 %)	-83.71028127972957	<input type="radio"/>
3	1 ( 38.93 %)	-65.77580112558034	<input type="radio"/>
4	1 ( 38.31 %)	-68.99020310194265	<input type="radio"/>
5	1 ( 37.53 %)	-66.94007994917887	<input type="radio"/>
6	1 ( 38.23 %)	-69.25529681720154	<input type="radio"/>
7	1 ( 36.88 %)	-59.9488153056753	<input type="radio"/>
8	1 ( 37.68 %)	-62.99186949879973	<input type="radio"/>
9	1 ( 37.46 %)	-66.28942599606536	<input type="radio"/>
10	1 ( 38.33 %)	-58.4447013764612	<input type="radio"/>

Save to file    Recalculate with burnin 0    Sort by posterior probability    Done

**b**

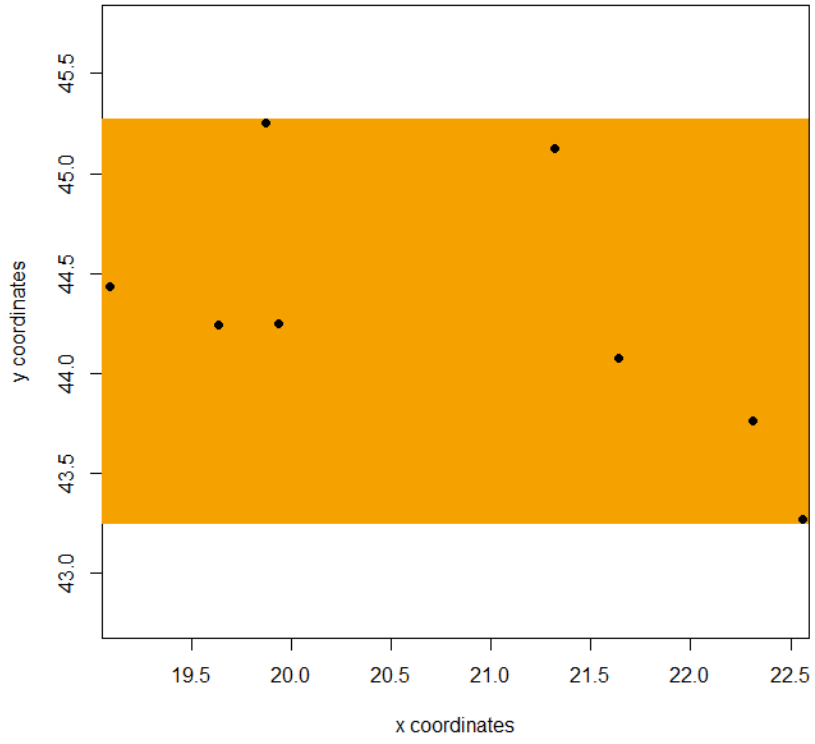


**c**



**d**

**Map of posterior probability to belong to cluster 10**



## BIOGRAFIJA AUTORA

Branka Bajić (rođeno Pejić) je rođena 16.12.1991. u Loznici. Osnovnu školu i gimnaziju je završila u Zvorniku. Osnovne studije biologije upisala je 2010. godine na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu, a master studije (modul eksperimentalna fiziologija) na istom fakultetu 2014. Doktorske studije (modul evolucionarna biologija) upisala je školske 2015/2016. godine, takođe na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu.

Odeljenju za genetička istraživanja Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“ se pridružuje odmah po upisavanju doktorskih studija, prvo u svojstvu stipendiste Ministarstva nauke, prosvete i tehnološkog razvoja (2016-2018), a od aprila 2018. u svojstvu zaposlenog istraživača pripravnika. Zvanje istraživač saradnik je stekla u junu 2020. godine. Od 2017. je spoljašnji saradnik Prirodnjačkog muzeja i Centra za markiranje životinja u Beogradu, uključena u projekat monitoringa populacija slepih miševa i njihovih staništa u Srbiji.

Aktivno angažovana od 2013. godine u popularizaciji nauke kroz projekte Evropske komisije, a od 2016. i kao organizator beogradske Noći istraživača (H2020-MSCA-NIGHT-2016-2017 i 2018-2019). Od 2013. godine učestvuje kao organizator i prezenter na manifestacijama Međunarodna noć slepih miševa u Beogradu. U Istraživačkoj stanici Petnica angažovana je kao stručni saradnik na seminarima biologije od 2016. godine. Od 2021-2023. godine bila je angažovana na međunarodnom projektu „Prekogranična zaštita slepih miševa iz familije potkovičara u rumunsko-srpskom području Đerdapske klisure“.

Preko programa mobilnosti Erasmus+ provela je tri meseca 2017. godine u Italiji u grupi za primenjenu ekologiju na Univerzitetu Federico II u Napulju, a 2019. mesec dana u Odeljenju za primenjenu ekologiju i zaštitu prirode Univerziteta u Grajsvaldu (Nemačka), kao stipendista nemačke agencije za akademsku razmenu.

Autor je, ili koautor, 10 naučnih radova, od kojih je 5 publikovano u vrhunskim međunarodnim časopisima. Učestvovala je na međunarodnim i domaćim naučnim skupovima sa 22 kongresna saopštenja.

## Изјава о ауторству

Потписана **Бранка Бајић (рођено Пејић)**

број индекса **Б3004/2015**

### Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

**„Генетички диверзитет и структура популација бескрилних мува фамилије Nycteribiidae и гриња фамилије Spinturnicidae, ектопаразита две литофилне врсте слепих мишева у Србији“**

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршила ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

**Потпис докторанда**

У Београду, 28.04.2023.

---



## **Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада**

Име и презиме аутора Бранка Б. Бајић (рођено Пејић)

Број индекса Б3004/2015

Студијски програм Биологија, модул Еволуциона биологија

Наслов рада **„Генетички диверзитет и структура популација бескрилних мува фамилије Nycteribiidae и гриња фамилије Spinturnicidae, ектопаразита две литофилне врсте слепих мишева у Србији“**

Ментори: др Јелена Благојевић, научни саветник Универзитета у Београду, Институт за биолошка истраживања „Синиша Станковић“

др Милан Пауновић, научни сарадник и музејски саветник, Природњачки музеј у Београду

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

**Потпис докторанда**

У Београду, 28.04.2023.

---

## Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

**„Генетички диверзитет и структура популација бескрилних мува фамилије Nycteribiidae и гриња фамилије Spinturnicidae, ектопаразита две литофилне врсте слепих мишева у Србији“**

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство

2. Ауторство - некомерцијално

3. Ауторство – некомерцијално – без прераде

4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима

5. Ауторство – без прераде

6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

Потпис докторанда

У Београду, 28.04.2023.

---

1. Ауторство - Дозвољава те умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.
2. Ауторство – некомерцијално. Дозвољава те умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.
3. Ауторство - некомерцијално – без прераде. Дозвољава те умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.
4. Ауторство - некомерцијално – делити под истим условима. Дозвољава те умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.
5. Ауторство – без прераде. Дозвољава те умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.
6. Ауторство - делити под истим условима. Дозвољава те умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.