

РЕЦЕНЗИЯ

за дисертационен труд на тема

“Молекулярно-биологични изследвания върху специфичността на кръвни паразити (Haemosporida) по птици към преносителите от род *Culicoides* Latreille, 1809 (Diptera: Ceratopogonidae)”

Докторант: Анелия Борисова Бобева, Институт по биоразнообразие и екосистемни изследвания – БАН

Рецензент: доц. д-р Стела Лазарова, Институт по биоразнообразие и екосистемни изследвания – БАН

Молекулярно-биологичните подходи са мощен съвременен инструмент за изучаване на важни аспекти от екологията, зоологията, паразитологията и еволюционната биология. Те са особено ценни при изследване на паразит-гостоприемниковите отношения, в частност на жизнените цикли и пътищата на трансмисия на паразитите. Използването на специфични молекулни секвенции, характерни за отделните видове паразити, позволява тяхното еднозначно разпознаване дори в гостоприемници, в които паразитните стадии са трудни за морфологично наблюдение. Именно такъв съвременен подход е използван в изследванията, проведени от докторант Анелия Бобева. Той е насочен към характеризиране на специфичността на едноклетъчните кръвни паразити към крайните гостоприемници – кръвосмучещи двукрили насекоми от род *Culicoides*.

Обща характеристика на дисертационния труд

Дисертационният труд е написан на 81 страници. От тях 38 стр. представляват текст на български език. Останалата част от дисертацията са три свързани с нея статии на английски език, в които са изложени и обсъдени основните изследователски резултати.

Уводът е написан на две страници и ясно описва актуалността и значимостта на изучаването на ролята на различните видове от род *Culicoides* в жизнените цикли на

птиците хемоспоридии, както и новите перспективи, които молекулярно-биологичните подходи поставят пред тяхното разкриване.

Литературният обзор е представен на 11 страници. Той е структуриран в пет части, подредени в логична последователност. Представено е кратко, но съдържателно изложение, разглеждащо съвременните еволюционни и екологични концепции за трансмисивните заболявания и по-специално за ролята на кръвосмучещите насекоми, кратък исторически преглед на изследванията върху хемоспоридиите на птиците, обобщени данни за жизнения цикъл на представителите от род *Haemoproteus*, биологията и трансмисивния потенциал на видовете от род *Culicoides* (включително и обзор на видовия състав на рода в България) и степента на изученост на взаимоотношенията в системите “паразит – преносител” и “преносител – гръбначен гостоприемник”. Считам, че тази структура на обзора помага да се въведе читателят в същността на проблема и да се очертаят нерешените въпроси.

Разделът “Цел и задачи. Изследователски подход” е написан на 3 страници. Целта е формулирана лаконично – да се разкрие специфичността на причинителите на птича малария (Haemosporida) към преносителите от род *Culicoides*. Формулирани са и три задачи, свързани с разширяване на познанията за видовия състав и разпространението на видовете *Culicoides* в България, изучаването на техния хранителен спектър и идентифициране на хемоспоридните генетични линии, срещани се в тях. От описанието на изследователския подход става ясно, че изследването е изцяло концентрирано върху район с добре известен и подробно проучен видов състав на куликоидите – Биологичната експериментална база “Калимок” на Института по биоразнообразие и екосистемни изследвания при БАН, разположена в близост до град Тутракан. За разкриването на видовия състав на насекомите е използван интегративен подход от морфологични методи и молекулярни маркери, а за другите две задачи – изцяло молекулярни маркери.

Централно място в дисертацията заемат трите свързани с нея статии, публикувани в авторитетни международни списания и представящи основните резултати и обсъждания. В тях са изложени данните за видовия състав на род *Culicoides* в района на изследването, установените в насекомите генетични линии хемоспоридии, данните за видовото идентифициране на установената в храносмилателния тракт на насекомите кръв, разкриваща техните хранителни предпочитания, а също и оценката на специфичността на отделните генетични линии хемоспоридии към преносителите.

В разделът “Обобщение и изводи” докторантът представя в синтезиран вид основните резултати и интерпретации, постигнати при тези изследвания. Формулирани са 9 извода, отразяващи най-важните резултати от проучването.

Представен е и списък на цитираната литература на 8 страници.

Тази структура на дисертационния труд не е традиционна, но изцяло съответства на актуалната нормативна уредба, по-специално на приетите изисквания към дисертационните трудове в ИБЕИ след влизането в сила на новия Закон за развитие на академичния състав. Дисертации, в които основните резултати и обсъждания са представени под формата на отпечатани или приети за печат статии, са отдавнашна и широко приета практика в много европейски страни.

Литературна осведоменост и теоретична подготовка на кандидата

Докторантката демонстрира отлична литературна осведоменост. Това проличава както от литературния обзор, така и от статиите, свързани с дисертационния труд. Както в изложения текст на български език, така и в статиите, проличава отличната теоретична подготовка на Анелия Бобева в областта на екологията и биологията на паразитите.

Методичен подход

Считам за силна страна на работата, че полевите изследвания са изцяло концентрирани в район с добре проучена фауна на хемоспориидите на птиците, което позволява по-голяма степен на увереност при идентифицирането на паразитите и при анализа на тяхната специфичност към гръбначния гостоприемник.

Определянето на представителите от род *Culicoides* е осъществено както по класическия морфологичен метод, така и чрез молекулярен метод за разпознаване на участък от митохондриалния ген за цитохром оксидаза 1 на куликоидите. Използван е и мас-спектрометричен анализ за идентификация на видовете куликоиди, основан на протеиновия спектър на насекомите.

Хранителните предпочитания на насекомите са изследвани посредством тотален ДНК извлек, PCR и последващо секвениране на получените продукти – по този начин е идентифициран произходът на кръвта в храносмилателния тракт на насекомите. Използвани са две групи маркери чрез използване на: а) праймери за сериен PCR, които разпознават специфичен само за птици участък от митохондриалния ген за цитохром b и б) праймери за сериен PCR, които разпознават участък от

митохондриалния ген за цитохром оксидаза 1, характерен за всички гръбначни животни.

Идентифицирането на генетичните линии от *Haemoproteus* в кръвосмучещите насекоми е осъществено с молекулярно-биологични маркери, локализиращи видово-специфичен участък от цитохром b на митохондриалната ДНК на паразита. Този участък се използва вече десетина години от мрежа от изследователски лаборатории от много страни, която разработва единна база-данни за идентифициране на генетичните линии хемоспоридии. Наличието на тази база-данни създава надеждна основа за откриване и идентифициране на хемоспоридни паразити както в птици, така и в насекоми – преносители.

По мое мнение, избраните методични подходи са съвременни, добре подбрани и надеждни. Те напълно отговарят на съвременното развитие на изследванията върху хемоспоридиите и куликоидите и позволяват постигането на значими резултати в съзвучие с целта на изследването.

Значимост и убедителност на получените резултати, интерпретациите и изводите

За наличие на хемоспоридни паразити са изследвани 870 екз. насекоми, отнесени към 11 вида, а също и 95 насмукани с кръв насекоми от 6 вида. Този материал позволява постигане на значими резултати, които хвърлят светлина върху такива недостатъчно проучени въпроси като ролята на отделните видове насекоми за преноса на хемоспоридии и разкриване на техните хранителни предпочитания към различни видове птици. Като особено стойностни оценявам следните:

- Четири вида от род *Culicoides* са изявени като орнитофилни.
- Кръв от 23 вида птици е идентифицирана в абдомените на тези видове, като обосновано е предположена потенциалната им роля в трансмисията на видове от род *Haemoproteus*.
- Хранителният спектър на изследваните куликоиди ги характеризира като генералисти.
- ДНК от 12 генетични линии от род *Haemoproteus* е установена в 4 вида насекоми от род *Culicoides*.
- Демонстрирани са вариации в степента на специфичност на паразитите от род *Haemoproteus* към кръвосмучещите преносители.

Считам, че всички тези важни резултати и заключения са надеждни, обосновани и убедителни.

Критични бележки към дисертационния труд

1. Стремешът за лаконично формулиране на целта на дисертацията е довел до твърде широка и практически неизпълнима формулировка – да се разкрие специфичността на причинителите на птича малария (Haemosporida) към преносителите от род *Culicoides*. Ако към тази формулировка се добави и районът на изследване (Североизточна България), тогава тя би била по-точна и по-добре отговаряща на проведените стойностни изследвания.
2. Аналогично, формулировката на първата задача “Идентифициране на видовете кръвосмучещи насекоми от род *Culicoides* от територията на България с помощта молекулярни маркери” не е реалистична и не съответства на съдържанието на изследванията. Както посочва авторът на дисертацията, в България са установени 38 вида от този род и не е реалистично в рамките на редовна докторантура да бъдат събрани материали от всички тях и да бъдат проведени молекулярно-биологични изследвания за проверка на тяхната идентификация. Формулировката и на тази задача щеше да е по-точна, ако районът на изследването е посочен в нея.
3. Интерес представлява установяването на новия за фауната на страната вид *Culicoides griseidorsum*, определен на основата на морфологични данни, но с генетична характеристика, която е различна от публикуваната по-рано за него. Би било добре в текста да се включи по-подробно обяснение на това противоречие и се надявам докторантката да го изясни по време на защитата.

Посочените критични бележки не намаляват значимостта и стойността на проведените изследвания.

Характер на научните приноси

Приемам справката за приносите, представена в дисертацията. В тази справка са включени само оригинални научни приноси.

Разкриването на видовия състав на представителите от род *Culicoides* в района на БЕБ „Калимок”, включително и установяването на два нови за страната вида, е принос със значение предимно към изучаването на фауната на България.

Разработката на маркери за сериен *PCR* със сравнително къса дължина (169 бази), които разпознават специфичен участък от митохондриалния ген за цитохром *b* на частично деградираната при храносмилателните процеси на насекомите птича ДНК, е

значим методичен принос, предоставящ нови възможности за бъдещи екологични изследвания в системата “паразит – гостоприемник” в световен мащаб.

Приносите относно хранителните предпочитания на куликоидите, идентифицирането на 12 генетични линии от род *Haemoproteus* в 4 вида насекоми от род *Culicoides*, както и различната степен на специфичност на хемоспоридиите към преносителите, са значими научни постижения, които могат да се отнесат към описването на неизвестни по-рано феномени в паразит-гостоприемниковата система “птици – куликоиди – хемоспоридии”.

Оценка на качеството на научните трудове, отразяващи изследванията по дисертацията

Трите статии, в които са отразени изследванията по дисертацията, са публикувани или приети за печат в международни научни списания с импакт-фактор. Две от тях са отпечатани в международни паразитологични списания *Parasitology Research* (IF2013 = 2.327) и *Acta Parasitologica* (IF2013 = 0.965) – издания на авторитетното научно издателство Springer. Статията за трофичните предпочитания на видовете от *Culicoides* към различни видове птици е под печат в списанието *Medical and Veterinary Entomology* (IF2013 = 2.333). Според *ISI Journal Citation Reports* за 2013 г. последното списание е на 8-мо място в ранга на наблюдаваните 129 ветеринарно-медицински списания и на 9-то място сред 90 ентомологични списания. Тези статии са преминали през строгата оценка на водещи чуждестранни специалисти преди да бъдат приети за печат и без съмнение заслужават висока оценка.

Изследванията по дисертацията като лично дело на докторанта

Статиите по темата на дисертацията са публикувани в съавторство, като в колективите участват от 4 до 6 съавтора. При съвременните интердисциплинарни изследвания в областта на биологията колективите от специалисти с различен профил на подготовка са обичайно явление. И на трите статии Бобева е първи автор, което показва нейната водеща роля при тези изследвания. Освен това, работейки с докторанта в една сграда, имам лични наблюдения върху нейната работа в молекулярната и препаративната лаборатории, където тя обработваше сборовете от ловилките, определяше насекомите и впоследствие ги обработваше чрез молекулярно-биологични техники и секвенционни анализи. Считаю, че дисертацията на Анелия Бобева е предимно нейно лично дело. Тя е ползвала и консултации на водещи български и чуждестранни специалисти (отразено в

тяхното съавторство), което е допринесло за по-зрялото и надеждно решаване на отделни въпроси, свързани с изследването.

Заключение

Настоящият дисертационен труд представлява актуално и стойностно научно изследване основано на богат материал, анализиран чрез съвременни молекулярно-биологични методи и методи за филогенетичен анализ. Подготвен е дисертационен труд, който напълно съответства на законовите и останалите нормативни изисквания. Демонстрирана е отлична теоретична и методична подготовка, които са добра основа за успешно развитие в бъдеще. На основата на изложеното, убедено предлагам на научното жури да присъди научната и образователна степен “доктор” на Анелия Бобева в областта на биологическите науки.

3 ноември 2014 г.

Рецензент:



(доц. д-р Стела Лазарова)