

**БЪЛГАРСКА АКАДЕМИЯ НА НАУКИТЕ**  
**ИНСТИТУТ ПО БИОРАЗНООБРАЗИЕ И ЕКОСИСТЕМНИ**  
**ИЗСЛЕДВАНИЯ**

**Анелия Борисова Бобева**

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

**Автореферат**

**Научен ръководител: проф. дбн Бойко Б. Георгиев**

**Научен консултант: доц. д-р Павел Х. Зехтинджиев**

**София, септември 2014 г.**

Дисертацията е разработена в рамките на редовна докторантура в Института по биоразнообразие и екосистемни изследвания, БАН.

Дисертационният труд е обсъден и насочен за защита на разширено заседание на отдел „Животинско разнообразие и ресурси” при Института по биоразнообразие и екосистемни изследвания, БАН, състояло се на 11 септември 2014 г.

Дисертационният труд е с общ обем 81 страници и съдържа 9 основни раздела, включително 9 таблици и 1 фигура. Списъкът на цитираната литература съдържа 79 заглавия, от които 5 на кирилица и 74 на латиница.

Защитата на дисертационния труд ще се състои на 20.11.2014 г. от 14:00 часа в Заседателната зала База 1 на Института по биоразнообразие и екосистемни изследвания, БАН, ул. „Ю. Гагарин”, № 2, на открито заседание на петчленно Научно жури (назначено със Заповед на Директора на ИБЕИ – БАН №186/18.09.2014) в състав:

доц. д-р Стела Стоянова Лазарова (ИБЕИ-БАН) – председател на Научното жури, рецензент

доц. д-р Павел Христов Зехтинджиев (ИБЕИ-БАН) – научен консултант

акад. дбн Васил Григоров Големански (пенсионер) – рецензент

проф. дбн Илия Йорданов Банков (пенсионер)

доц. д-р Здравко Хубенов (НПМ)

Материалите по защитата са на разположение на интересуващите се в библиотеката на Института по биоразнообразие и екосистемни изследвания при БАН, база 1.

## 1. Увод

Организмите съществуват в рамките на природни съобщества, които се дефинират като съвкупности от популации на различни видове, обитаващи обща територия. Представителите на различните видове, не съществуват изолирано едни от други, а непрекъснато си взаимодействат директно и индиректно. Природата на тези взаимоотношения може да се променя в зависимост от условията на средата и еволюционния контекст. Съществуват няколко основни категории междувидови отношения: положителни, отрицателни или неутрални. Когато индивидите от двата вида извличат полза от взаимоотношението си, наблюдаваме мутуализъм. Когато индивидите само от единия вид са облагодетелствани, а тези от другия вид са безразлични определяме като коменсализъм. В случаите когато единият от организмите изпитва неблагоприятен ефект от асоциацията наблюдаваме аменсализъм, а когато организмите, участващи в асоциацията не изпитват никакъв ефект от нея – неутрализъм. Ако взаимоотношението е с отрицателни последици за всички организми, участващи в него наблюдаваме конкуренция (Богоев и Кенарова, 2009). При паразитизма единият организъм изпитва неблагоприятни, дори разрушителни ефекти от взаимодействието, а за другия ефектите са благоприятни. Паразитизмът е най-често срещаната форма на живот на Земята (Roberts & Janovy, 2009). Паразитите са представени с широко разнообразие от организми – вируси, протозои, гъби, хелминти и много артроподи. Паразитите упражняват забележим ефект върху гостоприемниците си не само на организмово ниво, а също и на ниво популация на гостоприемника и екосистема (Roberts & Janovy, 2009). Поради тази причина изучаването на отношенията паразит-гостоприемник представлява важен аспект в екологията и еволюционната биология.

Кръвните паразити по птици от разред *Haemosporida* са повсеместно разпространени патогени. Те се пренасят от кръвосмучещи двукрили насекоми, които за представителите от род *Haemotoproteus* са куликоидите от род *Culicoides*. Въпреки дългогодишните традиции в изучаването на птичите хемоспоридии, досегашните изследвания са фокусирани главно

върху отношенията на паразитите с техните гръбначни гостоприемници (Valkiūnas, 2005). Информацията за взаимоотношенията и специфичността на хемоспоридиите с преносителите им е съвсем оскъдна и за науката все още е слабо известно кой вид куликоид е компетентен преносител на определен паразит от род *Haemoproteus* (Valkiūnas, 2005).

Традиционните изследвания върху специфичността на паразитите спрямо техните преносители, основаващи се главно на експериментални инфекции и последваща дисекция на насекомите, са времеемки и ограничени от факта, че насекомите от род *Culicoides* се отглеждат изключително трудно в лабораторни условия (Valkiūnas *et al.*, 2002). Липсата на еритроцитарна мерогония при *Haemoproteus* spp. (Valkiūnas, 2005), от своя страна, прави изследването след изкуствено заразяване на гръбначни гостоприемници на практика невъзможно. Молекулярно-биологичните методи, от своя страна, предоставят един иновативен и същевременно мощен инструмент за изучаване на взаимоотношенията, които паразитите изграждат с кръвосмучещите си преносители. Разработването на молекулни маркери, с помощта на които се установява наличието на хемоспоридни паразити в куликоидите, както и гръбначния източник на хранителен ресурс за тези насекоми, допринасят за изучаването на трансмисивния им потенциал и на специфичността на хемоспоридиите спрямо тях.

Изложените съображения определят актуалността и значимостта на изучаването на ролята на различните видове от род *Culicoides* Latreille, 1809 (семейство Ceratopogonidae) в жизнените цикли на птичите хемоспоридии, както и новите хоризонти, които молекулярно-биологичните подходи поставят пред тяхното разкриване.

## 2. Литературен обзор

В литературния обзор е направен кратък преглед върху жизнения цикъл на хемоспоридните паразити от род *Haemoproteus* и физиологичните ефекти, които те упражняват върху гостоприемниците си. Разгледан е също жизнения цикъл на двукрилите кръвосмучещи насекоми от род *Culicoides* и техния трансмисивен потенциал по отношение на кръвните паразити от род *Haemoproteus*. Разгледани са взаимоотношенията паразит-преносител и преносител-гръбначен гостоприемник.

От прегледа на литературата могат да се направят следните по-важни изводи и заключения:

1. Основната част от проведените до момента изследвания се отнася за взаимоотношенията на хемоспоридните паразити с техните гръбначни гостоприемници – птиците.
2. Кръвосмучещите насекоми от род *Culicoides* са изследвани основно като преносители на заболяването син език по преживните животни.
3. Литературата разполага с оскъдна информация относно обхвата на хранителните предпочитания на представителите от род *Culicoides*, а малкото известни данни за специфичността на хемоспоридните от род *Haemoproteus* спрямо преносителите си от род *Culicoides* показват вариации в степента на специфичност на паразитите.
4. Информацията за взаимоотношенията и специфичността на хемоспоридите с техните преносители е съвсем оскъдна и за науката все още е слабо известно кой вид куликоид е компетентен вектор на определена генетична линия от род *Haemoproteus*.

Оскъдните данни за специфичността на птиците хемоспоридии от род *Haemoproteus* към преносителите, в комбинация с изключително ценната информация, която предоставят молекулярно-биологичните подходи в съвременните екологични изследвания, определят **целта и задачите** на настоящия дисертационен труд.

### 3. Цел и задачи

#### Цел:

Да се разкрие специфичността на причинителите на птича малария (Haemosporida) към преносителите от род *Culicoides* Latreille, 1809 (Diptera: Ceratopogonidae).

#### Задачи:

1. Идентифициране на видовете кръвосмучещи насекоми от род *Culicoides* от територията на България с помощта молекулярни маркери; допълване на данните за разпространението на отделните видове.
2. Изучаване на хранителния спектър на видовете кръвосмучещи насекоми от род *Culicoides* с помощта на молекулярни маркери, по-специално по отношение на видовия състав на птиците, по които те се хранят.
3. Идентифициране чрез молекулярни маркери на видовете и генетичните линии хемоспоридии, срещащи се в кръвосмучещите насекоми от род *Culicoides*; определяне на срещаемостта на паразитите в естествените популации на видовете от род *Culicoides* и оценка на специфичността.

## Материали и методи

### I. Изследван район

Събирането на проби, съдържащи представители от род *Culicoides*, бе изцяло фокусирано в района на Биологичната експериментална база „Калимок“ към ИБЕИ – БАН, намираща се в района на с. Нова Черна, община Тутракан, Силистренска област. На тази полева станция в продължение на повече от 15 години са провеждани системни изследвания върху местни и мигриращи видове врабчоподобни птици, касаещи както видовото разнообразие и срещаемостта на птичи хемоспоридии, така и локалната трансмисия на паразитите (Valkiūnas *et al.*, 1999, 2007, 2008; Shurulinkov & Golemanski, 2002, 2003; Zehindjiev *et al.*, 2008; Shurulinkov & Ilieva, 2009; Dimitrov *et al.*, 2010). Сборовете бяха проведени през целия летен сезон на 2011 г. и 2012 г. и месец май 2013 г., като за целта бяха използвани специализирани светлинни ловилки с ултравиолетова и бяла светлина.

### II. Идентифициране на *Culicoides* spp

Определянето на представителите от род *Culicoides* бе осъществено посредством:

- класически морфологичен метод – с помощта на налични идентификационни ключове (Chvala, 1980; Glukhova, 1989; Delécolle, 1985) (вж. статии 1 и 2);
- молекулярен метод – с помощта на специфични маркери, разпознаващи участък от митохондриалния ген за цитохром оксидаза 1 (COI) на куликоидите. Методът включва *PCR* и последващо секвениране на получените продукти (Dallas *et al.*, 2003; Wenk *et al.*, 2012) (вж. статии 1 и 2);
- MALDI-TOF MS (matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry) – масспектрометричен анализ за идентификация на видовете куликоиди, основан на протеиновия спектър на насекомите (Kaufmann *et al.*, 2011, 2012 a, b) (вж. статия 2).

### **III. Определяне на хранителния спектър на *Culicoides* spp**

Тоталната ДНК, изолирана от насмуканите с кръв куликоиди, се използва като матрица за установяване на гръбначните гостоприемници на двукрилите кръвосмучеещи насекоми от род *Culicoides*. Анализът бе базиран изцяло на молекулярно-биологични методи – *PCR* и последващо секвениране на получените продукти. Използвани бяха две групи маркери:

- праймери за сериен *PCR*, които разпознават специфичен само за представители на птичата фауна участък от митохондриалния ген за цитохром *b*, разработени за целите на настоящето изследване;
- праймери за сериен *PCR*, които разпознават участък от митохондриалния ген за цитохром оксидаза 1 (COI), характерен за всички гръбначни животни. С помощта на този маркер се установиха нептичите източници на хранителен ресурс за куликоидите (Alcaide *et al.*, 2009).

### **IV. Идентифициране на *Haemoproteus* spp**

Изследването бе осъществено изцяло с молекулярно-биологични подходи. Използвани бяха широкозастъпени маркери (Hellgren *et al.*, 2004, Waldenström *et al.*, 2004), локализиращи видово-специфичен участък от цитохром *b* на митохондриалната ДНК на паразита. Установена бе степента на асоциация между паразитите и техните безгръбначни преносители и бе изчислена срещаемостта на хемоспоридиите в природните популации на двукрилите насекоми от род *Culicoides* (вж. статии 1 и 3).



#### 4. Резултати и обсъждане

Проведените изследвания в рамките на докторантурата са отразени в следните три статии:

Статия 1: Bobeva A., Zehtindjiev P., Bensch S., Radrova J. 2013. A survey of biting midges of the genus *Culicoides* Latreille, 1809 (Diptera: Ceratopogonidae) in NE Bulgaria, with respect to transmission of avian haemosporidians. *Acta Parasitologica*, 58(4), 585–591, DOI: 10.2478/s11686-013-0185-z

Статия 2: Bobeva A., Zehtindjiev P., Ilieva M., Dimitrov D., Mathis A., Bensch S. 2014. Host preferences of ornithophilic biting midges of the genus *Culicoides* in Eastern Balkans with respect to transmission of haemosporidian parasites. *Medical and Veterinary Entomology*, in press

Статия 3: Bobeva A., Ilieva M., Dimitrov D., Zehtindjiev P., 2014. Degree of associations among vectors of the genus *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) and host bird species with respect to haemosporidian parasites in NE Bulgaria. *Parasitology Research*, accepted for publication

## 5. Обобщение и изводи

5.1. Видово разнообразие на насекомите от род *Culicoides* в района на БЕБ „Калимок“

В рамките на настоящето изследване са идентифицирани 11 вида насекоми от род *Culicoides*. Това са *Culicoides alazanicus*, *C. circumscriptus*, *C. griseidorsum*, *C. festivipennis*, *C. newsteadi*, *C. obsoletus*, *C. pictipennis*, *C. punctatus*, *C. puncticollis*, *C. riethi* и *C. nubeculosus*. Два от видовете – *C. alazanicus* и *C. griseidorsum* – се съобщават за първи път за фауната на България. *C. griseidorsum* и *C. nubeculosus* са установени като такива на базата на морфологични характеристики, но молекулярният анализ не потвърди морфологичното им определяне. Поради тази причина идентификацията на тези 2 вида куликоиди се нуждае от допълнителни изследвания (вж. статии 1 и 2).

Видовото разнообразие на куликоидите, установено в Североизточна България, допълва известната до момента информация за тази изключително важна, но все още слабо проучена група кръвосмучещи насекоми. Предходните изследвания върху разпространението и видовия състав на представителите от род *Culicoides* на територията на нашата страна са извършени от Националния диагностичен научноизследователски ветеринарномедицински институт във връзка с ролята им за разпространението на важни за ветеринарномедицинската практика заболявания (син език, западно-нилска треска и др.) (Purse *et al.*, 2006; Неделчев, 2013). Те са обобщени в монографията на Неделчев (2013). До началото на настоящето изследване за фауната на България са установени 36 вида куликоиди (Zilahi, 1934; Remm, 1988; Неделчев, 2013), като установените в рамките на нашите изследвания 11 вида съставляват 30.6% от общия брой насекоми в списъка. Видовото разнообразие на представителите от род *Culicoides* в голяма степен отразява характеристиките на местообитанието и липсата на струпания от селскостопански животни в района.

## 5.2. Хранителен спектър на видовете кръвосмучещи насекоми от род *Culicoides*

Хранителният спектър на куликоидите бе установен на базата на 95 насмукани с кръв насекоми от 6 вида: *Culicoides alazanicus* (N=40), *C. circumscriptus* (N=6), *C. festivipennis* (N=23), *C. griseidorsum* (N=8), *C. pictipennis* (N=3) и *C. punctatus* (N=15). Уловите на двукрилите кръвосмучещи насекоми бяха проведени през целия полеви сезон на 2012 г. и м. май 2013г. в района на БЕБ „Калимок“. Гръбначният гостоприемник бе установен за 55 индивида. Кръв от 23 вида птици, отнесени към четири семейства бе установена в абдомените на 48 куликоида (50.6%); а в 7 индивида (14.5%) бе установена кръв от 3 вида бозайници (вж. статия 2). Съотношението между ДНК от птици и бозайници, установено в нашето изследване, до голяма степен отразява разнообразието на местообитанието и обилието на птици в изследвания район.

Кръв от птици бе установена в абдомените на четири вида насекоми от род *Culicoides* – *Culicoides alazanicus*, *C. circumscriptus*, *C. festivipennis* и *C. griseidorsum*. Най-чест източник на хранителен ресурс с птици произход е свраката (*Pica pica*), установена при общо седем представители от четирите вида насекоми с орнитофилни предпочитания, а шест индивида от вида *Culicoides alazanicus* са приели кръв от голям синигер (*Parus major*). Видовото разнообразие от птици, установени в настоящето изследване се допълва от: мочурно шаварче (*Acrocephalus palustris*), горска бъбрица (*Anthus trivialis*), червена чапла (*Ardea purpurea*), ушата сова (*Asio otus*), черешарка (*Coccothraustes coccothraustes*), гривяк (*Columba palumbus*), градска лястовица (*Delichon urbica*), малък воден бик (*Ixobrychus minutus*), северен славей (*Luscinia luscinia*), южен славей (*Luscinia megarhynchos*), сива мухоловка (*Muscicapa striata*), нощна чапла (*Nycticorax nycticorax*), авлига (*Oriolus oriolus*), домашно врабче (*Passer domesticus*), испанско врабче (*Passer hispaniolensis*), полско врабче (*Passer montanus*), брезов певец (*Phylloscopus trochilus*), гугутка (*Streptopelia decaocto*), градинско коприварче (*Sylvia borin*), кос (*Turdus merula*) и поен дрозд (*Turdus philomelos*) (подробности в статия 2). Нито един

от изследваните видове куликоиди не е стриктно специализиран към определен вид гръбначен гостоприемник.

Получените от нас резултати добавят важна информация относно хранителния спектър на куликоидите. Още повече, че в литературата липсва информация за хранителните предпочитания на *C. alazanicus* и *C. griseidorsum*. Нашите данни сочат, че и двата вида са генералисти по отношение на диетата си и се хранят както с кръв от птици, така и с кръв от бозайници.

Скорошни изследвания показват, че два от видовете куликоиди, в чиито коремчета установихме птича ДНК – *C. circumscriptus* и *C. festivipennis*, неведнъж са асоциирани с генетични линии от род *Haemoproteus* (Synek *et al.*, 2013; Ferraguti *et al.*, 2013). Те, заедно с *C. alazanicus* и *C. griseidorsum*, са видовете, изявени като орнитофилни при настоящите изследвания. Тези резултати подчертават важната роля, която четирите вида куликоиди потенциално играят в трансмисията на хемоспоридни паразити в изследвания район.

Приложението на молекулярно-биологичните подходи в екологичните изследвания допринесе за установяването на хранителните ресурси при редица видове кръвосмучещи насекоми. В много случаи, обаче, идентифицирането на гръбначния гостоприемник се затруднява поради храносмилателните процеси в средното черво на насекомото, които водят до фрагментирането на ДНК на гръбначния източник на кръв (Oshaghi *et al.*, 2006; Martinez-de la Puente *et al.*, 2013). С цел по-прецизна идентификация на птиците, по които куликоидите се хранят, за нуждите на настоящето изследване бяха разработени маркери за сериен *PCR*, позволяващи амплифицирането на ДНК-фрагмент със сравнително къса дължина (169 бази), разграничаващи забележителен брой видове птици. Това позволи увеличаването на вероятността за успешно амплифициране на частично деградиранията при храносмилателните процеси на насекомите птича ДНК.

5.3. Видово разнообразие на видовете и генетичните линии хемоспоридии, установени в кръвосмучещите насекоми от род *Culicoides*. Срещаемост и специфичност на паразитите в естествените популации на видовете от род *Culicoides*

За наличие на хемоспоридни паразити бяха изследвани 870 куликоида, отнесени към 11 вида, приемали поне веднъж кръв от гръбначен гостоприемник (Duce *et al.*, 1969) и 95 насмукани с кръв насекоми от 6 вида (Таблица 2).

**Таблица 2. Видов състав и брой на куликоидите, изследвани за наличие на хемоспоридни паразити в настоящето изследване.**

Вид	Ненасмукани с кръв индивиди (бр.)	Насмукани с кръв индивиди (бр.)
<i>C. alazanicus</i>	182	40
<i>C. circumscriptus</i>	261	6
* <i>C. cf. griseidorsum</i>	16	8
<i>C. festivipennis</i>	285	23
<i>C. newsteadi</i>	2	
<i>C. obsoletus</i>	4	
<i>C. pictipennis</i>	18	3
<i>C. punctatus</i>	25	15
<i>C. puncticollis</i>	26	
<i>C. riethi</i>	31	
* <i>C. cf. nubeculosus</i>	20	

\*- двата вида са идентифицирани само по морфологични характеристики.

Дванадесет генетични линии от род *Haemoproteus* бяха установена в 4 вида насекоми от род *Culicoides* – *C. alazanicus*, *C. circumscriptus*, *C. festivipennis* и *C. pictipennis* (Таблица 3).

Девет линии бяха изолирани от представители на *C. alazanicus*, три от *C. circumscriptus*, а в *C. festivipennis* и *C.*

*pictipennis* бяха открити съответно две и една генетични линии от род *Haemoproteus*. В допълнение, три генетични линии от род *Plasmodium* бяха установени в индивиди от *C. alazanicus*. ДНК от хемоспоридии бе изолирана от 16 насмукани с кръв и 6 ненасмукани индивиди. Изчислената срещаемост е съответно 13.7% и 0.7%. (вж. статии 1 и 3).

Получените в настоящето изследване резултати разкриват важна информация за асоциациите между птиците хемоспоридии и техните потенциални преносители от род *Culicoides*. Нашите резултат показват, че паразитите демонстрират различна специфичност към преносителите си от род *Culicoides* – в *C. alazanicus* бяха открити девет линии от род *Haemoproteus*, а две от линиите бяха регистрирани в повече от един вид куликоиди. Така например линията от род *Haemoproteus* H\_CIRCUM01 бе изолирана от насмукани с кръв индивиди от *C. alazanicus* (N=1), *C. circumscriptus* (N=1) и *C. festivipennis* (N=3), а линията H\_CIRCUM03 (*Haemoproteus* sp.) бе установена в единични представители на *C. alazanicus* и *C. festivipennis*. Двете генетични линии са установени за първи път в *C. circumscriptus* от Ferraguti *et al.* (2013) и до момента не са установявани в гръбначни гостоприемници. Още повече, от абдомените на всичките 5 индивида, подслонили H\_CIRCUM01, бе изолирана кръв от ушата сова (*Asio otus*), а ДНК от сврака (*Pica pica*) бе установена в стомашното съдържимо на двата индивида, в които бе регистрирана линията H\_CIRCUM03. Тези наблюдения предполагат, че двете линии най-вероятно са характерни за съответните видове птици, от които насекомите са се хранили, а фактът, че до момента не са установявани в птици, говори по-скоро за недостатъчната проученост на съответните видове гръбначни гостоприемници. Още повече свраката и ушатата сова се явяват местни за фауната на изследвания регион видове, което предполага и локалната трансмисия на H\_CIRCUM01 и H\_CIRCUM03. Паразитите, установени в насмукани насекоми, кореспондират на ДНК от птици, изолирана от съответния куликоид, разкривайки високата степен на асоциации между хемопротеидите и техните гръбначни и безгръбначни гостоприемници.

Седем от дванадесетте генетични линии от род *Haemoproteus*, установени в настоящето изследване, са

съобщавани по-рано от местни и мигриращи видове птици на територията на БЕБ „Калимок“. Това са H\_DELURB01, H\_ORIORI01, H\_ORIORI02, H\_SFC01, H\_TUPHI01, H\_WW02 и H\_HAWF02 (Dimitrov *et al.*, 2010).

За линията H\_HAWF02, установена от нас в *Culicoides circumscriptus*, е известно, че в изследвания район има локална трансмисия (Dimitrov *et al.*, 2010). Линията H\_TUPHI01, която открихме в *C. alazanicus*, в предходни изследвания на територията на БЕБ „Калимок“ е установена и у близкия мигрант поен дрозд (*Turdus philomelos*) (Dimitrov *et al.*, 2010), а Synek *et al.* (2013) я регистрират в други 2 вида преносители *C. segnis* и *C. kibunensis* в Република Чехия. Линията H\_TURDUS2, установена от нас в *C. pictipennis*, е изолирана от същия вид насекомо от Santiago-Alarcon *et al.* (2012), както и от *Culicoides kibunensis* и *C. festivipennis* (Synek *et al.*, 2013). Същата често е регистрирана в местни видове гръбначни гостоприемници като кос (*Turdus merula*) и син синигер (*Cyanistes caeruleus*) в различни района на Европа (Hellgren *et al.*, 2007 a, b; Wood *et al.*, 2007; Synek *et al.*, 2013). Линиите H\_SFC01 и H\_WW02, които ние изолирахме от *C. alazanicus* в района на БЕБ „Калимок“, са съобщавани от други части на Европа в немигриращи видове гръбначни гостоприемници, както и в мигранти на близко разстояние (вж. статия 3). Всички асоциации между генетични линии от род *Haemoproteus*, за които имаме данни, че са с локална трансмисия, и представители на род *Culicoides*, установени в настоящето изследване, ни дават основание да считаме, че видовете *C. alazanicus*, *C. circumscriptus* и *C. pictipennis* играят важна роля в трансмисията на хемоспории в изследвания район.

Наличието на три генетични линии от род *Plasmodium* в представители на род *Culicoides*, които не са компетентния преносител на този род хемоспоридни паразити, може да бъде индикация за наличието на неразградени остатъци от кръвта на гръбначните гостоприемници в абдомена на кръвосмучещия преносител и/или са резултат от абортивен цикъл на развие на паразита в организма на насекомото (Valkiūnas 2011).

Таблица 3. Генетични линии хемоспоридни паразити, установени в представители от род *Culicoides* в района на БЕБ “Калимок”.

	H_CIRCUM 01	H_CIRCUM 03	H_DELURB1	H_ORIORI1	H_ORIORI2	H_SFC1	H_SFC3	H_TUPHI01	H_HAWF2	H_CULCIR1	H_TURDUS2	H_WW2	P_PBPIP1	P_SGS1	P_SYAT05
<i>C. alazanicus</i>	+	+	+	+	+	+	+	+				+	+	+	+
<i>C. circumscriptus</i>	+								+	+					
<i>C. festivipennis</i>	+	+													
<i>C. pictipennis</i>											+				

H – *Haemoproteus* spp.; P – *Plasmodium* spp.



#### 5.4. Изводи

Резултатите от проведените изследвания върху разнообразието на представителите от род *Culicoides* в района на БЕБ „Калимок“, техните хранителни предпочитания и установените асоциации с генетични линии от род *Haemoproteus*, дават основание да се направят следните **изводи**:

1. В района на БЕБ „Калимок“ се срещат единадесет вида от род *Culicoides*, които съставляват 30.6% от общия брой, съобщени до момента за фауната на България видове.
2. Установени са два нови за фауната на страната представители от род *Culicoides* – *C. alazanicus* и *C. griseidorsum*.
3. Четири вида от род *Culicoides* са установени в района като орнитофилни – *Culicoides alazanicus*, *C. circumscriptus*, *C. festivipennis* и *C. griseidorsum*. Кръв от 23 вида птици, отнесени към четири семейства, бе установена в абдомените на тези видове. Орнитофилните предпочитания на четирите вида от род *Culicoides* подсказват потенциалната роля, която те играят в трансмисията на хемоспоридии от род *Haemoproteus* в изследвания район.
4. Хранителният спектър на изследваните куликоиди ги характеризира като генералисти.
5. ДНК от 12 генетични линии от род *Haemoproteus* е установена в 4 вида насекоми от род *Culicoides* – *C. alazanicus*, *C. circumscriptus*, *C. festivipennis* и *C. pictipennis*.
6. Установените в това изследване паразити от род *Haemoproteus* демонстрират вариации в степента на специфичност спрямо кръвосмучещите преносители. *C. alazanicus* се асоциира с 9 цитохром *b* линии от род *Haemoproteus*, докато *C. circumscriptus*, *C. festivipennis* и

*C. pictipennis* се свързват с по-малък брой линии, съответно 3, 2 и 1.

7. Установените асоциации на *C. circumscriptus*, *C. alazanicus* и *C. pictipennis* с генетични линии, установявани от предходни изследвания в местни видове птици, или такива, които са мигранти на близки разстояния (H\_HAWF02, H\_TUPHI01, H\_TURDUS2, H\_SFC01 и H\_WW02), подсказват значимостта на трите вида куликоиди в локалната трансмисия на съответните видове хемоспоридии.
8. Извършените изследвания върху хранителния спектър на куликоидите, съчетани със свързването на насекомите с определени цитохром *b* линии, допринесе за асоциирането на генетични линии паразити, които до момента са известни само от преносители, с потенциалните им гръбначни гостоприемници.
9. Установените генетични линии от род *Plasmodium* може да се дължат както на неразградени хранителни остатъци в абдомена на насекомото, така и на абортивния цикъл на развитие, който хемоспоридиите понякога претърпяват в организма на кръвосмучещите преносители.

## 5.5. Справка за научните приноси на дисертацията

Проведените изследвания в рамките на докторантурата дават основание да се формулират следните основни научни приноси:

1. Установен е видовият състав на представителите от род *Culicoides* в района на БЕБ „Калимок“. Идентифицирани са два нови за страната вида куликоиди – *C. alazanicus* и *C. griseidorsum*.
2. Разработени са 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.
3. За първи път са установени хранителните предпочитания на *C. alazanicus* и *C. griseidorsum*. Двата вида са генералисти по отношение на диетата си и се хранят както с кръв от птици, така и с кръв от бозайници.
4. На базата на идентифицираните дванадесет генетични линии от род *Haemoproteus* в 4 вида насекоми от род *Culicoides*, е установена различна степен на специфичност спрямо преносителите.
5. За първи път се установяват генетични линии, асоцииращи се с *C. alazanicus*.
6. За други пет генетични линии от род *Haemoproteus*, асоциирани с 3 вида куликоиди в настоящето изследване, е предположена локална трансмисия.
7. За две от линиите хемоспоридии (H\_CIRCUM01 и H\_CIRCUM03), изолирани до момента само от представители от род *Culicoides*, са установени гръбначните гостоприемници и е предположена локалната им трансмисия.

## ДЕКЛАРАЦИЯ ЗА ОРИГИНАЛНОСТ И ДОСТОВЕРНОСТ

от Анелия Борисова Бобева

Във връзка с провеждането на процедура за защита на дисертация за придобиване на ОНС „Доктор“ в Института по биоразнообразие и екосистемни изследвания – БАН, еднозначно декларирам:

1. Резултатите, обсъжданията и изводите в научната продукция, които предоставям в процедурата, са оригинални и не са заимствани без цитиране от изследвания и публикации, в които нямам участие.

2. Представената от мен информация във вид на копия на документи и публикации, лично съставени справки и др. съответства на обективната истина.

11.9.2014 г.

гр. София

Декларатор:

А. Бобева /подпис/

### **Публикации по темата на дисертацията:**

- Bobeva A., Zehtindjiev P., Bensch S., Radrova J. 2013. A survey of biting midges of the genus *Culicoides* Latreille, 1809 (Diptera: Ceratopogonidae) in NE Bulgaria, with respect to transmission of avian haemosporidians. *Acta Parasitologica*, 58(4), 585–591, DOI: 10.2478/s11686-013-0185-z
- Bobeva A., Zehtindjiev P., Ilieva M., Dimitrov D., Mathis A., Bensch S. 2014. Host preferences of ornithophilic biting midges of the genus *Culicoides* in Eastern Balkans with respect to transmission of haemosporidian parasites. *Medical and Veterinary Entomology*, in press
- Bobeva A., Ilieva M., Dimitrov D., Zehtindjiev P., 2014. Degree of associations among vectors of the genus *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) and host bird species with respect to haemosporidian parasites in NE Bulgaria. *Parasitology Research*, accepted for publication

## Участие в научни форуми

- Bobeva A., Dimitrov D., Marinov M., Ilieva M., Zehtindjev P., Bensch S. 2011. Association of vectors and bird malaria in wetland territories of Bulgaria: preliminary results. *International Conference Wetlands: Functioning, Management and Restoration* 16-19 October, 2011, Albena, Varna
- A. Bobeva, D. Dimitrov, M. Marinov, M. Ilieva, P. Zehtindjev & S. Bensch A survey of Haemoproteus spp. vectors with respect to their host preferences and transmission of avian haemosporidians. *Malaria and Related Haemosporidian Parasites of Wildlife* 7-11 August 2013, Nature Research Centre, Vilnius, Lithuania, 40.
- A. Bobeva, D. Dimitrov, M. Marinov, M. Ilieva, P. Zehtindjev & S. Bensch A survey of Haemoproteus spp. vectors with respect to their host preferences and transmission of avian haemosporidians. *Ninth National Conference of Parasitology with International Participation* 18-21 September 2013, Plovdiv, Bulgaria, 16.

## Благодарности

Изказвам най-искрени благодарности към научните си ръководители – проф. д.б.н. Бойко Б. Георгиев и доц. д-р Павел Х. Зехтинджиев за помощта и подкрепата, която ми оказваха по време на докторантурата, за разбирането, търпението, безценните съвети и познание, които безвъзмездно ми дариха. Благодаря!

Благодарна съм и на всичките си колеги от изследователска група „Кръвни паразити по птици“ за помощта, която ми оказваха при събирането на пробите и последвалата им обработка, за идеите, които ми даваха и подкрепата, която ми оказваха. Благодаря на гл. ас. д-р Михаела Илиева и ас. д-р Димитър В. Димитров, които направиха работата на БЕБ „Калимок“ изключително приятна и продуктивна и на Михаела Илиева и Никола Бънков за оказаното съдействие при лабораторната обработка на част от материалите. Благодаря на колегите от института д-р Пламен Панков, д-р Ясен Мутафчиев, д-р Павел Николов и д-р Надежда Тодорова за интересните разговори и идеи, които споделяха с мен. Благодаря на Мартин Маринов, Бойко Неов, Карина Иванова, Страхил Пеев и всички останали колеги за подкрепата и интереса към работата ми.

Благодаря на персонала на БЕБ “Калимок” за отличните условия за провеждане на теренните изследвания по дисертацията!

Благодаря на ентомолозите д-р Огнян Миков, д-р Ивайло Тодоров и д-р Владимир Крумов, за това, че ме въведоха в работата с насекоми и споделиха с мен ценния си опит и познания.

Благодаря на проф. д-р Снежана Грозева, научен секретар, и Анна Лукарска, технически секретар на ИБЕИ – БАН за винаги навременното съдействие в административната част от работата и подкрепата им.

I am very grateful to Professor Staffan Bensch for the valuable discussions, advice and support he gave me, as well as, for the great opportunity to visit his Molecular Ecology and Evolution Lab in Lund University. Thank you, Jane Jonsson, Martin Andersson and Vaidas Palinauskas, for the great fellowship and valuable support in the lab. Thanks to Jana Radrova for sharing her

experience and knowledge regarding the biting midges' taxonomy and identification. Tamara Emmenegger, I am very thankful for the great fellowship, priceless discussions and nice time spent together.

Не на последно място искам да благодаря на изключителната ми майка Бонка, партньорът ми в живота – Мартин и цялото ми прекрасно семейство за безвъзмездната подкрепа, разбиране, обич и търпение, с които ме даряват всеки ден.

Включените в тази дисертация изследвания са изпълнени с използване на лабораторното оборудване, придобито в рамките на проектите WETLANET (финансиран от Европейската комисия, програма “Капацитети”, грант 229802/FP7-REGPOT) и SEBDER (финансиран от Фонд “Научни изследвания”, Договор ДОО2-15/17.02.2009). Разработката беше подпомогната от проект “Развитие на научния потенциал в областта на фаунистичното разнообразие и опазването на природната среда” с ръководител доц. д-р Милчо Тодоров, реализиран в рамките на Оперативна програма “Развитие на човешките ресурси”, направление “Подкрепа за развитието на докторанти, постдокторанти, специализанти и млади учени”, Договор BG051PO001-3.3.04/41.



## Summary

Molecular studies of the specificity of avian malaria parasites (Haemosporida) to the vectors of the genus *Culicoides* Latreille, 1809 (Diptera: Ceratopogonidae)

Aneliya Borisova Bobeva

PhD thesis, Sofia, 2014

Institute of Biodiversity and Ecosystem Research – Bulgarian Academy of Sciences, 2 Gagarin Street, 1113 Sofia, Bulgaria

Supervisors: Prof. Boyko Georgiev, PhD, DSc  
Assoc. Prof. Pavel Zehtindjiev, PhD

The aim of the present study was to identify the biting midges of the genus *Culicoides* in North-East Bulgaria and to determine their feeding preferences in order to reveal their potential role in the transmission of avian haemosporidians. Eleven *Culicoides* species were recorded during the course of the study; two of them were reported for the first time for the Bulgarian fauna.

By applying two nested-PCR assays, one targeting the avian *cyt b* gene and another targeting the COI gene of a wide range of vertebrates, we identified the blood hosts of six biting midge species: *C. circumscriptus*, *C. festivipennis*, *C. punctatus*, *C. pictipennis*, *C. alazanicus* and *C. griseidorsum*. Bird DNA was found in 50.36% of 95 investigated bloodmeals whereas mammalian DNA was identified in 13.7%. Two *Culicoides* species were found feeding both on birds and mammals. There was a remarkable diversity of avian hosts: blood of 23 species of four orders was identified in the abdomens of four *Culicoides* species. The most common bird species identified was magpie, *Pica pica* (N=7) registered in all four ornithophilic

biting midge species. Six bloodmeals from the great tit, *Parus major*, were recorded only in *C. alazanicus*. None of the studied species of *Culicoides* appeared to be strictly specialized to a single avian host.

PCR-based technique amplifying part of mitochondrial cytochrome *b* gene of haemosporidian parasites was applied on naturally infected biting midges. Totally, 870 parous individuals of 11 species and 95 blood-fed individuals of 6 species of *Culicoides* were examined for the presence of DNA of haemosporidians. Haemosporidian genetic lineages were identified in individuals of 4 insect species: *C. alazanicus* (12 lineages, 9 lineages of *Haemoproteus* and 3 lineages of *Plasmodium*), *C. circumscriptus* and *C. festivipennis* (with 3 and 2 lineages of *Haemoproteus*, respectively) and *C. pictipennis* (with one *Haemoproteus* lineage). Two genetic lineages of *Haemoproteus* were recorded in more than one vector species. These results demonstrate variations in the specificity of *Haemoproteus* genetic lineages to their potential vectors, since some lineages are recorded in a single vector species and others occur in two or more vector species.