

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

Мартин Петров Маринов

**Връзка между индивидуалното поведение и инвазията с
кръвни паразити (Haemosporida) при моделни
видове врабчоподобни птици**

Автореферат

**Докторантска програма
“Екология и опазване на екосистемите”**

**Научен ръководител:
проф. д-р Бойко Б. Георгиев**

**Научен консултант:
проф. д-р Павел Зехтинджиев**

София, май 2017 г.

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

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 20 март 2017 г.

Дисертационният труд е с общ обем 72 страници и съдържа 9 основни раздела, включително 5 таблици и 4 фигури. Списъкът на цитираната литература съдържа 195 заглавия на латиница.

Защитата на дисертационния труд ще се състои на 19.05.2017 г. от 10:00 часа в Заседателната зала на База 1 на Института по биоразнообразие и екосистемни изследвания, БАН, ул. „Майор Ю. Гагарин” № 2, на открито заседание на петчленно Научно жури (назначено със Заповед на Директора на ИБЕИ – БАН №35/22.03.2017) в състав:

Проф. дбн Георги Марков – председател на научното жури
Проф. д-р Павел Зехтинджиев – научен консултант
Проф. д-р Даниела Симеоновска-Николова (БФ на СУ)
Проф. дбн Златозар Боев (НПМ – БАН)
Доц. д-р Диана Златанова (БФ на СУ)

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

Благодарности

Издавам най-искрените си благодарности към моите научни ръководители – проф. дбн Бойко Георгиев и проф. д-р Павел Зехтинджиев – за доверието, свободата да търся и намирам оптимални решения, предоставените възможности, търпението, ценните съвети и напътствия и готовността за съдействие в критични моменти.

I am sincerely grateful to Dr Chiara Marchetti and Prof Arie van Noordwijk for their priceless help in formulating hypotheses, data collecting and processing, conducting statistical analyses, interpreting results and drawing conclusions, manuscript writing and responding to reviewers. Thank you!

Изключително съм благодарен на моите колеги от изследователска група „Кръвни паразити на птици“: д-р Михаела Илиева, д-р Димитър Димитров, д-р Анелия Бобева, Карина Иванова и Страхил Пеев, за неогренимата помощ в полевата и лабораторна работа, дискусии, идеи, съвети и морална подкрепа.

Издавам почит към паметта на моя баща Петър Маринов, който разпали интереса ми към зоологията в ранното ми детство, и на моя учител по биология Димитър Бенчев, който канализира стихийния ми интерес в правилната посока. Поклон пред паметта на моя приятел и колега доц. д-р Николай Цанков, който ми даваше полезни съвети в прилагането на статистическите анализи.

Благодаря на семейството си, на Мирена и на приятелите, които винаги са ме подкрепяли в моите начинания.

Създаването на настоящия дисертационен труд бе подпомогнато от участието на М. Маринов в курс за докторанти „Поведение на животните“ в Университета в Лунд, Швеция, и обмяна на посещения на М. Маринов в Холандия и на К. Маркети в България, финансирани в рамките на проект WETLANET (финансиран от Европейската комисия, програма „Капацитети“, грант 229802/FP7-REGPOT). В хода на настоящата дисертация е използвано лабораторно 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). Полевата работа, свързана с улавянето, отглеждането и провеждането на поведенчески тестове с южния славей (*Luscinia megarhynchos*) е подпомогната от проект „Ориентация, навигация и наследствена миграционна програма на пойни птици далечни мигранти“, с ръководител д-р Михаела Илиева (финансиран от Фонд „Научни изследвания“, Договор ДО/02-277). Хардуер и литература, необходими за обработка на видеоматериали от поведенческите тестове, бяха осигурени чрез 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).

1. Увод

Паразитите оказват негативен ефект върху оцеляването и приспособеността на птиците и представляват съществен фактор, който повлиява динамиката на птичите популации и допринася за тяхната еволюция. Освен прякото въздействие върху физическото състояние на опаразитените индивиди, негативно са повлияни редица техни репродуктивни параметри като забавяне на яйцеснасянето, редуциран брой снесени яйца, редуциран брой излетели от гнездото малки, редуцирани тегло, размери и показатели на телесно състояние на малките и редуциран брой люпила за сезон (Møller et al. 1990). Инвестираните от птиците репродуктивни усилия често са за сметка на понижена имунна защита и повишена възприемчивост към паразити, а алтернативният избор на инвазираните индивиди да инвестират репродуктивни усилия в настоящето, вместо в бъдеще, намалява шанса им за оцеляване и размножаване (Richner 1998). Редуцирайки репродуктивния успех и оцеляване на своите гостоприемници, паразитите оказват силен натиск на отбора върху редица техни морфологични, физиологични и поведенчески белези на резистентност, които биха ограничили неблагоприятното влияние на паразитите в дългосрочен план (Møller et al. 1990; Davidar and Morton 1993).

Въздействието на паразитите върху физиологичното състояние на птиците може да има различни прояви, които варират от симптоми на заболяване, вследствие патогенния ефект на инвазията, до промени в поведението, които могат да имат неадаптивна или адаптивна роля (Ewald 1980). Докато промените, съпътстващи патологията на инвазията, са добре описани, промените в поведението на гостоприемниците и изясняването на адаптивната им стойност от гледна точка на еволюцията са все още слабо проучени.

Кръвните паразити по птици от разред Naemosporida са група с широко географско разпространение, огромно видово разнообразие и различна специфичност към гостоприемниците си (Valkiūnas 2005). Тяхното потенциално въздействие върху адаптивните възможности на птиците, заедно с разнообразието

от фактори на средата и възможните комбинации от тях, ги прави удобна група за изучаване на микроеволюционните процеси, водещи до динамично равновесие в системата паразит-гостоприемник (Hellgren et al. 2009). Изясняването на адаптивната роля на предизвиканите от хемоспоридиите промени в поведението на птиците предоставя възможност за разкриване на еволюционните пътища, довели до конкретните числености и динамика на птичите популации и съобщества днес (Hellgren et al. 2009).

Предвид значението на кръвните паразити като фактор в еволюционните процеси и регулатор на популациите на птиците-гостоприемници, настоящата дисертация е насочена към разбиране на връзката между едноклетъчните паразити от разред *Haemosporida* и поведенческите особености на техните гостоприемници – птици.

2. Литературен обзор

В литературния обзор е направен обстоен преглед върху следните теми: 1) взаимоотношенията паразит-гостоприемник в еволюционен и екологичен аспект; 2) типове промени в поведението на гостоприемника, предизвикани от паразита; 3) консистентни индивидуални поведенчески различия; 4) кръвни паразити (*Sporozoa*: *Haemosporida*) – врабчоподобни птици (*Aves*: *Passeriformes*) като моделна система паразит – гостоприемник.

В резюме, за да увеличат вероятността за трансмисията си, някои паразити променят фенотипните белези, включително поведението на своите гостоприемници. Консистентните индивидуални различия в поведението на гостоприемниците могат да бъдат както предпоставка, така и следствие от паразитните инвазии. Добре проучена е връзката между поведението на гостоприемниците и паразитите, използващи хранителните вериги за своята трансмисия, но са малко на брой изследванията върху векторно пренасяните паразити и влиянието им върху поведението на гръбначните гостоприемници.

От направения преглед става ясно, че хемоспоридиите по птици имат потенциал да променят поведението на гостоприемниците си, с доказано манипулативно въздействие върху векторите им. Изследванията, фокусирани върху връзката между поведенческата изменчивост при птиците и инвазията с хемоспоридии, са едва в начална фаза. Необходимо е натрупването на повече фактическа информация, която да хвърли светлина върху потенциалната връзка между хемоспориидните инвазии и консистентните поведенчески различия в популациите на врабчоподобните птици, свързани както с адаптивните промени в поведението на гостоприемниците, така и с ролята на поведението на птиците за вероятността от опаразитяване с хемоспоридии. Този извод определи целта и задачите на настоящия дисертационен труд.

3. Цел и задачи

Целта на настоящото изследване е да се установи има ли връзка между поведенческата индивидуалност при моделни видове врабчоподобни птици и тяхното опаразитяване с кръвни паразити (Haemosporida).

Задачи:

1. Проверка на хипотезата за наличието на закономерна връзка между поведенческата изменчивост, наличието на кръвни паразити (Haemosporida) и интензивността на инвазията при моделен вид врабчоподобни птици – южен славей *Luscinia megarhynchos* (Brehm, 1831). Сравнение на индексите на телесно състояние между неопаразитени и опаразитени с хемоспоридии птици.
2. Сравнение на количествените показатели на поведението между неопаразитени птици, птици с единични инвазии с паразити от родовете *Plasmodium* или *Haemoproteus* и птици със смесени инвазии с паразити от двата рода при моделен вид врабчоподобни птици – жълта стърчиопашка *Motacilla flava* L., 1758.

4. Материали и методи

4.1. Улавяне на птици и снимане на морфометрични данни

Птиците са улавяни с помощта на стандартни орнитологични мрежи. Всички индивиди са маркирани с орнитологични пръстени. Определяни са биологичният вид, възрастта и полът на птиците по Svensson (1992). Извършени са стандартни морфометрични измервания като тегло, дължина на крилото, дължина на стъпалото, степен на линеене, степен на охраненост (подкожни мазнини) и степен на развитие на гръдните мускули (Svensson 1992; Kaiser 1993; Bairlein 1995). Птиците са улавяни и задържани в плен съгласно разрешително № 213/26.6.2009, издадено от Министерството на околната среда и водите на Република България. Всички експерименти са проведени в съответствие с националното законодателство и указанията за етично отношение към животните на Асоциацията за изучаване поведението на животните (Association for the Study of Animal Behaviour, ASAB) и Дружеството за поведение на животните (Animal Behavior Society, ABS).

4.2. Диагностика на паразитите

Чрез хепаринизиран капиляр от птиците са събирани кръвни проби след пробождане на брахиалната вена. Около 20 μ l кръв е разреждана в 500 μ l SET буфер (0.015 M NaCl, 0.05 M Tris, 0.001 M EDTA, pH 8.0) или 96% етанол за генетичен анализ. Върху предметни стъкла са изготвяни минимум 2 натривки, впоследствие изсушавани и фиксирани в 100% метанол за 5 минути и по-късно оцветявани с 10% разтвор на Гимза за 1 час в лабораторни условия. Предметните стъкла с фиксираните кръвни натривки са опаковани в чиста хартия, за да се предпазят препаратите от повреждане. Кръвните натривки са преглеждани под светлинен микроскоп в продължение на 10-15 минути със слабо увеличение (400 \times) и след това най-малко 100 полета са преглеждани със силно увеличение (1000 \times). Идентификацията на паразитите е извършвана съгласно морфологичните и морфометрични характеристики, описани от Valkiūnas (2005).

Интензивността на инвазията е оценявана като процент инвазирани еритроцити чрез изброяване на паразитите в 1000 еритроцита, а в случаите при много слаба инвазия (т.е. < 0.1%) – на 10 000 еритроцита. За екстракция на ДНК е използван стандартен метод на етанолна преципитация с амониев ацетат. Установяването на паразитите в кръвните проби е извършвано чрез метод, основан на полимеразна верижна реакция (PCR) с използването на праймери и температурни профили, описани от Hellgren et al. (2004). Птиците, в чиито проби са идентифицирани хемоспоридии чрез един от двата или и чрез двата метода (микроскопски и молекулярен), са определяни като инвазирани. За оценка на смесените инвазии с родовете *Haemoproteus* и *Plasmodium* е използван микроскопският метод, тъй като молекулярният метод не може да идентифицира отделните родове паразити при наличие на смесена инвазия.

4.3. Отглеждане на експерименталните птици

Всички поведенчески тестове са извършени в Биологична експериментална база „Калимок” на Института по биоразнообразие и екосистемни изследвания към Българска академия на науките. Базата се намира в района на с. Нова Черна, Силистренска област (44°00'N, 26°26'E). Уловените птици са отглеждани временно в индивидуални клетки, защитени от преносителите на хемоспоридии с противокомарна мрежа. При продължително задържане на птиците индивидуалните им клетки са аранжирани със свежа растителност. Поддържана е температура от 16°C до 30°C и естествен фотопериод през лятото (от май до септември – от 10 h до 17 h светлина). Храната на насекомоядните видове птици (ларви на мухи от семейство Sarcophagidae, ларви на брашнен бръмбар *Tenebrio molitor* L., 1758 и съставките за приготвяне на смеска – яйца, фабрично приготвена храна за насекомоядни птици, натрошен хляб, зеленчуци и висококалорична добавка) е осигурявана от лицензирани търговски обекти. На всички птици е осигуряван достъп до прясна вода. След първоначалното настаняване на птиците теглото им е следено на всеки два дни, за да се установи успяват ли да се адаптират към храната и

условията в клетките. Птиците със силно понижено тегло са освобождавани незабавно.

4.4. Протокол от поведенческите тестове

4.4.1. Неофилия (тест за изследване на непознат обект)

След измерване на активността за 3 минути, на външната страна на стената на индивидуалната клетка е поставян ярък обект със сферична форма, след което на птицата е предоставяна възможност да се приближи или да остане на разстояние от обекта. Измервана е латентността на приближаване на птицата до обекта. Максимална продължителност – 15 минути.

4.4.2. Неофобия (тест за реакция към плашещ предмет)

В деня на теста на птицата е давана храна, състояща се само от яйчна смеска. Тестът е провеждан в две последователни сесии – контролна и експериментална. В началото на контролната сесия в клетката е поставяна купа с няколко ларви на брашнен бръмбар и на птицата е предоставяна възможност да започне да се храни. Измервана е латентността до започване на храненето. В началото на експерименталната сесия непосредствено до купата с храна е поставян ярко оцветен непознат обект, който напомня живо същество (гумена играчка). Отново е измервана латентността до започване на повторното хранене на птицата. Максимална продължителност – 20 минути.

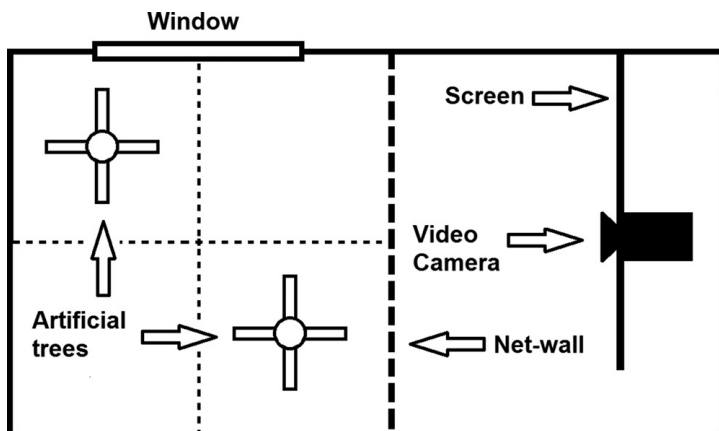
4.4.3. Стрес при манипулация (измерване на дишането)

След изваждане от клетката птицата е поставяна в памучна торбичка за 5 минути. След това птицата е изваждана и дишането ѝ е измервано, като е регистриран броят на вдишванията в продължение на една минута визуално и тактилно (Fučíková et al. 2009).

4.4.4. Изследователско поведение (тест за реакция към непозната обстановка)

Птицата е пускана в клетка или помещение (Фиг. 1), чиято обстановка се различава съществено от индивидуалната клетка, в която е настанена. Поведението ѝ е наблюдавано в

продължение на 5-10 мин. След края на сесията птицата е връщана в индивидуалната ѝ клетка.



Фиг. 1. Схема на помещението, използвано за наблюдение на изследователското поведение. С телена мрежа помещението е разделено на експериментална част, в която бива пускана изследваната птица и работна част, в която зад параван е разположена видеокамера. Подът на експерименталната част е разделен чрез маркировка на 4 сектора, в два от които са разположени две изкуствени дървета. Прозорецът е покрит с противокмарна мрежа, вместо стъкло.

4.5. Обработка на видеоматериалите

Всяка сесия на поведенческите измервания е записвана с видеокамера. Видеофайловете са обработвани чрез специализирана програма за анализ на поведението (JWatcher 1.0, Blumstein and Daniel 2007). За всеки поведенчески тест са дефинирани поведенчески категории и са отчитани количествените им показатели (честота, продължителност и латентност) в съответствие с описаната методика на Martin and Bateson (2007). Данните са въвеждани в електронни таблици за последващ анализ.

4.6. Статистически анализ

Оценка на поведенческата изменчивост между индивидите от един вид е извършена чрез тестове за корелация (тест на Pearson, тест на Spearman) и анализ на главните компоненти. Индексите на телесното състояние на птиците са изчислени съгласно Jakob et al. (1996) и Peig & Green (2009). Непараметрични (Z -тест за несвързани извадки на Колмогоров-Смирнов) и параметрични статистически тестове (t -тест на Student и дисперсионен анализ – GLM: ANOVA, ANCOVA) са използвани за сравнение на поведенческите променливи и индексите на телесното състояние между индивидите с различен статус на опаразитяване. Използвана е логистична регресия, за да се установи ефекта на статуса на инвазия върху вероятността птиците да приближат непознат обект. Тест на McNemar е използван за установяване на статистически значима разлика между срещаемостта на два хемоспоридни рода в популацията на жълтата стърчиопашка. Всички статистически анализи са извършени с помощта на програмите STATISTICA, Version 8.0 (Statsoft Inc., Tulsa, OK, USA) и MedCalc Statistical Software, Version 16.2.1 (MedCalc Software bvba, Ostend, Belgium).

5. Резултати и обсъждане

Резултатите от изследванията, свързани с темата на докторантурата, са публикувани в следните две статии, които са част от дисертационния труд:

Статия 1:

Marinov, M., Zehtindjiev, P., Dimitrov, D., Ilieva, M., Bobeva, A. & Marchetti, C. 2017. Haemosporidian infections and host behavioural variation: a case study on wild-caught nightingales (*Luscinia megarhynchos*). *Ethology Ecology & Evolution* 29, 126–137. (doi: 10.1080/03949370.2015.1102776).

Статия 2:

Marinov, M. P., Marchetti, C., Dimitrov, D., Ilieva, M. & Zehtindjiev, P. (in press). Mixed haemosporidian infections are associated with higher fearfulness in Yellow Wagtail, *Motacilla flava*. Canadian Journal of Zoology. (doi: 10.1139/cjz-2016-0121).

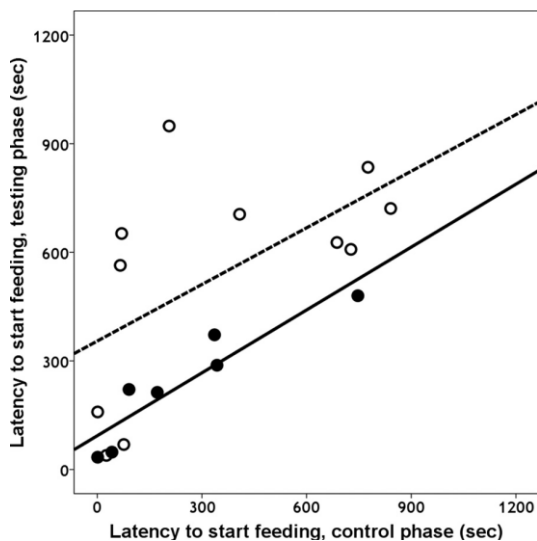
6. Обобщение и изводи

Първата задача на настоящия дисертационен труд е проверка на хипотезата за наличието на закономерна връзка между поведенческата изменчивост на гостоприемника (врабчоподобна птица) и наличието на кръвни паразити (Haemosporida), както и интензивността на инвазията. Тази задача е реализирана чрез изследване на моделен вид – южния славей *Luscinia megarhynchos* и неговите хемоспоридни паразити.

Индивидуалното поведение на неинвазирани и естествено инвазирани с хемоспоридии южни славеи (*L. megarhynchos*) е сравнено във връзка с доказването или отхвърлянето на хипотезата, че инвазираните птици би следвало да проявяват по-висока степен на риск и по-бързо да изследват непозната обстановка. Сравнени са резултатите от тестовете за неофобия (реакция към плашещ предмет) и реакция към непозната обстановка. Повторените измервания на реакцията към непозната обстановка между неинвазираните и инвазираните славеи са сравнени за проверка консистентността на поведенческите реакции. Двете групи птици са сравнени по отношение на темпа на дишане (реакция на стрес при манипулация), индексите на телесно състояние и разликите в стойностите на теллото, измерени при улавянето и освобождаването на птиците, с очакването за негативно влияние на паразитите върху инвазираните птици.

Резултатите от теста за неофобия показват, че инвазираните птици са по-склонни да поемат риск (ANCOVA; $F_{1,16} = 5.65$, $P = 0.03$; Фиг. 2) и това поведение корелира с интензивността на инвазията (Spearman, $r_s = -0.5$, $P = 0.035$, $n = 18$). Не са установени разлики в скоростта, с която птиците изследват непозната за тях обстановка, или в телесното

състояние, както и в реакцията към стрес по време на манипулация (Таблица 1). Изследователското поведение, измерено като времето, необходимо за посещение на третата възможна локация в непозната обстановка, не показва консистентност във времето, за разлика от времето, прекарано в изследване пода на помещението. Тези поведенчески променливи не показват връзка с опаразитяването. При инвазираните славеи е налице тенденция за по-висока консистентност на поведението, свързано с опитите за бягство.



Фиг. 2. Диаграма на разсейването, представяща неинвазираните (в бяло) и инвазираните славеи (в черно) спрямо двете латентности, измерени в теста за неофобия (контролна и експериментална фаза) и линиите на регресия на всяка група.

Таблица 1. Сравнение на темпа на дишане и индексите на телесно състояние (*t*-тест за независими извадки) между неинвазирани и инвазирани славеи.

Variable	N		Mean Non-infected	Mean Infected	t-value	P
	Non-infected	Infected				
Breath rate (1st trial) ^a	12	10	144.8	133.8	1.239	0.229
Breath rate (2nd trial) ^a	12	10	149.2	137.4	0.988	0.335
Scaled mass index	11	9	22.24	22.96	0.75	0.462
Weight change ^b	12	8	7.6	4.2	1.81*	0.087*

^a Брой вдъхвания /мин.; ^b Разлика в теглото (g) между последното и първото измерване в плен; * *t*-тестът е направен въз основа на Вох-Сох трансформирани стойности на промяната в теглото.

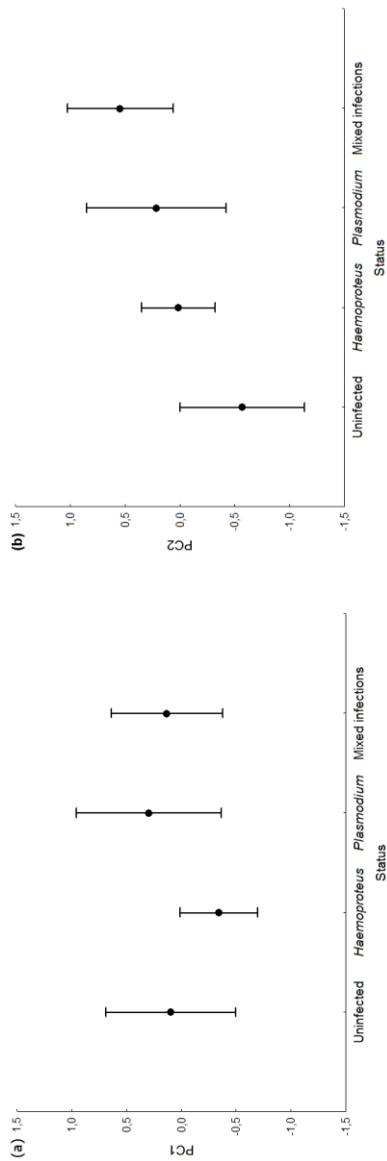
15

Таблица 2. Двухфакторен дисперсионен анализ за всяка от променливите: активност (PC1), любопитство – плахост (PC2) и индекс на телесно състояние (BCI) при жъли стърчионашки, с независими групиращи променливи „пол“ (Sex) и „статус на инвазия“ (Infection status).

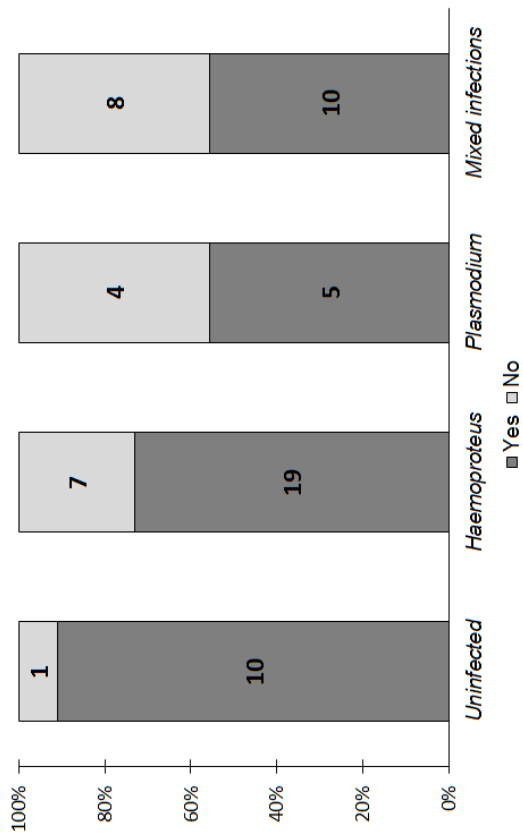
Effect	PC1			PC2			BCI								
	SS	DF	P	SS	DF	P	SS	DF	P						
Sex	0.02	1	0.02	0.89	1.72	1	1.72	1.96	0.17	0.006	1	0.006	13.00	0.001	
Infection status	4.35	3	1.45	1.51	0.22	8.07	3	2.69	3.06	0.03	0.000	3	0.000	0.34	0.80
Sex*Infection status	3.06	3	1.02	1.06	0.37	8.59	3	2.86	3.25	0.03	0.003	3	0.001	2.15	0.10
Residual	63.39	66	0.96			58.11	66	0.88			0.031	66	0.000		

Нашите резултати не подкрепят хипотезата, че инвазираните индивиди изследват средата по-бързо, както и очакването, че имат по-висока интензивност на дишането. Резултатите от теста за неофобия са в съответствие с предположението, че предприемането на риск от страна на гостоприемника е механизъм за минимизиране въздействието на паразита върху популацията на гостоприемника чрез увеличаване на вероятността инвазираните индивиди да станат по-лесна жертва на хищничество. Този процес намалява срещаемостта на паразита в популацията на гостоприемника, а също вероятността за заразяване на нови индивиди, като по този начин се поддържа стабилно равновесие между вирулентността на паразита (т.е. способността му да въздейства негативно на популационно равнище) и плътността на популацията на гостоприемника (Williams and Day 2001; Møller and Nielsen 2007; Møller 2008).

Втората задача на изследванията е проверката на това доколко опаразитеността с единични инвазии с паразити от родовете *Plasmodium* или *Haemoproteus* и със смесени инвазии с паразити от двата рода въздейства на поведението на врабчоподобните птици. За целта е избран вид, при който срещаемостта на смесените инвазии е висока (Shurulinkov et al. 2012) – жълта стърчиопашка *Motacilla flava*. Нашите изследвания, основани на два различни поведенчески теста, свързани със скалата любопитство – плахост, показват, че индивидите със смесени инвазии са по-плахи в сравнение с неинвазираните (тест за реакция към непозната обстановка – Factorial ANOVA: $F_{3,66} = 3.06$, P (Bonferroni corrected) = 0.025, Фиг. 3b; тест за неофилия – Logistic regression: Odds ratio = 8, $z = 1.807$, $P = 0.07$, 95% CI = 0.84/76.37, Фиг. 4), а при птиците с единични инвазии ефектът е междинен. Тази тенденция е по-силна при женските индивиди (тест за реакция към непозната обстановка – Bonferroni test, $P = 0.05$). Не е установено влияние на паразитите върху активността или телесното състояние на птиците (Таблица. 2; Фиг. 3a).



Фиг. 3. Сравнение на стойностите на поведението, измерени по скалите за активност (PC1, a) и лобопитство – плахост (PC2, b) в тест за реакция към непозната обстановка между четири групи жълти стърчиопашки (*Motacilla flava*) с различен статус на инвазия (PC1: отрицателни стойности – ниска активност; положителни стойности – висока активност; PC2: отрицателни стойности – висока степен на лобопитство; положителни стойности – висока степен на плахост). Вертикалните линии показват 95%-ните доверителни интервали.



Фиг. 4. Процент жълти стърчиопашки (*Motacilla flava*) с висока неофилия (приближават се към непознат обект) за всяка от четири групи птици с различен статус на инвазия. Yes – приближават се към нов обект; No – не се приближават.

Получените резултати дават основание да предполагаме, че птиците с хронични смесени инвазии изпитват по-силно влияние върху поведението от страна на паразитите в сравнение с птиците с единични инвазии. Липсата на различия в поведението между неинвазираните птици и птиците с единични инвазии, както и липсата на ефект върху телесното състояние и общата активност, показват, че паразитното влияние по време на хроничната фаза на инвазията може да не засяга съществени показатели на физиологичното състояние на гостоприемника и ефектът на единичните инвазии върху поведението да не е винаги достатъчно силен, за да бъде доказан. Доколкото механизмът, предопределящ проявите на любопитство и плахост, се обяснява като резултат от несъответствието между възприеманите и очакваните събития, като умереното несъответствие провокира любопитство, а по-голямо несъответствие – склонност към бягство (van Kampen 2015), е възможно паразитите да променят прага на различните мотивационни състояния, като засилват плахостта. Повишената предпазливост при женските индивиди със смесени хронични инвазии може да бъде предимство за оцеляването и защитата на гнездото, докато липсата на ефект при мъжките може да се дължи на повишените нива на тестостерон в началото на размножителния сезон. Тези предположения могат да бъдат доказани с помощта на бъдещи добре планирани експериментални изследвания.

В заключение, настоящето изследване установява значими разлики в поведението на неинвазирани и инвазирани с хемоспоридии моделни видове врабчоподобни птици. Нашите резултати подкрепят резултатите от други изследвания (Dunn et al. 2011; Remacha et al. 2013; García-Longoria et al. 2015) и показват сложната природа на взаимоотношенията паразит-гостоприемник. Склонността към поемане на риск при инвазираните индивиди от единия изследван вид – южния славей, не се потвърждава при втория проучен вид – жълтата стърчиопашка. Напротив, инвазираните стърчиопашки демонстрират по-висока степен на предпазливост. Това несъответствие вероятно се дължи на разликите в специфичните екологични особености на двата вида птици, времевите интервали, през които са извършени двете изследвания, както и

на специфичността на различните хемоспоридии към двата гостоприемника. Не е известно доколко тенденцията за поемане на риск при славеите не е свързана с пола, тъй като обемът на нашата извадка не позволи да бъде направен подобен анализ.

На основата на проведените изследвания могат да се направят следните основни изводи:

1. Инвазираните с паразити от род *Plasmodium* южни славеи *Luscinia megarhynchos* по време на хроничната фаза на инвазията показват поведение, характеризиращо се с по-голяма склонност за поемане на риск. Степента на проява на това поведение корелира с интензивността на инвазията.
2. Не е установена връзка между хроничната инвазия с хемоспоридии при южните славеи (*Luscinia megarhynchos*) и тяхното изследователско поведение, интензивност на дишане и промяна на телесното тегло в плен като показатели за реакция при стресова ситуация.
3. Жълтите стърчиопашки (*Motacilla flava*) с хронична смесена инвазия с паразити от родовете *Plasmodium* и *Haemoproteus* показват поведение на по-голяма плахост (измерена чрез тест за неофилия и тест за реакция към непозната обстановка) в сравнение с неинвазираните птици. Птиците с единични инвазии с *Plasmodium* или *Haemoproteus* заемат междинно положение между неинвазираните птици и птиците със смесени инвазии по отношение на тези тестове, без обаче да се извяват статистически достоверни различия.
4. Не е установена разлика в активността (измерена чрез теста за реакция към непозната обстановка) при неинвазирани жълти стърчиопашки (*Motacilla flava*), при носители на единични инвазии с *Plasmodium* или *Haemoproteus* и при такива със смесени инвазии с паразити от двата рода.

5. Както при южните славеи (*Luscinia megarhynchos*), така и при жълтите стърчиопашки (*Motacilla flava*), хроничната инвазия с хемоспоридии не показва въздействие върху индексите на телесно състояние.

Получените резултати разкриват неизвестни или слабо познати страни от въздействието на хемоспоридиите върху врабчоподобните птици. Могат да бъдат очертани следните научни приноси с оригинален характер:

1. За първи път е изследвана и установена връзка между хроничната фаза на инвазията с хемоспоридии и аспекти на индивидуалното поведение при южния славей (*Luscinia megarhynchos*) и жълтата стърчиопашка (*Motacilla flava*). Това е първото изследване върху етологичните последици на хроничната инвазия с хемоспоридии върху представители на семействата Turdidae и Motacillidae.
2. За първи път е установена връзка между хроничната инвазия с хемоспоридии и повишена степен на поемане на риск при заразените врабчоподобни птици (на примера на южния славей). Полученият резултат е в съответствие с хипотезата за елиминиране на заразените екземпляри с рисково поведение, което намалява срещаемостта на паразита в популацията на гостоприемника и спомага за поддържане на стабилно равновесие между вирулентността на паразита и плътността на популацията на гостоприемника.
3. За първи път е установено негативно въздействие на смесените хронични инвазии с хемоспоридии върху поведението по скалата любопитство – плахост при врабчоподобни птици (при жълтата стърчиопашка). Тези резултати разширяват представата за въздействието на смесените инвазии върху поведението на птиците, доколкото предходни изследвания на други автори демонстрират роля на смесени инвазии за промяна на поведението при големия синигер (*Parus*

major), при който женските индивиди, носители на смесени инвазии, показват повишена изследователска активност, а мъжките – по-добра познавателна способност и повишена степен на реакция за избягване на опасност.

В заключение, получените резултати от включените в този дисертационен труд изследвания имат пионерен характер и показват редица неясни страни от взаимоотношенията “паразит – гостоприемник”, в частност “хемоспоридни паразити – врабчоподобна птица”. Необходими са бъдещи, по-мощни и целенасочени изследвания, които да изградят по-пълна представа за ролята на хемоспоридиите като фактор за екологичните и поведенческите особености на птичите популации и тяхното еволюционно значение.

ДЕКЛАРАЦИЯ ЗА ОРИГИНАЛНОСТ И ДОСТОВЕРНОСТ

от Мартин Петров Маринов

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.

10.03.2017 г.
гр. София

Декларатор:
М.Маринов /подпис/

СПИСЪК НА ПУБЛИКАЦИИТЕ ПО ТЕМАТА НА ДИСЕРТАЦИЯТА

Резултатите от изследванията, свързани с темата на докторантурата, са публикувани в следните две статии, представени в приложение:

1. Marinov, M., Zehtindjiev, P., Dimitrov, D., Ilieva, M., Bobeva, A. & Marchetti, C. 2017. Haemosporidian infections and host behavioural variation: a case study on wild-caught nightingales (*Luscinia megarhynchos*). *Ethology Ecology & Evolution* 29, 126–137. (doi: 10.1080/03949370.2015.1102776).
2. Marinov, M. P., Marchetti, C., Dimitrov, D., Ilieva, M. & Zehtindjiev, P. (in press). Mixed haemosporidian infections are associated with higher fearfulness in Yellow Wagtail, *Motacilla flava*. *Canadian Journal of Zoology*. (doi: 10.1139/cjz-2016-0121).

СПИСЪК НА ЦИТИРАНИЯТА НА ТРУДОВЕТЕ ПО ТЕМАТА НА ДИСЕРТАЦИЯТА

Брой цитирани публикации: 1. Брой цитиращи източници: 4.

Цитирана публикация:

Marinov, M., Zehtindjiev, P., Dimitrov, D., Ilieva, M., Bobeva, A. & Marchetti, C. 2017. Haemosporidian infections and host behavioural variation: a case study on wild-caught nightingales (*Luscinia megarhynchos*). *Ethology Ecology & Evolution* 29, 126–137. (doi: 10.1080/03949370.2015.1102776).

Цитира се в:

1. Mukhin, A., Palinauskas, V., Platonova, E., Kobylkov, D., Vakoliuk, I., & Valkiūnas, G. 2016. The Strategy to Survive Primary Malaria Infection: An Experimental Study on Behavioural Changes in Parasitized Birds. *PloS ONE*, 11(7): e0159216.

2. Valkiūnas, G., Ilgūnas, M., Bukauskaitė, D., Žiegytė, R., Bernotienė, R., Jusys, V., Eigirdas, V., Fragner, K., Weissenböck, H., & Iezhova, T. A. 2016. *Plasmodium delichoni* n. sp.: description, molecular characterisation and remarks on the exoerythrocytic merogony, persistence, vectors and transmission. *Parasitology Research* 115(7): 2625–2636.
3. Merrick, M. J., Koprowski, J. L. 2017. Should we consider individual behavior differences in applied wildlife conservation studies? *Biological Conservation*, 209: 34–44.
4. Lopes, P. C. 2017. Why are behavioral and immune traits linked? *Hormones and Behavior*, 88: 52–59.

СПИСЪК НА УЧАСТИЯТА В НАУЧНИ ФОРУМИ С
ДОКЛАДИ И ПОСТЕРИ, ОТРАЗЯВАЩИ ИЗСЛЕДВАНИЯТА
ПО ДИСЕРТАЦИЯТА

- Marinov M., Zehtindjev P., Dimitrov D., Ilieva M., Marchetti C. 2011. Bird Behaviour and Malaria: Hypotheses, Preliminary Results and Possible Consequences for Wetland Biodiversity. *International Conference “Wetlands: Functioning, Management and Restoration”*, 16 – 19 October, 2011, Albena, Varna, 57.
- Marinov M., Zehtindjev P. Marchetti C. Prevalence of Blood Parasites in Birds of Different Personalities: Comparative Research in Certain European Bird Species. *International Conference on Malaria and Related Haemosporidian Parasites of Wildlife*, 7 – 11 August 2013, Nature Research Centre, Vilnius, Lithuania, 70.
- Marinov M., Zehtindjev P. Marchetti C. Comparative studies of blood parasites prevalence with regard to personality in certain European bird species. *Ninth National Conference of Parasitology with International Participation*, 18 – 21 September 2013, Plovdiv, Bulgaria, 11.

Marinov, M. P. Relation between individual host behaviour and blood parasite infections (Haemosporida) in model species of passerine birds. *Conference on Recent Challenges in Wildlife Avian Haemosporidian Reasearch*, 28 – 29 September 2014, Tyulenovo, Bulgaria.

Marinov M. P., Marchetti C., Dimitrov D., Ilieva M., Zehtindjiev P. Do mixed haemosporidian infections exert additive effects on the behaviour of a passerine host? *3rd International Conference - Malaria and Related Haemosporidian Parasites of Wildlife*. 27 – 29 September 2016. Arbanassi, Bulgaria, 28.

Associations between individual behaviour and haemosporidian infections in model species of passerine birds

PhD Dissertation

Martin Petrov Marinov

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

Supervisor: Prof. Boyko Georgiev, PhD, DSc

Co-supervisor: Prof. Pavel Zehindjiev, PhD

Sofia, 2017

This project aimed to examine the presence of associations between behavioural variation of model species of passerine birds and their infections with blood parasites (Haemosporida). I tested two hypotheses:

- there is an association between the behavioural variation among host individuals (Common Nightingale *Luscinia megarhynchos*) and their chronic haemosporidian infections (presence and intensity);
- there are differences in host behavioural traits among uninfected birds, single infections with the genera *Plasmodium* or *Haemoproteus* and mixed infections with both genera (using the Yellow Wagtail *Motacilla flava* as a model bird species).

The differences of body indices in uninfected and infected birds were also tested.

Behavioural tests for either neophilia or neophobia, reaction to a novel environment and handling stress were performed to assess behavioural variation among birds. Blood-samples of each bird were scanned by both microscopic examination and PCR-based molecular diagnostic method for the presence and identification of haemosporidian parasites.

In a sample of 22 wild-caught nightingales (*Luscinia megarhynchos*), we compared uninfected and infected birds in single behavioural traits under the hypothesis that infected birds should show more risk-taking behaviours and quicker exploration. Infected

nightingales were more prone to risk-taking and this behavioural trait was significantly correlated with the intensity of infection. No differences were found in exploration speed or body condition and reactions to a stressful situation, such as weight change in captivity and handling.

Following the hypothesis that a mixed infection by different parasite species should have higher effects than single-species infections, we analysed activity and boldness in wild-caught yellow wagtails (*Motacilla flava*) during the energetically demanding spring migration. Eighty-five percent of the birds were naturally infected with *Haemoproteus* or *Plasmodium* and 27% of individuals had parasites of both genera. No differences in activity were found among uninfected, single and mixed infection groups. Birds with infections with both genera appeared to be more fearful when first introduced to a cage. These birds also tended to be less likely to approach a novel object compared to uninfected birds and birds infected by a single genus only.

The results of the present study are described in the following publications:

Marinov, M., Zehindjiev, P., Dimitrov, D., Ilieva, M., Bobeva, A. & Marchetti, C. 2017. Haemosporidian infections and host behavioural variation: a case study on wild-caught nightingales (*Luscinia megarhynchos*). *Ethology Ecology & Evolution* 29, 126–137. (doi: 10.1080/03949370.2015.1102776).

Marinov, M. P., Marchetti, C., Dimitrov, D., Ilieva, M. & Zehindjiev, P. (in press). Mixed haemosporidian infections are associated with higher fearfulness in Yellow Wagtail, *Motacilla flava*. *Canadian Journal of Zoology*. (doi: 10.1139/cjz-2016-0121).