

ՀԱՅԱՍՏԱՆԻ ՀԱՆՐԱՊԵՏՈՒԹՅԱՆ ԳԻՏՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԻ
ԱԶԳԱՅԻՆ ԱԿԱԴԵՄԻԱ

ԱՂԱՅԱՆ ՄԱՐԳԻՍ ԱՂԱՍԻԻ

ԿՈՎԿԱՍԻ ՈՐՈՇ ԱՆՏԱՌԱՅԻՆ ՎԱՅՐԵՐԻ ԹՈՂՈՒՆՆԵՐԻ ԱՐՅԱՆ ՍՊՈՐՏՎՈՐ
ՄԱԿԱԲՈՒՅԾՆԵՐԻ ԲԱԶՄԱԶԱՆՈՒԹՅՈՒՆԸ, ՏԱՐԱԾՎԱԾՈՒԹՅՈՒՆԸ ԵՎ
ՄԱԿԱԲՈՒՅԾ – ՏԵՐ ՓՈԽՀԱՐԱԲԵՐՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԸ

Գ.00.13 – «Մակաբուծաբանություն» մասնագիտությամբ կենսաբանական
գիտությունների թեկնածուի գիտական աստիճանի հայցման ատենախոսության

ՍԵՂՄԱԳԻՐ

Երևան – 2012

НАЦИОНАЛЬНАЯ АКАДЕМИЯ НАУК РЕСПУБЛИКИ АРМЕНИЯ

АГАЯН САРГИС АГАСИЕВИЧ

РАЗНООБРАЗИЕ, РАСПРОСТРАНЕНИЕ И ПАРАЗИТО – ХОЗЯИННЫЕ ОТНОШЕНИЯ
СПОРОВЫХ КРОВЕПАРАЗИТОВ НЕКОТОРЫХ ЛЕСНЫХ ТЕРРИТОРИЙ КАВКАЗА

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени кандидата биологических наук
по специальности 03.00.13 – “Паразитология”

Ереван – 2012

Ատենախոսության թեման հաստատվել է ՀՀ ԳԱԱ Կենդանաբանության և հիդրոէկոլոգիայի գիտական կենտրոնում

Գիտական ղեկավար՝ կենս. գիտ. դոկտոր Գ.Հ. Բոյախյան

Պաշտոնական ընդդիմախոսներ՝ կենս. գիտ. դոկտոր, պրոֆ. Վ.Ա. Դավիդյանց
կենս. գիտ. դոկտոր, պրոֆ. Ռ.Մ. Հարությունյան

Առաջատար կազմակերպություն՝ Հայաստանի պետական ագրարային համալսարան

Ատենախոսության պաշտպանությունը կայանալու է 2012թ. հունիսի 19-ին, ժամը 14.00-ին ՀՀ ԲՈՂ-ի Կենսաբազմազանության և էկոլոգիայի 035 մասնագիտական խորհրդում

Հասցե՝ Երևան, 0014, Պ.Սևակի 7, E-mail: zoohec@sci.am

Ատենախոսությանը կարելի է ծանոթանալ ՀՀ ԳԱԱ Կենդանաբանության և հիդրոէկոլոգիայի գիտական կենտրոնի գրադարանում և www.sczhe.am կայքում

Սեղմագիրը առաքված է 2012թ. մայիսի 19-ին:

Մասնագիտական խորհրդի գիտական քարտուղար, կենս. գիտ. թեկ.՝



Հ.Գ. Խաչատրյան

Тема диссертации утверждена в Научном центре зоологии и гидроэкологии НАН РА

Научный руководитель: докт. биол. наук Г.А. Бояхчян

Официальные оппоненты: докт. биол. наук, проф. В.А. Давидянц
докт. биол. наук, проф. Р.М. Арутюнян

Ведущая организация: Государственный аграрный университет Армении

Защита состоится 19 июня 2012 г. в 14.00 часов на заседании специализированного совета ВАК РА 035 по биоразнообразию и экологии по адресу: г. Ереван, 0014, ул. П. Севака 7, E-mail: zoohec@sci.am

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Научного центра зоологии и гидроэкологии НАН РА и на сайте www.sczhe.am

Автореферат разослан 19 мая 2012 г.

Ученый секретарь специализированного совета, канд. биол. наук.



А.Г. Хачатрян

Ներածություն

Թեմայի արդիականությունը: Վերջին տարիներին նկատվում է վարակիչ հարուցիչների տարածվածության խիստ աճ, ինչը պայմանավորված է ինվազիվ տեսակների ներմուծմամբ, քաղաքաշինության ընդլայնմամբ, կենսաբազմազանության ոչնչացմամբ և այլ տարբեր գործոնների ազդեցությամբ (Sehgal, 2010): Ինվազիվ մակաբույծները հանդիսացել են որոշ կենդանիների տեսակների թվաքանակի էական նվազման և նույնիսկ իսպառ վերացման պատճառ (Harvell et al., 2002): Այս հարուցիչներն ընդլայնում են նաև իրենց տարածման արեալը՝ կապված կլիմայի գլոբալ տաքացման հետ: Դրա հետևանքով էկոհամակարգերում առաջացած վերաձևավորումները կարող են հանգեցնել իմունոլոգիական տեսանկյունից «նախկին» նոր տերերի վարակմանը: Այդ պատճառով նրանք մեծ ուշադրության են արժանի:

Նման կործանարար ազդեցությամբ աչքի են ընկնում մալարիայի հարուցիչները: Վերջիններս մակաբուծում են ողնաշարավորների բավականին լայն շրջանակի վրա՝ ներառյալ երկկենցաղները, սողունները, թռչունները և կաթնասունները՝ այդ թվում մարդը (Valkiūnas 2005; Martinsen et al., 2007): Մալարիայի հետ կապված հետազոտությունների թերությունը պայմանավորված է նրանով, որ դրանց մեծ մասի թիրախը հանդիսանում է մարդը, որոշ այլ պրիմատներ և մկները (Carlton et al., 2002; Sherman, 2005; Pain et al., 2008): Կենդանաբանական հետազոտությունները, կապված թռչունների և սողունների մալարիայի հետ, մնում են անբավարար, հատկապես հետազոտությունների այն մասը, որը կարևոր տեղեկություններ կտար մակաբույծ-տեր փոխհարաբերությունների մասին (Valkiūnas, 2005; Ishtiaq et al., 2008; Kimura et al., 2010): Մա մեծ խոչընդոտ է՝ ֆիլոգենետիկական մոդելներ կառուցելու և մակաբույծների այս մեծ ու բազմազան խմբի զարգացման ուղին հասկանալու համար՝ մասնավորապես/հատկապես կենդանաբանության և էվոլյուցիոն կենսաբանության տեսանկյունից:

Չնայած Կովկասը հանդիսանում է միջազգայնորեն ճանաչված կենսաբազմազանության թեժ կետերից (Denisova, Nikitina, 1994; Stattersfield et al., 1998)՝ գրականությունում գրեթե բացակայում են տվյալներ այս տարածաշրջանում թռչունների արյան սպորավոր մակաբույծների վերաբերյալ (Aghayan, 2011; Աղայան, Բոյախյան, 2012): Այս աշխատանքի առանձնահատկությունն այն է, որ այն ներառում է բավականին արժեքավոր ինֆորմացիա մակաբույծների կազմի, տարածվածության, մակաբույծ-տեր փոխհարաբերությունների առանձնահատկությունների (Aghayan, Drovetski, 2011), ինչպես նաև նոր տերերին փոխանցման և նոր տարածքների գաղութացման հնարավորությունների վերաբերյալ՝ լրացնելով գիտության այդ մեծ բացթողումը

էնդէմիզմի բարձր մակարդակ ունեցող այս տարածաշրջանի (Stattersfield et al., 1998) և վերոհիշյալ մակաբույծների բազմազանության վերաբերյալ (Aghayan, 2012):

Ուսումնասիրության նպատակը և խնդիրները: Հետազոտության նպատակն է եղել ուսումնասիրել և բացահայտել թռչնի մալարիայի և նրան ազգակից արյան սպորավորների՝ *Haemoproteus* (Hp), *Plasmodium* (Pl), *Leucocytozoon* (Le), առանձնահատկությունները Կովկասի որոշ անտառային վայրերում, մասնավորապես՝ Հայաստանի Հանրապետությունում (ՀՀ), Լեռնային Ղարաբաղի Հանրապետությունում (ԼՂՀ)՝ ներառյալ հարակից տարածքները (հարավային Կովկաս), ինչպես նաև հյուսիսարևմտյան Կովկասում (Ռուսաստանի Դաշնություն՝ ՌԴ):

Նպատակին հասնելու համար դրվել են հետևյալ խնդիրներն ու առաջադրանքները.

- բացահայտել թռչունների մալարիայի հարուցիչների բազմազանությունը և տարածվածությունը վերոհիշյալ տարածքներում
- բացահայտել մակաբույծների բաշխվածությունը թռչունների տարբեր կարգաբանական խմբերում և ուսումնասիրել մակաբույծ-տեր փոխհարաբերությունները
- զարգացնել և կատարելագործել կիրառվող ժամանակակից մոլեկուլային մեթոդները՝ մակաբույծների ախտորոշման և ուսումնասիրման համար
- բացահայտել մակաբույծների հավաքակազմը պայմանավորող գործոնները, մակաբույծների՝ նոր տերերին փոխանցման և նոր տարածքների գաղութացման հնարավորություններն ու հիմքերը
- պարզել մակաբույծների ֆիլոաշխարհագրական կենտրոնացման հնարավորությունները Կովկասի տարբեր ծայրամասերում, ինչպես նաև համեմատել հարավային և հյուսիսարևմտյան Կովկասում մակաբույծների կենսաբանական ցուցանիշները
- համեմատել ուսումնասիրման մանրադիտակային և մոլեկուլային մեթոդները և գնահատել դրանց հնարավորությունները, առավելություններն ու թերությունները

Հետազոտության գիտական նորույթը

1. Բացահայտվել և նկարագրվել են թռչնի մալարիա հարուցող մակաբույծների բոլոր երեք ցեղերը (*Plasmodium*, *Haemoproteus*, *Leucocytozoon*) վերոհիշյալ տարածքներում: Ցույց է տրվել.

- մակաբույծների բազմազանությունն ու տարածվածությունը տարածաշրջանում,
- թռչունների տարբեր կարգաբանական խմբերում վարակվածության առանձնահատկությունները,
- մակաբույծ-տեր փոխհարաբերության առանձնահատկությունները:

2. Հետազոտության արդյունքում հայտնաբերվել են մակաբույծների էվոլյուցիոն նոր գծեր, որոնք այլ տարածաշրջաններում գրանցված չեն եղել և որոնց մեծ մասը հավանաբար մենահատուկ է մեր տարածաշրջանին:

3. Աշխատանքի ընթացքում փորձարկվել են նոր պրայմերներ. դրանք ցույց են տվել իրենց բարձր արդյունավետությունը նույնիսկ միակի ՊՇՌ կիրառման դեպքում:

4. Բացահայտվել են Կովկասում թռչունների արյան սպորավորների հավաքակազմի բազմազանության առաջացման հիմքերը: Առաջարկվել է նոր մոդել՝ մակաբույծների նոր տերերին փոխանցման և տարածքների նվաճման հնարավորությունների ուսումնասիրության համար:

5. Ուսումնասիրվել են մակաբույծների ֆիլոաշխարհագրական կենտրոնացման հնարավորությունները հյուսիսարևմտյան և հարավային Կովկասում:

Պաշտպանությանը ներկայացվող հիմնական դրույթները:

- Կովկասի թռչունների մալարիայի հարուցիչների բազմազանությունը և տարածվածությունը:
- Մակաբույծների սպեցիֆիկությունը թռչունների տարբեր տեսակների նկատմամբ:
- Մակաբույծների՝ նոր տերերին փոխանցման և նոր տարածքների գաղութացման ուղիներն ու հնարավորությունները:
- Մակաբույծների ֆիլոաշխարհագրական կենտրոնացումը հարավային և հյուսիսարևմտյան Կովկասում:
- Ուսումնասիրության մանրադիտակային և մոլեկուլային մեթոդների համեմատությունը:
- Մակաբույծների հայտնաբերման համար նոր պրայմերների փորձարկումը:

Աշխատանքի գիտական և գործնական նշանակությունը: Սույն աշխատանքում առաջին անգամ ուսումնասիրվել և նկարագրվել են Կովկասի տարածաշրջանի թռչունների մալարիա հարուցող արյան սպորավոր մակաբույծների բոլոր 3 ցեղերը: Բացահայտվել է մակաբույծների լայն տարածվածություն և մեծ բազմազանություն, ինչը մեծ նշանակություն ունի հետագա համաճարակաբանական և էկոլոգիական հետազոտությունների համար: Ստացված արդյունքները կիրառություն կարող են գտնել բնական օջախային հիվանդությունների ուսումնասիրման և կանխարգելման գործում:

Հետազոտության ընթացքում փորձարկված նոր պրայմերները ցույց են տվել բավականին բարձր զգայունություն մակաբույծների նշված 3 ցեղերը հայտնաբերելու դեպքում, որը շատ կարևոր է բոլոր հետազոտողների համար, քանի որ պրայմերներն

ունեն նաև ախտորոշիչ մեծ նշանակություն՝ ռեակցիան իրականացվում է ՊՇՌ-ի միայն մեկ փուլով, ինչը կարևոր է նաև հետազոտություններում մարդու բազմակի միջամտությունը բացառելու, ինչպես նաև ժամանակ և միջոցներ խնայելու առումներով:

Աշխատանքի արդյունքները թույլ են տալիս հասկանալ տարածաշրջանում առկա մակաբույծների ծագումը, մակաբույծ-տեր փոխհարաբերությունները, ինչպես նաև մակաբույծների՝ նոր տերերին փոխանցվելու մեխանիզմներն ու առանձնահատկությունները:

Եզրակացությունն այն մասին, որ մանրադիտակային մեթոդը կիրառելի է նախնական ախտորոշման համար և դաշտային պրակտիկայում, մասնավորապես կարևոր է զարգացող երկրների գիտնականների և անասնաբույժների համար, որտեղ չկան բավական միջոցներ մոլեկուլային հետազոտություններ իրականացնելու համար:

Հրապարակումներ: Ատենախոսության թեմայով տպագրվել է 5 գիտական աշխատանք:

Աշխատանքի նախնական փորձաքննությունը: Աշխատանքի արդյունքները ներկայացվել են մի շարք գիտաժողովների և գիտական սեմինարների ժամանակ.

“Biological diversity and conservation problems of the fauna of the Caucasus” միջազգային գիտաժողովի (20-26 սեպտեմբեր, 2011թ., Երևան) և CIBIO - Centro de Investigação em Biodiversidade e Recursos Genéticos, Vairão, Portugal գիտական սեմինարի (2 մարտի, 2012թ. Պորտուգալիա), ինչպես նաև ՀՀ ԳԱԱ ԿՀԷԳԿ Կենդանաբանության ինստիտուտի ընդհանուր հելմինթոլոգիայի և մակաբուծաբանության լաբորատորիայի և նույն կենտրոնի գիտխորհրդի նիստերի ժամանակ:

Ատենախոսության կառուցվածքը և ծավալը: Աշխատանքը կազմված է ներածությունից, երեք գլուխներից, եզրակացությունից, օգտագործված գրականության ցանկից և հավելվածից: Նյութը շարադրված է համակարգչային շարվածքի 108 էջերի վրա, պարունակում է 28 նկար և 14 աղյուսակ: Օգտագործված գրականության ցանկը ներառում է 166 հղում:

Գլուխ 1. Գրական ակնարկ

Ատենախոսության այս գլխում ներկայացված են թռչունների մալարիայի և ազգակից արյան սպորավոր մակաբույծների ուսումնասիրությունների պատմությունը, հարուցիչ կենսական ցիկլը, բազմազանությունն ու տարածվածությունը, ինչպես նաև ազդեցությունը վայրի բնության և կենսաբազմազանության վրա: Բերված են ընդհանուր տվյալներ ուսումնասիրության ավանդական և ժամանակակից մեթոդների և նրանց արդյունավետության վերաբերյալ: Ներկայացված են նաև գրական տվյալներ

մակաբույծ-տեր փոխհարաբերությունների վերաբերյալ, ինչպես նաև մակաբույծների՝ նոր տերերին փոխանցման և նոր տարածքների գաղութացման հնարավորությունների մասին:

Գլուխ 2. Նյութեր և մեթոդներ

Ուսումնասիրության համար թռչունների արյան նմուշները (698) հավաքվել են ՀՀ, ԼՂՀ և հարակից շրջաններից՝ հարավային ($n=511$) և հյուսիսարևմտյան Կովկասից՝ ՌԴ Կրասնոդարի երկրամաս ($n=187$), 2010-2011 թվականների թռչունների ձվադրման շրջանում: Ուսումնասիրության նպատակով բռնվել են 69 տեսակի և 26 ընտանիքի պատկանող թռչուններ: Թռչունները բռնվել են կենդանի, որի համար օգտագործվել են ցանցեր, նրանցից վերցվել է արյան նմուշ էթանոլի լուծույթում և պատրաստվել է քսուք մոլեկուլային և մանրադիտակային ուսումնասիրությունների համար: Թռչունները օդակավորվել են և բաց են թողնվել:

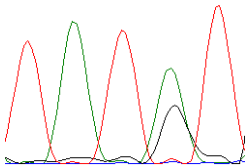
Հետազոտության մանրադիտակային մեթոդով ստուգվել է միայն Հեմոպրոտեոսի և Պլազմոդիումի առկայությունը արյան 96 քսուքներում: Մնացած բոլոր արդյունքները հիմնված են մոլեկուլային մեթոդների վրա:

Լաբորատորիայում արյան նմուշներից անջատվել է թռչնի, իսկ վարակի առկայության դեպքում՝ նաև մակաբույծի ԴՆԹ-ն: ԴՆԹ-ի անջատման համար օգտագործվել է Qiagen DNeasy extraction kit՝ նյութերի հավաքածու (Qiagen Corporation)՝ հետևելով արտադրողի ցուցումներին: Կիրառվել է ՊՇՌ մեթոդը՝ մակաբույծների միտոքոնդրիումային ցիտոքրոմ b գենի 505 bp երկարությամբ հատվածը նույնականացնելու համար: ՊՇՌ-ի իրականացման համար օգտագործվել են Ս.Վ. Դրովեցկիի կողմից նախագծված 3 զույգ պրայմերները՝ 1 առաջնային՝ UNIV-F և 3 հետին՝ UNIV-R, UNIV-R2, UNIV-R3 (Ս.Վ. Դրովեցկի, անձնական հաղորդակցություն): Որպես լրացուցիչ միջոց օգտագործվել են լայն կիրառություն ունեցող 1 զույգ պրայմերներ՝ HAEMN-F և HAEMN-R2 (Bensch et al., 2000): ՊՇՌ-ն իրականացվել է հետևյալ պայմաններով. 94°C՝ 3 րոպե, ապա ցիկլիկ շրջան՝ 30 վրկ – 94°C, 30 վրկ – 51°C, և 45 վրկ 72°C 41 ցիկլերով, որից հետո 72°C՝ 10 րոպե: 12,5 μ լ ռեակցիայի լուծույթը պարունակել է 2 μ լ անջատված ԴՆԹ-ից, 0,24 μ M յուրաքանչյուր պրայմերից, 1x GoTaq® Flexi Buffers, 0,287 mM՝ dNTP, 2 mM՝ MgCl₂, 5,978 μ լ՝ H₂O և 1,2 ս՝ Taq ԴՆԹ-պոլիմերազ (Promega Corporation): Դրական նմուշները երևակելու համար կատարվել է էլեկտրոֆորեզ 2 տոկոսանոց ազարոզային գելի վրա, արդյունքները դիտվել են ՈւՄ ճառագայթների տակ: Դրական արդյունք ցույց տված նմուշները մաքրվել են՝ օգտագործելով ExoSAP-IT PCR Clean-up Kit՝ նյութերի հավաքածու, (USB Corporation) և

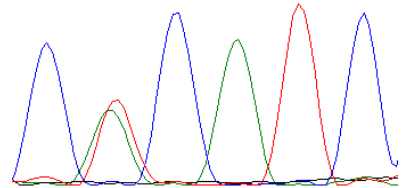
ուղարկվել են Macrogen կազմակերպություն (Macrogen corporation-Netherlands)՝ նուկլեոտիդային հաջորդականությունների որոշման համար: Հաջորդականությունները մշակվել են BioEdit ծրագրով (Hall, 1999), իսկ հապլոտիպերը որոշվել են DNAsp 5 ծրագրով (Librado, Rozas, 2009): Հապլոտիպերի պատկանելիությունը այս կամ այն մակաբույծի տեսակին պարզելու համար դրանք համեմատվել են գեների միջազգային բանկում և MalAvi բազայում (Bensch et al., 2009) առկա հաջորդականությունների հետ: Մակաբույծների ազգակցական կապերի որոշման համար կառուցվել է ֆիլոգենետիկական ծառ՝ օգտագործելով Neighbor-Joining մեթոդը (Saitou, Nei, 1987) և կիրառելով MEGA5 ծրագիրը (Tamura et al., 2011):

Հայտնաբերվել են կրկնակի և բազմակի վարակներ, որոնց առկայությունը պարզվել է հետևյալ կերպ.

1. Հաճախ միևնույն առանձնյակի մոտ տարբեր պրայմերներ հայտնաբերել են մակաբույծների տարբեր էվոլյուցիոն գծեր:
2. Սեկվենագրամաներում միևնույն տեղում տարբեր բարձրություն ունեցող կրկնակի պիկերի առկայությամբ (նկ. 1):
3. Սեկվենագրամաներում միևնույն տեղում միևնույն բարձրություն ունեցող, սակայն միմյանցից որոշակիորեն շեղված պիկերի առկայությամբ (նկ. 2):



Նկար 1. Մակաբույծի սեկվենագրամայում կրկնակի վարակի առկայությունը



Նկար 2. Մակաբույծի սեկվենագրամայում կրկնակի վարակի առկայությունը

Որպեսզի պարզենք, թե արդյոք կրկնակի պիկերի առկայությունը սեկվենագրամաներում մատնանշում է կրկնակի վարակի առկայությունը նմուշում, թե դրանք պարզապես սխալի արդյունք են, հաջորդականությունները համեմատել ենք MalAvi բազայում, գեների միջազգային բանկում և մեր ուսումնասիրությունների արդյունքում հայտնաբերված միակի վարակների հապլոտիպերի հետ: Արդյունքում պարզվել է նմուշներում կրկնակի վարակների առկայությունը: Բազմակի վարակների առկայության մասին է խոսում նաև միևնույն հապլոտիպի հանդիպելը մի քանի առանձնյակների մոտ՝ դեպքերի մեծ մասում:

Գլուխ 3. Արդյունքներ և քննարկում

3.1. Ուսումնասիրության մանրադիտակային և մոլեկուլային մեթոդների համեմատությունը

Արյան 96 քսուքներում ուսումնասիրվել է Հեմոպրոտեուսի և Պլազմոդիումի առկայությունը: Հետազոտություններում օգտագործված մանրադիտակային մեթոդի զգայունությունը համեմատվել է ՊՇՌ մեթոդի հետ (աղ. 1): Արդյունքները վկայում են ՊՇՌ մեթոդի առավելության մասին մակարոյծների հայտնաբերման գործում, սակայն տարբերությունները հավաստի չեն ($P>0.3$): Վերջինս կիրառելի է դաշտային պրակտիկայի և նախնական ախտորոշման համար, սակայն էկոլոգիական, էվոլյուցիոն և ֆիլոգենետիկական ավելի խորը ուսումնասիրությունների համար մոլեկուլային գենետիկական մեթոդները մնում են անփոխարինելի:

Աղյուսակ 1.

Ուսումնասիրության մանրադիտակային և մոլեկուլային մեթոդներով ստացված արդյունքները թոչունների վարակվածության վերաբերյալ

| | Ընդ. վար. | | Hp | | Pl | | HpPl | |
|------|-----------|----------|----------|----------|--------|-----|------|--|
| | N | n % | n % | n % | n % | n % | | |
| Ման. | 96 | 40 41.67 | 33 34.38 | 11 11.46 | 4 4.17 | | | |
| ՊՇՌ | 96 | 48 50.00 | 39 40.63 | 17 17.71 | 8 8.33 | | | |

N-ուսումնասիրված նմուշների թիվ, *n*-համապատասխան սյունակում նմուշների թիվ, %-*n*-ի կազմած տոկոսը ըստ ուսումնասիրված *N*-ի

Ման. – մանրադիտակային մեթոդ, *ՊՇՌ* – ՊՇՌ մեթոդ, *Ընդ. վար* – ընդհանուր վարակվածներ:

HpPl – միաժամանակ Հեմոպրոտեուսով և Պլազմոդիումով վարակվածներ

3.2. Թոչնի արյան սպորավորների բազմազանությունը և տարածվածությունը

Թոչունների արյան սպորավորներով վարակվածության ընդհանուր մակարդակը կազմել է 52%, ընդ որում 31% կազմել են Հեմոպրոտեուսով վարակվածները, 11%՝ Պլազմոդիումով, 20%՝ Լեյկոցիտոգոնով վարակվածները: Կրկնակի վարակված են եղել ուսումնասիրվածների 22%-ը, իսկ երկուսից ավել վարակներ են կրել ուսումնասիրված թոչունների 4%-ը: 610 նուկլեոտիդային հաջորդականությունների ուսումնասիրության արդյունքում հայտնաբերվել են 162 առանձին հապլոտիպեր, որոնցից 78-ը պատկանում

են *Haemoproteus*, 59՝ *Leucocytozoon* և 25՝ *Plasmodium* ցեղերին: Հապլոտիպերի շուրջ կեսը (n=81) նախկինում հայտնաբերված չեն եղել: Նրանցից 32-ը պատկանում են Հեմոպրոտեոսին՝ կազմելով Հեմոպրոտեոսի գծերի 43.6%-ը, 39-ը՝ Լեյկոցիտոզոոնին՝ 66.1% և 8-ը՝ Պլազմոդիումին՝ 32%:

Հայտնաբերվել է, որ մակաբույծներով վարակվածության մակարդակը կախված չէ թռչունների սեռից և տարիքից ($P>0.05$): Ընդհանուր առմամբ մակաբույծների տարբեր ցեղերով վարակվածության վրա հավաստիորեն ազդում են հետևյալ գործոնները.

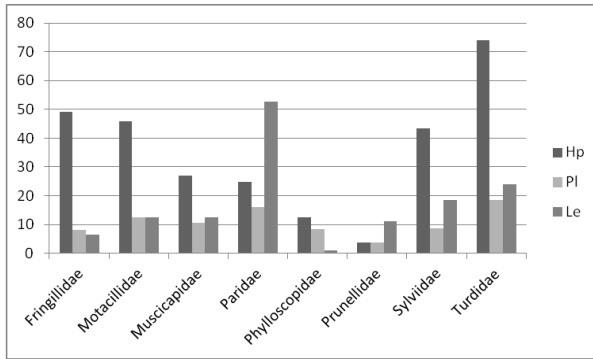
- Չվելու վարքագիծն ազդում է Հեմոպրոտեոսով և Լեյկոցիտոզոոնով վարակվածության վրա:
- Տարածաշրջանային մակարդակով թռչունների ձվադրման վայրը ազդում է Հեմոպրոտեոսով և Պլազմոդիումով վարակվածության վրա:
- Թռչնի տեսակից կախված է ընդհանուր վարակվածության մակարդակը, ինչպես նաև մակաբույծների բոլոր երեք ցեղերով վարակվածությունը:
- Թռչնի ընտանիքից կախված է ընդհանուր վարակվածությունը և Հեմոպրոտեոսով ու Պլազմոդիումով վարակվածության մակարդակները:

Առանձին անդրադառնանք գործոններից մի քանիսին: Հայտնաբերված է, որ Հեմոպրոտեոսով համեմատաբար ավելի շատ վարակված են չվող թռչունները, քան նստակյացները՝ $P<0.0001$, իսկ Լեյկոցիտոզոոնը ավելի շատ բնորոշ է նստակյաց թռչուններին՝ $P=0.000003$: Պարզվել է նաև, որ Հեմոպրոտեոսով վարակվածության էքստենսիվությունը համեմատաբար ավելի բարձր է հյուսիսարևմտյան Կովկասում, քան հարավայինում՝ $P=0.001$: Նույն պատկերն է ստացվում Պլազմոդիումի պարագայում՝ $P=0.0034$:

3.3. Մակաբույծների բազմազանությունը և տարածվածությունը թռչունների տարբեր կարգաբանական խմբերում

Հաշվի առնելով այն հանգամանքը, որ վարակվածության մակարդակը կախված է թռչունների ընտանիքից, մենք հաշվարկել ենք տարբեր ընտանիքներում տարբեր ցեղերի մակաբույծներով վարակվածության մակարդակները: Ըստ ստացված արդյունքների՝ որոշ ընտանիքներում առկա է 100% վարակվածություն, ինչը սակայն կարող է պայմանավորված լինել ուսումնասիրված նմուշների սակավությամբ և պատահականությամբ: Վերջիններից առավել ուշադրության են արժանի Corvidae ընտանիքի թռչունները, որոնց 6 առանձնյակներից բոլորի մոտ հայտնաբերվել են արյան սպորավոր մակաբույծներ, այդ թվում՝ 3 կրկնակի և 1 բազմակի վարակներ: Մեր կողմից առանձնացվել և առավել մանրամասնորեն ուսումնասիրվել են 20-ից ավել նմուշներ

ունեցող ընտանիքները (նկ. 3): Նրանց թվում վարակվածության ամենաբարձր մակարդակ գրանցվել է Turdidae ընտանիքին պատկանող թռչունների մոտ՝ 89%, իսկ ամենացածրը Prunellidae ընտանիքի ներկայացուցիչների մոտ՝ 19%:

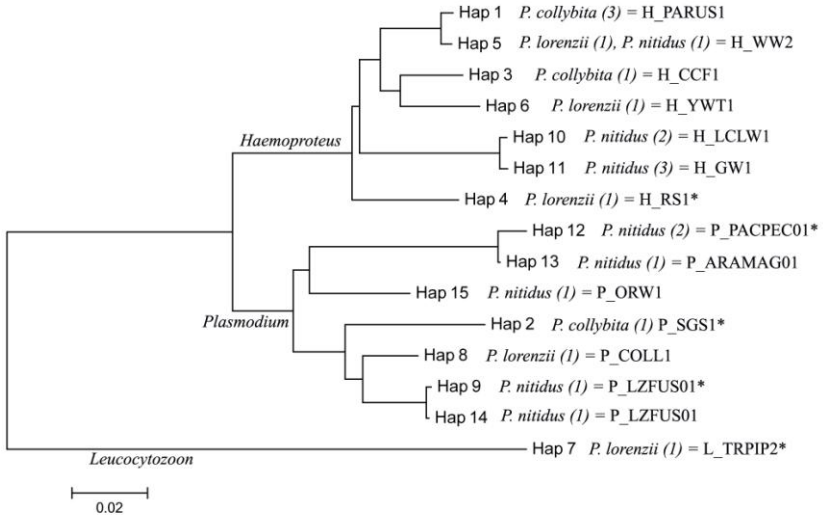


Նկար 3. 20-ից ավել առանձնյակներով ընտանիքների մոտ մակարոյծների վարակվածության մակարդակները:

Օրդինատների առանցքն իրենից ներկայացնում է վարակի էքստենսիվությունը՝ արտահայտած տոկոսներով:

Հեմոպրոտեոսով վարակվածությունը առավել բարձր է Turdidae ընտանիքի ներկայացուցիչների մոտ՝ 74%, իսկ ամենացածրը՝ Prunellidae ընտանիքի թռչունների մոտ՝ 4%: Վերջիններս իրենց դիրքերը պահպանում են նաև Պլազմոդիումով վարակվածության պարագայում՝ կազմելով համապատասխանաբար 19% և 4%: Պատկերը փոխվում է Լեյկոցիտոզոնի դեպքում՝ ամենաբարձր վարակվածությունը՝ 53%, Paridae ընտանիքի և ամենացածրը՝ 1%, Phylloscopidae ընտանիքի ներկայացուցիչների մոտ է (Aghayan, 2012): Prunellidae ընտանիքում ընդհանրապես բացակայում են կրկնակի և բազմակի վարակները: Գրկնակի և բազմակի վարակների առկայությամբ առաջին տեղում է Paridae ընտանիքը՝ 46% և 11% վարակվածությամբ համապատասխանաբար: Գրեթե բոլոր ընտանիքների մոտ առավել բարձր է Հեմոպրոտեոսով վարակի էքստենսիվությունը, բացառություն են կազմում Paridae և Prunellidae ընտանիքները, իսկ ընդհանուր վարակվածության ցածր մակարդակով աչքի են ընկնում Phylloscopidae և Prunellidae ընտանիքների ներկայացուցիչները (նկ. 3): Քանի որ գրականությունում առկա են տվյալներ Phylloscopidae ընտանիքի թռչունների արյան սպորավորներով վարակվածության վերաբերյալ (Jenkins, Owens, 2011), որտեղ հեղինակներն ուսումնասիրել են նմուշներ ամբողջ աշխարհից, մենք որոշեցինք

անդրադառնալ այդ ընտանիքի 3 տեսակներին (*Phylloscopus collybita*, *Ph. lorenzii*, *Ph. nitidus*) ավելի մանրամասնորեն և համեմատել ստացված արդյունքները գրական այն տվյալների հետ, որոնք վերաբերում են Կովկասի տարածաշրջանին (Aghayan, 2012):



Նկար 4. Հայտնաբերված 15 հապլոտիպերի ֆիլոգենետիկական ծառը

**-հապլոտիպը չի համընկել տվյալների բազայի որևէ հապլոտիպի հետ, գրվածը ամենամոտ ազգակից էվոլյուցիոն գծի անունն է:*

Ուսումնասիրված թռչուններից վարակվածության ամենաբարձր մակարդակը գրանցվել է *Ph. nitidus*-ի մոտ՝ 39%, նրան հետևում է *Ph. collybita*-ն՝ մոտ 33% և *Ph. lorenzii*-ն՝ 9%: Վարակված 20 առանձնյակների մոտ առկա են մակաբույծների 15 էվոլյուցիոն գծեր, որոնցից 5-ը նախկինում գրանցված չեն եղել: Առավել տարածված են Հեմոպրոտեոսի գծերը՝ 12 վարակված թռչուններով և 8 տարբեր գծերով: Նրան հետևում է Պլազմոդիումը՝ 8 թռչուն և 7 գծեր, ամենաքիչ տարածվածը Լեյկոցիտոզոնն է՝ 1 թռչուն և 1 էվոլյուցիոն գիծ (նկ. 4): Ստացված արդյունքները համեմատվել են նաև գրական տվյալների հետ (Jenkins, Owens, 2011), որտեղ *Ph. collybita*-ի մոտ ոչ մի մակաբույծ չի նշվել, այնինչ մեր հետազոտության արդյունքում հայտնաբերվել են վարակված 3 առանձնյակներ, որոնցից մեկը կրել է նույնիսկ մակաբույծների միաժամանակ 3 տարբեր գծեր: *Ph. lorenzii*-ի համար տպագրված աշխատանքում հայտնաբերվել են միայն Հեմոպրոտեոսի գծեր, իսկ մեզ մոտ՝ բոլոր 3 ցեղերին պատկանող էվոլյուցիոն գծեր:

Նմանատիպ պատկեր է նաև *Ph. nitidus*-ի մոտ՝ ցիտվող հողվածում նշված է միայն Հեմոպրոտեոս, իսկ մեր տվյալներով՝ Հեմոպրոտեոս և Պլազմոդիում:

3.4 Թռչունների մալարիայի համեմատական բնութագիրը հարավային և հյուսիսարևմտյան Կովկասում

Սույն աշխատանքում մենք հաշվարկել ենք տարբեր մակաբույծներով վարակի էքստենսիվությունը հարավային և հյուսիսարևմտյան Կովկասում (աղ. 2):

Աղյուսակ 2

Մակաբույծների երեք ցեղերով վարակվածության էքստենսիվությունը հարավային և հյուսիսարևմտյան Կովկասում

| | Վարակ. | | Hp | | Pl | | Le | |
|---|--------|-----------|-----------|----------|-----------|-----|----|--|
| | N | n % | n % | n % | n % | n % | | |
| Հ | 511 | 262 51.27 | 147 28.77 | 49 9.59 | 108 21.14 | | | |
| Ռ | 187 | 110 58.82 | 79 42.25 | 34 18.18 | 32 17.11 | | | |

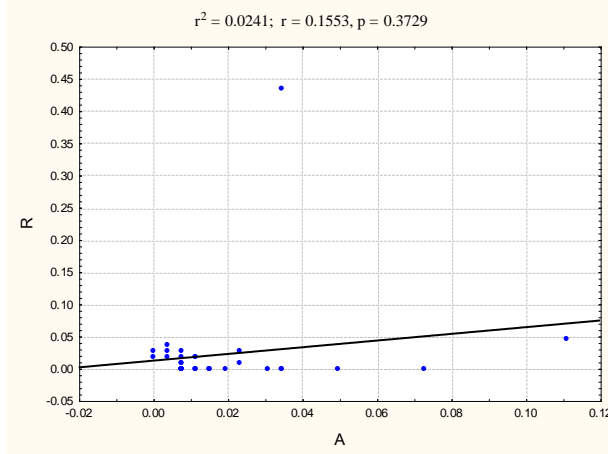
N-ուսումնասիրված նմուշների թիվը, *n*-համապատասխան սյունակում նմուշների թիվը, %-համապատասխան սյունակում նմուշների տոկոսային բաժինը ըստ ուսումնասիրվածների ընդհանուր թվի, Հ-հարավային Կովկաս, Ռ-հյուսիսարևմտյան Կովկաս, Վարակ.-ընդհանուր վարակվածներ:

Աղյուսակից երևում է, որ ընդհանուր վարակվածության մակարդակով այս երկու շրջանները միմյանցից այդքան էլ չեն տարբերվում: Մակայն մակաբույծների առանձին ցեղերի միջև նկատվում են զգալի տարբերություններ: Ինչպես նշել ենք նախորդ գլխում՝ Հեմոպրոտեոսով և Պլազմոդիումով վարակվածության մակարդակները հավաստիորեն բարձր են հյուսիսարևմտյան Կովկասում ($P < 0.05$): Լեյկոցիտոզոնի պարագայում հարավային Կովկասի թռչուններն ունեն վարակվածության ավելի բարձր մակարդակ ($P = 0.24$):

Հյուսիսարևմտյան և հարավային Կովկասում մակաբույծների ֆիլոաշխարհագրական կենտրոնացման հնարավորությունները պարզելու համար հաշվարկվել է 2 և ավել առանձնյակներ վարակող էվոլյուցիոն գծերի համեմատական վարակվածության էքստենսիվությունը տվյալ վայրերում.

**Վարակվածության համեմատական էքստենսիվություն = տվյալ գծով
վարակվածների թիվ տվյալ վայրում / տվյալ վայրում տվյալ ցեղի մակարդակներով
վարակվածների թիվ**

Վարակվածության համեմատական էքստենսիվության արժեքների հիման վրա կառուցվել է գծային ռեգրեսիայի կորը հյուսիսարևմտյան և հարավային Կովկասում և Հեմոպրոտեոսի (նկ. 5), Պլազմոդիումի (նկ. 6) և Լեյկոցիտոզոոնի (նկ. 7) համար:



Նկար 5. Հեմոպրոտեոսի համեմատական վարակվածության էքստենսիվության արժեքների համար կիրառված գծային ռեգրեսիայի կորը

A-հարավային Կովկասում, R-հյուսիսարևմտյան Կովկասում գծերի համեմատական վարակվածության էքստենսիվություն:

Ըստ գծային ռեգրեսիայի կիրառման արդյունքում ստացված տվյալների՝ Հեմոպրոտեոսի ցեղին պատկանող էվոլյուցիոն գծերին բնորոշ է գենետիկական կենտրոնացումը հարավային և հյուսիսարևմտյան Կովկասում (նկ. 5): Ըստ գծերի առկայության և հանդիպման հաճախականության՝ այս երկու տարածաշրջանների միջև ընդհանրությունը կազմում է ընդամենը 2.41% ($R^2=0,0241$, $P=0.3279$): Ստացված արդյունքները վկայում են այն մասին, որ հարավային և հյուսիսարևմտյան Կովկասում Հեմոպրոտեոսի գծերի հավաքակազմը բավականին տարբեր է՝ թե՛ գծերի առկայությամբ և թե՛ հանդիպման հաճախությամբ: Իսկ Պլազմոդիումի և Լեյկոցիտոզոոնի դեպքում պատկերն այլ է. վերոհիշյալ երկու տարածաշրջաններն իրար

3.5. Մակաբույծ – տեր փոխհարաբերություններ

Հաշվարկվել են թռչունների տեսակների և տերերի նկատմամբ սպեցիֆիկության ցուցանիշները մակաբույծների տարբեր ցեղերի մոտ (Beadell et al., 2009): Հաշվարկներում հաշվի են առնվել մակաբույծների այն էվոլյուցիոն գծերը, որոնք վարակել են երկու և ավելի առանձնյակներ:

Աղյուսակ 3

Թռչունների տեսակների և ընտանիքների սպեցիֆիկության ցուցանիշը մակաբույծների տարբեր ցեղերի նկատմամբ

| | Hp | Pl | Le |
|-------------|-------|-------|-------|
| Տեսակ/զիծ | 2.075 | 4.375 | 2 |
| Ընտանիք/զիծ | 1.675 | 3.125 | 1.643 |

Ներկայացված թվերն իրենցից ներկայացնում են Հեմոպրոտոսոլ (Hp), Պլազմոդիումով (Pl) և Լեյկոցիտոզոոնով (Le) վարակված թռչունների տեսակների և ընտանիքների քանակների միջին թվաբանականը:

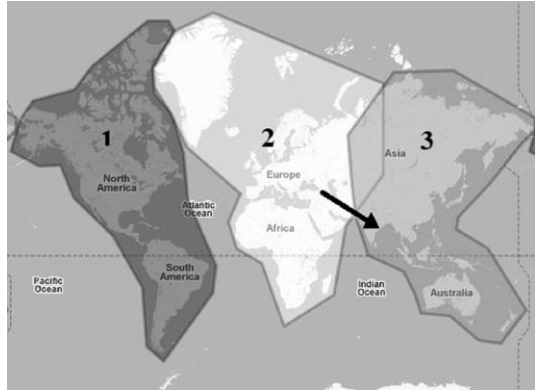
Պարզվել է, որ տերերի տեսակների և ընտանիքների նկատմամբ ամենից մեծ սպեցիֆիկություն դրսևորում է Լեյկոցիտոզոոնը: Նրան հաջորդում է Հեմոպրոտոսոլը և Պլազմոդիումը: Այն հապլոտիպերից, որոնք հանդիպում են երկու և ավելի առանձնյակների մոտ, 39 հապլոտիպեր վարակում են միայն մեկ ընտանիքի պատկանող թռչունների, ընդ որում նրանցից 30-ը՝ միայն մեկ տեսակի: Մակաբույծների սպեցիֆիկությունը տեսակների կամ ընտանիքների նկատմամբ առավել մանրամասն նկարագրելու համար նրանցից որոշները համեմատվել են MalAvi բազայում (Bensch et al., 2009) և գեների միջազգային բանկում առկա տերերի մասին ինֆորմացիայի հետ (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>):

Ուսումնասիրվել է նաև չվող թռչունների դերը մակաբույծների՝ նոր տերերին փոխանցման և նոր տարածքների գաղութացման ժամանակ: Քննարկվել և փորձարկվել են մակաբույծների փոխանցման հետևյալ հնարավոր տարբերակները.

1. Միայն ձմեռման ժամանակաշրջանում
2. Միայն ձվադրման ժամանակաշրջանում
3. Երկու ժամանակահատվածներում՝ խառը փոխանցումներ:

Վերոհիշյալ վարկածները ուսումնասիրելու համար ընտրվել է թռչունների այնպիսի համակարգ, որոնց չուի ուղղությունը ներառում է գլոբալ չուի տարբեր ուղիներն

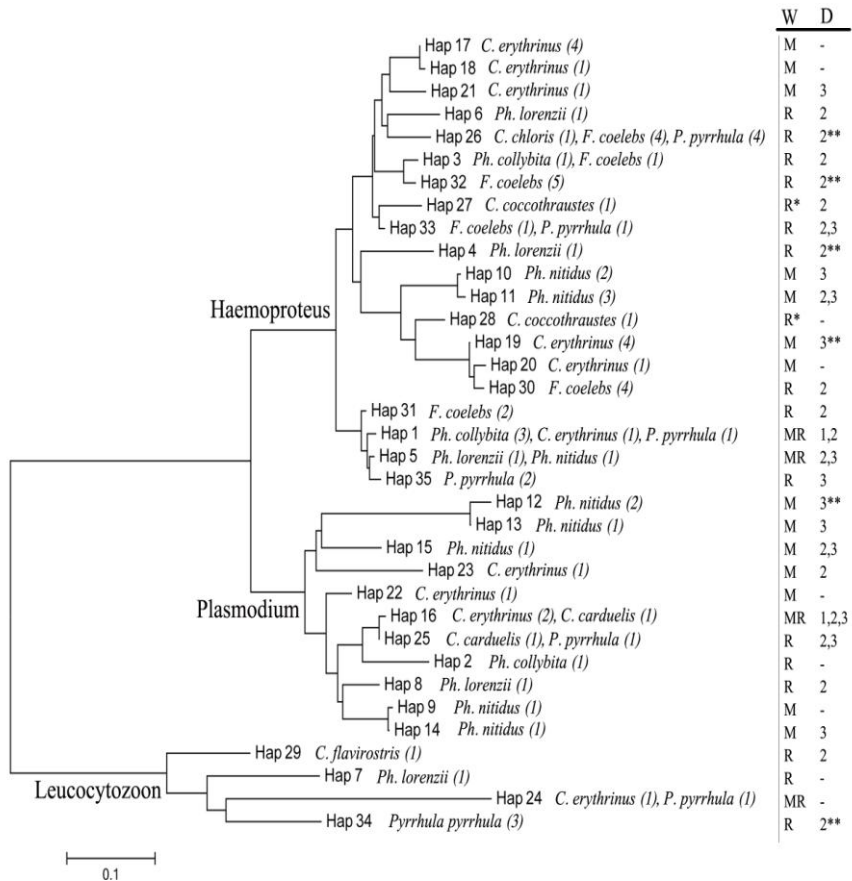
ընդգրկող արեալներ (նկ. 8): Հետազոտության համար օգտագործվել է *Phylloscopus collybita*, *Ph. lorenzii*, *Ph. nitidus*, *Carduelis carduelis*, *C. chloris*, *C. flavirostris*, *Carpodacus erythrinus*, *Pyrrhula pyrrhula*, *Fringilla coelebs*, *Coccothraustes coccothraustes*, *Ficedula parva* տեսակի թռչունների արյան 163 նմուշ:



Նկար 8. Գլոբալ չուի երեք ամենամեծ ուղիները ըստ BirdLife International-ի (BirdLifeInternational)

1. Ամերիկյան, 2. Աֆրիկա – Եվրասիական և 3. Արևմտյան Ասիա – Ավստրալական չուի ուղիներ: Մլաքով նշված է մեր ուսումնասիրած չվող թռչունների չուի ուղին՝ սկսած ձվադրման վայրից:

Հետազոտության արդյունքում բացահայտվել են 59 վարակված առանձնյակներ: Նրանցից 13-ի մոտ հայտնաբերվել են 2 տարբեր էվոլյուցիոն գծեր, իսկ 1-ի մոտ՝ նույնիսկ 3: Ընդհանուր առմամբ հայտնաբերվել է 35 առանձին հապլոտիպեր, որոնցից 20-ը Հեմոպրոտեուսի, 11-ը Պլազմոդիումի և 4-ը Լեյկոցիտոգոնի ցեղին պատկանող գծեր են (նկ. 9): Ինչպես երևում է նկար 9-ից՝ Հեմոպրոտեուսը և Լեյկոցիտոգոնը ավելի ընդհանրական են նստակյաց թռչունների համար, իսկ Պլազմոդիումն ավելի բնորոշ է չվողներին: Համեմատելով մեր և MalAvi բազայում գրանցված տվյալները՝ ստացվում է, որ դեպքերի համեմատաբար գերակշռող մասում հապլոտիպերը չեն փոխում իրենց տարածման արեալները՝ դուրս չգալով նկար 1-ում պատկերված գլոբալ չուի ուղիներից:



Նկար 9. Հայտնաբերված հապլոտիպերի ֆիլոգենետիկական ծառը (Neighbor joining tree)

W-ներկայացված է ուսումնասիրված թռչունների չվելու հատկությունը՝ *M*-չվող և *R*-նստակյաց: *D*-հապլոտիպի գեների բանկում գրանցված տերերի հանդիպման վայրերը՝ թվերը համապատասխանում են նկար 1-ում գլոբալ չուի ուղիների համարներին:

*-այս տեսակները կարճ տարածություն չվողներ են:

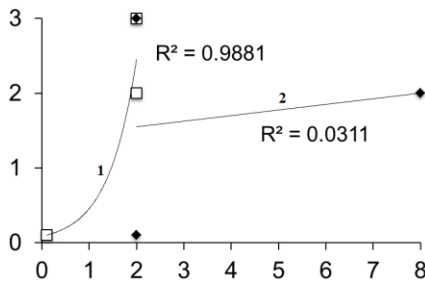
**-հապլոտիպը գրանցված չի եղել *MalAvi* բազայում: Գրվածք վերաբերում է ամենամոտ ազգակից էվոլյուցիոն գծին:

Քննարկումից բացառելով այն հապլոտիպերը, որոնք հայտնաբերվել են միայն մեկ առանձնյակի մոտ, ստացվում է հետևյալ պատկերը. Լեյկոցիտոզոոնի դեպքում մեկ

հապլոտիպ հանդիպում է միայն նստակյաց թռչունների մոտ և մեկ հապլոտիպ՝ և նստակյացի և չվողի, Հեմոպրոտեուսի մոտ՝ 6 հապլոտիպ միայն նստակյացի, 4-ը միայն չվողների մոտ և 2 հապլոտիպ՝ և նստակյացի և չվողի մոտ, իսկ Պլազմոդիումի դեպքում՝ 1-ական կամ նստակյացի կամ չվողի և մեկ հապլոտիպ՝ և նստակյաց և չվող թռչունների մոտ:

Լեյկոցիտոզոնի և Հեմոպրոտեուսի դեպքում ավելի ընդհանրական է մակարոյծների փոխանցումը ձվադրման ժամանակահատվածում և բացակայում կամ գրեթե բացակայում են ձմեռման և խառը տարբերակները: Իսկ Պլազմոդիումի պարագայում պատկերն այլ է. հանդիպման հաճախությամբ առաջին տեղում է խառը փոխանցումների տարբերակը:

Փոխանցման տարբերակները միմյանց հետ համեմատելու համար կառուցվել է ձվադրման (կոր 2) և ձմեռման (կոր 1) փոխանցումների կորերը ըստ խառը փոխանցումների՝ (նկ. 10) օգտագործելով գծային ռեգրեսիայի մեթոդը:



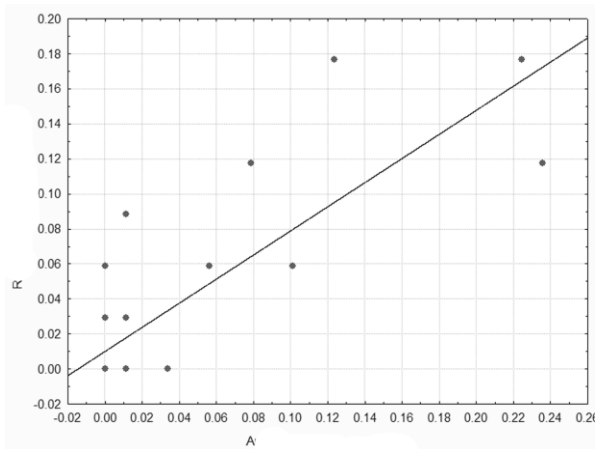
Նկար 10. Գծային ռեգրեսիայի մեթոդով կառուցված կորերը մակարոյծների փոխանցումների համար

1. Փոխանցումներ ձմեռման ժամանակահատվածում, 2. Փոխանցումներ ձվադրման ժամանակահատվածում: Որպես անկախ փոփոխական հանդիսանում է «խառը» փոխանցվող հապլոտիպերի թիվը (օրդինատների առանցք):

Կորերը ցույց են տալիս, որ եթե մակարոյծներն ի վիճակի են փոխանցվել ձմեռման ժամանակահատվածում, ապա նրանք հեշտությամբ կարող են վերածվել ինվազիվ ձևերի՝ փոխանցվել ձվադրման վայրին բնորոշ նստակյաց թռչուններին ($R^2=0.9881$, $P=0.07$): Հակառակ պատկերն է ստացվում ձվադրման շրջանում փոխանցումների պարագայում՝ փոխանցումները կարող են տեղի ունենալ միայն նստակյաց թռչնատեսակների միջև և չեն կարող փոխանցվել չվող թռչուններին ($R^2=0.0311$):

Քանի որ գրականությունում առկա են տվյալներ Paridae ընտանիքի նստակյաց թռչունների Լեյկոցիտոզոոնի ֆիլոաշխարհագրական կենտրոնացման բացակայության մասին Եվրոպայի տարբեր շրջաններում, մեր կողմից առանձնակիորեն ուսումնասիրվեց վերոհիշյալ խնդիրը հյուսիսարևմտյան և հարավային Կովկասի համար: Ուսումնասիրված 131 թռչուններից (*Parus caeruleus*-47, *P. major*-84) 99-ը վարակված էին արյան սպորավորներով, ընդ որում 22-ը՝ Պլազմոդիումով, 32-ը՝ Հեմոպրոտեոսով և 72-ը՝ Լեյկոցիտոզոոնով: Հայտնաբերվել են մակաբույծների 35 էվոլյուցիոն գծեր, որոնցից 6-ը՝ Պլազմոդիումի, 4-ը՝ Հեմոպրոտեոսի և 25-ը՝ Լեյկոցիտոզոոնի:

«Տերերի քանակ - տարածվածություն» կապը հարավային և հյուսիսարևմտյան Կովկասի մակաբույծների մոտ պարզելու համար կառուցվել է Paridae ընտանիքի Լեյկոցիտոզոոնի համեմատական վարակվածության էքստենսիվության արժեքների գծային կորելյացիան (նկ. 11):



Նկար 11. Հարավային (A) և հյուսիսարևմտյան (R) Կովկասում *P.major* և *P. caeruleus*-ի Լեյկոցիտոզոոնի գծերով վարակվածության էքստենսիվության արժեքների գծային ռեգրեսիայի կորը

Ստացված արդյունքները վկայում են այն մասին, որ ուսումնասիրված տեսակների Լեյկոցիտոզոոնի մոտ բացակայում է ֆիլոաշխարհագրական կենտրոնացումը Կովկասում և առկա է «Տերերի քանակ - տարածվածություն» կապը (Aghayan, 2012)՝

տվյալ տարածաշրջանում լայն տարածված գծերը դոմինանտում են նաև մյուս տարածաշրջանում:

Եզրակացություններ

1. Առաջին անգամ կատարվել է Կովկասի տարածաշրջանի թռչունների արյան սպորավորների համալիր հետազոտություն: Հայտնաբերվել են թռչունների մալարիա հարուցող մակաբույծների բոլոր երեք ցեղերը (*Haemoproteus*, *Plasmodium*, *Leucocytozoon*): Հայտնաբերված գծերից շատերը նախնական գրանցված չեն եղել ($n=81$): Վերջիններիս մեծ մասը հավանաբար հանդիսանում է տարածաշրջանին մենահատուկ գծեր:
2. Մակաբույծների որոշ էվոլյուցիոն գծերի մոտ առկա է հստակորեն արտահայտված սպեցիֆիկություն թռչնի որևէ տեսակի կամ ընտանիքի նկատմամբ: Հեմոպրոտեոսի և Լեյկոցիտոզոոնի էվոլյուցիոն գծերն ավելի սպեցիֆիկ են իրենց տերերի նկատմամբ, քան Պլազմոդիումի գծերը:
3. Պարզվել է, որ Հեմոպրոտեոսի և Լեյկոցիտոզոոնի էվոլյուցիոն գծերին ավելի բնորոշ են փոխանցումները նոր տերերին ձվադրման ժամանակահատվածում, իսկ Պլազմոդիումի գծերը փոխանցվում են ամբողջ տարվա ընթացքում: Ձմեռման ժամանակահատվածում փոխանցվող էվոլյուցիոն գծերը հեշտությամբ կարող են փոխանցվել նաև ձվադրման ժամանակահատվածում՝ վերածվելով ինվազիվ հիվանդությունների:
4. Գծերի համեմատական վարակվածության արժեքների վրա կիրառված գծային ռեգրեսիայի մեթոդը ցույց է տվել, որ Լեյկոցիտոզոոնի և Պլազմոդիումի էվոլյուցիոն գծերի հավաքակազմով հարավային և հյուսիսարևմտյան Կովկասը նման են՝ ինչպես գծերի առկայության, այնպես էլ նրանց տարածվածության առումով: Գործում է «տերերի քանակ – տարածվածություն» կապը՝ մի վայրում լայն տարածված գծերը դոմինանտում են նաև մյուսում: Հեմոպրոտեոսի դեպքում նկատվում է ֆիլոշախարհագրական կենտրոնացում:
5. Ցույց է տրված մոլեկուլային մեթոդի առավելությունը մանրադիտակայինի նկատմամբ: Վերջինս կիրառելի է դաշտային պրակտիկայի և նախնական ախտորոշման համար, սակայն էկոլոգիական, էվոլյուցիոն և ֆիլոգենետիկական ավելի խորը ուսումնասիրությունների համար մոլեկուլային գենետիկական մեթոդները մնում են անփոխարինելի:
6. Փորձարկվել են նոր պրայմերներ, որոնք ցուցաբերել են բարձր արդյունավետություն մակաբույծների երեք ցեղերի նույնականացման համար միակի ՊՇՌ դեպքում:

Ատենախոսության թեմայով տպագրված աշխատանքների ցանկ

1. Aghayan S. Avian Malaria and Caucasus // Vestnik IAELPS. 2011, **16** (2): 24-26.
2. Aghayan S. A., Drovetski S. V. Diversity and prevalence of Haemosporidian parasites in forest birds of Armenia and Northwest Greater Caucasus // International Scientific Conference «Biological diversity and conservation problems of the fauna of the Caucasus», 26-29 September, 2011. Yerevan, Armenia, 2011, 18-19.
3. Aghayan S. A. Migratory birds as a tool to colonize new territories for avian haemosporidians // Electronic Journal of Natural Sciences, 2012, **18** (1): 28-35
4. Aghayan S. A. Prevalence and diversity of avian haemosporidian parasite in Phylloscopidae: comparative analyzes of our and published data // Electronic Journal of Natural Sciences , 2012, **18** (1): 36-43
5. Աղայան Ս. Ա., Բոյախյան Գ. Հ. Թռչունների արյան սպորավոր մակարոյժների բազմազանությունը և տարածվածությունը Կովկասում // ՀՀ ԳԱԱ զեկույցներ, 2012, **112** (2): 211-218.

Разнообразие, распространение и паразито-хозяйинные отношения споровых кровепаразитов птиц некоторых лесных территорий Кавказа

Резюме

Гемоспоридные паразиты птиц известны своим разрушительным воздействием на популяции и, в частности, на эндемичную авифауну. Несмотря на то, что Кавказ является одним из признанных центров биоразнообразия и эндемизма, литературные данные о гемоспоридных паразитах птиц очень скудны. Нами были изучены разнообразие, распространение, паразито-хозяйинные отношения, возможности передачи новым хозяевам и колонизации новых территорий паразитов, принадлежащих родам *Haemoproteus*, *Plasmodium*, и *Leucocytozoon*. В исследованиях использовались методы ПЦР. В качестве маркера было использовано 505 нуклеотидных последовательностей гена митохондриального цитохрома-*B* паразитов. Испытаны 3 пары новых праймеров, разработанных С. В. Дровецким, а также широко используемые праймеры С. Бенча. Испытанные нами новые праймеры показали высокую эффективность даже при однократном применении ПЦР, что позволяет сэкономить время и средства, а также значительно снижает вероятность лабораторных ошибок.

Всего было исследовано 698 проб крови птиц, собранных во время гнездования в 2010-2011 гг. в РА (Республика Армения), НКР (Нагорно-Карабахская Республика) и прилегающих территориях (n=511), а также на северозападном Кавказе – Краснодарский край РФ (Российская Федерация) (n=187).

С помощью микроскопа были исследованы 96 мазков крови. Сравнительный анализ микроскопии и молекулярных методов показал некоторое преимущество ($P>0.3$) ПЦР в идентификации *Haemoproteus*, *Plasmodium* и *Leucocytozoon*. Микроскопия может быть применена во время полевой практики и предварительной диагностики, а в эволюционных и филогенетических исследованиях молекулярные методы незаменимы.

Впервые на Кавказе были исследованы возбудители кровепаразитозов птиц. Выявлены все три рода возбудителей малярии, многие из которых являются новыми линиями и возможно эндемиками Кавказа. Общая зараженность птиц составила 53% (n=372), из них 31% (n=216) были заражены *Haemoproteus*-ом, 11% (n=77) *Plasmodium*-ом и 20% (n=140) *Leucocytozoon*-ом. Двойные инфекции были обнаружены у 22% (n=153) особей, а 4% (n=28) птиц были заражены более чем двумя линиями паразитов.

Изучено 610 нуклеотидных последовательностей, которые сгруппировались в 162 уникальных гаплотипа, 78 из которых принадлежали роду *Haemoproteus*, 25 – *Plasmodium* и 59 – *Leucocytozoon*. Выявлены новые для науки 81 гаплотип. Среди них 34 принадлежат роду *Haemoproteus*, 8 – *Plasmodium* и 39 – *Leucocytozoon*.

Метод корреляционных матриц выявил отсутствие связи между возрастом, полом и зараженностью птиц. Факторами, влияющими на зараженность, являются вид и семейство птиц, миграционное поведение и местность их ловли. Зараженность мигрантов паразитами рода *Haemoproteus* оказалась выше чем у оседлых птиц ($P < 0.0001$), а *Leucocytozoon*, наоборот, чаще заражает оседлых птиц ($P = 0.000003$). Выявлено также, что *Plasmodium* и *Haemoproteus* чаще поражают птиц из северозападного Кавказа, чем из южного ($P = 0.0034$, $P = 0.001$). Среди семейств птиц с выборкой более 20 особей наиболее зараженными оказались птицы семейства Turdidae (89%) и в меньшей степени – птицы семейства Prunellidae (19%).

У некоторых линий паразитов присутствует ярко выраженная специфичность к видам птиц, что чаще встречается у паразитов родов *Haemoproteus* и *Leucocytozoon*, чем *Plasmodium*. Среднее число видов и семейств птиц, пораженных разными линиями паразитов, найденных у более чем 2 особей, у *Haemoproteus* составило соответственно 2.075 видов и 1.675 семейств, у *Plasmodium* – 4.375 видов, 3.125 семейств, а у *Leucocytozoon* – 2 видов и 1.643 семейств.

Haemoproteus и *Leucocytozoon* в основном заражают птиц в местах и в период их гнездования, а *Plasmodium* – в течении всего года: как в местах зимовки, так и в местах гнездования. Линии паразитов, передающихся во время зимовок, способны передаваться и во время гнездования ($R^2 = 0.9881$, $P = 0.07$), превращаясь в инвазивные заболевания.

Нами подсчитана также сравнительная зараженность эволюционными линиями паразитов у птиц южного и северозападного Кавказа. Линейная регрессия относительной зараженности птиц разными гаплотипами на северозападном и южном Кавказе показала, что сообщества паразитов родов *Plasmodium* ($R^2 = 0.615$, $P < 0.001$) и *Leucocytozoon* ($R^2 = 0.540$, $P < 0.001$) очень близки по своему составу, а сообщества паразитов рода *Haemoproteus* отличаются ($R^2 = 0.024$, $P = 0.373$). Таким образом, у паразитов рода *Haemoproteus* наблюдается филогеографическое структурирование, в то время как паразитам родов *Plasmodium* и *Leucocytozoon* свойственна связь между их обилием и распространением, то есть линии, доминирующие на северозападном Кавказе, являются наиболее обычными и на южном.

Diversity, prevalence and host-parasite relations of avian haemosporidian parasites in some forest areas of Caucasus

Summery

Avian haemosporidian parasites are known for their devastating impact on bird communities and, particularly, on the endemic avifauna. Although the Caucasus is an internationally recognized hotspot of biodiversity and endemism, data on avian haemosporidians are scarce. We used PCR methods to determine the diversity, distribution, and host specificity of parasites from genera *Haemoproteus*, *Plasmodium*, and *Leucocytozoon*, as well as, their patterns of new hosts and area colonization. We used a 505 bp part of the mitochondrial cytochrome-*B* gene of the parasites as the marker of choice. We used 3 pairs of new primers designed by S. V. Drovetski and one pair of commonly used primers designed by S. Bensch. New primers showed high efficiency with a single PCR assay, saving time and resources, and significantly reducing the possibility of laboratory errors. Our comparative analysis of the 96 samples using microscopy and molecular techniques showed an advantage of PCR methods for the identification of the presence of *Haemoproteus*, *Plasmodium*, and *Leucocytozoon*, but the difference was not significant ($P>0.3$), so microscopy is also suitable for fieldwork and preliminary diagnosis.

Overall, 698 avian blood samples were collected during the breeding seasons of 2010 and 2011 in RA (Republic of Armenia), NKR (Nagorno-Karabakh Republic) and adjacent territories (n=511) and in the northwest Caucasus - Krasnodarski krai, RF (Russian Federation) (n=187). Firstly for Caucasus all three genera of avian malaria parasites were discovered, many of which were new lineages and probably endemic to the Caucasus. The overall prevalence of haemosporidian parasites was 53% (n=372), of which 31% (n=216) were infected by *Haemoproteus*, 11% (n=77) *Plasmodium* and 20% (n=140) *Leucocytozoon*. Double infections were detected in 22% (n=153) of birds, and 4% (n=28) were infected by more than two lineages of parasites. A total of 162 unique haplotypes were identified among 610 sequenced fragments, 78 of which belonged to the genus *Haemoproteus*, 25 to *Plasmodium* and 59 to *Leucocytozoon*. Half of the unique haplotypes (n=81) had not been previously reported. Among those novel haplotypes, 34 belong to the genus *Haemoproteus*, 8 to *Plasmodium* and 39 to *Leucocytozoon*. Correlation matrices did not show a significant correlation between age or sex of the bird and parasite prevalence. In contrast, species and family of a bird, its migratory behavior and geographic region appear to be related to the prevalence of haemosporidian parasites. More

migratory species were infected by *Haemoproteus*, than resident birds ($P < 0.0001$), but resident species were more susceptible to *Leucocytozoon* infections than migrants ($P = 0.000003$). We also found that the prevalence of *Plasmodium* and *Haemoproteus* was much higher in the northwest than in the south Caucasus ($P = 0.0034$, and $P = 0.001$, respectively). Among the families of birds with a sample size greater than 20, Turdidae was the most frequently infected (89%), and Prunellidae had the lowest prevalence of haemosporidian infections (19%).

Some lineages of parasites had high host-specificity, which was especially common for the genera *Leucocytozoon* and *Haemoproteus*, whereas lineages of *Plasmodium* were less host-specific. The average number of parasitised avian species and families for lineages from genera *Haemoproteus* and *Leucocytozoon*, which were detected in at least two individual birds, was 2.075 and 2.000 avian species and 1.675 and 1.643 avian families (respectively), whereas the average number of parasitised avian species and families for lineages of *Plasmodium* was 4.375 and 3.125.

Haemoproteus and *Leucocytozoon* appear to be transmitted primarily on breeding grounds, whereas *Plasmodium* – on both, wintering and breeding grounds. There was a strong, albeit marginally significant, correlation between the number of congeneric lineages transmitted during winter and year-round ($R^2 = 0.9881$, $P = 0.07$). This suggests that winter transmission may facilitate colonization of the distant breeding grounds of migratory birds, becoming invasive diseases.

Linear regression of the relative abundance of parasites in the northwest versus south Caucasus showed that the parasite community of *Plasmodium* ($R^2 = 0.615$, $P < 0.001$) and *Leucocytozoon* ($R^2 = 0.540$, $P < 0.001$) were very similar in these areas, and the community of *Haemoproteus* lineages differed in its composition and lineage abundance ($R^2 = 0.024$, $P = 0.373$). Thus, lineages of *Haemoproteus* appear to be phylogeographically structured, whereas *Plasmodium*, and *Leucocytozoon* followed abundance–occupancy relationship - i.e., the dominant lineages in the south Caucasus were also the most common in the northwest Caucasus.



Երախտիքի խոսք

Աշխատանքն իրականացվել է Գ.Գյուլբենկյան հիմնադրամի (Fundação Calouste Gulbenkian) ֆինանսական աջակցությամբ:

Հեղինակը շնորհակալություն է հայտնում Գ. Բոյախյանին, Ս. Դրովեցկիին, Ֆ. Դանիելյանին, Ս. Առաքելյանին, Ա. Ղազարյանին, Ի. Ֆադեևիին, Ս. Ռակովիչին, Տ. Հայրապետյանին, Գ. Նիկողոսյանին, Ս. Ռեիշին, Վ. Մատային, Գ. Սեմյոնովին, Հ. Խաչատրյանին:

Հեղինակն իր երախտագիտությունն է հայտնում նաև ՀՀ ԳԱԱ Կենդանաբանության և հիդրոէկոլոգիայի գիտական կենտրոնի, ԵՊՀ Կենդանաբանության ամբիոնի և Պորտոյի համալսարանի CIBIO (Centro de Investigação em Biodiversidade e Recursos Genéticos) կենտրոնի աշխատակիցներին՝ աշխատանքի իրականացման և կայացման գործում ներդրում ունենալու համար: