

На правах рукописи

Безжонова Оксана Владимировна

**Комплексы видов кровососущих комаров
рода *Anopheles* (Diptera, Culicidae)
России и ближнего зарубежья**

Специальности 03.02.05 – энтомология и 03.02.07 - генетика

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

МОСКВА – 2011

Работа выполнена на кафедре энтомологии Биологического факультета
Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова и в
лаборатории сравнительной генетики животных Учреждения Российской академии
наук Института общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН

Научный руководители:

кандидат биологических наук
Федорова Марина Вадимовна

кандидат биологических наук
Горячева Ирина Игоревна

Официальные оппоненты:

кандидат биологических наук
Андрианов Борис Витальевич
Учреждение Российской академии наук
Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН
доктор биологических наук
Ганушкина Людмила Алимпиевна
Институт медицинской паразитологии и
тропической медицины им. Е.И. Марциновского
ММА имени И.М. Сеченова

Ведущая организация:

Московский Государственный
областной университет

Защита диссертации состоится «10» октября 2011 г. в «17» часов «00» минут
на заседании диссертационного совета Д 501.001.20 при Московском
государственном университете имени М.В. Ломоносова по адресу: 119991,
ГСП-1, Москва, Ленинские горы, Московский государственный университет
им. М.В. Ломоносова, д. 1 стр. 12, Биологический факультет, ауд. М-1.
Факс: 8(495)939-17-46; E-mail: *irbeme@mail.ru*

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке биологического
факультета МГУ имени М.В. Ломоносова

Автореферат разослан « » сентября 2011 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
доктор биологических наук, профессор



И.Р. Бёме

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. До настоящего времени малярия остается одним из самых распространенных трансмиссивных заболеваний: ежегодно в мире этой инфекцией болеют около 300 миллионов человек, а количество летальных случаев исчисляется сотнями тысяч (WHO, 2009, 2010).

В результате интенсивных мероприятий на европейском континенте и на всей территории СССР передача малярии была практически прервана к 1950г., и в 1955г. ВОЗ объявила об окончательной ликвидации этого заболевания в Европе (Mendis et al, 2009). Однако во многих странах европейского региона ВОЗ плотность популяций переносчиков малярии, комаров рода *Anopheles*, оставалась высокой. Это создавало условия для возобновления местной передачи на основе завозных случаев или вследствие активизации местных остаточных очагов, и привело к развитию полномасштабных эпидемий малярии в Азербайджане и Таджикистане с середины 90-х годов, а потом и по всей территории европейского региона ВОЗ (Касумов, Гусейнов, 2001; Сабатинелли, 2002). В связи со сложившейся ситуацией ВОЗ была разработана программа «Обратим малярию вспять», которая вступила в действие в 1998 г. Одной из центральных задач программы стала ревизия фауны малярийных комаров с целью уточнения основных переносчиков заболевания и контроля их численности (Региональная стратегия, 2006).

Ареал малярии ограничивается в основном областью распространения переносчиков этого заболевания - комарами рода *Anopheles*. В мировой фауне насчитывается 484 вида этого рода (Sallum et al., 2000; Harbach, 2004; Harbach et al., 2005), но далеко не все они представляют опасность для человека. Эпидемиологическое значение имеют лишь те, которые удовлетворяют критерию "основной переносчик", т.е. обладают биологическими особенностями, повышающими вероятность контакта комаров с человеком. К таким биологическим особенностям комаров относятся высокая численность, способность развиваться вблизи жилья человека в антропогенных биотопах, высокий уровень антропофилии, эндофагии и эндофильности (Беклемишев, 1944). В настоящее время к числу основных переносчиков относят около 60 видов комаров рода *Anopheles* (Service, 2004; Fontenille et al., 2005).

Исследования особенностей пищевого и репродуктивного поведения, суточного ритма активности, сезонного хода численности и других биологических характеристик у ряда видов малярийных комаров показали, что они представляют собой комплексы близкородственных видов, морфологические различия между которыми выражены крайне слабо, а часто и вовсе отсутствуют, тогда как эпидемическая роль может существенно отличаться. Описание комплексов в роде *Anopheles* началось с европейского вида *An.maculipennis* в 1920-годах и в дальнейшем затронуло значительное число видов (Norris, 2002). Уже в 30-40-е годы в Индии были найдены внутривидовые формы комара *An.stephensi* (Sweet, Rao, 1937), в Южной Америке - подвиды *An.albitarsis*, *An.darlingi*, *An.crusians*, *An.quadrifasciatus*, в Северной Америке - *An.maculipennis*, *An.pseudopunctipennis* (Aitken, 1945). Начавшееся в 40-е годы изучение *An.gambiae*, основного переносчика малярии в Африке (Coluzzi, 1964), привело к описанию по меньшей мере семи новых видов, образовавших комплекс *An.gambiae* (Coluzzi et al., 2002). Среди них пять видов являются переносчиками малярии. К настоящему времени показано, что около 77% видов - переносчиков малярии представляют собой комплексы видов. Разработка методов их идентификации является важной, но сложной задачей, которая в настоящее время далека от завершения.

На территории России и в других странах СНГ наиболее распространены представители комплекса *An.maculipennis*, к числу которых относятся основные переносчики малярии (Gordeev et al., 2008). Кроме того, большое эпидемиологическое значение в некоторых регионах имеют комары *An.claviger* (Бубликова, 2001), а в Средней Азии - *An.superpictus* (Gordeev et al., 2008). По современным представлениям, оба эти вида также представляют собой комплексы.

Цель и задачи исследования. Целью работы была ревизия видового статуса комаров комплексов *An.maculipennis*, *An.claviger* и *An.superpictus*, их распространения на территории России и ближнего зарубежья и оценка области второго внутреннего транскрибируемого спейсера кластера рибосомных генов (ITS2) как универсального маркера для идентификации видов указанных комплексов.

В связи с этим были поставлены следующие задачи:

1) уточнение видового состава комаров комплекса *An.maculipennis* на территории России и некоторых стран СНГ методами морфологического, цитогенетического и молекулярно-генетического анализа;

2) оценка внутривидовой изменчивости первичной структуры области второго внутреннего транскрибируемого спейсера (ITS2) кластера рибосомных генов комаров комплекса *An.maculipennis*;

3) разработка молекулярно-генетического ключа для идентификации видов комплекса *An.maculipennis*;

4) оценка внутривидовой изменчивости первичной структуры области второго внутреннего транскрибируемого спейсера (ITS2) кластера рибосомных генов комаров комплекса *An.claviger*;

5) изучение комаров комплекса *An.superpictus* методами морфологического и молекулярно-генетического анализа.

Научная новизна. Впервые проведен сравнительный анализ методов идентификации видов-двойников, распространенных на территории России и ближнего зарубежья. Показано, что применение морфологических признаков для идентификации всех видов комплекса *An.maculipennis* затруднено из-за наличия промежуточных вариантов окраски экзохориона яйца и схожести морфологии яиц у некоторых видов (например, *An.maculipennis*, *An.atroparvus*). Применение анализа структуры политенных хромосом для идентификации видов ограничено существованием гомосеквентных видов (*An.labranhiaae* и *An.atroparvus*; *An.maculipennis*, *An.melanoon* и *An.artemievi*). Показано, что наиболее перспективным является молекулярно-генетический подход, основанный на использовании первичной структуры области второго внутреннего транскрибируемого спейсера кластера рибосомных генов (ITS2) как универсального маркера для идентификации видов комплекса *An.maculipennis*. С использованием этого маркера впервые разработан молекулярный ключ для идентификации видов комплекса *An.maculipennis*, обитающих на территории России и ближнего зарубежья.

У *An.messeae*, представителя комплекса *An.maculipennis*, впервые обнаружен внутригеномный полиморфизм ITS2. Изучение степени внутригеномного полиморфизма указанного вида на территории России показало, что недавно описанный в Европе вид *An.daciae* представляет собой одну из внутригеномных форм *An.messeae* и не может считаться самостоятельным видом. Другие исследованные виды комплекса *An.maculipennis* оказались мономорфными по маркеру ITS2. Использование молекулярно-генетических методов позволило выявить новый для фауны СНГ вид – *An.persiensis*, а также уточнить границы ареалов *An.messeae*, *An.maculipennis*, *An.atroparvus*, *An.artemievi*, *An.melanoon* и *An.sacharovi*.

В ходе цитогенетических исследований впервые получены данные по кариотипической структуре популяций *An.messeae* юго-восточной части Русской равнины. Выявлены три четко дифференцированные зоны, различающиеся по частоте встречаемости разных кариотипов.

Впервые выявлена и исследована внутригеномная изменчивость первичной структуры области второго внутреннего транскрибируемого спейсера кластера рибосомных генов (ITS2) у *An.claviger*. Различия по этому маркеру между популяциями из Абхазии, с одной стороны, и Беларуси и Германии с другой, значительно превосходили различия на популяционном уровне. Эти результаты дают основу для дальнейшей исследовательской работы на уровне комплекса видов.

Впервые проведен молекулярно-генетический анализ *An.superpictus* в Туркменистане и Кыргызстане. Показано, что морфологические формы *An.superpictus* не соответствуют молекулярным формам по ITS2 и COI-II; выявлены два новых митотипа X1 (в Кыргызстане и Туркменистане) и X2 (в Кыргызстане).

Теоретическое и практическое значение работы. Данные о внутривидовом и межвидовом полиморфизме в комплексах видов-двойников *An.maculipennis*, *An.claviger* и *An.superpictus* по изученным маркерам являются важными для дальнейших систематических и эволюционных исследований, а также мониторинга биоразнообразия. Разработанный молекулярно-генетический ключ для идентификации видов комаров комплекса *An.maculipennis* успешно применяют для изучения переносчиков по программе «Обратим малярию вспять» ВОЗ и в центрах эпидемиологии (Акт о внедрении от 21.04.2004 г.) Полученные результаты внесли изменения в видовой состав и распространение переносчиков малярии на территории РФ и некоторых стран ближнего зарубежья.

Апробация работы и публикации. Основные результаты исследований были представлены в виде докладов на 3 международных и 1 российской конференциях: Международном семинаре «Генетика репродукции насекомых и ее практическое применение» (Москва, 2006), XII Международной орнитологической конференции (Ставрополь, 2006), I Всероссийском Совещании по проблемам изучения кровососущих насекомых (Санкт-Петербург, 2006), III международном совещании "Молекулярная и популяционная биология комаров и других переносчиков заболеваний" (Колимбари, Крит, Греция, 13-20 июля 2007).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 15 печатные работы, в том числе 10 статей, из которых 9 – в журналах, рекомендованных ВАК.

Структура и объём диссертации. Диссертация состоит из разделов: «Введение», четырех глав, «Заключение», «Выводы», «Список литературы» (включающий 240 источник, из них 144 на иностранных языках). Текст изложен на 120 страницах (без учета приложений), содержащий 13 таблиц и проиллюстрированный 20 рисунками. Приложения содержат 5 таблиц.

БЛАГОДАРНОСТИ

Я выражаю глубочайшую благодарность научным руководителям кандидату биол. наук М.В. Федоровой и кандидату биол. наук И.И. Горячевой. Особую благодарность выражаю члену-корреспонденту РАН, доктору биол.наук И.А. Захарову-Гезехусу за всестороннюю помощь и поддержку при выполнении работы в руководимой им лаборатории. Я благодарю профессора, доктора биол. наук М.И. Гордеева и кандидата биол. наук Е.В. Шайкевич за совместную работу. Я искренне признательна за предоставление материала А.Б. Званцову, доктору биол. наук М.Ю.Щелканову, А.Бабуадзе, кандидатам биол. наук А. Кешишьян, Т.В.Волковой, Н.К. Потаповой. Я очень благодарна за всестороннюю помощь и профессиональные советы доктору биол. наук Н.А. Тамариной, кандидатам биол. наук Н.Я. Маркович и Р.М. Горностаевой.

Работа финансировалась Глобальным фондом по борьбе со СПИДом, туберкулезом и малярией, Европейским региональным бюро Всемирной Организации Здравоохранения, а также по грантам РФФИ 05-04-49047, 05-04-49035, 06-04-08347, 08-04-01674-а; по грантам Президента РФ НШ-827.2003.4; НШ-15.2003.4; НШ-10122.2006.04, по программе РАН «Динамика генофондов растений, животных и человека».

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

ВВЕДЕНИЕ

I.1. КОМПЛЕКС ВИДОВ-ДВОЙНИКОВ *AN.MACULIPENNIS*

Комплекс видов *Anopheles maculipennis* – основной переносчик малярии в Палеарктике. Комплекс *An. maculipennis* включает в себя 11 Палеарктических видов (*An. artemievi* Gordeev, Zvantzov, Goryacheva, Shaikevich and Ejov, *An. atroparvus* van Thiel, *An. beklemishevi* Stegnii & Kabanova, *An. daciae* Linton, Nicolescu & Harbach, *An. labranchiae* Falleroni, *An. maculipennis* Meigen, *An. martinius* Shingarev, *An. melanoon* Hackett, *An. messeae* Falleroni, *An. persiensis* Linton, Sedaghat & Harbach and *An. sacharovi* Favre) и 5 Неарктических видов (*An. occidentalis* Dyar and Knab, *An. aztecus*, Hoffman, *An. freeborni* Aitken, *An. earlei* Vargas, *An. hermsi* Barr and Guptavani) (Nicolescu et al., 2004; Kampen, 2005b).

В странах СНГ найдены 8 видов: *An. artemievi*, *An. atroparvus* van Thiel, *An. beklemishevi* Stegnii & Kabanova, *An. maculipennis* Meigen, *An. martinius* Shingarev, *An. melanoon* Hackett, *An. messeae* Falleroni и *An. sacharovi* Favre (Горностаева, 2000, 2003, 2009; Горностаева, Данилов, 2002; Мамедниязов, Ерохин, 2005; Мамедниязов, 1995; Ejov, 2005; Gordeev et al., 2008).

Изучение систематики видов комплекса не прекращалось на протяжении всего XX столетия. Первые работы были посвящены поиску морфологических особенностей и доказательствам существования репродуктивной изоляции между членами комплекса. Во второй половине столетия с успехом были использованы цитогенетические и биохимические подходы, а в последнее десятилетие широкое распространение получили методы молекулярной генетики. Итогом этих работ явилось открытие новых видов, часть из которых описана на основании молекулярно-генетических различий, а часть - с использованием методов цитогенетики.

I.2. КОМПЛЕКС ВИДОВ-ДВОЙНИКОВ *AN.CLAVIGER*

В 40-х годах Del Vecchio на основании морфологических отличий яиц, личинок и куколок выделил два варианта *An. claviger*: *An. cl. petraghani* и *An. cl. missiroli* (Del Vecchio, 1939; Lupascu, 1941; Senevet, Andranelli, 1955; Coluzzi, 1963). Видовая самостоятельность *An. petraghani* и *An. claviger s.s.* обсуждалась до 60-х гг. XX в., когда Колуцци показал репродуктивную изоляцию этих форм (Coluzzi, 1963).

На территории бывшего СССР Устиновым (1946) и Маркович (1951) были выявлены две физиологические расы вида *An. claviger*, отличающиеся по признаку автогенности (способности самок откладывать первую кладку яиц без кровососания). Неавтогенные популяции были обнаружены в окрестностях Сочи (Шленова, 1938), в Адлере (Шипицина, 1941) и Абхазии (Устинов, 1945, 1946), тогда как популяции из европейской части Российской Федерации, Украины, Молдавии, Прибалтики, Казахстана и республик Средней Азии были способны к автогенному развитию яиц. Полученные данные поставили вопрос о видовом статусе комаров из автогенных и неавтогенных популяций на территории СНГ.

I.3. КОМПЛЕКС ВИДОВ-ДВОЙНИКОВ *AN.SUPERPICTUS*

An. superpictus в последнее время рассматривается как комплекс видов. Известны две морфологические формы имаго (А и В), различающиеся по наличию или отсутствию темного пятна (кольца) на апикальном сегменте максиллярных щупиков (Amani, 1999). Молекулярно-генетический анализ области гена малой субъединицы цитохромоксидазы I (COI) и участка COI-II методом ПЦР-ПДРФ позволил выделить три молекулярные формы этого локуса, которые были обозначены как X, Y и Z (Oshagi et al, 2007a). Параллельно для выявления внутри- и межвидовых различий велись исследования другой маркерной области генома переносчика – первичной структуры области второго

внутреннего транскрибируемого спейсера кластера рибосомных генов (ITS2). Исследования показали отсутствие корреляции между молекулярными маркерами и морфологическими формами личинок и имаго (Oshaghi et al., 2007a, 2007b, 2008), но выявили соответствие между митохондриальными и ядерными молекулярными формами.

ГЛАВА II. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

II.1. Места сбора. Материалом для работы послужили личинки и имаго малярийных комаров, собранные с 2004 по 2009 г.г. в Волгоградской, Астраханской, Ростовской, Пензенской областях, Краснодарском крае, Абхазии, республиках Адыгея и Калмыкия. Имаго собирали энтомологическим сачком, световыми ловушками, в местах дневок самок – заплечным пылесосом (BioQuip, USA), а также ловили на себе с помощью ловушки Кришталя. Среди самок отбирали особей, напитавшихся кровью, которых помещали в индивидуальные пробирки для получения кладок. Сбор личинок проводили с помощью ковша. Кроме собственных сборов были проанализированы также личинки, имаго и яйца комаров из Воронежской области, республики Карачаево-Черкесия, Якутии, а также из Беларуси, Грузии, Армении и Азербайджана, любезно предоставленные местными энтомологами. Материал из Московской и Томской областей, Алтайского края, республики Калмыкия, из Казахстана, Кыргызстана, Узбекистана, Туркменистана и Таджикистана предоставлен М.И. Гордеевым и А.Б. Званцовым. Для определения имаго и личинок использовали стандартные ключи (Гуцевич и др., 1970).

II.2. Цитогенетический анализ. Для цитогенетических исследований личинок IV возраста фиксировали в смеси 96% спирта и ледяной уксусной кислоты (в соотношении 3:1). Слюнные железы комаров выделяли в капле фиксатора под микроскопом МБС–10. Хитиновый покров личинки приподнимали с помощью препаровальных игл. Затем из грудного отдела извлекали парные слюнные железы. Железы окрашивали 2%-ным лактоацеторсином в течение 30 минут. Затем излишки краски убирали фильтровальной бумагой. Железы дифференцировали в 45% уксусной кислоте. Далее железы накрывали покровным стеклом и раздавливали легкими постукиваниями тупым концом препаровальной иглы. Цитогенетический анализ политенных хромосом проводили под микроскопом Micros (Австрия). Видовой и половой состав личинок малярийных комаров определяли путем сравнения препаратов политенных хромосом с фотокартами политенных хромосом видов-двойников рода *Anopheles* (Стегний, 1991). Для оценки достоверности различий в частоте встречаемости инверсий в разных популяциях *An. messeae* европейской части ареала использовали метод χ^2 (Гершкович, 1968).

II.3. Молекулярно-генетические методы.

Выделение ДНК. Для молекулярно-генетических исследований комаров фиксировали в 96° спирте. ДНК выделяли с помощью набора для выделения ДНК D1Atom DNA Prep (Изоген, Россия) в соответствии с инструкциями фирмы-производителя. Принцип действия данного набора основан на использовании Лизирующего реагента с гуанидинтиоцианатом, последний предназначен для лизиса клеток, солиubilизации клеточного дебриса и денатурации клеточных нуклеаз. В присутствии Лизирующего реагента ДНК активно сорбируется на NucleoSTM-сорбенте, а затем легко отмывается от других компонентов (белков, солей) спиртовым раствором. ДНК элюируется с сорбента ЭкстраГеном ЕTM или деионизованной водой. Полученную ДНК использовали для проведения ПЦР. В реакцию амплификации брали по 0,01 мкг выделенной тотальной ДНК.

ПЦР. Амплификацию фрагментов ДНК проводили в объеме 25 мкл с использованием набора реактивов Encyclo PCR kit (Евроген, Россия).

Реакционную смесь готовили в соответствии с рекомендациями производителя: 2,5 мкл 10x Encyclo-буфера, 0,5 мкл смеси dNTP, содержащей по 0,2 мМ каждого нуклеотида,

0,5 мкл 50х- Енсуло-полимеразы (конечная концентрация 0,5 ед.), по 0,2 мкМ каждого праймера, 100 нг/25 мкл тотальной ДНК, бидистиллированная вода добавлялась до конечного объема 25 мкл.

Аmplификацию фрагментов ДНК проводили в течение 35 циклов на термоциклере GeneAmp[®] RCR System 2700 (Applied Biosystems, США). Структура использованных праймеров представлена в таблице.

Таблица 1. Последовательность использованных в работе праймеров

Название праймера	Последовательность праймера	Источник
5,8S	5'-TGT GAA CTG CAG GAC ACA TG-3'	Porter,Collins, 1991
28S	5'- ATG CTT AAA TTT AGG GGG TA-3'	Porter,Collins, 1991
28S1	5'- TAT GCT TAA ATT CAG GGG GT -3'	Beebe, Saul, 1995
COIIR1	5'-TTGATTTTTTGGTCATCCAGAAGT-3'	Roehrdanz, 1993
COIIR2	5'-CCACAAATTTCTGAACATTGACC-3'	Crozier and Crozier, 1993

Полимеразную цепную реакцию с праймерами, комплементарными 3'-концу гена 5,8S рРНК и 5'-концу гена 28S рРНК и фланкирующими область второго внутреннего транскрибируемого спейсера кластера рибосомных генов, проводили по условиям, описанным ранее (Proft et al., 1999; Oshaghi et al, 2007a, 2007b). Для амплификации данной области генома использовали праймеры 5,8S и 28S для комаров комплекса *An. maculipennis* и комаров *An. claviger*, и праймеры 5,8S и 28S1 для комаров *An. superpictus*. Полимеразную цепную реакцию проводили в следующем режиме: предварительная денатурация – 3 мин 98⁰С, за которой следовали 35 циклов: денатурация – 20 сек 95⁰С, отжиг - 20 сек, полимеризация – 72⁰С – 40 сек; заключительная полимеризация 7 мин 72⁰С. Отжиг праймеров проводили при t=50⁰С для праймеров 5,8S и 28S, и при t=53⁰С для праймеров 5,8S и 28S1. Полимеразную цепную реакцию с праймерами COIIR1 и COIIR2, комплементарными фрагменту между генами субъединиц I и II цитохромоксидазы проводили при следующих параметрах: предварительная денатурация – 3 мин 98⁰С, 35 циклов: денатурация – 20 сек 95⁰С, отжиг - 20 сек 56⁰С, полимеризация – 72⁰С – 40 сек; заключительная полимеризация - 7 мин 72⁰С.

ПЦР-ПДРФ. Видовую идентификацию комаров комплекса *An. maculipennis* проводили методом ПЦР-ПДРФ на основании различий в паттернах рестрикции продуктов амплификации по ряду диагностических рестриктаз. Идентификацию видов осуществляли в несколько этапов. На первом этапе ПЦР-продукты, полученные в результате полимеразной цепной реакции с праймерами 5,8S и 28S, обрабатывали эндонуклеазой рестрикции *CfoI* (*HhaI*) (Promega Corporation, USA). Для этого 15 мкл ПЦР продукта смешивали с 2мкл 10х буферного раствора для рестриктазы *CfoI* и 5 ед рестриктазы. Смесь инкубировали при 37⁰С в течение часа. Результаты ПЦР-ПДРФ визуализировали методом горизонтального электрофореза в 2,5% агарозном геле.

Использование данного подхода, предложенного Николеску с соавторами (Nikolescu et al., 2004), позволяет идентифицировать 3 вида из комплекса – *An. atroparvus*, *An. maculipennis*, *An. sacharovi*. Паттерны рестрикции видов *An. messeae*, *An. daciae*, *An. melanoon*, *An. artemievi* оказываются сходными. Для идентификации этих четырех видов автором был разработан подход, основанный на использовании эндонуклеаз рестрикции, имеющих сайты рестрикции в нуклеотидной последовательности только одного из четырех вышеназванных видов (специфически расщепляющими ПЦР-продукт лишь одного из вышеназванных видов с образованием паттернов рестрикции специфического размера). Поиск специфических эндонуклеаз был проведен с использованием программы «Restriction of DNA sequences» (Bikandi et al., 2004).

Для выявления митохондриальных гаплотипов *An. superpictus* проводили рестрикцию продуктов амплификации области генов цитохромоксидазы субъединицы I и

субъединицы II (COI-COII) с использованием эндонуклеазы рестрикции *AluI* (Fermentas, Литва) по ранее описанной методике (Oshaghi et al., 2008a). Для этого 15 мкл ПЦР продукта смешивали с 2мкл 10x буферного раствора для рестриктазы *AluI* и 5ед рестриктазы. Реакцию проводили в течение часа и останавливали реакцию добавлением EDTA до конечной концентрации 20mM.

Клонирование ПЦР фрагментов, их фракционирование в агарозном геле, элюция фрагментов ДНК и их секвенирование проводили согласно стандартным протоколам.

Методы биоинформационного анализа. Анализ хроматограмм проводили с помощью программы ChromasPro 13.3 (Technelysium, Australia). Выравнивание последовательностей, полученных в результате секвенирования, с последовательностями, размещенными в базах данных, проводили с помощью ресурсов, расположенных на сайте <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>, программ CLUSTAL W 1.83 (Thompson et al., 1994) и CLUSTAL X 2.1. (Larkin et al., 2007). Для статистической обработки последовательностей использовали программы BioEdit 7.0.5.3. (Hall, 1999). Для построения дендрограмм применяли программу MEGA 4.0. (Tamura et al., 2007) с использованием алгоритма neighbor joining (NJ). Для оценки статистической достоверности полученных дендрограмм была выбрана величина бутстрэп-поддержки не менее 70%.

ГЛАВА III. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

III.1. Морфологические признаки, цитогенетические и молекулярно-генетические особенности комаров комплекса *An. maculipennis*

С помощью морфологических, цитогенетических и молекулярно-генетических методов были исследованы 8 видов комаров комплекса *An. maculipennis*. Всего проанализировано 2151 особей комаров, собранных в 10 странах. В 300 кладках, полученных от напитавшихся самок, были изучены морфологические особенности яиц.

III.1.1. Морфология яиц у комаров комплекса *An. maculipennis*

Морфология яиц была изучена у 8 представителей комплекса. На территории европейской части России *An. maculipennis*, *An. messeae* и *An. atroparvus* являются наиболее многочисленными видами, в южных и центральных регионах их ареалы симпатричны (Горностаева, Данилов, 2002). При анализе индивидуальных кладок *An. maculipennis* были обнаружены промежуточные варианты яиц. Количество пятен между черными перевязями на экзохорионе варьировало от практически полного их отсутствия до значительного количества. Изменчивость по признаку «количество пятен на экзохорионе яйца» была впервые отмечена в Македонии (Rice, Barber, 1937) и на Среднем Урале (Маркин, 1938), а впоследствии - в Армении, Одесской области и некоторых других регионах (Чубкова, 1948, Селенс, 1953). При получении массовых кладок подобная картина изменчивости рисунка яиц существенно затрудняет видовую идентификацию.

В ряде исследованных регионов при получении индивидуальных кладок у *An. messeae* и *An. atroparvus* были обнаружены промежуточные варианты, у которых в разной степени были развиты темные поперечные перевязи у основания воздушных камер. Яйца еще одного представителя комплекса *An. maculipennis* – *An. melanoon* были либо полностью темные, либо с темными поперечными полосами и пятнами между полосами; в последнем случае яйца *An. melanoon* были практически неотличимы от яиц *An. messeae*. Сходство кладок *An. melanoon* и *An. messeae* в свое время создало трудности при идентификации переносчиков малярии в ряде стран, в том числе в Грузии (Гакетт, Барбер, 1935; Каландадзе, Сагателова, 1938) и Азербайджане (Ременникова, 1953, 1958; Киясов, 1970, 1973; Региональная стратегия, 2006), Турции (Postiglione et al., 1970), Греции (Linton et al., 2002) и на юге России (Маркович, 1936; Калита, 1939). Во всех указанных регионах отмечали оба вида (*An. messeae* и *An. melanoon*), основываясь на признаках морфологии и окраски экзохориона яиц. В дальнейшем было показано, что в странах Закавказья, Турции и, вероятно, на юге России (начиная от Адлера - 43°4'с.ш.)

распространен только *An.melanoon*, тогда как в Греции эти виды являются симпатричными (Postiglione et al., 1970; Linton et al., 2002). Более того, темные яйца *An.melanoon* явно не отличались от хорошо пигментированных яиц в кладках *An.messeae* и *An.atroparvus*, что вызывало дополнительные сомнения в правильности идентификации этих видов. Проблема в изучении распространения *An.melanoon* усложнилась после описания нового вида, *An.persiensis*, обнаруженного на севере Ирана, яйца которого похожи на яйца *An.melanoon* (Sedaghat et al., 2003)

Яйца *An.sacharovi* (Закавказье), *An.martinius* и *An.artemievi* (Средняя Азия) без воздушных камер и не различимы между собой. Идентификация этих видов проводилась нами с использованием цитогенетических и молекулярно-генетических методов анализа

Таким образом, использование морфологических признаков для идентификации всех видов комплекса *An.maculipennis* затруднено из-за наличия промежуточных вариантов окраски экзохориона яйца и сходства морфологии яиц у некоторых видов.

III.1.2. Цитогенетический анализ комаров комплекса *An.maculipennis*

Цитогенетическими методами было изучено 205 кариотипов *An.maculipennis* и *An.melanoon*, 48 *An.atroparvus*, 12 *An.sacharovi* и 425 *An.messeae*.

Кариотип *An.atroparvus* принят как «стандартный» (Frizzi, 1947,1953) При изучении полученных нами препаратов не удалось выявить каких-либо особенностей. Кариотипы всех особей, собранных в южных регионах России (Краснодарский и Ставропольский край, Ростовская область, Калмыкия) по рисунку не отличались от фотокарт, сделанных в Западной Европе (Frizzi, 1947,1953) и на Украине, Молдавии, Ростовской области (Стегний, 1976, 1991; Шуваликов,1986).

При изучении рисунка политенных хромосом *An.maculipennis*, собранных в 10 регионах, не выявлено отличий от кариотипов, полученных ранее в Молдавии, Абхазии, на Украине, европейской части России и других исследованных ранее регионов (Стегний, 1976, 1991; Шуваликов, 1986; Гордеев, 1997). Редкая инверсия на левом плече второй аутосомы, описанная в молдавской популяции *An.maculipennis* Стегнием и Кабановой (1978), нами не обнаружена. Полученные нами данные показывают, что на всем изученном нами ареале этот вид является мономорфным. Сравнение кариотипов *An.maculipennis* с *An.melanoon*, собранного в Грузии и идентифицированного молекулярно-генетическими методами, подтвердило, что эти виды являются гомосеквентными, т.е. имеют идентичную структуру политенных хромосом, и поэтому не могут быть диагностированы цитогенетическими методами.

Кариотипы *An.sacharovi* были исследованы в популяциях Грузии. Этот вид отличается от рассмотренных выше фиксированной инверсией в правом плече хромосомы 3R. В изученном нами материале никаких отличий от полученных ранее кариотипов выявлено не было.

Характерной особенностью полиморфных видов является наличие флуктуирующих хромосомных инверсий. Среди исследованных нами видов это явление было обнаружено у *An. messeae*. В изученных популяциях *An.messeae* нами выявлены только известные ранее хромосомные инверсии: XL₁, XL₄, 2R₁, 3R₁, 3L₁ (табл. 2). Все они, кроме XL₄, широко распространены по ареалу вида. Инверсия XL₄ является эндемичной и встречается с низкой частотой (2%) в Пензенской и Московской областях.

На основании сходства кариотипической структуры популяций на территории Русской равнины нами было выделено три зоны - юго-западная, юго-восточная и центральная, - которые отличались по набору хромосомных перестроек и частотам отдельных инверсий (табл.2).

По хромосоме XL: В юго-западной и юго-восточной зонах отмечена высокая частота инверсионной последовательности XL₀. В центральной зоне встречается инверсия XL₄ и наблюдается повышенная частота инверсии XL₁ ($X^2=73,3$; число степеней свободы $df=2$; $p<0,001$).

По хромосоме 2R: В юго-западной и юго-восточной зонах отсутствуют варианты с инверсией 2R₁. В центральной зоне отмечена высокая частота гомо- и гетерозигот с этой инверсией ($X^2=218$; $df=1$; $p<0,001$).

По хромосоме 3R: Юго-восточная зона отличается от юго-западной и центральной зон по соотношению инверсионных генотипов ($X^2=35,8$; $df=4$; $p<0,001$). В юго-восточной зоне наблюдается максимальная частота гомозигот 3R₁₁. Самая низкая частота вариантов с инверсией 3R₁ отмечена в юго- западной зоне.

По хромосоме 3L: Три зоны отличались друг от друга по составу инверсионных вариантов ($X^2=93,5$; $df=4$; $p<0,001$). Юго-восточная зона характеризуется высокой долей вариантов 3L₀₁ и 3L₁₁. В центральной зоне отмечена минимальная частота особей с инверсией 3L₁.

Три рассматриваемые зоны четко дифференцируются по кариотипическому составу. Центральная зона характеризуется более высоким уровнем инверсионного полиморфизма по всем хромосомам, кроме плеча 3L. Для двух южных зон отмечена высокая частота инверсии XL₀, наблюдается полное отсутствие гомо- и гетерозигот по инверсии 2R₁ и высокая доля особей с инверсией 3L₁. Одновременно эти южные зоны имеют ряд различий. Особенностью юго-восточной зоны является увеличение частоты гомо - и гетерозигот по инверсиям 3R₁ и 3L₁.

Данные по кариотипической структуре популяций юго-восточной зоны Русской равнины получены впервые и хорошо согласуются с выводами В.Н. Стегния (1991) о клинальном характере изменчивости по инверсии 3R₁ (увеличение частоты с запада на восток) и об увеличении доли гомозигот 3L₁₁ на южной и восточной периферии ареала.

Таблица 2. Частоты инверсий у *An.messeae* в изученных зонах Русской равнины.

Инверсии	Центр	Частота ($f \pm s_f$, %)	Юго-Запад	Частота ($f \pm s_f$, %)	Юго-Восток	Частота ($f \pm s_f$, %)
XL0	16	9,4±2,3	71	47±4,1	147	45,7±2,8
XL1	151	88,3±2,5	80	53±4,1	175	54,3±2,8
XL4	4	2,3±1,2	0	0	0	0
n`	171		151		322	
2R00	44	39,6±4,6	207	100	96	100
2R01	49	44,2±4,7	0	0	0	0
2R11	18	16,2±3,5	0	0	0	0
3R00	59	53,2±4,7	76	79,2±3,5	106	51,2±3,5
3R01	46	41,4±4,7	19	19,8±3,2	67	32,4±3,3
3R11	6	5,4±2,1	1	1±1,0	34	16,4±2,6
3L00	108	97,3±1,5	75	78,125±4,2	97	46,8±3,5
3L01	3	2,7±1,5	20	21±4,2	85	41,1±3,4
3L11	0	0	1	1±1,0	25	12,1±2,3
n	111		96		207	

Примечание: n-число особей, n`-число половых хромосом XL у самцов и самок, f-частота инверсий по отдельным хромосомам, s_f-стандартная ошибка.

Таблица 3. Виды малярийных комаров комплекса *An. maculipennis*, определенные молекулярно-генетическими методами

Области/ Страны	Виды и количество исследованных комаров, в скобках приведены номера секвенированных последовательностей ПЦР-продуктов (клонов) ITS2, зарегистрированных в GenBank входе настоящего исследования							
	<i>An. maculipennis</i>	<i>An. atroparvus</i>	<i>An. messeae s.l.</i>	<i>An. melanoon</i>	<i>An. beklemishevi</i>	<i>An. sacharovi</i>	<i>An. persiensis</i>	<i>An. artemievi</i>
Россия								
Карачаево-Черкесия	83 (AM409759, AM409760)	1 (AM409761)						
Краснодарский край и республика Адыгея	76	35	53 (AM409773, AM409774 (FN646207.1 FN646206.1))					
Ростовская обл.	14	18	36(AM409770- AM409772)					
Воронежская обл.	6		55					
Калмыкия	5	14	27 (5(4)) (AM409762, AM409763, AM409764(FN64 6211, FN646212), AM409765, AM409766 (AM409767, AM409768))					
Астраханская обл.			82(2(9)) (AM409784, AM409785 (AM409786- AM409788) (FN646219 FN646218) (FN646216 FN646217) (AM409782 AM409783))					
Ставропольский край		3	9					
Пензенская обл.	7 (AM409781)		5(1(2)) (AM409769 (FN646204, FN646205))					
Московская обл.	1 (AM409780)		10 (3(3)) (AM409797, AM409798 (FN646215) AM409799 (FN646213, FN646214))					
Республика Алтай			36		46			
Якутия			48					
Томская обл.			6 (AM409775, AM409776)					
Беларусь	85		79					
Закавказье								
Абхазия	57	1		2				
Грузия	58 (AM269898 AM269738)			20 (AM271001)		17 AM269899		
Армения	48					24		
Азербайджан	42 FN665790- FN665792					235 FN665793, FN665795, FN665796	2 AM409777 FN665794	
Центральная Азия								
Киргизия			18					15 (FN908225)
Узбекистан								9(FN908219- FN908224)
Казахстан								3(FN908217 FN908218)
Таджикистан								4
Всего	485 (10)	89 (2)	500 (20(31))	22 (1)	46	286 (4)	2 (2)	31 (9)

Анализ полученных данных показал, что только три вида комплекса- *An.atroparvus*, *An.sacharovi*, *An.maculipennis* – могут быть идентифицированы на основании структуры паттернов рестрикции по рестриктазе *CfoI*. Паттерны рестрикции видов *An.messeae*, *An.daciae*, *An.melanoon* и *An. artemievi* плохо различались из-за сходства в размерах фрагментов рестрикции, в связи с чем для дифференциации этих видов был проведен дополнительный рестрикционный анализ.

Для этого был разработан подход, основанный на использовании эндонуклеаз рестрикции, имеющих сайты рестрикции в нуклеотидной последовательности только одного из четырех вышеназванных видов (специфически расщепляющих ПЦР-продукт лишь одного из вышеназванных видов с образованием паттернов рестрикции специфического размера). В каждом случае на начальном этапе исследования была проведена амплификация образцов ДНК с праймерами 5,8S и 28S. Для дифференциации видов *An.messeae*, *An.daciae* и *An.melanoon* были использованы рестриктазы *MroXI*, *SacII* и *BstEII*, а для дифференциации видов *An.messeae* и *An. artemievi* – эндонуклеазы рестрикции *BstACI* и *BsuI*.

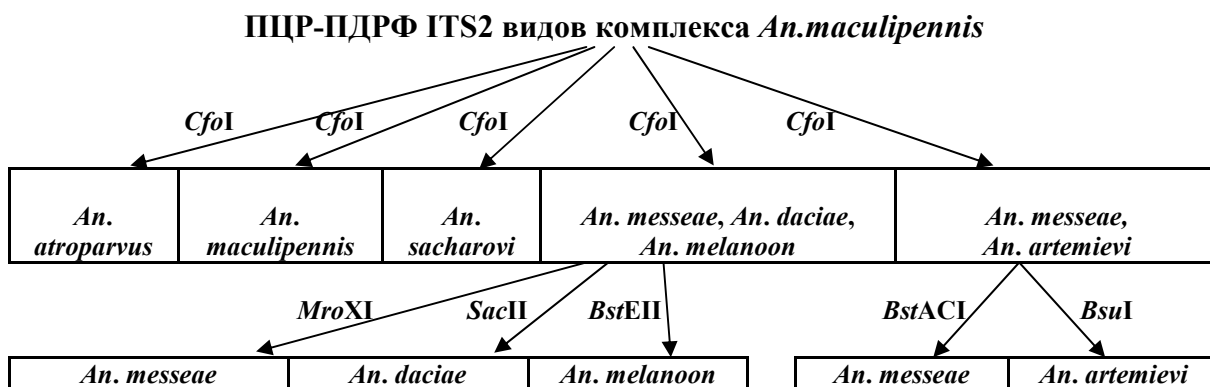


Рис.2 . Схема пошаговой рестрикции видов комплекса *An.maculipennis*.

Наши результаты показали, что дифференциацию и идентификацию видов комплекса *An.maculipennis* можно проводить с помощью методов ПЦР и ПЦР-ПДРФ с использованием в качестве маркера области второго внутреннего транскрибируемого спейсера кластера рибосомных генов (ITS2). Идентификация проводится в несколько этапов. На начальном этапе на основании размера продукта амплификации идентифицируется вид *An. beklemishevi*. Применение метода ПЦР-ПДРФ позволяет за несколько последовательных шагов идентифицировать 7 других представителей комплекса.

III.1.3.1. Первичная структура ITS2 у комаров *An. maculipennis*, *An.atroparvus*, *An.sacharovi*, *An.persiensis*, *An.artemievi*

Для изучения внутривидового индивидуального полиморфизма области второго внутреннего транскрибируемого спейсера кластера рибосомных генов было проведено секвенирование продуктов амплификации образцов ДНК *An. maculipennis*, *An.atroparvus*, *An.sacharovi*, *An.persiensis*, *An.artemievi*. Анализ хроматограмм и сравнение нуклеотидных другими последовательностей, полученных в результате секвенирования, с последовательностями, размещенными в GeneBank, выявили идентичность последовательностей в пределах каждого из изученных видов. Комары *An.maculipennis*, *An.atroparvus*, *An.artemievi*, *An.persiensis*, *An.melanoon*, *An.sacharovi* на изученной территории являются мономорфными по структуре второго внутреннего

транскрибируемого спейсера, что позволяет считать эту область генома исключительно удобным маркером для видовой диагностики видов-двойников комплекса *An. maculipennis*.

III.1.3.2. Первичная структура ITS2 у *An. messeae*

Особый интерес для исследования представляли два вида комплекса *An. maculipennis* – *An. messeae* и *An. daciae*. Последний вид описан в 2004 году. *An. daciae* был выделен из вида *An. messeae* (Linton et al., 2005). У *An. daciae* были обнаружены пять позиций, по которым нуклеотидная последовательность этой области генома вида отличалась от нуклеотидной последовательности второго внутреннего транскрибируемого спейсера комаров *An. messeae*.

Паттерны рестрикции *An. messeae* и *An. daciae* после обработки эндонуклеазой рестрикции *CfoI* не отличались. Для дифференциации видов были отобраны рестриктазы *MroXI* и *BseGI*. Эндонуклеаза *MroXI* имеет сайт рестрикции в последовательности нуклеотидов второго внутреннего транскрибируемого спейсера кластера рибосомных генов *An. messeae* в положении 161, в котором у *An. messeae* находится тимин. Для рестриктазы *MroXI* не было выявлено сайтов рестрикции в соответствующей последовательности комаров *An. daciae*, в том числе и в положении 161, поскольку у *An. daciae* в этом положении располагается аденин. Наличие аденина в положении 161 последовательности второго внутреннего транскрибируемого спейсера кластера рибосомных генов *An. daciae* приводит к возникновению сайта рестрикции эндонуклеазы *BseGI*, отобранной для идентификации этого вида и дифференциации *An. daciae* от *An. messeae*.

ПЦР-ПДРФ анализ с использованием эндонуклеаз рестрикции *MroXI* и *BseGI* был выполнен для 150 особей *An. messeae*. Паттерны рестрикции продуктов амплификации образцов ДНК 44 особей по эндонуклеазе рестрикции *MroXI* соответствовали *An. messeae*. Обработка продуктов амплификации этих особей рестриктазой *BseGI* не выявила специфических сайтов рестрикции для данной эндонуклеазы. ПЦР-ПДРФ анализ образцов ДНК 106 особей из Московской, Астраханской, Пензенской, Воронежской, Волгоградской, Ростовской областей, республики Калмыкия и Краснодарского края показал, что в геноме этих особей обнаруживаются оба варианта последовательностей, один - специфичный для *An. messeae* и второй – специфичный для *An. daciae*. Например, после обработки образцов эндонуклеазой рестрикции *MroXI* и проведения электрофореза выявлялись как фрагменты длиной 152 п.н. и 275 п.н., характерные для *An. messeae*, так и нерестрицированный продукт амплификации длиной 427 п.н., характерный для *An. daciae*.

Полученные результаты свидетельствовали либо об отсутствии репродуктивных барьеров и частых межвидовых скрещиваниях симпатрических видов, либо о наличии предкового полиморфизма *An. messeae* как особенности вида. Для выбора альтернативной гипотезы было проведено прямое секвенирование продуктов амплификации. Анализ хроматограмм образцов, имеющих паттерны рестрикции, характерные для *An. messeae* (7 особей), показал, что в изученных последовательностях обнаруживается только по одному сигналу в каждом из положений 161, 165, 167, 362, 382 (GenBank, Калмыкия: AM409762-AM409764, Астраханская область: AM409783, AM409784, Томская область: AM409775, AM409776), что соответствует нуклеотидам ТТС GG. Анализ образцов, для которых был выявлен внутригеномный полиморфизм, показал, что в положениях 161 п.н., 165 п.н., 167 п.н., 362 п.н., 382 п.н. на хроматограммах обнаруживается по два сигнала во всех или нескольких сайтах 161 п.н., 165 п.н., 167 п.н., 362 п.н., 382 п.н.

Для дальнейшего анализа были отобраны образцы, для которых внутригеномный полиморфизм был подтвержден методами ПЦР-ПДРФ и прямого секвенирования. Продукты амплификации 16 особей из Московской (2), Пензенской (1), Волгоградской (3), Астраханской (3) областей, республики Калмыкия (2) и Краснодарского края (3) были клонированы. Всего было получено и секвенировано 29 клонов. При сравнении

нуклеотидных последовательностей была выявлена их значительная изменчивость, как индивидуальная, так и внутривидовая (2,3%). Анализ только филогенетически значимых замен для образцов из центра европейской части (Московская и Пензенская области) показал, что варианты ITS2 в этих образцах соответствуют молекулярным формам 1, 2 (*An.messeae*) и 5 (*An.daciae*) согласно классификации, предложенной Ди Лука и др. (Di Luca et al. 2004) (табл.5). На юго-западе европейской части (Краснодарский край) выявлены варианты ITS2 №4 (*An.messeae*) и №5 (*An.daciae*). Варианты последовательностей образцов из юго-восточных областей европейской части (Волгоградская, Астраханская области и Калмыкия) соответствовали № 1, 2, 3, 4 (*An.messeae*) и 5 (*An.daciae*). Нами впервые были найдены еще две уникальные формы по филогенетически значимым сайтам. В трех особях (двух из Ростовской, одной из Астраханской областей) найдены комбинации нуклеотидов, характерные как для *An.messeae*, так и для *An.daciae*.

Полученные нами данные указывают на то, что европейская часть России как центр ареала и происхождения *An.messeae*, характеризуется высоким полиморфизмом первичной структуры второго внутреннего транскрибируемого спейсера кластера рибосомных генов. Наши результаты не совпадают с результатами западных исследователей (Di Luca et al., 2004; Nicolescu et al., 2004), также изучавших полиморфизм первичной структуры спейсера у комаров *An. messeae*. В цитируемых работах первичная структура ITS2 изучалась у комаров из локальных популяций, обитающих по краю ареала вида, где полиморфизм этого многокопийного элемента кластера может быть снижен и где в силу указанной причины, вероятно, представлен лишь один из вариантов последовательностей.

Таблица 5. Филогенетически значимые замены в области ITS2 у *An.messeae*

Молекулярные формы <i>An.messeae</i> (по Di Luca et al, 2004)	Европейская часть РФ
TTC AC-1	Центр TTC AC-1
ATC AC-2	ATC AC-2
ATC GG-3	ААТ AC-5
TTC GG-4= <i>An.messeae</i> s.s.	Юго-запад TTC GG -4
ААТ AC-5= <i>An.daciae</i> (Linton et al,2004)	ААТ AC-5
ААС AC-6	Юго- Восток TTC AC-1
	ATC AC-2
	TTC GG -4
	ААТ AC-5
	ATC AC
	TTC AC

Исходя из изложенного выше, можно считать неправомерным выделение *An.daciae* в качестве самостоятельного вида. Очевидно, что для *An. messeae* с его высоким инверсионным полиморфизмом, огромным ареалом и высокой пластичностью характерны внутривидовая и индивидуальная изменчивости второго внутреннего транскрибируемого спейсера, являющиеся, возможно, адаптивно значимыми для этого вида. Дальнейшие исследования изменчивости ITS2 *An.messeae* по всему ареалу помогут выявить закономерности во встречаемости разных вариантов этого маркера.

III. 2. Молекулярно-генетические особенности комаров *An. claviger*

Проведено изучение особенностей первичной структуры области второго внутреннего транскрибируемого спейсера кластера рибосомных генов у 13 комаров *An. claviger* из локальных географически удаленных популяций Абхазии, Краснодарского края и Беларуси.

Длина второго внутреннего транскрибируемого спейсера кластера рибосомных генов у исследованных комаров *An. claviger* равна 315-336 п.н. Изменчивость размера фрагмента связана с многочисленными инсерциями/делециями длиной от двух до двадцати пар нуклеотидов.

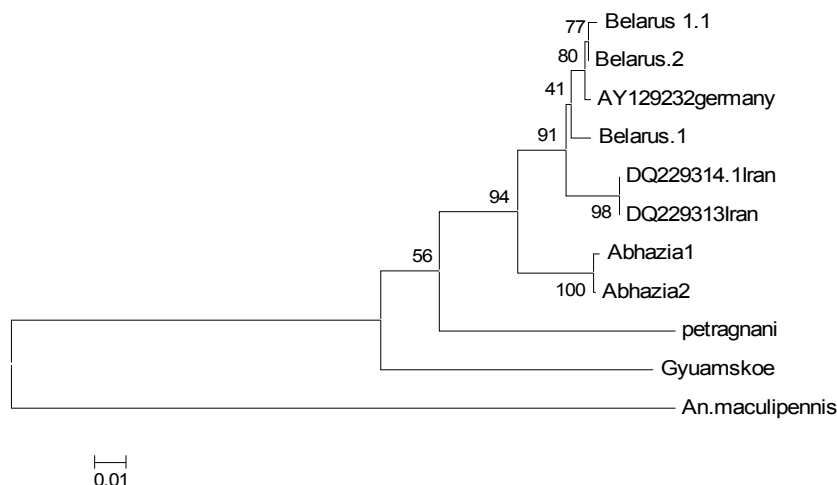


Рис. 3. Филогенетические связи между представителями комплекса *An. claviger* по данным анализа ITS2.

Филогенетический анализ, выполненный с привлечением базы данных GeneBank, позволяет выделить четыре варианта последовательностей второго внутреннего транскрибируемого спейсера кластера рибосомных генов у *An. claviger* (рис.). Три группы, которые можно назвать: западно-европейской, иранской и абхазской, образуют кластер, обособленный от кластера, сформированного единственным вариантом ITS2, обнаруженным у комара из Гуамского ущелья, и *An. petrognani* (GenBank:AY129233). В пользу высказанного предположения о наличии четырех вариантов последовательностей ITS2 у комаров *An. claviger* свидетельствует высокий уровень бутстреп поддержки (94%). Следует отметить, что каждая группа последовательностей маркируется специфическими инсерциями/делециями.

В ранних исследованиях *An. claviger* указывалось, что популяции вида различаются по признаку автогенности/неавтогенности самок. Специфическая структура последовательности ITS2 комаров из популяции Абхазии и кластеризация в отдельную группу с высокой бутстреп поддержкой являются указанием на генетическую обособленность неавтогенной популяции. Биологические характеристики, которые сопровождают подобную обособленность, могли бы существенно дополнить популяционно-генетические данные.

Особый интерес представляют данные о структуре последовательности ITS2, обнаруженной у комара из Гуамского ущелья. Статистический анализ указывает на то, что данная последовательность имеет весьма высокий уровень различия с последовательностями ITS2 *An. claviger*, описанными другими авторами (GenBank: DQ229313, DQ229314, AY129232) и нами – до 34,4 % при попарном сравнении. Различия первичной структуры ITS2 комара из Гуамского ущелья и комара близкородственного вида *An. petrognani* из Франции составили 30,5%. При попарном сравнении последовательностей ITS2 комаров из абхазской и белорусской популяций, а также немецкого и иранских вариантов с первичной структурой ITS2 *An. petrognani* различия

достигают 39,6%. Отсутствие дополнительных данных, прежде всего данных по морфологии имаго и куколок и цитогенетике, не позволяют сделать однозначного вывода о таксономическом статусе находки. Высокая изменчивость структуры второго внутреннего транскрибируемого спейсера может быть особенностью вида *An. claviger*. С другой стороны, возможно существование криптических видов в комплексе *An. claviger*.

Несмотря на вышесказанное, на современной стадии исследований представляется возможным и желательным использование данных о первичной структуре второго внутреннего транскрибируемого спейсера кластера рибосомных генов как маркера для диагностики видов *An. claviger* и *An. petrogmani*. С нашей точки зрения исключительно интересным представляется еще и возможность использования этого маркера для характеристики изменчивости локальных популяций вида *An. claviger*.

III.3. Морфологические и молекулярно-генетические особенности *An.superpictus*

Интерес к этому виду обусловлен тем, что в Иране в 2007 году были описаны три молекулярные формы, открытие которых позволило авторам предположить, что *An.superpictus* является комплексом видов-двойников. Этот вид широко распространен в среднеазиатских республиках, что создает благоприятные условия для проверки этого предположения. Мы начали исследования с морфологического анализа. Известно, что форма А не имеет темного кольца на последнем членике максиллярных щупиков, которое присутствует у формы В. Нами было просмотрено 39 самок из разных районов Туркменистана и Кыргызстана. Результаты показали, что на этих территориях преобладали морфологические типы А. Форма В была обнаружена в двух точках: в д.Сузак (Кыргызстан) - из 4-х исследованных самок 3 относились к форме В и в с.Узген 2 самки из 13 были определены как форма В.

Анализ первичной структуры области второго внутреннего транскрибируемого спейсера был проведен с использованием 28S1 обратного праймера. Сравнение полученных последовательностей с материалом из международных баз данных показал, что в исследованных районах Кыргызстана и Туркменистана распространена только одна молекулярная форма, которая соответствует форме Х, описанной в Иране. Уровень сходства оказался равен 100%. Эта молекулярная форма обнаружена также в Греции, Узбекистане, Пакистане. По нашим данным, она представлена обеими морфологическими вариантами, т.е. формой А и В.

Для изучения молекулярно-генетической структуры популяций в целях оценки уровня полиморфизма и генетического разнообразия популяций *An. superpictus* был проведен ПЦР-ПДРФ анализ области COI-COII митохондриального генома переносчика. В Туркменистане и Кыргызстане преобладал митотип Х, наряду с ним, в Туркменистане и Кыргызстане отмечен митотип Y в единичных экземплярах. Более того, было выявлено два новых гаплотипа Х1 в Туркменистане и Кыргызстане с паттернами рестрикции около 540 п.н., 420 п.н., 200 п.н., 150 п.н., 140 п.н. (1, 4 дорожки, рис. 4) и Х2 в Кыргызстане около 540, 360, 280, 150, 140 (дорожка 2, рис. 4).

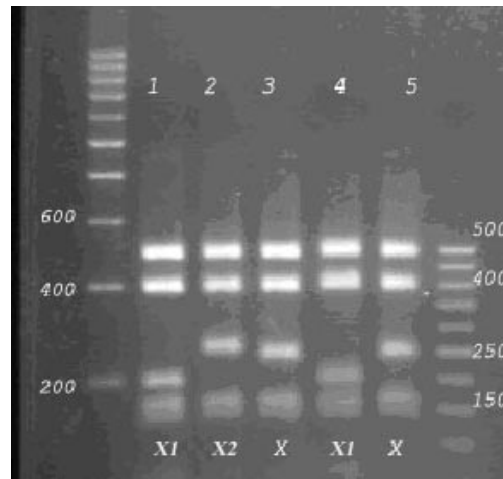


Рис. 4. Электрофореграмма результатов рестрикции области COI-COII *An. superpictus* по сайту рестрикции *AluI*. 1 - *An. superpictus* из Туркменистана (Лебапский велаят, Керки); 2,3 - *An. superpictus* г. Ташкумыр; 4,5 - *An. superpictus*, пос. Сузак (Кыргызстан).

Таким образом, исходя из полученных результатов, морфологические формы *An. superpictus* не соответствуют молекулярным формам по ITS2 и COI-II. Более того, выявлено и несоответствие митотипов и молекулярных форм по ITS2, что не подтверждает ранние исследования. Обнаружены два новых митотипа X1 (в Кыргызстане и Туркменистане) и X2 (в Кыргызстане).

ГЛАВА IV. ФАУНИСТИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Разработанный нами молекулярно-генетический подход был использован для уточнения видового состава комплекса *An. maculipennis* на территории России и сопредельных государств: Грузии, Армении, Азербайджана, Кыргызстана, Казахстана, Узбекистана, Таджикистана, Белоруссии.

При анализе 75 кладок комаров, собранных в Азербайджане в Ленкоранской низменности (с. Пенсар Астаринского р-на), в одной были обнаружены яйца, сходные по рисунку экзохориона с яйцами *An. melanoon*. Согласно данным, полученным в 30-40 г.г. и основанным на традиционных морфологических исследованиях, *An. melanoon* являлся одним из основных переносчиков малярии в Ленкоранской низменности (Киясов, 1970, 1973, Ременникова, 1953, 1958). Для определения видовой принадлежности самки, отложившей кладку, были проведены молекулярно-генетические исследования. Сравнение последовательности нуклеотидов, полученной в результате секвенирования продукта амплификации (GenBank: AM409777), с последовательностями, размещенными в банке данных GenBank, показало, что первичная структура исследованной последовательности имеет полное (100%) сходство с нуклеотидными последовательностями (GenBank: AY137847-AY137817) недавно описанного на севере Ирана вида *An. persiensis* (Sedaghat et al, 2003). Таким образом, мы впервые обнаружили на территории Азербайджана новый для фауны стран СНГ вид - *An. persiensis*. Эта находка подтвердилась при исследовании материала, полученного из соседнего района (с. Герматук Ленкоранский р-н) в 2009 г. (GenBank: FN665794). Очевидно, что ранние находки *An. melanoon* (= *subalpinus*) в Ленкоранском районе не относятся к *An. persiensis*. Последний выявлен только на юге Азербайджана и встречается с низкой частотой. Эпидемиологическое значение *An. persiensis* как переносчика малярии остается неясным.

В 2005 г. в Кыргызстане был описан *An. artemievi* (Гордеев и др., 2005). Последовательность нуклеотидов второго внутреннего транскрибируемого спейсера этого вида отличается на 9% от последовательности наиболее близкого ему вида *An. maculipennis*, а кариотипы обоих видов идентичны. Яйца *An. artemievi* похожи с яйцами

An.sacharovi и *An.martinius*. Ареал этого нового вида до настоящего времени оставался практически не изученным. Чтобы восполнить этот пробел, мы проанализировали материал, полученный из Казахстана, Кыргызстана и Узбекистана с целью выявления *An.artemievi*. Был использован метод ПЦР-ПДРФ с последующим секвенированием продуктов амплификации. В результате было показано, что *An. artemievi* в пределах Кыргызстана распространён по всему Приферганью: Джалал-Абадская обл., нижнее течение р. Нарын (гг. Кара-Куль, Ташкумыр), г. Майлуу-Суу; Ошская обл., окрестности г. Узген, предгорья Алайского хребта (Кара-Суйский р-н., пос. Лангар, Алайский р-н., пос. Гульча), Баткенская обл., пос. Кара-Токой (граница с анклавом Узбекистана Сох), вдоль границы области с Таджикистаном: пос. Кара-Бак (Баткенский р-н.), пос. Алга (Ляйлякский р-н.). Также этот вид обилён в Таласской обл. от г. Талас до пос. Кизил-Адыр (среднее течение р. Талас). Самка этого вида отмечена на западе Нарынской обл. (пос. Угют, среднее течение р. Нарын) на высоте 1600 м над у.м.

В Западном Узбекистане этот вид был обнаружен в Ферганской, Ташкентской и Кашкадарской областях. Ранее в этих регионах были отмечены *An. maculipennis* и *An. sacharovi* (Чинаев, 1945, Таджиева, 1949). Нам не удалось обнаружить эти виды в проанализированном материале. Поэтому распространение *An.maculipennis* и *An.sacharovi* на указанной территории нуждается в дополнительной проверке. Нельзя исключить, что находки этих видов относятся к *An.artemievi*.

В Таджикистане *An.artemievi* отмечен в Согдийской области (Джаббад-Расуловском районе (уч. Дехмой); окрестности Худжанд (уч. Ева); Исфаринский р-н).

An.artemievi был впервые обнаружен нами также на территории Казахстана (Южно-Казахстанская область). Проведение дальнейших исследований позволит уточнить его ареал в этой стране.

Мы также уточнили распространение *An. melanoon*, впервые применив молекулярно-генетические методы анализа. Комары этого вида были найдены в Западной Грузии и Абхазии. Ранние находки в этих республиках *An.messeae*, который был определен по окраске яиц (Каландадзе, Сагателова, 1938, Сичинава, 1973), вероятно, также соответствуют *An.melanoon*, поскольку эти виды не различаются по морфологии яиц. Распространение *An.melanoon* в Восточной Грузии пока нами не установлено, хотя ранее этот вид единично находили в Алазанской долине (Каландадзе, Сагателова, 1938). Представляется интересным в будущем с использованием методов молекулярно-генетического анализа подтвердить здесь присутствие *An.melanoon*, т.к., возможно, именно в Восточной Грузии проходит восточная граница ареала вида, а все его находки в Прикаспийской низменности относятся к *An.persiensis*. Остается нерешенным вопрос о распространении *An.melanoon* на юге РФ. Ранее его отмечали на юге Краснодарского края (Калита, 1939), в Кабардино-Балкарии (Маркович, 1936) и Дагестане (Калита, 1939). В ходе работы обнаружить этот вид не удалось.

Специальные исследования были посвящены анализу распространения основных переносчиков в Закавказье; к числу таких переносчиков относятся *An.maculipennis* и *An.sacharovi*. Результаты подтвердили данные, полученные ранее: *An.maculipennis* распространен по всей территории Грузии, а *An.sacharovi* - только в Восточной ее части (Канчавели, 1955).

Результаты изучения комплекса *An.maculipennis* в Армении согласуются с данными других исследователей. Согласно этим данным на территории Армении распространены только комары *An.maculipennis* и *An.sacharovi* (Чубкова, 1949).

Результаты молекулярно-генетического анализа, касающиеся распространения и относительной численности *An.maculipennis* и *An.sacharovi* в Азербайджане, совпадают с имеющимися в литературе сведениями (Лемер, 1948; Киясов, 1970; Ануфриева и др., 1975). *An.sacharovi* преобладает на сухих и теплых равнинах Азербайджана, *An.maculipennis* тяготеет к горным районам, а также встречается на севере страны в Самур-Дивичинской низменности.

Северная граница ареала *An.sacharovi* вероятно проходит на юге России, где его отмечали только в Дагестане (Шипицина, 1936). К сожалению, мы не имели возможность изучить фауну этой республики.

На территории России *An.maculipennis* обнаружен во всех изученных областях европейской части, что подтверждает результаты предыдущих исследований (Поликарпова, 1936; Покровский, Муратова, 1936; Беклемишев, Желоховцев, 1937; Данилова, Лаппин, 1937; Данилова, Будымко, 1938; Калита, 1937, 1938; Зима, 1964; Шаркова, 1964). Неясным пока остается вопрос о северной границе распространения *An.maculipennis*. Вероятно, *An.maculipennis* викарирует на некоторой территории с *An.beklemishevi* в районе 55-60 градусов с.ш., а далее полностью замещается *An.beklemishevi* (Новиков, Алексеев, 1989). Последний вид найден нами на территории Алтайского края, что соответствует литературным данным (Стегний, 1991, Горностаева, 1998). В азиатской части Российской Федерации распространен именно *An. beklemishevi*, которого ранее не отличали от *An. maculipennis* из-за сходства в окраске яиц (Стегний, 1991).

An.atroparvus чаще встречается в приморской части Ростовской обл. и севера Краснодарского края; на восток доходит вплоть до Волгоградской области, и на юг – до Черкесска и Гудаутского р-на (с. Приморский) Абхазии, что соответствует литературным данным (Беклемишев, Желоховцев, 1937; Данилова, Лаппин, 1937; Калита, 1937, 1938). Несмотря на довольно большой проанализированный материал из Белоруссии, этот вид не был найден нами в этой стране, хотя ранее *An.atroparvus* там отмечали (Волкова, 2006).

An.messeae является самым распространенным видом в Палеарктике, он отмечен нами во всех исследованных регионах на территории России и Белоруссии. Остается нерешенным вопрос о самой южной границе его ареала на территории европейской части РФ. Вероятно, уже начиная от Адлера- 43°4`с.ш. распространен только *An.melanoon*, который проникает далее в страны Закавказья. На территории Средней Азии в соответствии с полученными нами данными *An.messeae* распространен в Иссык-Кульской обл. (гг. Балыкчи, Чолпон-Ата, Караколь), на севере Нарынской обл. (пос. Кочкорка, наиболее высокая точка, где нами встречен данный вид - 1879 м н.у.м.), в Чуйской обл. (пос. Мраморное, окрестности аэропорта "Манас"). Не обнаружен в Таласской области и не проникает в южный регион Кыргызстана.

ВЫВОДЫ

1. В результате исследований уточнен видовой состав комплекса *An.maculipennis*: на территории России выявлено 4 вида (*An.atroparvus*, *An.beklemishevi*, *An.maculipennis*, *An.messeae*), в Ближнем зарубежье - 7 (*An.atroparvus*, *An.artemievi*, *An.maculipennis*, *An.melanoon*, *An.messeae*, *An. persiensis*, *An.sacharovi*). Впервые обнаружен новый для фауны стран СНГ вид - *An. persiensis*. Доказана неправомочность выделения *An.daciae* в качестве самостоятельного вида.
2. На основании анализа кариотипов *An.messeae* на территории Русской равнины выделены три зоны: центральная, юго-восточная и юго-западная. Комары центральной зоны характеризуется более высоким уровнем инверсионного полиморфизма по всем хромосомам, кроме плеча 3L. Для комаров южной зоны отмечена высокая частота инверсии XL₀, наблюдается полное отсутствие гомо- и гетерозигот по инверсии 2R₁ и высокая доля особей с инверсией 3L₁. Особенностью комаров юго-восточной зоны является увеличение частоты гомо- и гетерозигот по инверсиям 3R₁ и 3L₁.
3. По первичной структуре второго внутреннего транскрибируемого спейсера *An.maculipennis*, *An.atroparvus*, *An.artemievi*, *An.persiensis*, *An.melanon*, *An.sacharovi* мономорфны на изученной территории, *An.messeae* является полиморфным на внутривидовом и внутригеномном уровнях. Разработан молекулярно-генетический ключ для идентификации видов комплекса *An.maculipennis*.

4. На Европейской части России, Абхазии и Беларуси комплекс *An.claviger* представлен единственным видом - *An.claviger*. Для вида характерен инсерционно-делеционный внутривидовой и внутригеномный полиморфизм первичной структуры второго внутреннего транскрибируемого спейсера кластера рибосомных генов.
5. Выявленные на территории Кыргызстана и Туркменистана морфологические формы и митотипы *An.superpictus* не соответствуют молекулярным формам по ITS2 и COI-II. Обнаружены два новых митотипа X1 (в Кыргызстане и Туркменистане) и X2(в Кыргызстане).
6. Уточнены ареалы *An.messeae*, *An.artemievi*, *An.melanoon* и *An.sacharovi*. Южная граница распространения *An.messeae* проходит по территории Южного Казахстана и северного Кыргызстана; северная граница ареала *An.artemievi* находится на территории южного Казахстана, а северная граница ареала *An. persiensis* доходит до Ленкоранской низменности на территории Азербайджана. Подтверждены ареалы *An.melanoon*, *An.sacharovi*, *An.messeae*, *An.maculipennis*, *An.atroparvus*.

ПУБЛИКАЦИИ ПО МАТЕРИАЛАМ ДИССЕРТАЦИИ

1. **Bezzhonova OV**, Goryacheva II. Intragenomic heterogeneity of rDNA internal transcribed spacer 2 in *Anopheles messeae* (Diptera: Culicidae)// J Med Entomol. 2008 May;45(3):337-41.
2. Gordeev M., Zvantsov A., Goriacheva I., Shaikevich E., **Bezzhonova O.V.** Mosquitoes of the genus *Anopheles* (Diptera, Culicidae) in countries of the WHO European Region confronted with resurgence of malaria // World Health Organization Regional Office for Europe, Copenhagen. 2008. 34 p.
3. **Безжонова О.В.**, Бабуадзе А., Гордеев М. И., Горячева И. И., Званцов А. Б., Ежов М. Н.,Имнадзе П., Иосава М., Курцикашвили Г. Малярийные комары комплекса *Anopheles maculipennis* (Diptera, Culicidae) Грузии // Мед. паразитол. 2008. Вып.3:32-6.
4. **Безжонова О.В.**, Горячева И.И. Изучение видового состава комаров комплекса *Anopheles maculipennis* (Diptera, Culicidae) юга европейской части России и стран Закавказья // В сб.: Тезисы I Всероссийское Совещание по проблемам изучения кровососущих насекомых (Санкт-Петербург, Россия, 24-27 октября 2006 г.) Санкт-Петербург: Изд-во ЗИН, 2006. - С. 20-22.
5. **Безжонова О.В.**, Иваницкий А.В., Федорова М.В. Ночная активность нападения комаров (Diptera, Culicidae) в Волгограде и его окрестностях // Мед. паразитол. 2004. Вып. 4. С. 5-27.
6. Гордеев М.И., **Безжонова О.В.** , Горячева И.И., Шайкевич Е.В., Званцов А.Б., Мамедов С., Мутдалибов Н., Гасымов Э., Ежов М.Н. Молекулярно-генетический анализ малярийных комаров комплекса *Anopheles maculipennis* (Diptera, Culicidae) Азербайджана // Мед. паразитол. 2010. Вып. 4:43-5.
7. Горячева И.И., Званцов А. Б., Гордеев М. И., **Безжонова О.В.** , Усенбаев Н.Т., Ежов М. Н. Изучение переносчиков малярии в Кыргызстане *An. superpictus*, *An. messeae* и *An. artemievi* методами ПЦР-ПДРФ и прямого секвенирования // Мед. паразитол. 2011. Вып. 1:34-8.
8. Кешишьян А. , Гордеев М. И., **Безжонова О.В.** , Горячева И.И. , Шайкевич Е.В., Званцов А. Б. , Ежов М. Н. Генетический анализ малярийных комаров комплекса *Anopheles maculipennis* (Diptera, Culicidae) Армении// Мед. паразитол. 2009. Вып. 3. С. 24 - 28

9. Лопатина Ю.В., **Безжонова О.В.**, Федорова М.В., Булгакова Т.В., Платонов А.Е. Комплекс кровососущих комаров (Diptera, Culicidae) в очаге лихорадки Западного Нила в Волгоградской области. III Виды, питающиеся на птице и человеке, и ритмы их ночной активности. // Мед. паразитол. 2007. Вып. 4. :37-43.
10. Львов Д.Н., Щелканов М.Ю., Джаркенов А.Ф., Галкина И.В., Колобухина Л.В., Аристова, В.А., Альховский С.В., Прилипов А.Г., Самохвалов Е.И., Дерябин П.Г., Воронина Ф.Г., Васильев А.В., **Безжонова О.В.**, Львов Д. К. Популяционные взаимодействия вируса Западного Нила (Flaviviridae, Flavivirus) с членистоногими переносчиками, позвоночными животными, людьми в среднем и нижнем поясах дельты Волги, 2001-2006 гг. // Вопросы вирусологии. 2009. №.54. Вып.2. С.36-43.
11. Платонова О.В., Федорова М.В., Лопатина Ю.В., **Безжонова О.В.**, Булгакова Т.В., Платонов А.Е. Комплекс кровососущих комаров (Diptera, Culicidae) в очаге лихорадки Западного Нила в Волгоградской области. II Особенности питания комаров в разных биотопах // Мед. паразитол. 2007. Вып. 2.:49-52.
12. Федорова М.В., Лопатина Ю.В., **Безжонова О.В.**, Платонов А.Е. Комплекс кровососущих комаров (Diptera, Culicidae) в очаге лихорадки Западного Нила в Волгоградской области. I Видовой состав, сезонный ход численности // Мед. паразитол. 2007. Вып. 1:41-6.
13. Федорова М.В., **Безжонова О.В.**, Щелканов М.Ю., Львов Д.Н., Бушкиева Б.Ц., Куликова Л.Н. Орнитофильные комары (Diptera, Culicidae) России // В сб.: Тезисы XII Международной орнитологической Конференции (Ставрополь, Россия, 31 января – 5 февраля 2006 г.). – Ставрополь: Изд-во СГУ, 2006.– С.528.
14. Федорова М.В., **Безжонова О.В.**, Щелканов М.Ю. Орнитофильные комары Северо-Западного Прикаспия: видовой состав и сезонный ход численности // В сб.: Тезисы XII Международной орнитологической Конференции (Ставрополь, Россия, 31 января – 5 февраля 2006 г.). – Ставрополь: Изд-во СГУ, 2006. – С. 526-528.
15. Яшкова С.Е., Пашкович В.В., Себут Н.С., Самойлова Т.И., Ерофеева Н.И., Верещак Н.С., Волкова Т.В., Якович М.М., Сибатаев А.К., Храброва Н.В., Бухарская Е.Д., **Безжонова О.В.**, Камлюк Г.Г. Энтомологический надзор за акаро-энтомофауной и другими биологическими объектами, имеющими энтомологическое значение в республике Беларусь. Информационно-аналитический бюллетень ГУ «Республиканский центр гигиены, эпидемиологии и общественного здоровья» Министерства здравоохранения Республики Беларусь. 2008. Минск. 36 с.