

На правах рукописи

Храброва Наталья Валерьевна

МОЛЕКУЛЯРНО – ГЕНЕТИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ КОМАРОВ КОМПЛЕКСА *CULEX*
PIPIENS
(DIPTERA: CULICIDAE)

03.00.15 – генетика

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Томск – 2006

Работа выполнена в Научно – исследовательском институте биологии и биофизики при Томском государственном университете

Научный руководитель: доктор биологических наук,
профессор В.Н. Стегний

Официальные оппоненты: доктор биологических наук

В.А. Степанов

кандидат биологических наук

А.В. Симакова

Ведущая организация: Институт цитологии и генетики СО РАН (г. Новосибирск)

Защита диссертации состоится «18» мая 2006 г. в 10 часов на заседании диссертационного совета Д 212.267.10 в Томском государственном университете по адресу: 634050 г. Томск, пр. Ленина, 36

С диссертацией можно ознакомиться в Научной библиотеке Томского государственного университета

Автореферат разослан «14» апреля 2006 г.

Ученый секретарь

диссертационного совета

кандидат биологических наук

Е.Ю. Просекина

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы. Комары комплекса *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) представляют большой научный и практический интерес. Они являются активными кровососами людей и известны как переносчики возбудителей ряда опасных заболеваний человека. Высокая экологическая пластичность, сложная таксономическая структура и характер взаимоотношений между членами комплекса привлекают постоянное внимание исследователей (Виноградова, 1997).

Culex pipiens L., 1758 – северный обыкновенный комар, включает в себя две формы или экотипа, *pipiens* и *molestus*, для которых характерно симпатрическое распространение, небольшие морфологические и значительные биологические отличия (Виноградова, 1961, 1997; Лопатин, 2000). Единственным достоверным морфологическим признаком, позволяющим идентифицировать *pipiens* и *molestus*, является величина сифонального индекса личинок.

Culex torrentium Martini, 1924 считается видом – двойником *Culex pipiens*, литературные сведения о нем фрагментарны, не определены и границы ареала (Natvig, 1948; Mattingly, 1951a; Service, 1968; Jupp, 1979; Gillies, Gubbins, 1982; Dahl, 1988). Морфологически *C. torrentium* и *C. p. pipiens* близки, распространение симпатричное. В биологическом отношении *C. torrentium* также похож на *C. p. pipiens* – неавтогенный, эвригамный и гетеродинамный комар (Dahl, 1988; Виноградова, 1997). По личинкам виды не различимы, определение ведется только по самцам, диагностическое значение имеют особенности строения гипопигия (Виноградова, 1997).

Исследования представителей рода *Culex* приобрели особое значение в связи с возникновением трех крупных эпидемий западнонильской лихорадки (West Nile virus) в урбанизированных районах на юге Румынии (Tsai, Popovici, Cernescu et al., 1998), в дельте Волги в России (Lvov, Butenko, Gromashevsky et al., 2000; Platonov, Shipulin, Shipulina et al., 2001) и на северо – востоке США (Lanciotti, Roehrig, Deubel et al., 1999) в 1996 – 1999 гг. Основным признаком, объединяющим эти эпидемии, явилось вовлечение *Culex pipiens* в передачу возбудителя заболевания (Hayes, 2001).

Надежная и быстрая идентификация комаров необходима для дифференцировки форм и лучшего понимания их потенциальной роли в передаче возбудителей заболеваний, а также для разработки эффективных мер контроля. Кроме того, возможность точной идентификации видов или подвидов позволяет изучить другие аспекты биологии, например, особенности личиночной экологии, брачного поведения, устойчивости к инсектицидам (Walton, Sharpe, Pritchard et al., 1999; Kengne, Trung, Baimai et al., 2001; Manguin, Kengne, Sonnier et al., 2002). Морфологические признаки, особенно, если они носят количественный характер, не всегда удобно использовать для этих целей, т.к. часто они подвержены индивидуальной, географической, комбинативной и модификационной изменчивости. Для облегчения идентификации криптических видов комаров широко применяются разнообразные молекулярно – генетические методы в дополнение к традиционным морфологическим (Wilkerson, Parsons, Albright et al., 1993). ДНК – маркеры можно использовать для идентификации организма на любой стадии развития; эти маркеры не подвержены изменчивости, вызванной действием факторов окружающей среды (Hoy, 1994; Walton, Sharpe, Pritchard et al., 1999), что позволяет избежать недостатков, присущих морфометрическим признакам.

Цели и задачи исследования. Цель данной работы заключалась в поиске молекулярно – генетических маркеров для идентификации представителей комплекса *Culex pipiens* и оценке внутри – и межвидовой изменчивости *Culex torrentium*, *C. pipiens pipiens*, *C. p. molestus*. Для достижения поставленной цели требовалось выполнить следующие задачи:

1. Провести анализ спектров амплифицированных RAPD – фрагментов ДНК для выявления мономорфных специфических последовательностей ДНК
2. Определить нуклеотидные последовательности специфических RAPD – фрагментов ДНК для создания SCAR – праймеров
3. Проверить диагностическую ценность молекулярно – генетических маркеров, предложенных другими авторами для идентификации представителей комплекса *Culex pipiens*
4. Провести секвенирование и сравнение последовательностей второго интрона гена ацетилхолинэстеразы 2 и участка митохондриального гена субъединицы I цитохромоксидазы *c* у особей *C. p. pipiens* и *C. p. molestus* с целью выявления различий, пригодных для получения молекулярно – генетических маркеров
5. Оценить внутри – и межвидовую изменчивость и дивергенцию RAPD – маркеров у членов комплекса *Culex pipiens*

Научная новизна. Впервые были найдены специфические RAPD – маркеры для идентификации *C. torrentium*. Определение нуклеотидной последовательности RAPD – фрагментов позволило создать специфические SCAR – праймеры. ПЦР с использованием SCAR – праймеров является простым,

быстрым и надежным методом идентификации *C. torrentium*. В ходе работы также была изучена диагностическая ценность маркеров, предложенных другими авторами для идентификации *C. p. molestus* и *C. torrentium* (Виноградова, Шайкевич, 2005), *C. p. pipiens* и *C. torrentium* (Smith, Fonseca, 2004). Показано, что эти маркеры позволяют идентифицировать особей *C. torrentium*, в то время как, *C. p. pipiens* и *C. p. molestus* идентичны по этим маркерам. Выявлено соответствие результатов при использовании различных типов молекулярно – генетических маркеров. Впервые предложен способ идентификации гибридных особей от скрещивания *C. torrentium* и *C. p. molestus*.

Проведен анализ изменчивости RAPD – маркеров в популяциях *C. p. pipiens*, *C. p. molestus* и *C. torrentium* из г. Томска, Томской области и Республики Казахстан. Полученные результаты позволили сделать вывод о генетической дифференциации *C. torrentium*, *C. p. pipiens* и *C. p. molestus* и об отсутствии природной гибридизации между ними в районе проведенных исследований. Кроме того, показано, что в открытых личиночных биотопах (Томская область и Республика Казахстан) доминантным видом является *C. torrentium*; личинки *C. p. pipiens* встречаются с небольшой частотой.

Практическая ценность работы. Молекулярно – генетические маркеры, рассмотренные в настоящей работе, можно использовать в любых исследованиях, где необходима надежная идентификация *C. torrentium* и *C. p. pipiens*, в частности, при изучении устойчивости к инсектицидам, путей передачи возбудителей заболеваний, при разработке новых методов контроля за численностью переносчиков, для анализа гибридогенеза, а также, в популяционно – генетических, таксономических, филогенетических и фаунистических исследованиях. Принципы поиска и создания специфичных маркеров (RAPD– и SCAR – маркеры), изложенные в диссертации, можно применять для получения диагностических маркеров практически для любого организма.

Апробация результатов работы. Результаты исследований были представлены на II Международной конференции «Проблема вида и видообразования», Томск (2001); на III Съезде Вавиловского общества генетиков и селекционеров, Москва (2004); на III Международной конференции «Проблема вида и видообразования», Томск (2004).

Публикации. По теме диссертации опубликовано шесть работ.

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из введения, четырех глав, выводов, списка цитируемой литературы. Работа изложена на 118 страницах машинописного текста, включает 7 таблиц, 17 рисунков. Список литературы содержит 164 источника, в том числе 137 на иностранном языке.

1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

В главе на основе отечественных и зарубежных литературных источников обобщены данные о комплексе *Culex pipiens*. Особое внимание уделено *C. p. pipiens* и *C. p. molestus*. Подробно рассматриваются особенности биологии и экологии, а также проблема гибридизации между *C. p. pipiens* и *C. p. molestus*. Также приведены данные по биологии *C. torrentium*.

Кроме того, в литературном обзоре подробно обсуждается возможность использования различных типов молекулярно – генетических маркеров для видовой диагностики; наибольшее внимание уделено RAPD – и SCAR – маркерам, а также маркерам мтДНК и ITS2 регионам рДНК.

2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

2.1. Материал

В работе использовалась ДНК, выделенная из личинок комаров IV стадии. Сбор личинок проводили по стандартной методике. Личинки *Culex pipiens pipiens* и *C. torrentium*, были отловлены в открытых естественных водоемах и цистернах для сбора дождевой воды, личинки *C. p. molestus* – в затопленных подвальных помещениях городских зданий, личинки *C. territans* и *C. modestus* – в естественном водоеме (Таблица 1). Личинки фиксировались в 96% - ом этаноле.

| Вид / подвид (форма) | n | Место сбора | Тип водоема | Дата сбора |
|--|----|---|-------------|------------|
| <i>C. torrentium</i> и <i>C. p. pipiens</i> | 48 | РК, г. Алматы | Е, О | 24.08.1999 |
| <i>C. torrentium</i> | 48 | ТО, с. Белоусово | И, О | 30.07.2000 |
| <i>C. torrentium</i> | 48 | ТО, д. Михайловка | И, О | 11.06.2003 |
| <i>C. torrentium</i> и <i>C. p. pipiens</i> | 48 | ТО, с. Моряковский Затон | И, О | 03.08.2003 |
| <i>C. torrentium</i> | 48 | РК, с. Аксаковка | Е, О | 05.08.2003 |
| <i>C. torrentium</i> | 48 | РК, с. Науалы | Е, О | 08.08.2003 |
| <i>C. torrentium</i> | 48 | ТО, Керамический завод | И, О | 13.08.2003 |
| <i>C. torrentium</i> | 48 | ТО, Керамический завод | И, О | 05.07.2004 |
| <i>C. torrentium</i> | 48 | РК, г. Алматы 1 | И, О | 08.08.2004 |
| <i>C. torrentium</i> | 48 | РК, г. Алматы 2 | И, О | 08.08.2004 |
| <i>C. torrentium</i> | 24 | г. Томск, ул. Короленко, 15 | Е, О | 12.07.2004 |
| <i>C. torrentium</i> | 24 | г. Томск, ул. Короленко, 15 | Е, О | 16.06.2005 |
| <i>C. p. pipiens</i> | 48 | РК, г. Семипалатинск | И, О | 16.08.2004 |
| <i>C. p. molestus</i> | 48 | г. Томск, ул. Тимакова, 3 | И, 3 | 28.06.2000 |
| <i>C. p. molestus</i> | 48 | г. Томск, ул. Тимакова, 3 | И, 3 | 15.07.2001 |
| <i>C. p. molestus</i> | 48 | г. Томск, ул. Яковлева, 14 | И, 3 | 21.07.2000 |
| <i>C. p. molestus</i> | 48 | г. Томск, ул. Алтайская, 78/2 | И, 3 | 03.08.2003 |
| <i>C. p. molestus</i> | 48 | г. Томск, ул. Тимакова, 3 | И, 3 | 24.09.2003 |
| <i>C. p. molestus</i> | 24 | г. Томск, ул. Алтайская, 78/2 | И, 3 | 07.07.2004 |
| <i>C. p. molestus</i> | 24 | г. Томск, ул. Короленко, 15 | И, 3 | 12.07.2004 |
| <i>C. p. molestus</i> | 48 | г. Томск, ул. Иркутский тракт, 104 | И, 3 | 17.12.2004 |
| <i>C. p. molestus</i> | 48 | РК, г. Сарышаган | И, 3 | 09.02.2005 |
| F1: ♀♀ <i>C. p. molestus</i> x ♂♂ <i>C. torrentium</i> | 36 | Лаборатория | ---- | 15.09.2003 |
| F1: ♀♀ <i>C. p. molestus</i> x ♂♂ <i>C. torrentium</i> | 48 | Лаборатория | ---- | 23.09.2003 |
| F1: ♀♀ <i>C. p. molestus</i> x ♂♂ <i>C. torrentium</i> | 24 | Лаборатория | ---- | 26.06.2004 |
| <i>C. territans</i> | 48 | г. Томск, коммунальный мост через р. Томь | Е, О | 24.08.2003 |
| <i>C. modestus</i> | 48 | г. Томск, коммунальный мост через р. Томь | Е, О | 24.08.2003 |

Таблица 1 – Выборки комаров, использованные в работе

Примечание. Тип водоема: Е – естественный; И – искусственный; О – открытый; 3 – закрытый; n – объем выборки; РК – Республика Казахстан, ТО – Томская область

2.2. Методы

При выполнении работы применялись следующие методы: выделение ДНК, RAPD – ПЦР, ПЦР со специфичными праймерами, электрофоретическое разделение продуктов амплификации, рестрикция, клонирование и секвенирование. Праймеры, использованные в работе, представлены в таблице 2. Для обработки полученных результатов использовали пакеты программ SeqMan™ 4.02, PrimerSelect™ 4.01, FinchTV 1.3.1, POPGENE©1.32, TreeView©1.6.6, STATISTICA©6.0, Adobe®Photoshop® 7.0.

Таблица 2 – Праймеры, использованные в работе

| Праймер | Последовательность праймера, 5' → 3' | Продукт амплификации |
|-----------------------------|--|---|
| SCARcp1 SCARcp2 | CCCTTACGCACGGAGAAA СТААСАААГТАСТСССТСАА | Специфичный RAPD – фрагмент (SCAR – маркер) |
| SCARcp3 SCARcp4 | ATTTGGATTGGACTTTCTATTTA TTGAATTTTGACATGACGGTTTTT | Специфичный RAPD – фрагмент (SCAR – маркер) |
| UEA9 UEA10 | GТАААССТААСАТТТТТСССТСААСА ТССААТГСАСТААТСТГССАТАТТА | Участок митохондриального гена субединицы I цитохромоксидазы <i>c</i> |
| 5.8S 28S 5.8Sa | TGTGAACTGCAGGACACATG ATGCTTAAATTTAGGGGGTA ATCACTCGGCTCGTGGATCGAT | ITS2 регион рДНК |
| ACEp1p ACEtorr B1246s | GGAACAACGACGTATGТАСТ TGCCTGTGCTACCAGTGATGTT TGGAGCCTCCTCTCACGG | Участок второго интрона гена ацетилхолинэстеразы 2 |

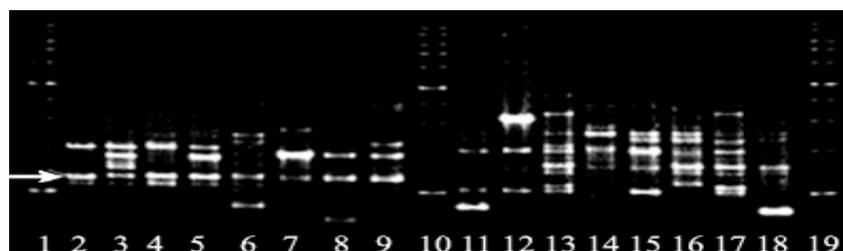
3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Использование молекулярно – генетических маркеров для идентификации представителей комплекса *Culex pipiens*

3.1.1. RAPD – маркеры

Скрининг двадцати шести RAPD – праймеров показал, что для идентификации *C. torrentium* и *C. p. pipiens* можно использовать фрагменты ДНК, амплифицирующиеся RAPD – праймерами OPB – 02 и OPA – 11. В спектре фрагментов ДНК, амплифицированных праймером OPB – 02 (5' – TGATCCCTGC – 3'), был выявлен мономорфный бэнд, размером 1183 п.н. (по данным секвенирования), идентифицирующий *C. torrentium* (Рисунок 1А).

А



В

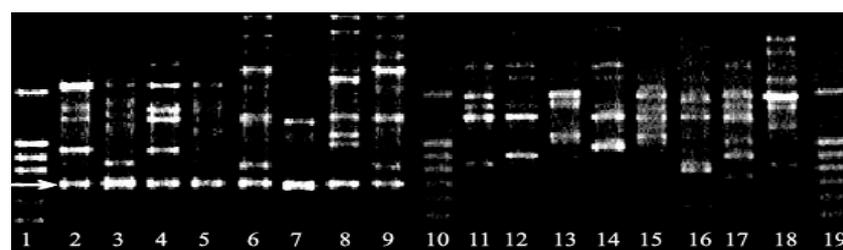


Рисунок 1 – Результаты амплификации ДНК с использованием RAPD – праймеров OPB – 02 (А) и OPA – 11 (В)

Примечание. Специфичные для *C. torrentium* фрагменты ДНК обозначены стрелками. Дорожки 2 – 9 – *C. torrentium*. Дорожки 11 – 13 – *C. p. pipiens*; дорожки 14 – 18 – *C. p. molestus*. Дорожки 1, 10, 19 ДНК маркеры: 1kb (10, 8, 6, 5, 4, 3, 2.5, 2, 1.5, 1, 0.75, 0.5, 0.25 т.п.н.) (А), 100bp + 1,5kb (1.5, 1, 0.9, 0.8, 0.7, 0.6, 0.5, 0.4, 0.3, 0.2, 0.1 т.п.н.) (В)

На рисунке 1В представлены результаты амплификации с использованием праймера ОРА – 11 (5' – СААТСГСССГТ – 3'). В паттерне *C. torrentium* четко выявляется специфичный фрагмент ДНК, размером 680 п.н. (по данным секвенирования), отсутствующий в спектре амплифицированных фрагментов ДНК *C. p. pipiens* и *C. p. molestus*.

Маркеры не подвержены внутри – и межпопуляционной изменчивости, они представлены в спектрах RAPD – фрагментов у всех особей *C. torrentium* всех изученных популяций, но отсутствуют в спектрах амплифицированных фрагментов ДНК *C. p. pipiens* и *C. p. molestus*, т.е., присутствие RAPD – маркера среди продуктов амплификации характеризует особей *C. torrentium*, а его отсутствие – особей *C. p. pipiens* и *C. p. molestus*. Таким образом, использование RAPD – маркеров позволяет надежно идентифицировать особей *C. torrentium*. Метод является простым и быстрым в исполнении. Любому исследователю необходим лишь навык в анализировании RAPD – спектров, остальные моменты RAPD – идентификации *C. torrentium*, не вызывают затруднений.

3.1.2. SCAR – маркеры

Специфичные RAPD – бэнды были клонированы и секвенированы (данные не показаны). Определение последовательности нуклеотидов позволило подобрать специфичные SCAR – праймеры. Праймеры SCARcp1 и SCARcp2 (Таблица 2) были созданы на основе нуклеотидной последовательности фрагмента, размером 1183 п.н., амплифицированного RAPD – праймером ОРВ – 02. Праймеры SCARcp3 и SCARcp4 (Таблица 2) – на основе последовательности RAPD – фрагмента, размером 680 п.н. (RAPD – праймер ОРА – 11); Результатом использования SCAR – праймеров является амплификация одного специфичного фрагмента ДНК (SCAR – маркера).

В ходе SCAR – ПЦР с праймерами SCARcp1 и SCARcp2 у особей *C. torrentium* и гибридов между ♀♀ *C. p. molestus* и ♂♂ *C. torrentium* амплифицируется фрагмент ДНК, размером 1093 п.н.; особи *C. p. pipiens* и *C. p. molestus* характеризуются отсутствием амплификации фрагмента ДНК соответствующего размера (Рисунок 2А). Использование праймеров SCARcp3 и SCARcp4 приводит к амплификации фрагмента ДНК, размером 474 п.н. у особей *C. torrentium* и гибридов между ♀♀ *C. p. molestus* и ♂♂ *C. torrentium*; у особей *C. p. pipiens* и *C. p. molestus* данный фрагмент ДНК не амплифицируется (Рисунок 2В).

SCAR – маркеры являются специфичными, т.к. не подвержены внутри – и межпопуляционной изменчивости. Применение SCAR – маркеров позволяет усовершенствовать метод RAPD – идентификации *C. torrentium*, сделать его доступным широкому кругу исследователей, т.к. в случае использования SCAR – маркеров отпадает необходимость в анализе набора фрагментов ДНК разных размеров. Однако, эти маркеры

А



В

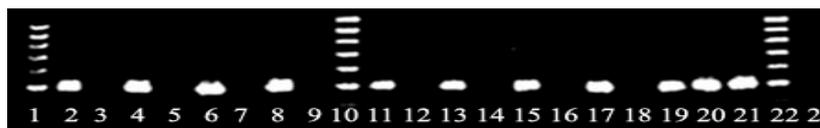


Рисунок 2 – Результаты амплификации ДНК с использованием праймеров SCARcp1 и SCARcp2 (А), SCARcp3 и SCARcp4 (В)

Примечание. Дорожки 2, 4, 6, 8, 11, 13, 15, 17 – *C. torrentium*; дорожки 3, 5, 7 – *C. p. pipiens*; дорожки 9, 12, 14, 16, 18 – *C. p. molestus*; дорожки 19 – 21 – F1: ♀♀ *C. p. molestus* x ♂♂ *C. torrentium*. Дорожка 23 – негативный контроль, дорожки 1, 10, 22 – ДНК маркеры: 1,5 kb + 100 bp (А) и 100 bp (1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100 п.н.) (В)

не позволяют идентифицировать гибридов, т.к. гибридные особи от скрещивания ♀♀ *C. p. molestus* x ♂♂ *C. torrentium* идентичны по SCAR – маркерам особям *C. torrentium*.

3.1.3. ITS2 регионы рибосомальной ДНК

По данным Виноградовой и Шайкевич (2005), размер ПЦР фрагментов ДНК *C. torrentium* и *C. p. molestus*, полученных в результате амплификации с праймерами, фланкирующими ITS2 регион, составляет приблизительно 410 п.н. и 460 п.н., соответственно, т.е. различие между ними достигает 50 п.н. На рисунке 3 представлены результаты амплификации ITS2 регионов рДНК с использованием праймеров 5.8S и 28S (Таблица 2). Размеры амплификатов равны около 410 п.н. у *C. torrentium* и около 460 п.н. у *C. p. pipiens* и *C. p. molestus*. В рДНК гибридных особей от скрещивания ♀♀ *C. p. molestus* x ♂♂ *C. torrentium* представлены оба варианта (материнский и отцовский) ITS2 регионов (Рисунок 3).

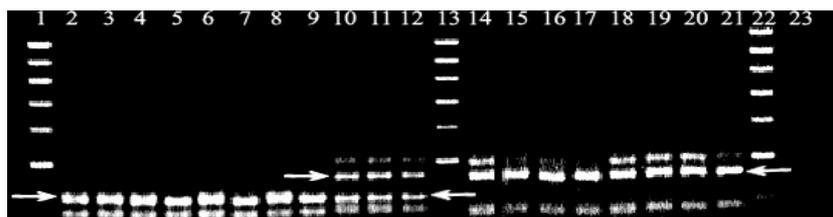


Рисунок 3 – Результаты амплификации ITS2 регионов рДНК с использованием праймеров 5.8S и 28S

Примечание. Специфичные продукты амплификации обозначены стрелками. Дорожки 2 – 9 – *C. torrentium*; дорожки 10 – 12 – F1: ♀♀ *C. p. molestus* x ♂♂ *C. torrentium*; дорожки 14 – 16 – *C. p. pipiens*; дорожки 17 – 21 – *C. p. molestus*; дорожка 23 – негативный контроль; дорожки 1, 13, 22 – 100 bp ДНК маркер

Следует отметить, что размеры амплифицированных фрагментов не соответствуют размерам ITS2 регионов, т.к. в состав амплификатов входят также области генов 5.8S и 28S рРНК, фланкирующие ITS2 регионы. За вычетом фланкирующих участков, размер ITS2 регионов *C. torrentium*, *C. p. pipiens* и *C. p. molestus* из изученных мест сбора (г. Томск, Томская область и Республика Казахстан) составляет около 257 п.н., около 307 п.н. и около 307 п.н., соответственно, что согласуется с литературными данными (Miller, Crabtree, Savage, 1996).

Использование праймеров, фланкирующих ITS2 регионы, позволяет идентифицировать особей *C. torrentium* и *C. p. pipiens* или *C. p. molestus*, а также гибридов от скрещивания ♀♀ *C. p. molestus* x ♂♂ *C. torrentium*. К сожалению, не удалось изучить наследование молекулярно – генетических маркеров у гибридных особей от скрещивания ♀♀ *C. torrentium* и ♂♂ *C. p. molestus*, т.к. не было получено потомков от такого типа скрещивания. Однако, можно предположить, что у этих гибридов, также как у гибридов от скрещивания *C. p. pipiens* и *C. torrentium* будут представлены два типа ITS2 регионов.

3.1.4. Участок гена субъединицы I цитохромоксидазы *c*

Анализ последовательностей участка митохондриального гена субъединицы I цитохромоксидазы *c* (COI), проведенный Виноградовой и Шайкевич (2005), показал, что эти последовательности отличаются у *C. torrentium* и *C. p. molestus* шестью заменами нуклеотидов, которые не нарушают функции гена цитохромоксидазы I. Одна из замен расположена в сайте узнавания рестриктазы SspI (AAT'ATT). Метод идентификации *C. torrentium* и *C. p. molestus*, предложенный этими авторами, заключается в обработке рестриктазой SspI амплифицированного участка гена COI, размером 311 п.н. (Виноградова, Шайкевич, 2005).

Для амплификации участка гена COI использовали праймеры UEA9 и UEA10 (Otranto, Traversa, Guida et al., 2003) (Таблица 2). Амплифицированный участок ДНК, размером 311 п.н. после обработки рестриктазой SspI у *C. torrentium* оставался неизменным, в то время как у *C. p. pipiens* и *C. p. molestus* он разрезался рестриктазой на два фрагмента, размером 220 и 90 п.н. (Рисунок 4), т.е., особи *C. p. pipiens* и *C. p. molestus* идентичны по этому маркеру, но отличаются от особей *C. torrentium*. У гибридных особей от скрещивания ♀♀ *C. p. molestus* x ♂♂ *C. torrentium* амплифицированный участок митохондриального гена COI расщепляется на два фрагмента, так же как у материнской формы (Рисунок 4).

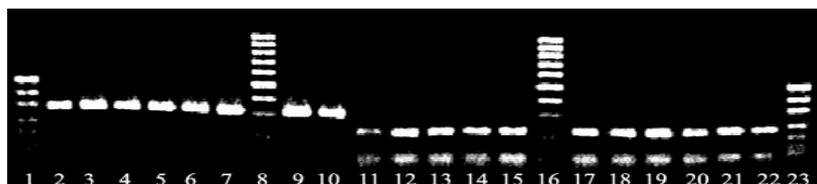


Рисунок 4 – Результаты рестрикции амплифицированного участка гена COI рестриктазой SspI

Примечание. Дорожки 2 – 7, 9, 10 – *C. torrentium*; дорожки 11 – 13 – *C. p. pipiens*; дорожки 14, 15 – F1: ♀♀ *C. p. molestus* x ♂♂ *C. torrentium*; дорожки 17 – 22 – *C. p. molestus*. Дорожки 1, 23 – ДНК маркер pUC19 / MspI (501 (489), 404, 331, 242, 190, 147, 110 (111), 67, 34 п.н.); дорожки 8, 23 – 100 bp ДНК маркер

Известно, что мтДНК наследуется, независимо от ядерного генома, в основном через цитоплазму женских гамет. К сожалению, в ходе работы не удалось получить гибридов от скрещивания ♀♀ *C. torrentium* и ♂♂ *C. p. molestus*, но можно предположить с большой долей вероятности, что участок гена COI гибридных особей от такого типа скрещивания не будет разрезаться рестриктазой SspI, т.е. будет соответствовать типу *C. torrentium* (материнской форме). Учитывая характер наследования, следует ожидать, что у потомков от скрещивания ♀♀ *C. p. pipiens* и ♂♂ *C. torrentium* участок гена COI при обработке рестриктазой SspI будет расщепляться на два фрагмента, а у гибридных особей от скрещивания ♀♀ *C. torrentium* и ♂♂ *C. p. pipiens* – будет оставаться неизменным. Участок гена COI гибридных потомков от скрещивания *C. p. pipiens* и *C. p. molestus* любого направления будет разрезаться рестриктазой SspI. Таким образом, вследствие материнского наследования мтДНК, метод не позволяет идентифицировать гибридных особей между *C. torrentium* и *C. p. pipiens* или между *C. torrentium* и *C. p. molestus*.

Было проведено секвенирование участка гена COI у особей *C. p. pipiens* и *C. p. molestus*. Сравнение нуклеотидных последовательностей участка гена COI *C. p. pipiens* и *C. p. molestus* показало, что они идентичны между собой (данные не показаны).

3.1.5. Второй интрон гена ацетилхолинэстеразы 2

Анализ последовательностей второго интрона гена ацетилхолинэстеразы 2 (ACE2), проведенный Смит и Фонсекой (Smith, Fonseca, 2004), позволил создать видоспецифичные праймеры для идентификации нескольких представителей рода *Culex*, включая *C. torrentium* и *C. pipiens*.

В результате мультипраймерной ПЦР с использованием праймеров ACEip, ACEtorr и B1246s (Таблица 2), у особей *C. torrentium* амплифицируется фрагмент ДНК, размером 416 п.н., у особей *C. p. pipiens* и *C. p. molestus* – 610 п.н.; у гибридных особей от скрещивания ♀♀ *C. p. molestus* x ♂♂ *C. torrentium* амплифицируются оба фрагмента (Рисунок 5).

Эти маркеры позволяют легко идентифицировать особей *C. torrentium* от *C. p. pipiens* и *C. p. molestus* в выборках из любых природных популяций, включая смешанные. Кроме этого, данные маркеры применимы и для идентификации гибридных особей. Учитывая характер наследования, следует ожидать, что использование праймеров ACEip, ACEtorr и B1246s, позволит выявлять гибридных особей от любого направления скрещивания *C. p. molestus* и *C. torrentium*, а также *C. p. pipiens* и *C. torrentium*.



Рисунок 5 – Результаты амплификации ДНК с использованием праймеров ACEip, ACEtorr и B1246s

Примечание. Дорожки 2 – 9 – *C. torrentium*; дорожки 10 – 12 – F1: ♀♀ *C. p. molestus* x ♂♂ *C. torrentium*; дорожки 14 – 17 – *C. p. molestus*; дорожки 18 – 20 – *C. p. pipiens*; дорожки 1, 13, 21 – 100 bp ДНК маркер

Секвенирование и сравнение нуклеотидных последовательностей участка второго интрона гена ACE2 у особей *C. p. pipiens* и *C. p. molestus* показало, что они идентичны между собой (данные не показаны).

В таблице 3 представлены все молекулярно – генетические маркеры, изученные в настоящей работе (полученные самостоятельно и предложенные другими авторами).

Выявлено соответствие результатов при использовании различных типов маркеров. Как следует из таблицы 3 все типы маркеров, рассмотренные в работе, позволяют надежно идентифицировать особей *C. torrentium*. Эти маркеры применимы к любой стадии развития организма. Известно, что личинки, куколки и самки *C. torrentium* и *C. p. pipiens* морфологически неразличимы; *C. torrentium* и *C. p. pipiens* различаются только по строению гениталий самцов, поэтому молекулярно – генетические маркеры для идентификации *C. torrentium* будут служить основой популяционно – генетических, эколого – фаунистических, фенологических исследований этого малоизученного вида. Особи *C. p. pipiens* и *C. p. molestus* идентичны по всем изученным молекулярно – генетическим маркерам. Это свидетельствует о большей генетической близости *C. p. pipiens* и *C. p. molestus* и отдаленности от них *C. torrentium*, что соответствует существующим представлениям о степени филогенетического родства представителей комплекса *C. pipiens* (Miller, Crabtree, Savage, 1996; Виноградова, 1997). ITS2 регионы рДНК, гены мтДНК, интроны генов широко используются для создания диагностических маркеров в разных группах кровососущих комаров (Caterino, Cho, Sperling, 2000). Таблица 3 – Молекулярно – генетические маркеры для идентификации представителей комплекса *Culex pipiens*

| Праймер | Размер продукта амплификации / рестрикции, п.н. | | | |
|------------------------------------|---|----------------------|-----------------------|--|
| | <i>C. torrentium</i> | <i>C. p. pipiens</i> | <i>C. p. molestus</i> | F1: ♀♀ <i>C. p. molestus</i> x ♂♂ <i>C. torrentium</i> |
| OPB - 02 | 1183 | — | — | 1183 |
| OPA - 11 | 680 | — | — | 680 |
| SCARcp1 SCARcp2 | 1093 | — | — | 1093 |
| SCARcp3 SCARcp4 | 474 | — | — | 474 |
| 5.8S 28S | 410 | 460 | 460 | 410, 460 |
| 5.8Sa 28S | 460 | 510 | 510 | 460, 510 |
| UEA9 UEA10 + рестрикция SspI | 311 | 220, 90 | 220, 90 | 220, 90 |
| ACEpip ACEtorr B1246s | 416 | 610 | 610 | 416, 610 |

Примечание. «—» – отсутствие амплификации

Однако, учитывая значительное сходство *C. p. pipiens* и *C. p. molestus* по этим участкам ДНК, мы считаем, что наиболее быстрым способом получения молекулярно – генетических маркеров для идентификации *C. p. pipiens* и *C. p. molestus*, является поиск специфичных RAPD – маркеров и создание на их основе SCAR – маркеров. Гибридных особей от скрещивания *C. torrentium* и *C. p. molestus* можно выявить, как в ходе анализа размеров ПЦР – фрагментов ITS2 регионов, так и при использовании праймеров ACEpip, ACEtorr и B1246s.

3.2. Генетическая дифференциация популяций *C. p. pipiens*, *C. p. molestus* и *C. torrentium* умеренных широт

Полиморфизм по RAPD – маркерам был изучен в десяти популяциях *C. torrentium*, пяти популяциях *C. p. molestus* и трех популяциях *C. p. pipiens* из г. Томска, Томской области (ТО) и Республики Казахстан (РК). Для оценки генетической изменчивости использовался RAPD – праймер OPA – 01 (5' – CAGGCCCTTC – 3'), амплифицирующий наибольшее число полиморфных фрагментов ДНК.

Генетическую дифференциацию популяций оценивали, используя величину генетического расстояния по Нею (D_{Nei}) (Nei, 1978), которая отражает среднее число замен аллелей в каждом локусе, произошедших за время раздельной эволюции двух популяций. Величина D_{Nei} варьирует от нуля (максимальное сходство) до бесконечности (максимальное различие).

На рисунке 6 представлены средние значения генетических расстояний (\overline{D}_{Nei}) между популяциями: а) *C. p. pipiens* ($\overline{D}_{Nei} = 0,068 \pm 0,003$); б) *C. p. molestus* ($\overline{D}_{Nei} = 0,036 \pm 0,008$); в) *C. torrentium* ($\overline{D}_{Nei} = 0,047 \pm 0,003$); г) *C. p. pipiens* и *C. p. molestus* ($\overline{D}_{Nei} = 0,102 \pm 0,007$); д) *C. p. pipiens* и *C. torrentium* ($\overline{D}_{Nei} = 0,136 \pm 0,007$); е) *C. p. molestus* и *C. torrentium* ($\overline{D}_{Nei} = 0,165 \pm 0,005$).

Средние значения генетических расстояний между популяциями *C. p. pipiens* и *C. p. molestus* (г) больше \overline{D}_{Nei} между популяциями *C. p. pipiens* (а) и между популяциями *C. p. molestus* (б). \overline{D}_{Nei} между популяциями *C. p. pipiens* и *C. torrentium* (д) больше, чем средние значения генетических расстояний между популяциями *C. p. pipiens* (а) и между популяциями *C. torrentium* (в). Средние значения генетических расстояний между популяциями *C. p. molestus* и *C. torrentium* (е) значительно превышают генетические расстояния между популяциями *C. p. molestus* (б) и между популяциями *C. torrentium* (в). Выявленные различия статистически достоверны, о чем свидетельствуют не перекрывающиеся доверительные интервалы средних значений D_{Nei} (Рисунок 6).

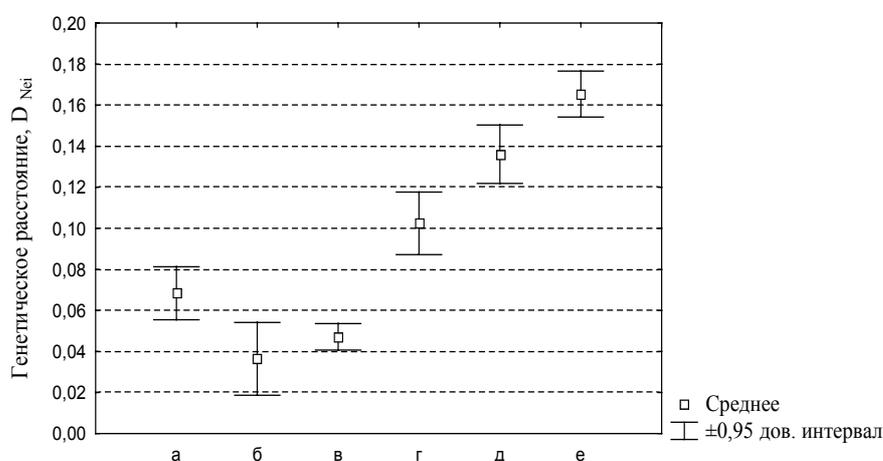


Рисунок 6 – Средние значения генетических расстояний между популяциями *C. p. pipiens*, *C. p. molestus*, *C. torrentium*

Примечание. Средние значения генетических расстояний между популяциями: а) *C. p. pipiens*; б) *C. p. molestus*; в) *C. torrentium*; г) *C. p. pipiens* и *C. p. molestus*; д) *C. p. pipiens* и *C. torrentium*; е) *C. p. molestus* и *C. torrentium*

UPGMA – дендрограмма, основанная на коэффициентах генетического сходства по Нею (1978) показывает, что все изученные популяции разделяются на три отчетливых кластера: в одном представлены популяции *C. p. molestus*, в другом – *C. p. pipiens*, в третьем – *C. torrentium* (Рисунок 7).

Анализ генетического полиморфизма RAPD – маркеров позволяет сделать вывод о значительной дифференциации популяций *C. p. pipiens*, *C. p. molestus* и *C. torrentium* в районе проведенных исследований. Вывод базируется на следующих положениях: 1) генетические расстояния (D_{Nei}) между популяциями разных подвидов

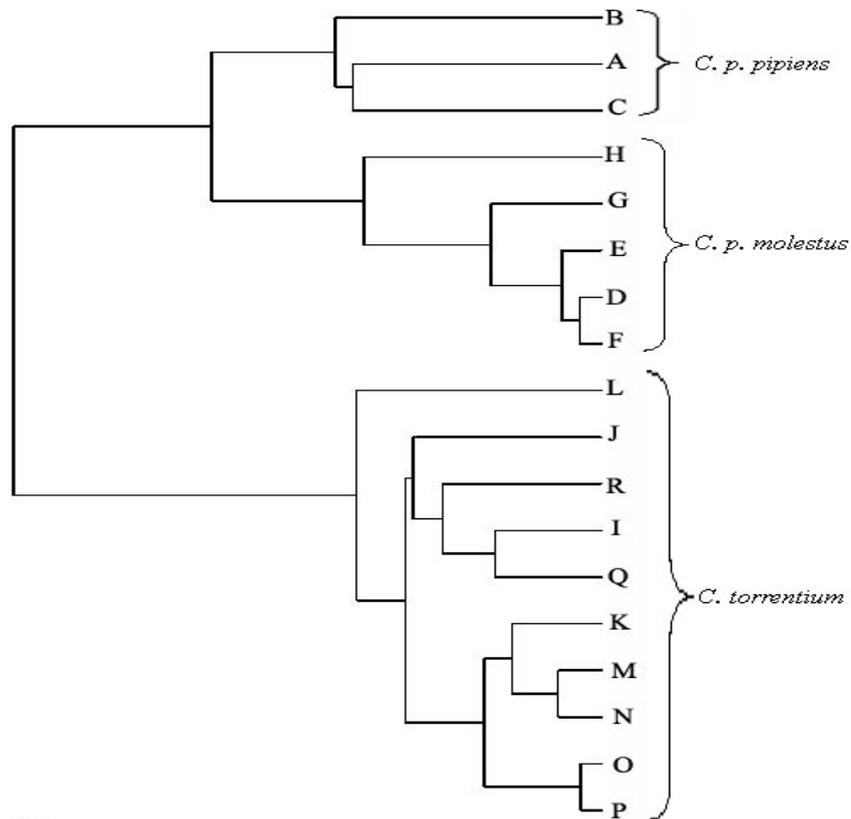


Рисунок 7 – Дендрограмма генетического сходства популяций *C. torrentium*, *C. p. pipiens* и *C. p. molestus*, построенная с использованием метода иерархического кластерного анализа (UPGMA) по результатам RAPD – анализа (RAPD – праймер ОРА – 01)

Примечание. Популяции: А – с. Моряковский Затон, ТО (2003г.); В – г. Алматы, РК (1999г.); С – г. Семипалатинск, РК (2004 г.); D – г. Томск, ул. Короленко, 15 (2004 г.); Е – г. Томск, ул. Тимакова, 3 (2003г.); F – г. Томск, ул. Алтайская, 78/2 (2004 г.); G – г. Томск, ул. Иркутский тр., 104 (2004 г.); H – г. Сарышаган, РК (2005 г.); I – с. Моряковский Затон, ТО (2003 г.); J – Керамический завод, ТО (2003 г.); K – Керамический завод, ТО (2004 г.); L – г. Алматы, РК (1999 г.); M – с. Науалы, РК (2003 г.); N – с. Аксаковка, РК (2003 г.); O – г. Алматы 1, РК (2004 г.); P – г. Алматы 2, РК (2004 г.); Q – г. Томск, ул. Короленко, 15 (2005 г.); R – г. Томск, ул. Короленко, 15 (2004 г.)

или вида достоверно превышают генетические расстояния между популяциями в пределах одного подвида или вида, 2) дендрограмма генетического сходства показывает, что все изученные популяции разделяются на три отчетливых кластера: в одном представлены популяции *C. p. molestus*, в другом – *C. p. pipiens*, в третьем – *C. torrentium*, 3) не получены прямые или косвенные подтверждения, свидетельствующие о существовании природной гибридизации между *C. p. pipiens* и *C. torrentium* или между *C. p. molestus* и *C. torrentium*; гибридные особи не выявлены ни в одной из изученных популяций, включая смешанные выборки. По всей видимости, генетическая дифференциация, наблюдаемая между популяциями *C. p. pipiens*, *C. p. molestus* и *C. torrentium* умеренного климата, обусловлена как пре- так и постзиготическими механизмами репродуктивной изоляции. К ним относятся отличия, касающиеся жизненных циклов, полового поведения, а также, разобщенность местообитаний и цитоплазматическая несовместимость.

3.3. Распространение *C. torrentium* и *C. p. pipiens* на территории Томской области и Республики Казахстан

При проведении настоящей работы было собрано тринадцать выборок комаров из открытых водоемов (предпочтительные местообитания личинок *C. p. pipiens* и *C. torrentium*) Томской области (ТО) и Республики Казахстан (РК) (Таблица 1). Только одна выборка была представлена особями *C. p. pipiens* (г. Семипалатинск, РК, 2004 г.), в состав двух выборок входили, как особи *C. p. pipiens*, так и *C. torrentium* (г. Алматы, РК, 1999 г. и с. Моряковский Затон, ТО, 2003 г.), остальные десять выборок состояли только из особей *C. torrentium* (шесть выборок в Томской области и четыре в Республике Казахстан). В смешанных сборах на долю *C. torrentium* приходилось 56,25 % особей (г. Алматы, РК, 1999 г.) и 52,08 % (с. Моряковский Затон, ТО, 2003 г.). Таким образом, показано, что в открытых личиночных биотопах в районе проведенных исследований доминирует *C. torrentium*. Что касается Республики Казахстан, то встречаемость там *C. torrentium* зарегистрирована неоднократно разными авторами (Дубицкий, 1970; Лопатин, 2000). В Томской области этот вид был описан Шингаревым в 1928 г. под именем *C. pavlovsky* (Шингарев, 1928; Штакельберг, 1937) и это единственное упоминание о встречаемости *C. torrentium* на территории Томской области. Существует два возможных объяснения:

1) *C. torrentium* был и ранее широко распространен на территории Томской области, но ошибочно принимался за *C. p. pipiens*, по причине значительного морфологического сходства *C. p. pipiens* и *C. torrentium*; известно, что единственный морфологический признак, отличающий *C. p. pipiens* от *C. torrentium*, касается деталей строения гипопигия самцов, а именно формы дорзальных склеритов эдеагуса (Service, 1968; Онуека, 1982; Dahl, 1988; Виноградова, 1997);

2) в течение какого – то времени *C. torrentium* вытеснил *C. p. pipiens* на территории Томской области.

Для выяснения действительной картины распространения *C. p. pipiens* и *C. torrentium*, а также, характера их взаимоотношений в Томской области, необходимо проведение широких эколого – фаунистических и фенологических исследований. В настоящей работе констатируется лишь факт преимущественной встречаемости личинок *C. torrentium* в открытых водных биотопах в районе проведенных исследований.

ВЫВОДЫ

1. Проведен анализ ДНК – маркеров у трех представителей комплекса *Culex pipiens* – *Culex torrentium*, *C. p. pipiens*, *C. p. molestus*

2. Выявлены, идентифицирующие *Culex torrentium*, специфичные фрагменты ДНК, амплифицирующиеся RAPD – праймерами OPB – 02 и OPA – 11

3. Определение нуклеотидных последовательностей мономорфных RAPD – фрагментов позволило подобрать видоспецифичные SCAR – праймеры. Результатом использования SCAR – праймеров является амплификация специфичных фрагментов ДНК (SCAR – маркеров), позволяющих надежно идентифицировать особей *C. torrentium* и *C. p. pipiens* в природных популяциях

4. Показано, что рестрикционный анализ участка митохондриального гена COI, анализ размеров ПЦР фрагментов ITS2 регионов рДНК, а также маркеры, основанные на последовательности второго интрона гена ACE2, позволяют идентифицировать особей *C. torrentium*

5. Выявлено, что нуклеотидные последовательности участка митохондриального гена COI и участка второго интрона гена ACE2 идентичны у *C. p. pipiens* и *C. p. molestus*

6. Анализ изменчивости RAPD – маркеров в популяциях представителей комплекса *Culex pipiens* из г. Томска, Томской области и Республики Казахстан показал, что *C. torrentium*, *C. p. pipiens* и *C. p.*

molestus умеренного климата генетически дифференцированы, природная гибридизация между ними отсутствует

7. Показано, что в открытых личиночных биотопах (Томская область и Республика Казахстан) доминантным видом является *C. torrentium*; личинки *C. p. pipiens* встречаются с небольшой частотой

Список работ, опубликованных по теме диссертации:

1. Храброва Н.В., Сибатаев А.К. Анализ генетической изменчивости комаров *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) с использованием микросателлитного локуса CQ46 в качестве маркера // Эволюционная биология: Материалы II Международной конференции «Проблема вида и видообразование» / Под ред. В.Н. Стегния. – Томск: Томский государственный университет, 2002. – Т. 2. – С. 392 – 393.

2. Храброва Н.В., Сибатаев А.К. Молекулярные маркеры для идентификации комаров *Culex pipiens pipiens* и *C. p. pipiens f. molestus* (Diptera: Culicidae) // Генетика в XXI веке: современное состояние и перспективы развития: Материалы III съезда ВОГиС. – Москва, 2004. – Т.1. – С. 35.

3. Храброва Н.В., Сибатаев А.К., Стегний В.Н. RAPD – маркеры для идентификации представителей рода *Culex* – переносчиков вируса западнонильской лихорадки // Вестник Томского гос. ун – та. Приложение. – 2004. – № 10. – С. 128 – 130.

4. Храброва Н.В., Сибатаев А.К., Стегний В.Н. SCAR – маркер для идентификации *Culex pipiens pipiens* (Diptera: Culicidae) // Вестник Томского гос. ун – та. – 2004. – № 30. – С. 146 – 149.

5. Храброва Н.В., Сибатаев А.К., Стегний В.Н. Генетическая идентификация комаров группы *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) методом RAPD – анализа // Доклады РАН. – 2005. – Т. 401, № 3. – С. 125 – 126.

6. Храброва Н.В., Сибатаев А.К., Стегний В.Н. Таксономический статус комаров *Culex pipiens* L. и *Culex molestus* F. // Эволюционная биология: Материалы III Международной конференции «Проблема вида и видообразования» / Под ред. В.Н. Стегния. – Томск: Томский государственный университет, 2005. – Т. 3. – С. 275 – 299.