

На правах рукописи

Русакова  
Антонина Михайловна

ПОПУЛЯЦИОННО-ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ  
КОМАРОВ КОМПЛЕКСА *ANOPHELES MACULIPENNIS*  
(*DIPTERA: CULICIDAE*)

03.00.15 – генетика

Автореферат  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Томск – 2007

Работа выполнена в Научно – исследовательском институте биологии и биофизики Томского государственного университета

Научный руководитель:  
доктор биологических наук, профессор Стегний Владимир Николаевич

Официальные оппоненты:  
доктор биологических наук Кучер Аксана Николаевна  
НИИ медицинской генетики ТНЦ СО РАМН, г. Томск

кандидат биологических наук Перевозкин Валерий Петрович  
Томский государственный педагогический университет, г. Томск

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

Защита диссертации состоится «21» февраля 2007 г. в 10 часов на заседании диссертационного совета Д 212.267.10 в ГОУ ВПО Томский государственный университет по адресу: 634050 г. Томск, пр. Ленина, 36.

С диссертацией можно ознакомиться в Научной библиотеке Томского государственного университета

Автореферат разослан «16» января 2007 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета  
кандидат биологических наук



Е.Ю. Просекина

## ВВЕДЕНИЕ

**Актуальность темы.** Изучение генетических механизмов адаптации и видообразования остаётся актуальной проблемой современной популяционной и эволюционной генетики. Для многих семейств отряда *Diptera* показано, что в основе этих процессов лежит реорганизация хромосомного аппарата, обусловленная, прежде всего пара- и перичентрическими инверсиями, структурными модификациями гетерохроматина (Чуксанова, 1971; Стегний, 1984, 1993; Шарахова, Стегний, Брагинец, 1997; Дурнова, Белянина, 2001; Кикнадзе, Сиирин, 1991; Кикнадзе, Истомина, 2000; Wasserman, 1963; Kitzmiller, Frizzi, Baker, 1967; Yoon, Richardson, 1978; Coluzzi et al., 1979).

Изменения климатических условий, связанные с увеличением среднегодовых температур за последние 10-15 лет, делают актуальным “ревизию” частотных характеристик инверсионного полиморфизма в природных популяциях различных полиморфных видов насекомых, в том числе малярийных комаров *Anopheles messeae* Fall. Инверсионный полиморфизм этого вида был всесторонне изучен в 70-е годы (Кабанова, Карташова, Стегний, 1972; Плешкова и др., 1978; Новиков, Кabanова, 1979). Было показано межгодовое изменение частот инверсионных вариантов за период с 1972 по 1982 гг. (Стегний, 1991) и с 1982 по 1997 гг. (Новиков, 1997), по-видимому, связанное с изменениями температурных режимов существования популяции. Вместе с тем, изменение климатических условий должно накладывать отпечаток не только на межгодовую динамику хромосомных инверсий, но и сезонную и межпопуляционную.

Несмотря на длительный период изучения гетерохроматина вопрос о его функциях остаётся открытым (Zuckerlandl, Hennig, 1995; Hennig, 1999; Dimitri et al., 2005). В результате изучения природных популяций малярийных комаров обнаружен ещё один тип полиморфизма, основанный на изменении количества прицентромерного гетерохроматина у *An. messeae* и *An. maculipennis* Mg. в политенных хромосомах питающих клеток яичников (Шарахова, Тимофеева, Стегний, 1997; Тимофеева, Шарахова, 1999) и это даёт возможность изучения функциональной значимости гетерохроматина в процессе адаптации.

Изменения гетерохроматина играют важную роль в процессе видообразования в отряде *Diptera*. В комплексе *Anopheles maculipennis* процесс видообразования связан с преобразованием архитектуры хромосом в политенных ядрах генеративных клеток (Стегний, 1979). Прежде всего, эти преобразования касаются гетерохроматина прицентромерных участков хромосом (Стегний, 1979; Стегний, 1993; Шарахова, Брагинец, Стегний, 1999). Гетерохроматиновые участки, располагаясь в прицентромерных районах, обеспечивают определённое расположение хромосом в политенных ядрах трофоцитов яичников, что было показано на примере малярийных комаров и дрозофил (Стегний, Вассерлауф, 1991; Стегний, 1993; Стегний, Вассерлауф, Ананьина, 1996). Изменение в молекулярном составе ДНК гетерохроматина может являться причиной пространственной реорганизации ядер в ходе эволюции в комплексе *Anopheles maculipennis* (Грушко и др., 2004).

В то же время, увеличение количества гетерохроматина в хромосомах видов комплекса *Anopheles maculipennis*, в том числе и гомосеквентных, является видоспецифичным признаком (Стегний, 1993; Шарахова, Брагинец, Стегний, 1999).

Обнаружение нового вида в роде *Anopheles* - *An. artemievi* Gordeev et al. (Гордеев и др., 2004; 2005), создает предпосылки для изучения систематических и филогенетических отношений с другими видами данной группы насекомых, позволяет выявить пути видообразовательных событий в отряде *Diptera*. Подключение к исследованиям палеарктической группы малярийных комаров, неарктического вида комплекса *Anopheles maculipennis* – *An. freeborni* Aitken позволяет дополнить существующие схемы видообразования и оценить степень филогенетической близости в изучаемой группе организмов.

Наличие эпидемически опасных видов рода *Anopheles* в отряде *Diptera* ещё более повышает актуальность цитогенетического изучения адаптации и эволюции представителей этой группы.

**Цели и задачи исследования.** Целью данной работы является популяционно-цитогенетическое изучение механизмов адаптации и видообразования в комплексе *Anopheles maculipennis* на основе анализа хромосомных инверсий, структуры гетерохроматина и архитектуры хромосом в политенных ядрах.

Для достижения поставленной цель предполагается решить следующие задачи:

1. Провести анализ сезонной, межгодовой и межпопуляционной динамики полиморфных вариантов по инверсиям и гетерохроматину *Anopheles messeae*.
2. Выявить межвидовые отличия по молекулярной организации прицентромерного гетерохроматина малярийных комаров - *Anopheles messeae* и *Anopheles atroparvus* van Thiel.
3. Изучить пространственную организацию политенных хромосом трофоцитов яичников *Anopheles artemievi* и *Anopheles freeborni*.
4. Провести сравнительный межвидовой анализ особенностей политенных хромосом по распределению гетерохроматина и взаимодействию хромосом с ядерной оболочкой в комплексе *Anopheles maculipennis*.

**Научная новизна.** В проведённом исследовании установлено существенное изменение частотных характеристик адаптивного инверсионного полиморфизма *An. messeae* за период с 2003 -2005 гг. по сравнению с периодом 1972 -1982 гг. Выявлено, что хромосомные инверсии, ранее доминирующие на юго-западе ареала вида *An. messeae* стали преобладать и в центральной части ареала. Изучение полиморфизма прицентромерного гетерохроматина хромосомы 2 в питающих клетках яичников *An. messeae* выявило межпопуляционные различия, что, по-видимому, свидетельствует о его адаптивном характере.

Изучение молекулярной организации прицентромерного гетерохроматина *An. messeae* и *An. atroparvus* выявило отличия по содержанию и локализации консервативных повторов ДНК.

Впервые в результате проведённой работы изучено пространственное расположение политенных хромосом в ядрах питающих клеток яичников *An. artemievi* и *An. freeborni*. Показаны межвидовые отличия видов *An. artemievi* и *An. freeborni* по распределению гетерохроматина и взаимодействию хромосом с ядерной оболочкой от ранее изученных видов комплекса *maculipennis*.

**Практическая ценность.** Выявленные в ходе проведения данной работы межвидовые различия *An. messeae* и *An. atroparvus* по содержанию консервативных повторяющихся последовательностей могут быть использованы для видовой диагностики. Установленные видоспецифичные признаки организации хромосом политенных ядер питающих клеток яичников и модификации гетерохроматина позволяют идентифицировать виды комаров *An. artemievi* и *An. freeborni* на стадии имаго при минимальном количестве изучаемого биологического материала, что важно для практических энтомологов и эпидемиологов в связи с проблемами регуляции численности опасных переносчиков малярии.

**Апробация результатов.** Результаты работы были представлены на Второй Сибирской школе молодого учёного (Томск, 1999); International Conference “Biodiversity and Dynamics of Ecosystems in North Eurasia: BDENE” (Novosibirsk, Russia 2000); на II и III съезде Вавиловского общества генетиков и селекционеров (Санкт-Петербург, 2000; Москва, 2004); на III симпозиуме по кариосистематике беспозвоночных животных (Санкт-Петербург, 2006); на конференции “Проблемы популяционной экологии животных” (Томск, 2006); на VII межрегиональном совещании энтомологов Сибири и Дальнего Востока (Новосибирск, 2006).

**Публикации.** По теме диссертации опубликовано 9 работ.

**Структура и объём диссертации.** Диссертация состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов и обсуждения, выводов, списка используемой литературы. Работа изложена на 142 страницах машинописного текста, включает 14 таблиц, 12 рисунков.

**Вклад автора.** Основные результаты получены автором самостоятельно. Гибридизация *in situ* проводилась совместно с к.б.н. О.Г. Грушко.

**Благодарности.** Искренняя благодарность к.б.н. М.В. Шараховой, которая была первым учителем. Слова благодарности и сердечную признательность за доверие, поддержку и постоянную помощь выражаю научному руководителю д.б.н.,

проф. В.Н. Стегнию. Собрать материал помогали к.б.н. В.А. Бурлак, к.б.н. А.В. Катохин, к.б.н. О.Г. Грушко, Е.П. Герик, Ю.В. Шабанова, Г.Н. Артемов. За помощь и поддержку слова благодарности близким и родным мне людям и к.б.н. С.И. Цитленок. Без помощи и поддержки всех сотрудников лаборатории эволюционной цитогенетики и кафедры цитологии и генетики Томского государственного университета невозможна была бы вся работа.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

### Материал.

Таблица 1 - Выборки комаров, использованные в работе

Вид	Место сбора	Дата сбора	n
<i>An. messeae</i>	Томск (с. Коларово)	06.1998	50
		07.1998	80
		08.1998	20
		05.1999	33
		06.1999	46
		07.1999	26
		08.1999	50
		09.1999	35
		07.2000	54
		07.2001	46
		07.2002	41
		07.2003	54
		05.2004	27
		06.2004	51
		07.2004	115
	07.2005	36	
	Москва	07.1998	50
	Полоцк	08.2000	29
	Бирск	08.2000	70
	Челябинск	08.2000	59
	Курган	08.2000	52
Омск	08.2000	18	
Шира	07.2003	26	
Бийск	08.2003	19	
Тегульдет	08.2003	30	
Воронеж	08.2004	56	
Всего: 1173			
<i>An. artemievi</i>	Республика Кыргызстан, г. Майлуулусуу	06.2006	18

В работе использованы четыре вида малярийных комаров: *An. messeae*, *An. atroparvus*, *An. artemievi*, *An. freeborni*. Виды *An. messeae*, *An. artemievi* были собраны в природных популяциях (Таблица 1). Изучение видов *An. atroparvus* и *An. freeborni* проводили на лабораторных культурах. Все исследования проводились на взрослых самках малярийных комаров.

**Методы.** Для проведения цитогенетического анализа отбирали самок всех изученных видов находящихся на активной стадии созревания трофобластов (II–IV стадии переваривания крови и развития яичников по Селла). Фиксацию яичников проводили с использованием этанол–уксусной смеси в соотношении 3:1.

Цитогенетические препараты готовили по стандартной лактоацетоорсеиновой методике (Кикнадзе, 1967; Кабанова, Карташова, Стегний, 1972). На каждом препарате анализировали 10–15 ядер.

Цитогенетический анализ препаратов политенных хромосом питающих клеток яичников проводили при увеличении 10x100 с использованием масляной инверсии на микроскопе Zeiss, оснащенным цифровой фотокамерой. Гетерохроматин измеряли с помощью окуляр-микрометра, вариант прицентромерного гетерохроматина *An. messeae* оценивали по количеству блоков визуально.

Для приготовления воздушно-высушенных препаратов политенных хромосом *An. messeae* и *An. atroparvus* 5-6 фолликулов из яичника помещали на предметное стекло в каплю 50% пропионовой кислоты, мацерировали, инкубировали 10–15 минут. Затем фолликулы раздавливали под предметным стеклом и, инкубировали 1 минуты при +65°C и охлаждали до комнатной температуры, после чего препараты замораживали в течение 1–2 минут в жидком азоте. Затем удаляли покровное стекло и препарат помещали в холодный (-20°C) 50% этанол на 2 часа при температуре +4°C. После чего препарат обезвоживали, выдерживая последовательно по 5 минут в 70%, 90% и 100% этаноле при +4°C. После этого препарат фиксировали 5 минут при +4°C в этанол-уксусном фиксаторе (3:1), высушивали на воздухе, промывали в 100% этаноле и затем окончательно высушивали на воздухе. Хранили препараты при +20°C.

Аmplификацию, гибридизацию, детекцию консервативных высокоповторённых последовательностей ДНК проводили на политенных хромосомах *An. messeae* и *An. atroparvus*. Фрагменты Atr2R-25a, Atr2R-25b, Atr2R-46a, Atr2R-73, Atr2R-85a, Atr2R-90, Atr2R-118 и Atr2R-136 были получены в результате микродиссекции прицентромерного гетерохроматина хромосомы 2 *An. atroparvus* (Грушко и др., 2004). Для получения зондов ДНК клонированные фрагменты Atr2R-25a, Atr2R-25b, Atr2R-46a, Atr2R-73, Atr2R-85a, Atr2R-90, Atr2R-118 и Atr2R-136 (Грушко и др., 2004) были амплифицированы в ходе ПЦР (95°C / 5 мин, 25 циклов: 94°C / 30 сек, 70°C / 2 мин и 68°C / 3 мин) в присутствии 1 пикомоля праймеров T3 и T7 и рекомбинантных плазмидных клонов в качестве матричных ДНК. Биотинилирование зондов ДНК, их гибридизацию и детекцию на препаратах политенных хромосом проводили согласно рекомендованным

протоколам с использованием соответственно GIBCO BRL BioPrime DNA labeling system, GIBCO BRL *In situ* Hybridization and Detection system (Invitrogen / Life Technologies, США) и Rhodamin-Avidin/Biotinylated Anti-Avidin (Vector Laboratories, США). Хромосомы окрашивали флуоресцентным красителем YOYO-1 (Sigma-Aldrich, США) и заключали в DABCO antifade solution (Sigma-Aldrich, США). Регистрацию результатов осуществляли на конфокальном микроскопе Bio-Rad MRC 1024 Scanning Confocal.

Статистическую обработку данных проводили с использованием общепринятых методов (Боровиков, 2003).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ инверсионного полиморфизма *An. messeae* в томской популяции показал существенное изменение частот инверсионных вариантов за изученный период (с 2003 по 2005 г.) по сравнению с 1972–1982 г. (рисунок 1, 2).

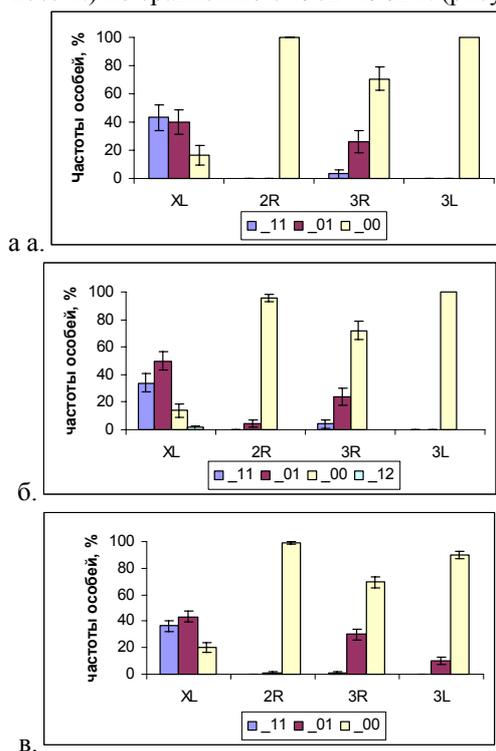


Рисунок 1 - Сезонное распределение инверсионных вариантов *An. messeae* в томской популяции в 2004 г.: а) май; б) июнь; в) июль

Изучение томской популяции с мая по июль 2004 г. (Рисунок 1) показало преобладание инверсионных вариантов  $2R_{00}$ ,  $3R_{00}$ ,  $3L_{00}$ ; по X хромосоме преобладают гетерозиготы  $XL_{01}$  и гомозиготы  $XL_{11}$ . В период с 1972 по 1982 год в начале репродуктивного сезона преобладали варианты,  $2R_{11}$ ,  $3R_{11}$ , частота инверсионных вариантов  $XL_{00}$ ,  $2R_{00}$ ,  $3R_{00}$ , увеличивалась только к середине сезона.

Анализ межгодовых распределений частот инверсионных вариантов в томской популяции с 2003 по 2005 год показал, что во всех выборках примерно с одинаковой частотой преобладают варианты  $XL_{01}$  (Рисунок 2).

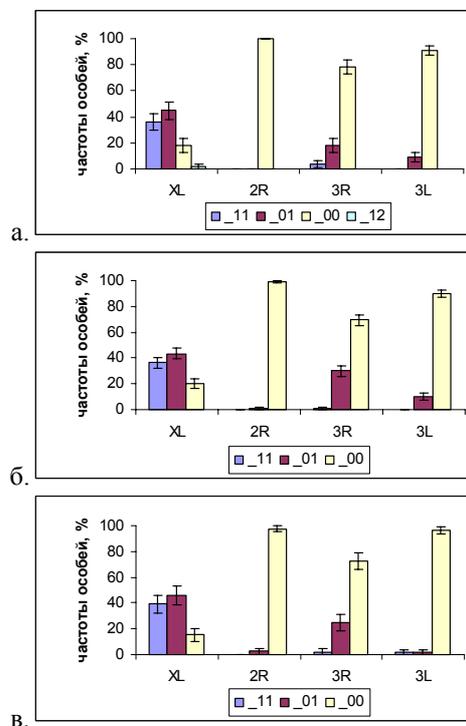


Рисунок 2 - Межгодовое распределение частот инверсионных вариантов у *An. messeae* в томской популяции: а) 2003 г.; б) 2004 г.; в) 2005 г.

Частоты гомозигот  $XL_{11}$  и  $XL_{00}$  также практически не меняются во всех изученных выборках. В выборке 2003г. с частотой 2% обнаружен вариант  $XL_{12}$  в составе гетерозиготы  $XL_{12}$ . По хромосоме 2R, 3R и 3L преобладают гомозиготы  $2R_{00}$ ,  $3R_{00}$ ,  $3L_{00}$ .

В период с 1974 по 1976 год по X хромосоме в популяции Томска преобладали гомозиготы  $XL_{11}$ , частота гетерозигот  $XL_{01}$  при этом не превышала 25% (Плешкова и др., 1978).

По хромосоме 2 в период с 1974 по 1976 год в томской популяции преобладали гомозиготы  $2R_{00}$ , как и в 2003, 2004 и 2005 году, но при этом частота инверсионного варианта  $2R_{11}$  составляла около 10%, в последние годы вариант  $2R_1$ , представлен только в виде гетерозигот, и то с низкой частотой.

Существенные отличия выявлены по 3R между выборками 70-х годов и 2003-2005 гг. В 70-е годы в томской популяции преобладали гомозиготы  $3R_{11}$  с частотой 52 - 81%, сейчас около 75% особей имеют генотип  $3R_{00}$ . По хромосоме 3L уже в 1974 -1976 гг. отмечалась высокая концентрация гомозигот  $3L_{00}$  (до 79%), которая к 2003 -2005 гг. увеличилась более чем до 90%.

В 1981 г. наблюдалось резкое увеличение частот  $XL_0$  до 21%,  $2R_0$  до 78%,  $3R_0$  до 54%. Проведенное сравнение температурных данных с 1972 по 1982 гг. показало, что в 1981 г. наблюдалось увеличение среднегодовой температуры, и изменение частот инверсий было связано с изменением теплового режима (Стегний, 1991).

Анализ географически разобщенных популяций (Рисунок 3) показал, что в воронежской и томской популяциях преобладают инверсионные варианты, характерные в 70-е годы для популяций западной части ареала (Стегний, Кабанова, 1985).

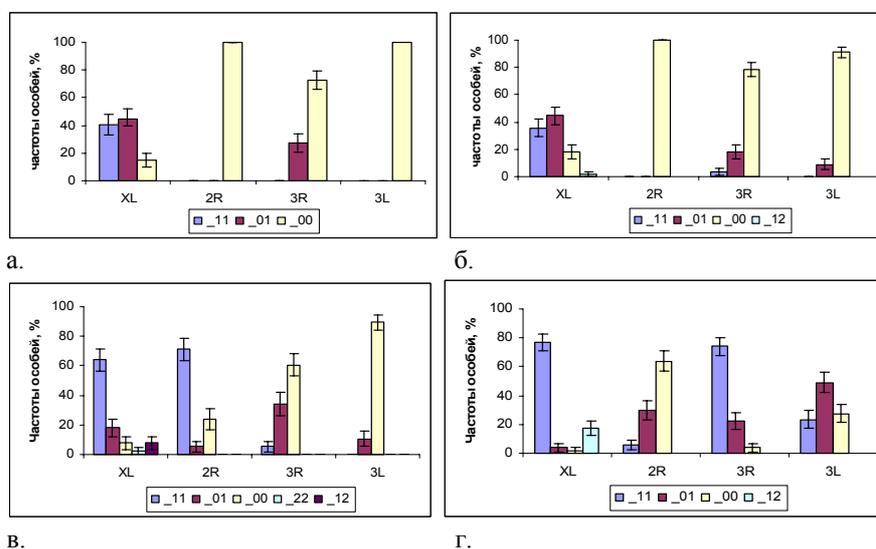


Рисунок 3 - Распределение частот инверсионных вариантов у *An. messeae* в географически разобщенных популяциях: а) Воронеж; б) Томск; в) Тегульдэт; г) Шира

Популяция Тегульдета, расположена в микроклиматической зоне с более резко выраженным континентальным климатом, который характерен для зоны северной тайги и отличается от томской популяции по частотному распределению инверсионных последовательностей по хромосомам XL, 2R, 3R, и почти не отличается по 3L.

Популяция Шира отличается от других изученных популяций по распределению инверсионных вариантов по хромосоме 3. В ней преобладают варианты 3R<sub>11</sub> и 3L<sub>01</sub>, что не характерно для трёх других изученных популяций.

Таким образом, изучение сезонных и межгодовых распределений инверсионных вариантов в томской популяции и анализ распределений в географически разобщённых популяциях показал, что хромосомные инверсии, ранее доминирующие на юго-западе видового ареала 2R<sub>00</sub>, 3R<sub>00</sub>, 3L<sub>00</sub> стали преобладать в центральной части ареала.

Результаты анализа сезонной динамики частот особей *An. messeae* с различными вариантами прицентромерного гетерохроматина хромосомы 2 питающих клеток яичников в течение репродуктивного периода 1998, 1999 и 2004 гг. представлены на рисунке 4. Показано, что в начале и конце репродуктивного сезона популяция более разнообразна по составу. К середине сезона разнообразие уменьшается, и в популяции преобладают особи с двойным вариантом блока.

Анализ межгодового распределения частот особей с полиморфными вариантами прицентромерного гетерохроматина (Рисунок 5) показал, что во всех выборках в период с 1998 по 2005 гг. преобладали особи с двойным вариантом блока.

Изучение географически разобщённых природных популяций *An. messeae* не выявило чёткой клинальной изменчивости (Рисунок 6). Популяции Воронежа, Челябинска, Томска, Тегульдета отличаются от всех других изученных популяций. Для них характерно преобладание особей с двойным вариантом блока гетерохроматина. Во всех других популяциях преобладают особи с одинарным блоком.

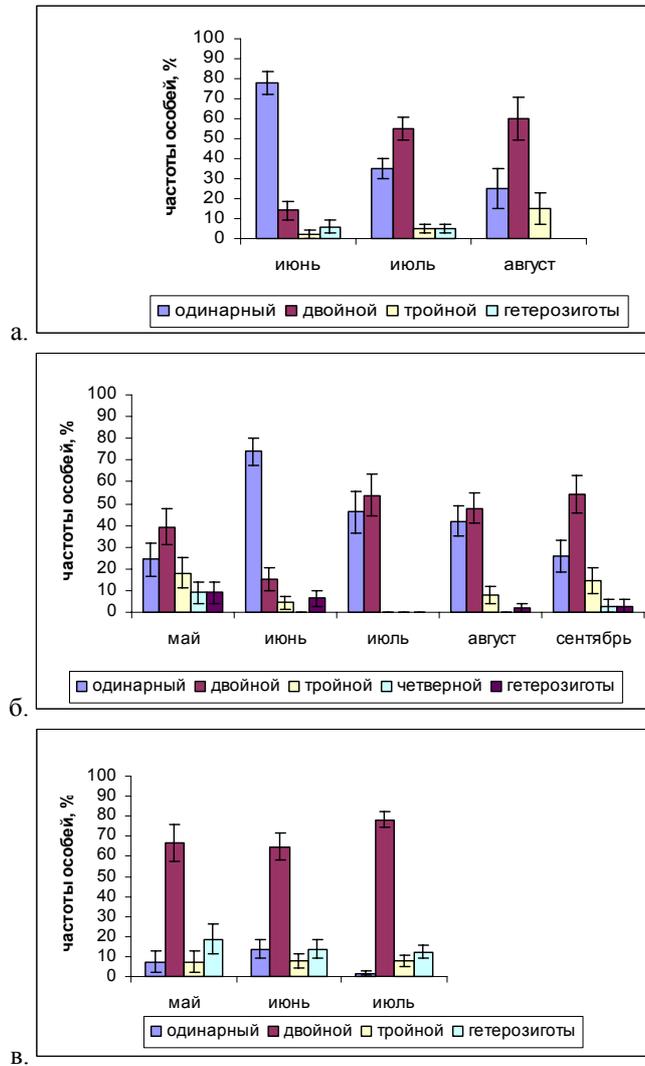


Рисунок 4 - Сезонное распределение частот особей *Ap. messeae* с полиморфными вариантами прицентромерного гетерохроматина в томской популяции: а) 1998 г.; б) 1999 г.; в) 2004 г.

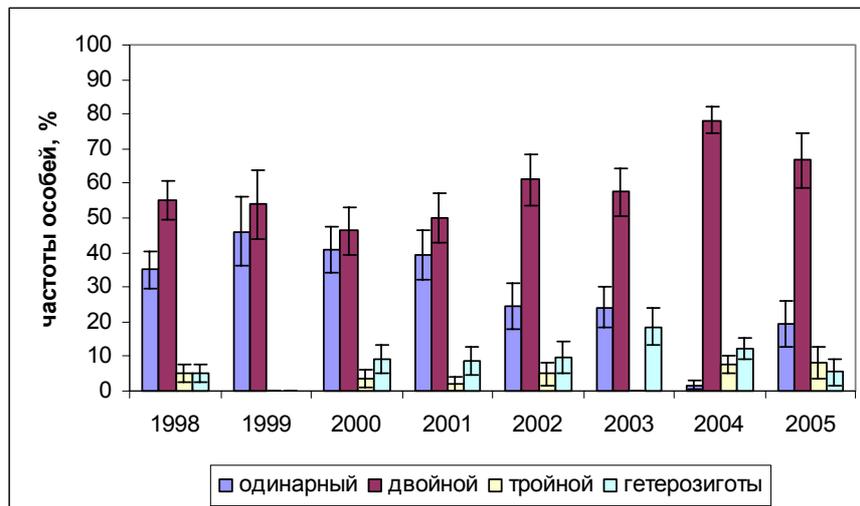


Рисунок 5 - Межгодоевое распределение частот особей *An. messeae* с полиморфными вариантами прицентромержного гетерохроматина в томской популяции

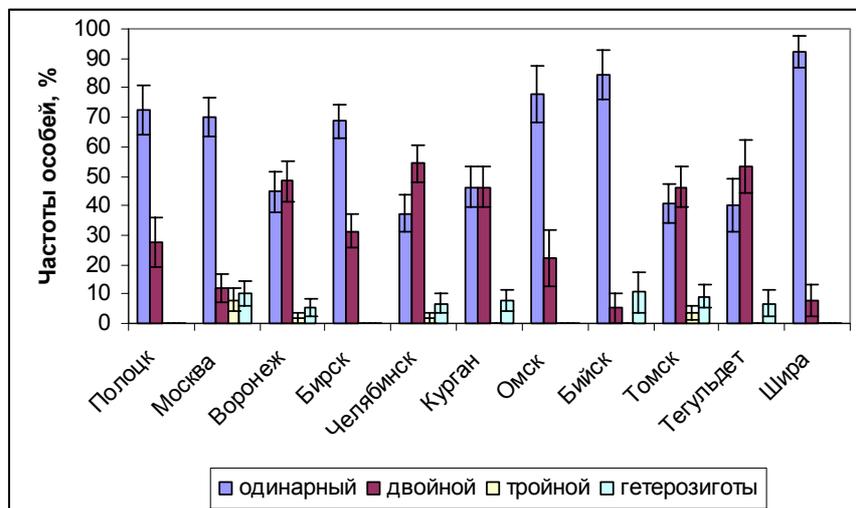


Рисунок 6 - Географическое распределение частот особей *An. messeae* с полиморфными вариантами прицентромержного гетерохроматина

Таким образом, изучение полиморфизма по блокам прицентромерного гетерохроматина хромосомы 2 *An. messeae* в период с 1998 по 2005 гг. показало пространственно-временную динамику, проявляющуюся в сезонном, межгодовом и межпопуляционном изменении вариантов блока прицентромерного гетерохроматина.

Изучение прицентромерного гетерохроматина малярийных комаров комплекса *maculipennis* представляет интерес в плане выявления межвидовых отличий по молекулярной организации ДНК данных районов. Изучение содержания 8 консервативных повторов в прицентромерных районах хромосом *An. messeae* и *An. atroparvus* выявило межхромосомные и межвидовые отличия в составе ДНК у этих видов (Рисунок 7).

В составе хромосом *An. atroparvus* выявлен ряд фрагментов: Atr2R-46a, Atr2R-85a, Atr2R-90, Atr2R-118, Atr2R-136, но эти фрагменты не выявлены в хромосомах *An. messeae*. Фрагмент - Atr2R-25b (Рисунок 7) не выявлен при *in situ* гибридизации в составе хромосом *An. atroparvus*, хотя минибibliothekа создана из прицентромерного гетерохроматина хромосомы 2 *An. atroparvus*. Отсутствие фрагментов в составе политепных хромосом может быть связано с их недостаточной представленностью, либо с небольшим числом их копий в составе политепных хромосом.

Межвидовые различия в локализации консервативных повторов, проявляются не только в наличии и отсутствии, но и в местах локализации этих повторов на хромосомах. Фрагменты Atr2R-25a и Atr2R-73 гибридизовались на хромосомах обоих видов, но они оказались локализованными в разных районах прицентромерного гетерохроматина. У *An. messeae* фрагмент Atr2R-25a был локализован в диффузном прицентромерном гетерохроматине хромосомы 2, и в диффузном прицентромерном гетерохроматине правого плеча хромосомы 3. У *An. atroparvus* клон Atr2R-25a выявлен в блочном и диффузном прицентромерном гетерохроматине хромосом X и 2. Клон Atr2R-73 у *An. messeae* был локализован в блоках прицентромерного гетерохроматина трёх хромосом - X, 2 и в блоках плеча 3R хромосомы 3. Однако, у *An. atroparvus* клон Atr2R-73 обнаружен только в одном районе - в диффузном гетерохроматине хромосомы 2.

Распределение консервативных повторённых последовательностей ДНК районспецифичной библиотеки прицентромерного гетерохроматина хромосомы 2 *An. atroparvus* (клонов Atr2R-25a, Atr2R-25b, Atr2R-46a, Atr2R-73, Atr2R-85a, Atr2R-90, Atr2R-118 и Atr2R-136) у *An. atroparvus* и *An. messeae* отличается как между хромосомами, так и между видами.

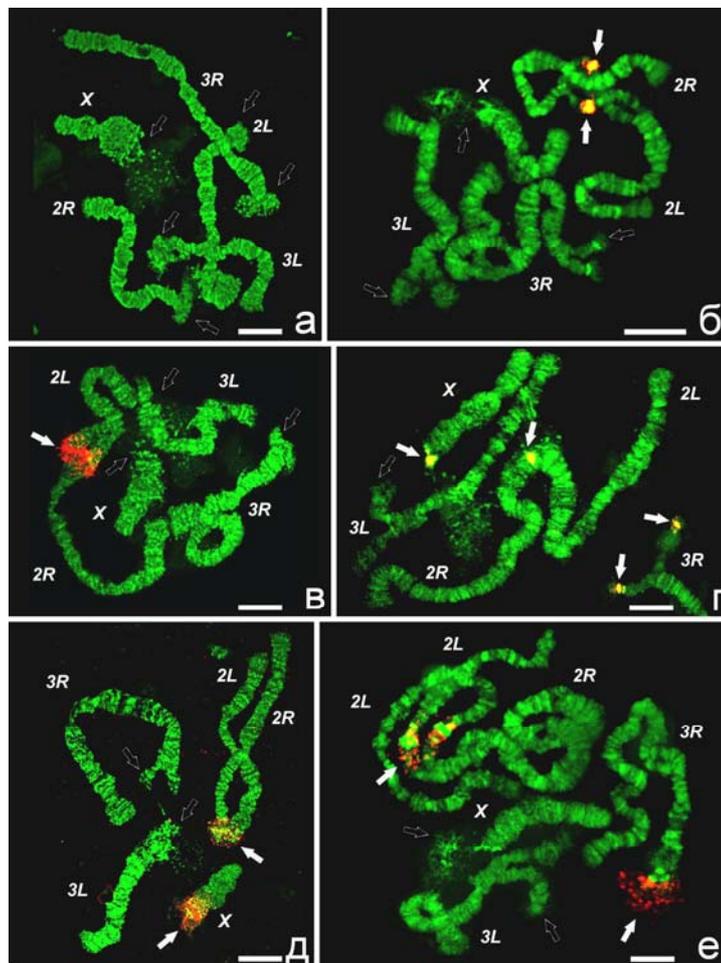


Рисунок 7 - Сравнение локализации консервативных повторённых последовательностей ДНК клонов Atr2R-25b, Atr2R-73 и Atr2R-25a в прицентромерном гетерохроматине политенных хромосом *An. atroparvus* и *An. messeae*; а - клон Atr2R-25b на хромосомах *An. atroparvus*; б - клон Atr2R-25b на хромосомах *An. messeae*; в - клон Atr2R-73 на хромосомах *An. atroparvus*; г - клон Atr2R-73 на хромосомах *An. messeae*; д - клон Atr2R-25a на хромосомах *An. atroparvus*; е - клон Atr2R-25a на хромосомах *An. messeae*. Контуры стрелок указывают прицентромерные участки хромосом. Стрелки указывают на меченые районы хромосом. X, 2L, 2R, 3L, 3R – плечи хромосом. Шкала – 10 мкм

Таким образом, изучение молекулярной организации прицентромерного гетерохроматина показало отличия по содержанию и локализации в хромосомах консервативных повторов ДНК.

Обнаружение нового вида в комплексе *maculipennis* - *An. artemievi* Gordeev et al. (Гордеев и др., 2004) и изучение особенностей организации политенных хромосом питающих клеток яичников одного из видов неарктической группы – *An. freeborni*, дает возможность расширить имеющиеся знания по особенностям пространственной организации хромосом в политенных ядрах видов комплекса.

По линейной структуре политенных хромосом *An. artemievi* является гомосеквентным видом группе *maculipennis-melanoon (subalpinus)*. *An. freeborni* по линейной организации политенных хромосом наиболее близок к гомосеквентным видам *An. atroparvus* и *An. labranchiae*, от этих видов *An. freeborni* отличается сложной инверсией по X хромосоме и инверсией в плече 3R хромосомы 3. По хромосоме 2 *An. freeborni* полностью идентичен типу *atroparvus-labranchiae*.

Анализ взаимоотношения хромосом с ядерной оболочкой выявил чёткие видовые отличия *An. artemievi* и *An. freeborni* от других видов (Рисунок 8, 9, 10).

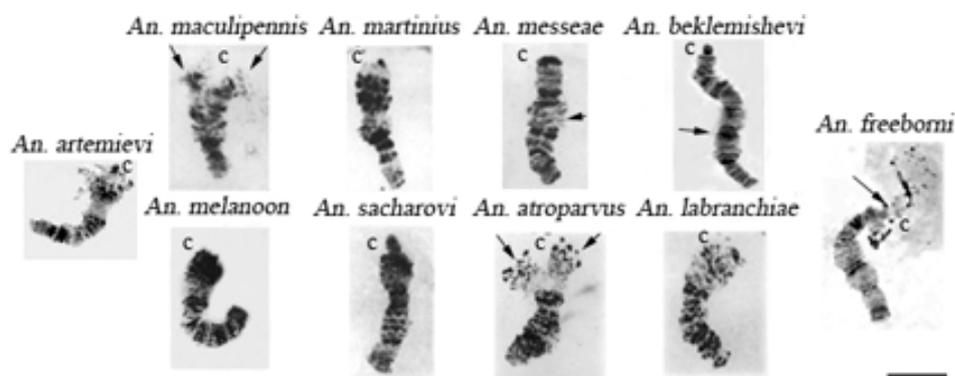


Рисунок 8 - X хромосомы трофоцитов яичников видов комплекса *maculipennis*

Примечание: С – центромера; стрелками указаны участки контакта с ядерной оболочкой; (фотографии хромосом *An. sacharovi*, *An. martinus*, *An. melanoon (subalpinus)*, *An. labranchiae* использованы из статьи Шарахова, Стегний, Брагинец, 1997)

По типу взаимоотношения X хромосомы с оболочкой ядра все виды различны (Рисунок 8). Гомосеквентные виды также различаются по характеру

взаимоотношений хромосом с ядерной оболочкой. Так, например, виды *An. maculipennis*, *An. melanoon (subalpinus)* и *An. artemievi* с идентичным дисковым строением политенных хромосом, различаются по хромосомно-ядерным взаимодействиям XL. У *An. melanoon (subalpinus)* прицентромерный участок X хромосомы связан с ядрышком и расположен в некотором отдалении от ядерной оболочки. В отличие от *An. melanoon (subalpinus)*, *An. maculipennis* имеет прикрепление XL-плеча к ядерной оболочке центромерной частью (Шарахова, Стегний, Брагинец, 1997). У *An. artemievi* в некоторых случаях наблюдается разобщение гомологов в центромерном районе, что характерно для *An. maculipennis* и не характерно для *An. melanoon (subalpinus)*. В то же время, в отличие от *An. melanoon (subalpinus)* в прицентромерном районе *An. artemievi* не формируется яркоокрашенный гетерохроматиновый блок (Рисунок 8).

X хромосома *An. maculipennis*, *An. atroparvus* и *An. labranchiae* из палеарктической группы имеет прикрепление к оболочке прицентромерным участком (Шарахова, Стегний, Брагинец, 1997). По морфологии участка прикрепления X хромосома *An. freeborni* отличается от этих трёх видов. В прицентромерном районе X хромосомы *An. freeborni* не наблюдается асинопсиса гомологов.

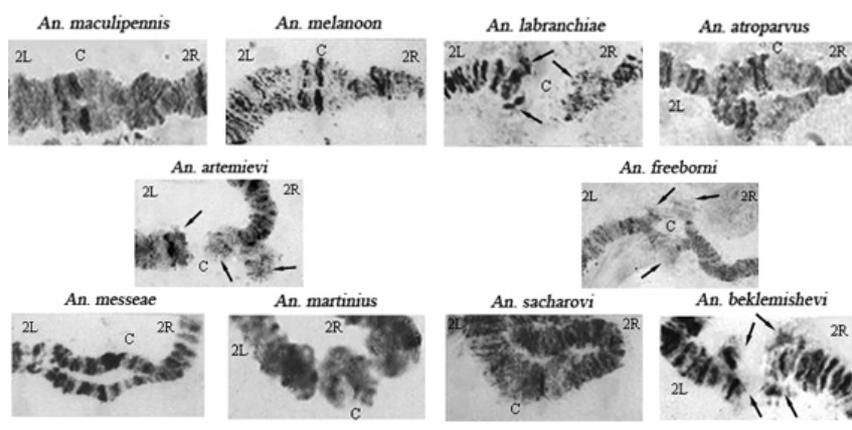


Рисунок 9 - Прицентромерные участки хромосомы 2 трофоцитов яичников видов комплекса *maculipennis*

*Примечание:* 2L – левое плечо хромосомы 2; 2R – правое плечо хромосомы 2; C – центромера; стрелками указаны участки контакта с ядерной оболочкой; (фотографии хромосом *An. sacharovi*, *An. martinus*, *An. melanoon (subalpinus)*, *An. labranchiae* использованы из статьи Шарахова, Стегний, Брагинец, 1997)

По взаимодействию хромосомы 2 с ядерной оболочкой большинство видов не имеют чётких отличий (Рисунок 9). Из 8 изученных ранее видов только у *An. beklemishevi* и *An. labranchiae* наблюдается разобщение плеч хромосомы 2 и прикрепление прицентромерными районами к оболочке ядра (Шарахова, Стегний, Брагинец, 1997). У изученных в данной работе видов *An. artemievi* и *An. freeborni* плечи хромосомы 2 также разобщены в прицентромерном районе и связаны с ядерной оболочкой в прицентромерном районе хромосомы 2.

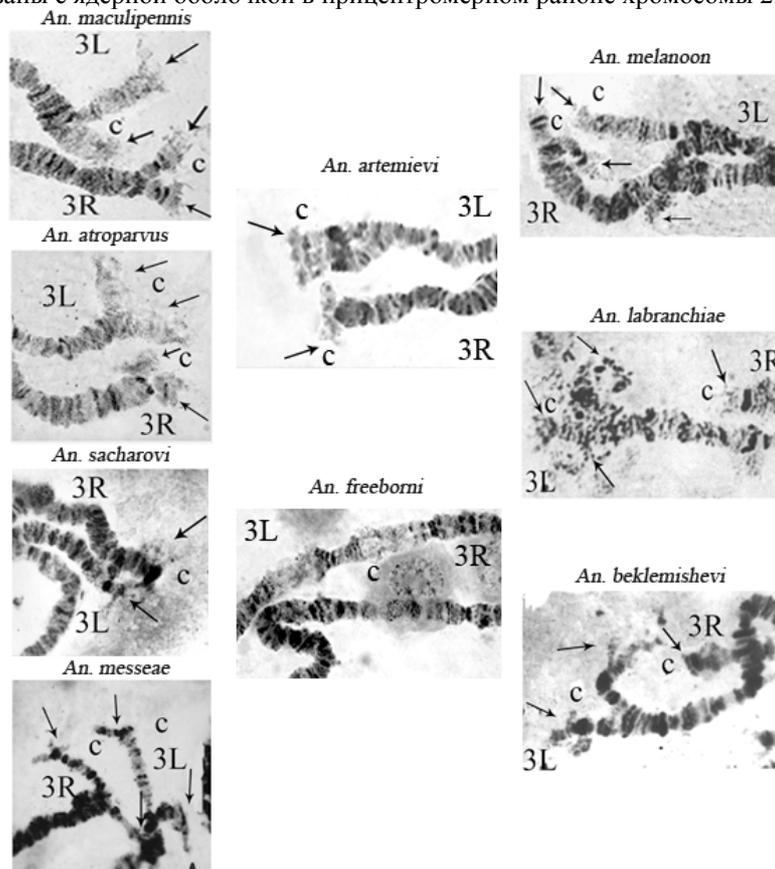


Рисунок 10 - Прицентромерные участки хромосомы 3 трофозитов яичников видов комплекса *maculipennis*

*Примечание:* 3L – левое плечо хромосомы 3; 3R – правое плечо хромосомы 3; С – центромера; стрелками указаны участки контакта с ядерной оболочкой; (фотографии хромосом *An. sacharovi*, *An. martinius*, *An. melanoon (subalpinus)*, *An. labranchiae* использованы из статьи Шарахова, Стегний, Брагинец, 1997)

По хромосоме 3 *An. artemievi* соответствует остальным палеарктическим видам, и имеет прикрепление к ядерной оболочке прицентромерными районами 3R и 3L (Рисунок 10).

В то же время, *An. freeborni* по организации хромосомы 3 в питающих клетках отличается от всех изученных палеарктических видов малярийных комаров комплекса *maculipennis* тем, что у этого вида отсутствует прикрепление хромосомы 3 к ядерной оболочке. Это является чётким диагностическим признаком *An. freeborni*.

Хромосома 3 у видов *An. maculipennis*, *An. melanoon (subalpinus)* и *An. artemievi* идентична по дисковой структуре, но эти виды различаются по распределению гетерохроматиновых участков (Рисунок 11).

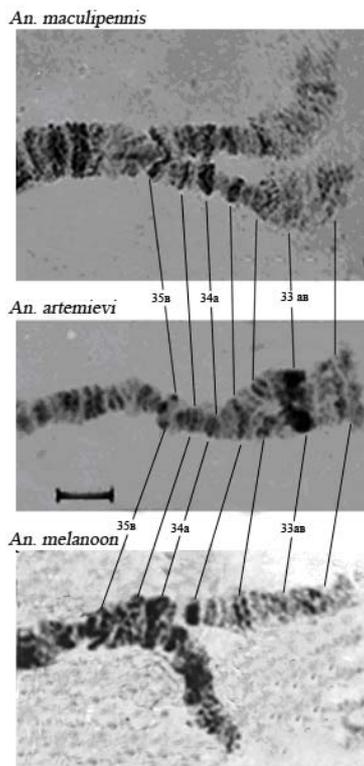


Рисунок 11 - Сравнение прицентромерного участка хромосомы 3L гомосеквентных видов комплекса *maculipennis*

*Примечание:* линиями обозначены гомологичные районы хромосом; 33ав, 34а, 35в – районы хромосом.

У *An. maculipennis* не обнаружено ярких блоков в районах 34, 33. У *An. melanoon (subalpinus)* в районе 34а 3L плеча формируется крупный интеркалярный блок гетерохроматина. В отличие же от *An. melanoon (subalpinus)*, у *An. artemievi* блок располагается ближе к центромере – район 33а/б.

Таким образом, для *An. artemievi* и *An. freeborni* характерны как общие для комплекса *maculipennis* (отсутствие объединения центромерных районов всех хромосом в единый хромоцентр), так видоспецифичные черты пространственной организации политенных хромосом трофоцитов яичников.

## ВЫВОДЫ

Проведённый комплексный популяционно-цитогенетический анализ полиморфизма по инверсиям, структуре гетерохроматина и пространственной организации хромосом 10 видов малярийных комаров комплекса *Anopheles maculipennis* из Палеарктики (9 видов) и Неарктики (1 вид) позволил сделать следующие выводы.

1. Популяционно-цитогенетический анализ полиморфизма по инверсиям показал, что за последние годы (2003-2005 гг.) существенно изменились частотные характеристики адаптивного инверсионного полиморфизма у *An. messeae* по сравнению с 1972 -1981 гг.
2. Хромосомные инверсии, ранее доминирующие на юго-западе ареала вида (XL<sub>00</sub> 2R<sub>00</sub> 3R<sub>00</sub> 3L<sub>00</sub>) стали преобладать и в центральной части ареала.
3. Изучение полиморфизма по блокам прицентромерного гетерохроматина хромосомы 2 *Anopheles messeae* в 1998 -2004 гг. выявило пространственно-временную динамику частот вариантов, при этом в географически отдаленных популяциях не обнаружено значимых изменений, тогда как сезонные изменения частот демонстрируют устойчивую динамику отдельных вариантов, связанную очевидно с изменением их адаптивной ценности в сезоны размножения и зимовки популяции.
4. Исследование молекулярной организации прицентромерного гетерохроматина *An. messeae* и *An. atroparvus* показало отличия по содержанию и локализации в хромосомах консервативных повторов ДНК. Выявлены фрагменты высокоповторяющихся последовательностей ДНК обеспечивающие взаимосвязь хромосом с ядерной оболочкой.

5. Межвидовой анализ линейной и пространственной организации хромосом трофоцитов яичников 10 видов малярийных комаров позволил установить отличия видов *An. artemievi* и *An. freeborni* по распределению гетерохроматина и по характеру взаимодействия хромосом с ядерной оболочкой от других видов комплекса *maculipennis*, что позволяет их чётко идентифицировать.

#### СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. **Русакова А.М.**, Шарахова М.В. Полиморфизм прицентромерного гетерохроматина в природных популяциях малярийных комаров // Труды Второй сибирской школы молодого учёного. – Томск, 2000. – Т. 1. – С. 117 - 120.
2. **Русакова А.М.**, Шарахова М.В. Сезонная, годовая и межпопуляционная динамика полиморфизма прицентромерного гетерохроматина хромосомы 2 в питающих клетках яичников малярийного комара *Anopheles messeae* // Материалы II Съезда ВОГиС. – Санкт-Петербург, 2000.
3. **Rusakova A.M.**, Sharakhova M.V. Variability of a pericentric heterochromatin inconnection with adaptation of natural populations of malarial mosquitoes // International Conference “Biodiversity and Dynamics of Ecosystems in North Eurasia” - Novosibirsk, 2000. – V. 1– P. 99.
4. **Русакова А.М.**, Шарахова М.В., Стегний В.Н. Изучение сезонной и популяционной изменчивости прицентромерного гетерохроматина малярийных комаров *Anopheles messeae* Fall. // Материалы III съезд ВОГиС “Генетика в XXI веке: современное состояние и перспективы развития”. – М., 2004. – Т. 2. – С. 220.
5. Артёмов Г.Н., **Русакова А.М.**, Стегний В.Н. Инверсионный полиморфизм малярийного комара *Anopheles messeae* в природных популяциях // Вестник Томского государственного университета. Бюллетень оперативной научной информации. - 2004 - №30. - С. 3 - 7.
6. Грушко О.Г., **Русакова А.М.**, Стегний В.Н., Шарахова М.В., Шарахов И.В. Особенности локализации повторённых последовательностей ДНК в прицентромерном гетерохроматине малярийных комаров комплекса “*Anopheles maculipennis*” // Цитология. – 2006. – Т. 48. - № 3. – С. 240 - 245.
7. Артёмов Г.Н., **Русакова А.М.**, Стегний В.Н. Полиморфизм прицентромерного гетерохроматина хромосомы 2 трофоцитов яичников *Anopheles messeae* Fall. в природной популяции Томска // Материалы VII Межрегионального совещания энтомологов Сибири и

Дальнего Востока в рамках Сибирской зоологической конференции. – Новосибирск, 2006. – С. 22 – 24.

8. **Русакова А.М.**, Стегний В.Н. Цитогенетический анализ поличенных хромосом трофоцитов яичников малярийного комара *Anopheles freeborni* // Материалы VII Межрегионального совещания энтомологов Сибири и Дальнего Востока в рамках Сибирской зоологической конференции. – Новосибирск, 2006. – С. 126 - 127.
9. **Русакова А.М.** Экологическая дифференцировка особей с различными вариантами блока прицентромерного гетерохроматина в природной популяции малярийного комара *Anopheles messeae* Fall. // Материалы Международной конференции “Проблемы популяционной экологии животных”. – Томск, 2006. – С. 249 - 251.