На правах рукописи

Сибатаев Ануарбек Каримович

Филогения и таксономический статус близкородственных видов кровососущих комаров р.р. *Anopheles Meigen* и *Culex Linnaeus* фауны России и сопредельных территорий

Специальность: 03.00.08 – зоология

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
доктора биологических наук

ТОМСК – 2007

Работа выполнена в НИИ биологии и биофизики ГОУ ВПО «Томский государственный университет»

Научный консультант
доктор биологических наук, профессор Стегний Владимир Николаевич

Официальные оппоненты:
доктор биологических наук, профессор Бабенко Андрей Сергеевич, кафедра защиты растений, Томский государственный университет
доктор биологических наук, профессор Бугров Александр Геннадиевич, факультет естественных наук, Новосибирский государственный университет
доктор биологических наук, Комарова Людмила Алексеевна, кафедра биологии и химии, Бийский педагогический государственный университет

Ведущая организация:
Институт экологии растений и животных УрО РАН

Защита состоится «_15_» ноября 2007 г. в 14.00 часов на заседании диссертационного совета Д 212.267.09 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 «09» октября 2007 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета
доктор биологических наук В.П.Середина

Актуальность темы. Кровососущие комары семейства *Culicidae* являются одной из наиболее интенсивно изучаемых групп насекомых в связи с их эпидемиологической значимостью как переносчиков малярии, желтой лихорадки, лихорадки Денге, энцефалитов и других трансмиссивных болезней.

На примере многих видовых комплексов показано, что даже близкородственные виды кровососущих комаров обладают различной способностью к переносу поражающих человека трансмиссивных болезней, различной антропофильностью, различной широтой ареала и численностью, что придаёт им разную эпидемическую значимость. Точная идентификация видов является важной как для фундаментальных, так и для прикладных исследований. Это особенно необходимо для переносчиков заболеваний при проведении широких кампаний по регуляции их численности. Проблемы в классической таксономии близкородственных видов заключаются не только в сильном морфологическом сходстве между ними, но также и в выраженной морфологической изменчивости в пределах вида.

Решение сложных таксономических ситуаций требует комплексного подхода, который включает морфологические, молекулярные, цитогенетические и экологические исследования. Известно, что виды-двойники комплексов часто отличаются по способности переносить опасные болезни, поэтому идентификация видов этих комплексов важна для прогнозирования распространения заболеваний.

Особый интерес представляют виды-двойники малярийных комаров, объединяемых в комплекс "*Anopheles maculipennis*". Этот комплекс занимает огромную территорию Голарктики и является интересным объектом для решения вопросов филогенеза, видообразования и таксономии (Kitzmiller et al., 1967, Стегний, 1991). Комары комплекса «*Culex pipiens»* также представляют большой научный и практический интерес. Высокая экологическая пластичность, сложная таксономическая структура и характер взаимоотношений между членами комплекса привлекают постоянное внимание исследователей (Laven, 1967; Виноградова, 1997).

Несмотря на достаточно хорошую морфо-экологическую (Беклемишев, 1944; Мончадский, 1951) и цитогенетическую изученность (Frizzi, 1947, 1953; Kitzmiller et al., 1967; Стегний, и др., 1976; Стегний, 1979), виды комплекса "*maculipennis*" можно идентифицировать в основном по структуре политенных хромосом или морфологии яиц, а также по молекулярным данным, что затрудняет решение научных и практических вопросов. Виды и формы комплекса *Culex pipiens* трудно идентифицировать по структуре политенных хромосом: их диагностика возможна только молекулярными методами. По личинкам *C. torrentium* и *C. p. pipiens* не различимы, определение ведется только по самцам, диагностическое значение имеют особенности строения гипопигия (Service, 1968; Виноградова, 1997).

Определение видов-двойников должно основываться на комплексе признаков: морфологических, экологических, этологических, генетических, что предполагает необходимость комплексных исследований. Комплексный подход особенно актуален применительно к близкородственным видам для оценки эколого-генетических принципов адаптации популяций и видов к условиям обитания. Обычная идентификация видов на основе фенотипа (морфотипа) является самым дешевым, быстрым и простым методом (White, 1977).

Цель работы: Анализ филогенеза и характера морфо – физиологической адаптации и эволюции видов на основе исследования морфологической, цитогенетической и молекулярно-генетической дифференциации близкородственных видов комплексов «*Anopheles maculipennis*» и «*Culex pipiens*».

Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие задачи:

1. Изучить фенотипическую изменчивость в природных популяциях кровососущих комаров близкородственных видов комплексов «*Anopheles maculipennis*» и «*Culex pipiens*».

2. Провести морфологическое описание близкородственных видов и составить определительные таблицы.

3. Выявить морфологические признаки для идентификации видов в онтогенезе в соответствии с хромосомной структурой видов.

4. Выяснить молекулярно-генетическую дифференциацию видовых популяций в комплексах «*Anopheles maculipennis*» и «*Culex pipiens*» с помощью метода таксонопринта путём сравнительного анализа повторов геномной ДНК.

5. Осуществить поиск молекулярно – генетических маркеров для идентификации представителей комплекса «*Culex pipiens*» и оценки их внутри – и межвидовой изменчивости.

6. Выявить молекулярно-генетическую внутри- и межвидовую изменчивость и дивергенцию у членов комплекса «*Culex pipiens*».

7. Выяснить адаптационные признаки по физиологическим параметрам у малярийных комаров.

8. Провести анализ филогенетических связей в комплексе «*Anopheles maculipennis*» на основе хромосомных, молекулярных и морфологических показателей.

Научная новизна. Выявлена фенотипическая изменчивость в географически удаленных популяциях кровососущих комаров р.р. *Anopheles* и *Culex*. Впервые показано, что фенотипическая изменчивость коррелирует со степенью хромосомной изменчивости. Впервые проведено морфологическое описание комаров *An.beklemishevi* и *An.artemievi,* выявленных ранее цитогенетическими и молекулярными методами. Проведен сравнительный морфологический анализ видов-двойников р. *Anopheles*.

По результатам анализа спектров повторяющихся последовательностей ДНК у кровососущих комаров получены новые данные о межвидовой и межродовой изменчивости геномов *Anopheles, Culex* по составу семейств повторяющихся ДНК.

Выявлены различия в чувствительности к патогену Bti у личинок комаров *An.messeae* и *An.beklemishevi* с различными фенотипическими, физиологическими, весовыми и размерными параметрами и показано, что чувствительность комаров к патогену существенно различается в зависимости от вариаций этих параметров. Изучена генетическая детерминация физиологического параметра - скорости поглощения пищи личинками. Показано, что особи с разными хромосомными вариантами имеют различия по этим физиологическим параметрам.

Впервые проведенное изучение ряда близкородственных видов комплекса "*maculipennis*" по многим морфологическим признакам позволило провести реконструкцию филогенеза и установить соответствие характера эволюции морфологических признаков с ранее полученными данными по хромосомному и гибридологическому анализу (Стегний, 1991).

Практическая значимость. Впервые уточнен видовой состав малярийных комаров России, Средней Азии и Казахстана. Составлены определительные таблицы на различных стадиях развития малярийных комаров в азиатской части России и сопредельных территориях, что важно для практических энтомологов. Впервые были найдены видоспецифичные RAPD – маркеры для идентификации *Culex torrentium*. Определена нуклеотидная последовательность RAPD – праймеров. Показано, что

ПЦР с использованием SCAR – праймеров является простым, быстрым и надежным методом идентификации *C. torrentium.* Полученные данные по пищевому поведению личинок необходимы при обработке биопрепаратами с целью регулирования численности комаров. Полученные результаты по фенотипической изменчивости дают информацию для различных биомониторинговых и других экологических исследований.

Апробация результатов. Материалы работы представлены: на конференции «Проблемы экологии Томской области», Томск, апрель 1992 г.; на региональной научно-практической конференции (Томск, 1994); на I съезде ВОГиС, декабрь, 1994, г. Саратов; на 10 th. European SOVE Meeting, (Strasbourg, 1996); на XX International Congress of Entomology (Firence, Italy, 1996); на I научной конференции Новосибирского отделения Паразитологического общества РАН «Паразиты и паразитарные болезни в Западной Сибири» (Новосибирск. 1996); на II En Gebi Conference on bacterial control of agricultural insect pests and vectors of human diseases (Shoresh, Israel, 1996); на I международном симпозиуме «Эволюция жизни на земле» (Томск, 1997); на XI энтомологическом съезде (Санкт-Петербург, 1997); на конференции «Проблемы эволюционной цитогенетики, селекции и интродукции» (Томск, 1997); на VI Всероссийском диптерологическом симпозиуме «Место и роль двукрылых насекомых в экосистемах» (Санкт-Петербург, 1997); на научной конференции «Проблемы энтомологии в России» научной конференции «Биологическое разнообразие животных Сибири» (Томск, 1998); на I Международной конференции «Биоразнообразие и динамика экосистем Северной Евразии» (Новосибирск, 2000); на I, II и III Международных конференциях «Проблема вида и видообразование», Томск (2000, 2001, 2004); на I Международной Школе-семинаре «Кровососущие насекомые – переносчики трансмиссивных заболеваний и проблемы генетической безопасности» (Москва, 2002); на XII Съезде Русского энтомологического общества (2002); на III Съезде Вавиловского общества генетиков и селекционеров, Москва (2004); VII Межрегиональном совещании энтомологов Сибири и Дальнего Востока «Энтомологические исследования в Северной Азии» (Новосибирск, 2006); на I Всероссийском совещании по кровососущим насекомым (Санкт-Петербург, 2006); XIII съезде Русского энтомологического общества (Краснодар, 2007).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 48 работы (среди них 19 статей, из которых 17 в рецензируемых журналах, входящих в перечень ВАК).

Положения, выносимые на защиту:

1. Фенотипическая изменчивость характерна для разных видов кровососущих комаров. Большей фенотипической изменчивостью отличаются полиморфные по хромосомному составу виды кровососущих комаров по сравнению с мономорфными видами. Флуктуирующая асимметрия количественных признаков малярийных комаров варьирует под действием неблагоприятных факторов (патогеная микрофлора) и зависит от хромосомной структуры популяции.

2. В популяциях *C. p. pipiens* L. 1758,, *C. p. molestus* Fors., 1775 и *C. torrentium* Mart., 1924 умеренных широт существует генетическая дифференциация по геномной ДНК. В природных популяциях видов комплекса *«C.pipiens»* отсутствуют гибридные формы. В зонах симпатрии природных популяций между *C. p. pipiens*, *C. p. molestus* и *C. torrentium* отсутствует гибридизация. Личинки комаров *C. p. pipiens* и *C. torrentium,* обитающих совместно в открытых водоемах, имеют большее морфологическое сходство между собой, чем с *C. p. molestus,* обитающим в основном в закрытых помещениях.

3. У кровососущих комаров комплексов *«An.maculipennis»* и «*C.pipiens»* спектры повторяющихся последовательностей ДНК отличаются разнообразием в организации повторов и низким содержанием общих фракций.

4. Близкородственные виды комаров комплекса *«An.maculipennis»* имеют разную степень сходства по морфологическим признакам. Виды, находящиеся в одной филетической линии ближе по морфологии, чем в разных линиях. Характер эволюции морфологических признаков у видов комплекса *«maculipennis»* соответствует филогенетической схеме, предложенной ранее на основе гибридологического и хромосомного анализов.

Структура диссертации. Диссертация состоит из введения, семи глав, заключения выводов. Текст диссертации изложен на 284 страницах и включает 39 таблиц и 90 рисунков. Список литературы содержит 441 источников, из которых 258 на иностранном языке.

Благодарности. Выражаю искреннюю благодарность всем соавторам публикаций, сотрудникам НИИББ ТГУ за помощь и поддержку при выполнении данной работы. Особую признательность выражаю научному консультанту проф. В. Н. Стегнию за всестороннюю помощь и поддержку.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Глава 1. Современное состояние исследования кровососущих комаров семейства *Culicidae*

В данной главе приведены сведения о комарах комплексов *«Anopheles maculipennis»* и *«Culex pipiens».* Подробно проанализированы публикации, касающиеся изучения таксономического статуса, морфологии и фенотипической изменчивости, экологии, молекулярной и цитогенетической диагностики кровососущих комаров.

ГЛАВА 2. Материал и методика исследований

Материалом для морфологического анализа послужили выборки личинок и имаго кровососущих комаров комплексов *«maculipennis»* и *«Culex pipiens»,* собранных в разных частях бывшего СССР. Морфологию личинок малярийных комаров изучали параллельно с определением кариотипа. Морфометрические измерение личинок проводили с помощью миллиметровой шкалы на МБС-10. Давленые препараты политенных хромосом готовили по лактоацеторсеиновой методике (Кабанова и др., 1972). В основу настоящего исследования положен материал как собранный лично автором в 1988-2005 годах, так и предоставленный коллегами. Проанализировано 14957 личинок малярийных комаров и 980 имаго малярийных комаров, 2100 личинок комаров комплекса *“Culex pipiens”.*

Личинок комаров комплекса «Culex pipiens» изучали параллельно с молекулярной идентификацией (Crampton, 1994; Hoy, 2003).

Достоверность частных коэффициентов корреляции определена путём сравнения их с критическим значением при уровне значимости 0,05. Определение уровня значимости для парных коэффициентов осуществлено в пакете Statistica 7.0. В данном случае достоверными считали коэффициенты с $p<0,05$.

ГЛАВА 3. Фенотипическая изменчивость кровососущих комаров

Варьирование морфологических признаков у личинок кровососущих комаров связано с разнообразием экологических условий их местообитаний и генетической изменчивостью. Изучение морфологической неоднородности преимагинальных фаз развития комаров имеет важное значение для диагностики видов, поскольку для низших двукрылых характерно наличие многочисленных видов-двойников, плохо различимых по внешним признакам. У личинок комаров отмечена обширная вариабельность количественных и качественных морфологических признаков (Беклемишев, 1944; Мончадский, 1951; Маслов, 1967; Пестрякова, 1971; Dahl et al., 1988; Сибатаев, Гордеев, 1993; Гордеев, Сибатаев, 1995, 1996; Бурлак, Сибатаев, 1995; Виноградова, 1997; Бурлак, Сибатаев, 1998; Сибатаев, Бурлак, 2000). В главе рассматривается взаимосвязь фенотипического и генетического полиморфизмов. В комплексе «*maculipennis*» самым полиморфным видом является – *An.messeae*, а в комплексе *«C.pipiens» – C.pipiens.* Сравнение этих видов с мономорфными видами позволило определить влияние генетической компоненты на фенотипический полиморфизм.

3.1 Изменчивость фенотипа stripe у личинок малярийных комаров в природных водоемах. Изучена частота встречаемости фенотипа stripe (Benedict et al., 1996) у личинок малярийных комаров из природных водоемов. Фенотип stripe хорошо заметен невооруженным глазом. Проявляется в виде рисунка (полосы, пятен или их комбинации) белого цвета, реже – красного цвета на спинной стороне груди и брюшка. Наличие полосы обусловлено отложениями мочевой кислоты в амебоидных клетках жирового тела, сходных с уроцитами. Предполагается, что пигмент имеет адаптивное значение, предохраняя окрашенных личинок от избыточной инсоляции.

Частота фенотопа *stripe* (*st*) в популяциях малярийных комаров довольно значительна. В течение 4 лет обследовано свыше 10 тыс. личинок малярийных комаров (*An. messeae, An. beklemishevi. An. maculipennis, An. sinensis*) из более чем 30 водоемов Западной Сибири, Среднего Урала, Алтая, Северного Казахстана, Дальнего Востока и Подмосковья. Фенотип stripe имеет значительную изменчивость.

Доля пигментированных личинок варьировала от 13,5 до 57, 3 % в различных водоемах и увеличивалась на юг и запад. В одновременных выборках с участков одного водоема различий в концентрации пигментированных особей не обнаружено. В разных водоемах одного местообитания частота окрашенных особей достоверно варьировала. По межсезонной динамике частоты фенотипа stripe у личинок малярийных комаров водоемы делились на "стабильные" и "лабильные".

3.2. Изменчивость количественных признаков личинок

Для оценки внутри- и межпопуляционной фенотипической изменчивости использовали один из самых вариабельных морфологических признаков - количество зубцов гребней стигмальной пластинки (Мончадский, 1951). Личинки малярийных комаров 4-го возраста имеют на каждом из двух гребней по 5 - 11 больших зубцов, между которыми помещается от 0 до 11 более мелких. Суммы зубцов на правом и левом гребнях одной и той же личинки могут не совпадать (явление асимметрии, которое демонстрирует вариативность выражения признака в ходе онтогенеза). В связи с этим подсчитывалось количество зубцов на обоих гребнях.

Исследование проводили на выборках личинок малярийных комаров из Средней Азии и Сибири. Число зубцов было просчитано у 785 личинок *An.beklemishevi* и 3490 личинок *An. messeae*.

При сравнительном анализе всех популяций (г. Томск, пос. Тегульдет, пос. Киреевск и Коларово) двух видов выяснилось, что количество зубцов на гребне у *An.beklemishevi* выше, чем у *An.messeae* (Рисунок 1). Анализ этого признака по полу показывает, что количество зубцов на гребне самок больше у обоих видов.

Сравнение количества больших и малых зубцов стигмальной пластинки личинок выявило, что во всех популяциях больше зубцов у особей с хромосомной инверсией $2R_{00}$, чем у личинок с инверсией $2R_{11}$ (Рисунок 2). Сравнительный анализ личинок из разных местообитаний показал, что число малых зубцов закономерно увеличивается в направлении с юга на север (Сибатаев, Гордеев, 1996; Сибатаев, Бурлак, 1996).

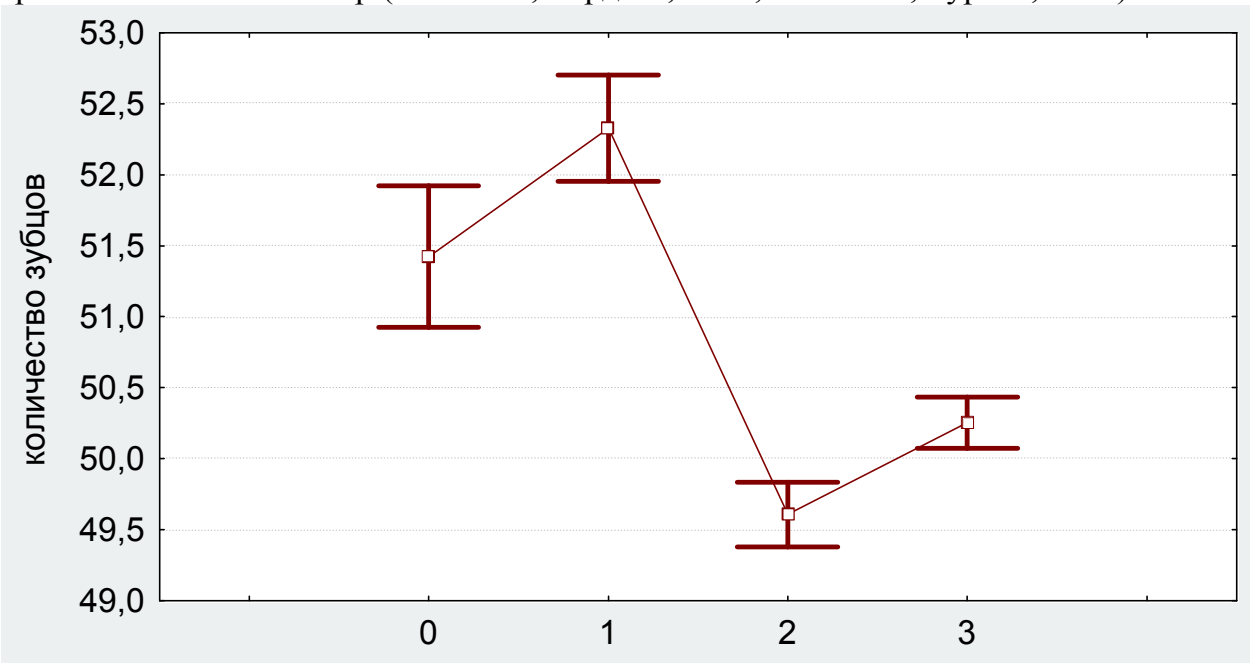

Рисунок 1 – Количество больших и малых зубцов гребней стигмальной пластинки
0- самцы *An.beklemishevi*, 1 – самки *An.beklemishevi*, 2- самцы *An.messeae*, 3 - самки *An.messeae.* Указан 95% доверительный интервал.

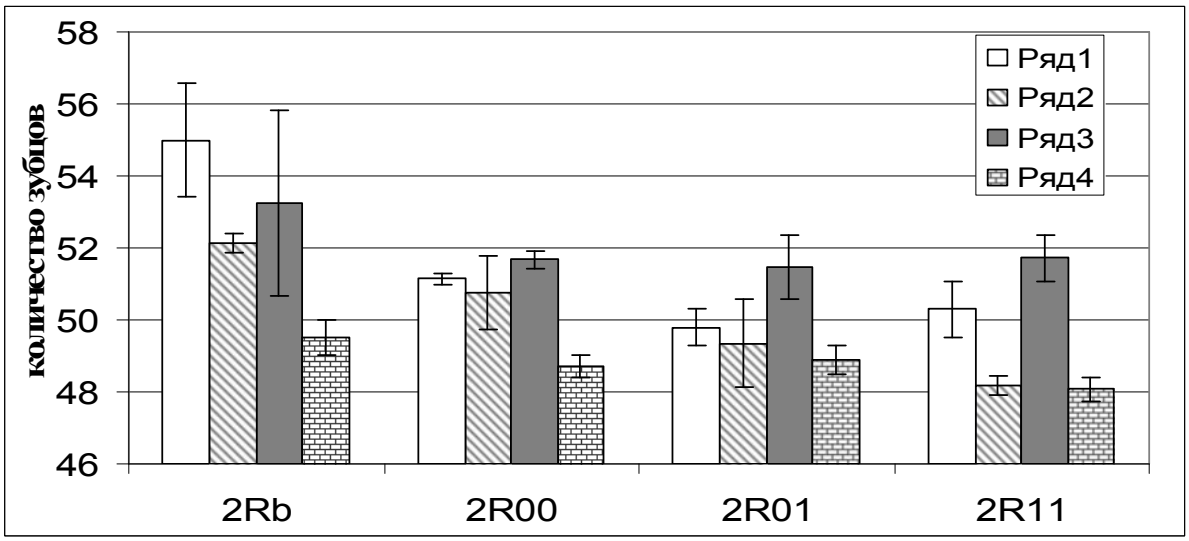

Рисунок 2 – Количество зубцов гребней стигмальной пластинки
Ряд 1 – г. Томск, ряд 2 – пос. Тегульдет, ряд 3 – пос. Коларово, ряд 4 – пос. Киреевск. 2Rb- *An.beklemishevi*, $2R_{00}$,$2R_{01}$, $2R_{11}$ – *An. messeae*.
Указан 95 % доверительный интервал

В Киргизии и на юге Казахстана среднее число зубцов не превышает 33,50; в пос. Науалы возрастает до 33,73 и в пос. Коларово достигает 36,83 ($p < 0,001$).

Изменчивость морфологических признаков видов комплекса *C.pipiens.* В изученных популяциях представителей комплекса «*C.pipiens*» в искусственных открытых водоемах чаще встречаются комары вида *C.torrentium* и иногда *C.p.pipiens.* В искусственных закрытых водоемах со 100% частотой встречается комар *C.pipiens molestus.* Многие исследователи, изучающие виды этого комплекса, отмечают, что большинство морфологических различий между ними носит количественный характер, что для идентификации в симпатрических популяциях не всегда удобно.

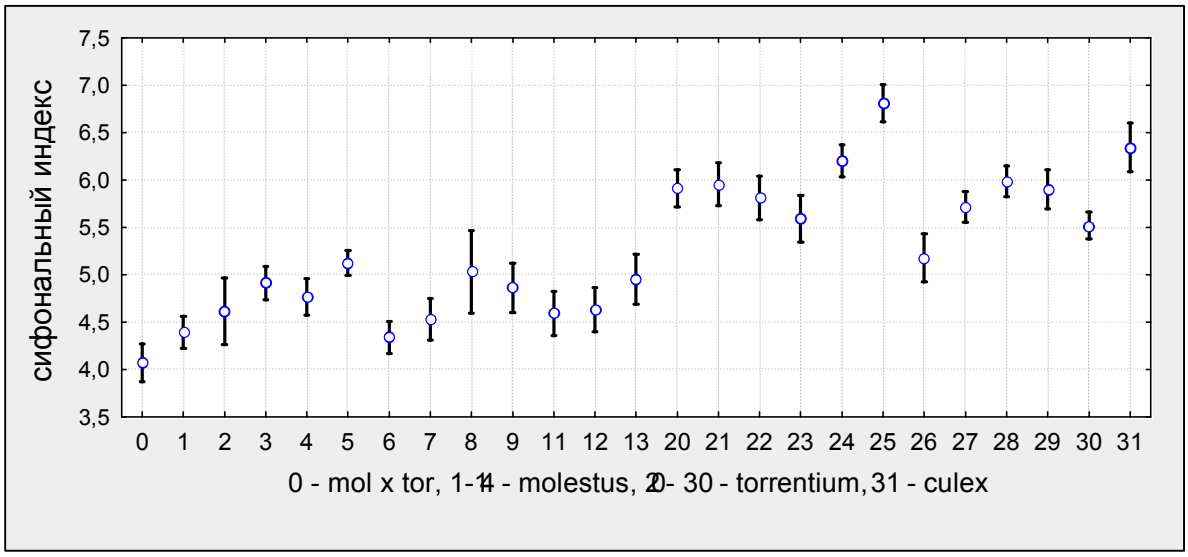

Рисунок 3 – Сифональный индекс личинок. 1-13 – выборки из подвальных помещений г. Томска, 20 – пос. Белоусово Томской области (ТО), 21, 27-30 – Керамический завод, 22 , 23, 26 – пос. Белоусово, 31 – г. Томск (открытый водоем); 24 – пос. Аксаковка (Казахстан), 25 – г. Алматы (Казахстан).
Указан 95 % доверительный интервал

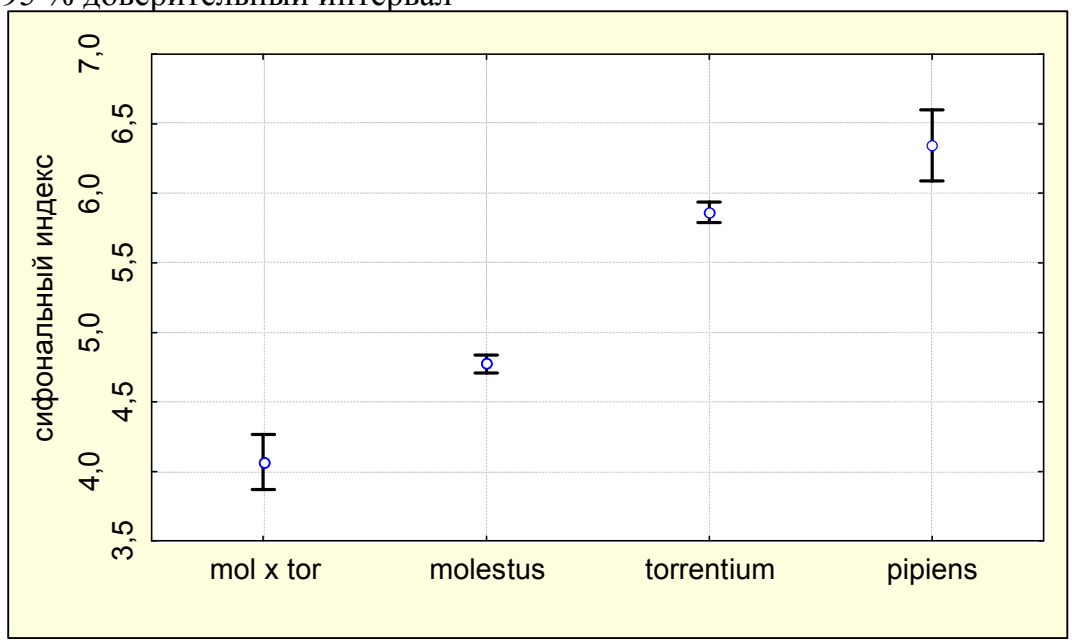

Рисунок 4 – Сифональный индекс личинок комаров по видам и подвидам.
mol x tor – гибриды *F1:* ♀♀ *C. p. molestus x* ♂♂ *C. torrentium.*
Указан 95 % доверительный интервал.

Отмечено, что величина сифонального индекса косвенно связана с добыванием пищи. Зубцы ментума связаны непосредственно с пищевым поведением личинок. Морфологические структуры, имеющие большую функциональную нагрузку, характеризуют дивергенцию популяций (Ивницкий и др., 2006). Исследование сифонального индекса у личинок комаров выявило различие между выборками (Рисунок 3). Наименьший сифональный индекс оказался у гибридов комаров (выборка № 0, Рисунок 3). Наибольший сифональный индекс оказался у личинок комаров *C.p.pipiens* и *C.torrentium*.

При объединении и сравнении сифонального индекса личинок по видам и группам выявлены интересные результаты (Рисунок 4). Дисперсионный анализ по данному признаку показал четкие различия (SS= 288,7, df=3, $p<0.01$). Использование метода критерия наименьшей значимой разности обнаружило различие по сифональному индексу между выборками ($p<0.01$).

Важным признаком, позволяющим идентифицировать виды и подвиды комплекса «*Culex pipiens»,* является количество зубцов на ментуме. По данному признаку выявляется две группировки: *molestus* и *torrentium – pipiens*.

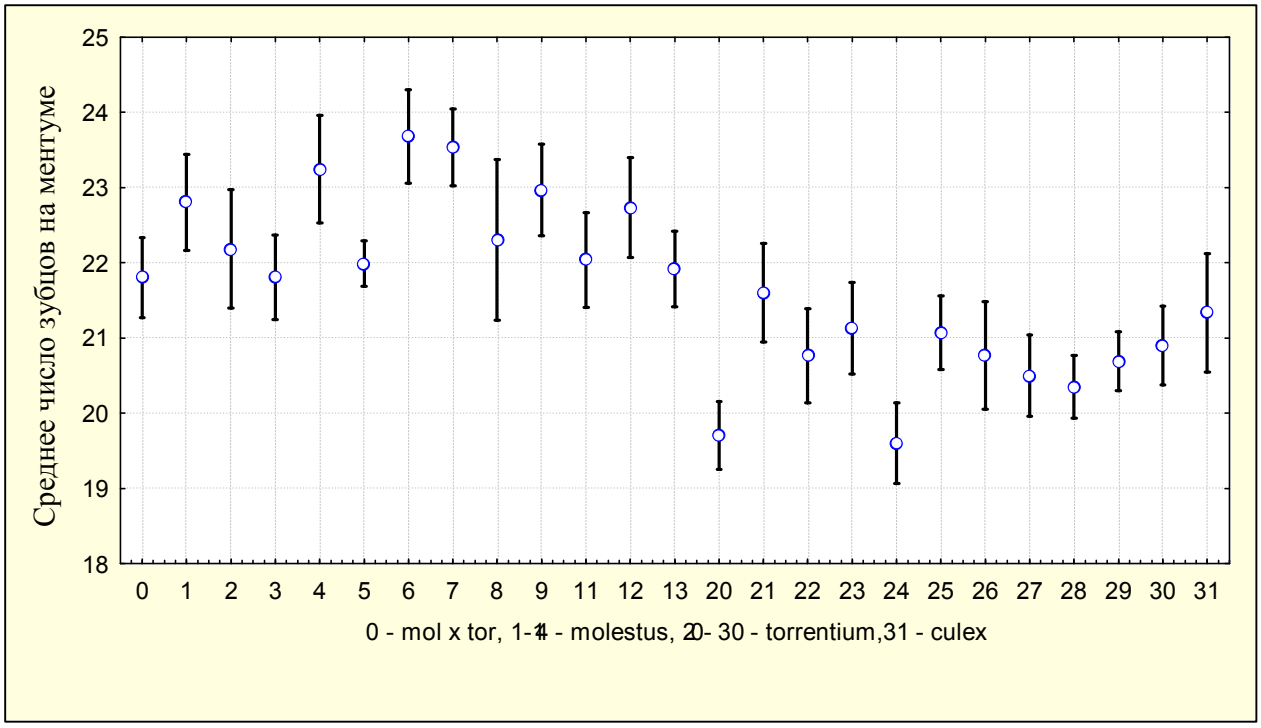

Рисунок 5 – Количество зубцов на ментуме у личинок.
Обозначение в рисунке 3. Указан 95 % доверительный интервал.
mol x tor - гибриды *F1:* ♀♀ *C. p. molestus x* ♂♂ *C. torrentium.*

Наибольшее количество зубцов на ментуме у личинок *C. p. molestus*, наименьшее – у *C.torrentium* и *C.p. pipiens* (Рисунок 5). Использование данного признака в сочетании с сифональным индексом позволяет идентифицировать комаров *C.p.molestus* от других видов комплекса. Полученные различия по количеству зубцов ментума, по-видимому, связаны с различиями поведенческих актов в добывании пищи личинками комаров комплекса «*C. pipiens»*.

3.3 Изменчивость морфологии класпет гипопигиев самцов малярийных комаров комплекса *Anopheles maculipennis*

Исследовано вооружение класпет гипопигиев восьми палеарктических видов малярийных комаров комплекса *«Anopheles maculipennis»: An.beklemishevi*, *An.messeae, An maculipennis, An melanoon, An.artemievi, An.sacharovi*, *An. martinius, An.atroparvus*. Сравнительные данные показывают, что наибольшей изменчивости подвержены дорсальные шипы класпет. Изменчивость морфологических признаков класпет весьма значительна в пределах одного вида. По всей видимости, в процессе видообразования, у видов – двойников комплекса «*maculipennis»* не происходило значительной дивергенции по данному признаку.

Таким образом, анализ изменчивости морфологических признаков на разных стадиях развития позволяет сделать предположение, что наличие внутривидовых группировок в популяциях полиморфных видов *C.pipiens* и *An.messeae* повышает экологическую пластичность этих популяций. Полиморфные виды комаров с различными адаптивными комплексами сосуществуют в условиях динамического равновесия и успешно конкурируют с другими видами.

Глава 4. Морфология малярийных комаров комплекса *Anopheles maculipennis* на территории России

Подробный морфологический анализ, сопровождаемый кариотипическими и молекулярными данными, позволил оценить и выявить ряд морфологических показателей для идентификации видов-двойников в комплексе *An.maculipennis*. Представлены морфологические описания видов, открытых на основе цитогенетических и молекулярных исследований (Стегний, Кабанова, 1976; Гордеев и др., 2005). В данной главе дается описание представителей комплекса *“maculipennis”* и определительные таблицы для различных стадий развития.

4.1. *Anopheles beklemishevi* Stegniy and Kabanova, 1976

Яйца. Рисунок экзохориона яиц *An.beklemishevi* схож с рисунком *An.maculipennis.* На поверхности, ближе к концам, имеются две темные поперечные полосы, более широкие у яиц *An.beklemishevi* (Стегний, Кабанова, 1976). Воздушные камеры хорошо развиты, поверхность межреберной перепонки морщинистая.

Личинка IV стадии. Внутренние волоски наличника 2, прикрепляющиеся к бугоркам, сближены своими основаниями. Эти волоски в основном бывают в следующих вариациях: простых или разделяющихся на вершине на 2 ветки. Наружные волоски наличника 3 дихотомически разветвлены.

Три срединных волоска переднегруди включают: внутренний (1) – короткий, который может ветвиться на конце; средний (2) – длинный перистый; наружный (3) - короткий простой. Переднегрудная плевральная группа состоит из длинных простых волосков 9, 10, 12, и короткого простого волоска 11. Волоски 10 и 12 одинаковой длины и длиннее волоска 9. Среднегрудная плевральная группа образована двумя длинными простыми волосками 9, 10 и короткими волосками 11 и 12. Заднегрудная плевральная группа включает длинные простые волоски 9 и 10, короткий простой волосок 11. Волосок 12 короткий, простой или разделяющийся на две ветви. Заднегрудной волосок 6 простой, иногда раздвоенный**.**

Основными отличиями в морфологии личинок *An.beklemishevi* от других членов комплекса *An.maculipennis* являются следующие: 1. Внутренние волоски наличника 2

простые или разделяющиеся на вершине на 2 ветки; 2. Переднегрудная плевральная группа состоит из длинных простых волосков 9, 10, 12 и короткого простого волоска 11, волоски 10 и 12 одинаковой длины и длиннее волоска 9.

Куколка. Интегумент светлый, желтоватый. Дорзальный апотом со слегка вогнутой или плоской верхушкой подобен откидной створке без апикального выступа. Передний угол скутума широкий, около 90° (в 80%), переходящий в короткую прямолинейную лопасть. Медиальный киль со слабо выраженными поперечными полосами. Латеральная линия медиального киля длинная, продлевается от волоска 4-СТ за волосок 8-СТ (в 78 %), в остальных случаях не доходит до основания волоска 8-СТ.

Труба. Angusticorn типа, простая, с глубокой расселиной, листок ее коричневого цвета. Длина трубы 0,8-1,1 мм, в среднем 0,94 мм, ширина 0,1-0.15 мм, в среднем 0.11мм, индекс 6.2-10.0, в среднем 7.75. Длина листочка составляет 0.47-0.56, в среднем 0.52 от длины трубы.

Имаго. Общая окраска по большей части тела серовато-бурая. Голова с боков с темно-серыми чешуйками, на макушке с такими же чешуйками чисто белого цвета; лоб с торчащим вперед пучком серебристых чешуек и волосков. Хоботок и щупики одноцветно темно-серые. Усики серые, у основания члеников с розетками довольно длинных бурых волосков; первые 5-7 члеников усиков со светлыми кольцами в местах соединения.

Крылья самок и самцов различаются по длине (соответственно 6,7±0,21 мм и 6,3±0,21 мм, $p<0.005$). Ширина крыла самок превышает ширину крыла самцов (соответственно 1,5±0,01 мм, и 1,2±0,02 мм, $p<0.001$).

По сравнению с *An. beklemishevi*, особи *An. messeae* более крупные. Общий окрас тела – рыжевато-коричневый. Отличается размер и расположение апикального пятна: оно меньше по величине, образовано золотисто-желтыми чешуйками и расположено от ветвления радиальной жилки- R_1 до R_{4+5} (Рисунок 6). Пятно менее контрастно по отношению к общей окраске крыла, встречаются особи без явно выраженного апикального пятна. Величина и расположение пятна на верхушке крыльев у самок *An.messeae* и *An.beklemishevi* может считаться систематическим признаком.

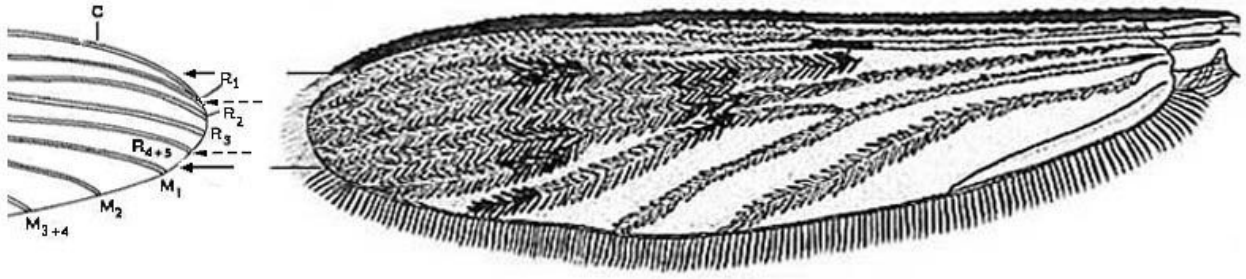

Рисунок 6 – Крыло комара *An. beklemishevi*. На схеме сплошными стрелками указаны границы апикального пятна *An. beklemishevi*; прерывистыми - *An. messeae*. Жилки: С – костальная, R_1, R_2, R_3, R_{4+5} – радиальные, M_1, M_2 – медиальные.

4.2. *An. artemievi* Gordeev et al., 2004

Яйца. На поверхности экзохориона яиц *An. artemievi* отсутствует какой-либо рисунок, поверхность одноцветная светло-серая. Яйца имеют форму лодки с легким расширением на переднем конце. При рассмотрении сбоку видно, что дорзальная поверхность слегка вогнута, а боковые части более выпуклые. В срединной части каждого яйца воздушные поплавки не развиты, присутствует только оторочка. На каждом боковом конце яйца имеются 3–4 крупных розетковидных воздушных

пузырька с 5-7 боковыми лепестками, окруженных склеротизированной каймой. Остальная поверхность покрыта более мелкими колбовидными пузырьками. Пузырьки хориона на наружных боковых поверхностях располагаются отдельно друг от друга, имеют уплощенную, сглаженную поверхность и полностью закрыты тонким мембрановидным слоем – пластроном, составленным из пяти - шестиугольных ячеек.

Личинка IV стадии. (обозначения по Рейнерту (Reinert et al., 1997)) Личинки в основном светлые, серого или желтоватого цвета. Обитают в хорошо прогреваемых стоячих или слабо текучих водоемах с густой растительностью. Длина тела в среднем 6.3±0.6 мм.

Голова. Длина головы в среднем 0.77±0.007 мм; ширина – 0.75±0.007 мм; индекс головы 1.1. Внутренние волоски наличника 2, прикрепляющиеся к бугоркам, сближены своими основаниями. Эти волоски бывают простые или разделяющиеся на вершине на 2 ветки. Наружные волоски наличника 3 дихотомически разветвлены и, по сравнению с *An. messeae* Falleroni, 1926, имеют меньшее количество ветвлений (рис. 7). Эти волоски у *An. martinius* Shingarev, 1926, *An. sacharovi* Favre, 1903 также характеризуются небольшим количеством ветвлений. У видов *An. artemievi, An. martinius*, *An. sacharovi* наружные волоски наличника заходят за края боковых лопастей верхней губы, в отличие от других палеарктических видов комплекса *maculipennis.* Антенны покрыты шипиками, дистальные участки антенн слегка пигментированы. Длина антенны – 0,34±0,01 мм. Волосок 1 антенны ветвится от 2 до 7 раз. Волосок на антенне короче, чем у *An. messeae*.

Грудь. Переднегрудная плевральная группа состоит из длинных простых волосков 10, 12 и короткого простого волоска 11. Волоски 10 и 12 одинаковой длины и длиннее волоска 9, который ветвится 2–5 (3) раз. Среднегрудная плевральная группа образована двумя длинными простыми волосками 9, 10 и короткими волосками 11 и 12.

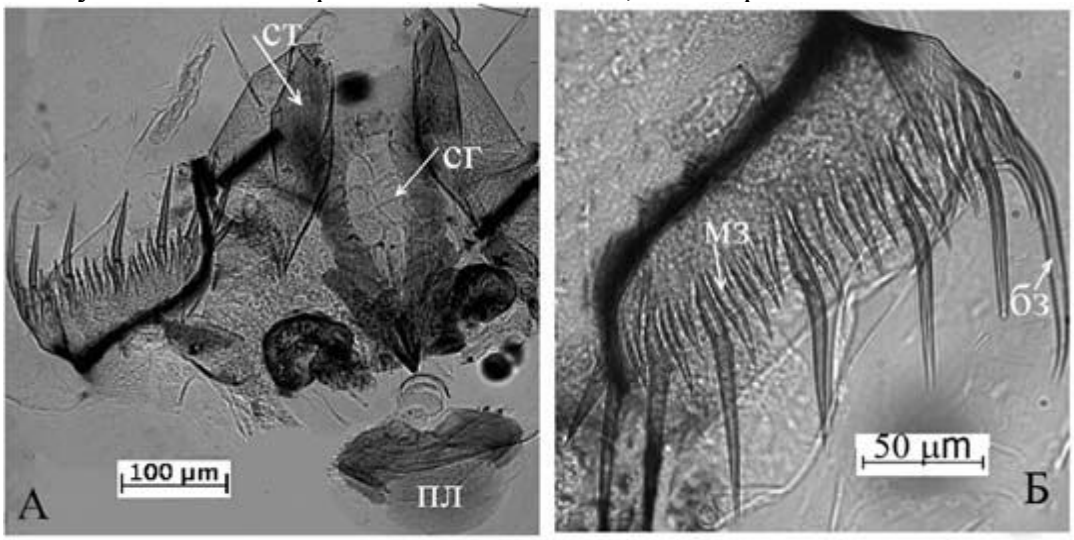

Рисунок 7 – А – стигмальная пластинка и гребень стигмальной пластинки *An. artemievi*. Б - гребень стигмальной пластинки *An. artemievi*. *An. messeae*. Обозначения: СТ– стигмальная пластинка; СГ – срединная грануляция; ПЛ – передняя лопасть; БЗ – большие зубцы; МЗ – малые зубцы.

Заднегрудная плевральная группа включает длинные волоски 9 и 10, короткий простой волосок 11. Волосок 6 короткий, ветвится 1–3 раза, чаще раздвоен. Волосок 12 обычно с 1–3 (2) ветвлениями.

Хитиновые части стигмальной пластинки достаточно сильно пигментированы. Основание передней лопасти пигментировано в большей степени, вся остальная ее

часть окрашена значительно светлее. Передний отросток своим основанием доходит до границы между передним и средним отделами. В среднем отделе имеется срединная грануляция, проходящая полосой между средним и задним отделами.

Гребень на боковых пластинках VIII сегмента брюшка состоит из 5–10 (7) больших зубцов, между которыми помещаются 0–5 более мелких зубцов. Маленькие зубцы копьевидной формы, сближены своими основаниями. Внутренняя их поверхность покрыта шипиками.

Куколка. Обозначения по Рейнерту (Reinert et al., 1997).

Головогрудь. Интегумент светлый, желтоватый. Дорзальный апотом со слегка вогнутой или плоской верхушкой подобен откидной створке без апикального выступа.

Труба. Angusticorn типа (Reid et al., 1961), простая, с глубокой расселиной, листок ее коричневого цвета. Длина трубы 1.02–1.20 мм, в среднем 1.09±0.03 мм, ширина 0.098–0.13 мм, в среднем 0.11±0,005 мм, индекс 8.67–10.86, в среднем 9.59. Длина листочка составляет 0.55–0.62 мм, в среднем 0.58±0,01 от длины трубы.

Имаго: Комар светлой окраски. Голова с боков с темно-серыми чешуйками, на макушке с такими же чешуйками чисто белого цвета; лоб с торчащим вперед пучком серебристых чешуек и волосков. Хоботок и щупики одноцветно темно-серые. Усики серые, у основания члеников с розетками довольно длинных бурых волосков; первые 5–7 члеников усиков со светлыми кольцами в местах соединения.

Среднеспинка золотисто-желтая. Срединная полоса выражена слегка. Спереди, у головы, близ средней линии, с пучком белых чешуек. Срединная и боковые области среднеспинки густо покрыты короткими белыми и золотистыми волосками. На верхней части боков имеются светло-коричневые и коричневые волоски, в нижней части – длинные черные волоски.

Длина крыла 4.2–4.5 мм, в среднем 4.4 мм, ширина 0.95–1.2 мм, в среднем 1.07 мм. Чешуйки на жилках узкие, длинные, серые. У основания крыла короткие, с зазубренным краем. Пятна на крыловой пластине и апикальное пятно выражены слабо. Пятно на апексе крыла образовано светло-желтыми чешуйками. Оно начинается чуть ниже ветвления радиальной жилки R_1 и заканчивается посредине между жилками R_{4+5} и разветвлением медиальной жилки – M_1 (Рисунок 8).

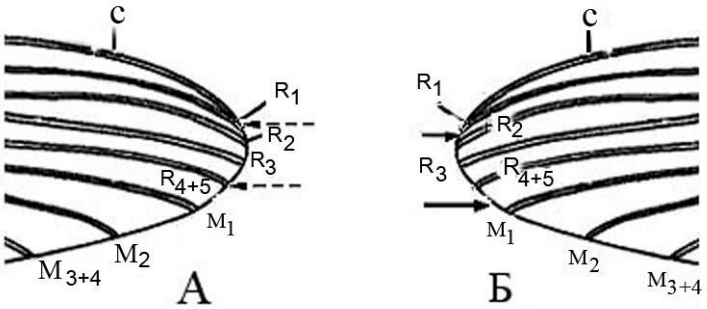

Рисунок 8 – Схема крыла. А – схема крыла *An. messeae,* В – схема крыла *An. artemievi.* Обозначения: пунктирные стрелки – границы апикального пятна *An. messeae* сплошные стрелки– границы апикального пятна *An. artemievi*. Жилки крыла – С– костальная; R_1, R_2, R_3, R_{4+5} – радиальные; M_1, M_2, M_{3+4} – медиальные.

По морфологии личинки и имаго *An. artemievi* является видом – двойником *An. martinius* и *An. sacharovi*. (Гордеев и др., 2005). Имаго имеют светлую окраску тела, срединная матовая полоса среднеспинки не выражена. Пятна темных чешуек на их крыльях хорошо различимы, бахромка у вершины крыла одноцветно темная. На

стадии яйца описано отсутствие воздушных камер, наличие только оторочки и отсутствие рисунка на поверхности.

Сравнивая наши данные по *An. artemievi* с данными Седагата (Sedaghat et al., 2003) по *An. sacharovi,* можно отметить отличия (в основном, количественного характера) видов друг от друга. Так, у личинок *An. artemievi* более округлая голова, внутренний волосок наличника 2 ветвится 1-3 (2) раза, тогда как у *An. sacharovi* 2–5 (4) раза. Волосок 1 переднегруди у *An. artemievi* ветвится 3-7 (5) раз, у *An. sacharovi* 1–5 (4) раза, волосок 9 переднегруди у *An. sacharovi* никогда не бывает простым, у *An. artemievi* подобный вариант встречается. Волосок 2 на V сегменте у *An. artemievi* имеет 1-4 (3) разветвления, у *An. sacharovi* – 6-11 (6) разветвлений. Количество ветвлений волоска 7 на VII сегменте у *An. artemievi* составляет 5-8 (5), у *An. sacharovi* 3–5 (5). Для куколок *An. artemievi* характерны более крупные размеры тела, а также отсутствие дополнительных волосков 8, 10, 11 на II сегменте. Волосок 2 на III сегменте у *An. artemievi* имеет 7-9 (7) ветвлений, у *An. sacharovi* – 4-6 (5) ветвлений. Волосок 1 пятого брюшного сегмента у *An. artemievi* ветвится 3–6 (5) раз, у *An. sacharovi* 1–5 (3) раза. Количество ветвлений волоска 5 на VI и VII сегментах у *An. artemievi* составляет 4–8 (5) и 3–5 (3), у *An. sacharovi* 1-3 (3) и 1-3 (2) соответственно. Волосок 1 плавника у *An. artemievi* всегда простой, у *An. sacharovi* ветвится 2-5 (4) раза. Имаго *An. sacharovi* отличается от *An.artemievi* отсутствием срединной матовой полосы на среднеспинке и апикального пятна на крыловой пластине (Sedaghat et al., 2003). По характеристикам имаго *An. artemievi* занимает промежуточное положение между *An. sacharovi* и *An. maculipennis*. Имаго *An.sacharovi* имеют светлую окраску тела, невыраженную срединную полосу среднеспинки, одноцветную бахромку у вершины крыла (Гуцевич, Дубицкий, 1981). У комаров *An. maculipennis* имаго тело по большей части рыжевато-коричневые, с четкой матовой полосой на среднеспинке и контрастно светлым пятном на апексе крыла.

Нами отмечены некоторые отличительные признаки личинки IV возрастной стадии *An. martinius* – еще одного вида-двойника *An. artemievi.* Спинные пластинки брюшка немного темнее остального покрова. Гребень на боковых пластинках VIII сегмента брюшка состоит из 4–8 (6) больших зубцов, между которыми помещаются 0–5 более мелких зубцов. Маленькие зубцы сосулевидной формы, основания их отстают друг от друга. На их внутренней поверхности в небольшом количестве имеются слабо выраженные шипики. Из количественных признаков можно выделить следующие: волосок 1 переднегруди у *An. artemievi* ветвится 3–7 (5) раз, у *An. martinius* 1-3 (2) раза; волосок 2 на V сегменте у *An. artemievi* разветвляется 1–4 (3) раза, у *An. martinius* – 3-8 (5) разветвлений; на X брюшном сегменте волосок 2 у *An. artemievi* разветвляется 14-25 (17) раз, у *An. martinius* – 3-14 (10) раз.

На территории Кыргызстана *An. sacharovi* и *An. martinius* не встречаются (Гордеев, Сибатаев, 1996). Там, возможно, происходит перекрывание ареалов *An. artemievi* с *An. messeae* – также морфологически сходных представителей комплекса *maculipennis.* На стадии яйца эти виды четко отличаются наличием воздушных камер и рисунка на экзохорионе у *An. messeae*.

При анализе морфологических признаков на личиночной стадии развития выявлено, что длина антенны и волоска на ней варьируют у обоих видов. Для личинок *An. artemievi* характерно меньшее расстояние между основанием антенны до волоска 1А, в отличие от *An. messeae* (соответственно 0.67±0.02 и 0.94±0.05 нм, $p < 0,001$). Этот признак может применяться для определения этих видов при помощи статистических данных (Сибатаев, Шабанова, 2007).

Наиболее интересный результат выявлен при изучении морфологии и числа зубцов стигмальной пластинки. У личинок *An. artemievi* структура малых зубцов отличается от *An. messeae* более утолщенной, копьевидной формой и слабо выраженными шипиками на них. Малые зубцы на гребнях *An. artemievi* сближены своими основаниями (Рисунок 7Б), тогда как для *An. messeae* характерно почти параллельное их расположение относительно друг друга и сильно развитые шипы на зубцах. Число малых зубцов обоих гребней стигмальной пластинки у личинок *An. artemievi* меньше, чем у *An. messeae*. Имеется еще один признак – спинные пластинки брюшка *An. artemievi* такого же цвета, что и весь покров, у *An. messeae* эти пластинки от темно-коричневого до черного цвета (Сибатаев, Шабанова, 2007).

У куколки *An. messeae* волосок 12– СТ ветвится 1–3 (2) раз, у *An. artemievi* 3–5 (4) раз.

На крыльях имаго *An. messeae* скопления чешуек образуют четыре темных пятна, хорошо различимых даже невооруженным глазом. Апикальное пятно образовано золотисто-желтыми чешуйками и расположено от ветвления радиальной жилки – R_1 почти до R_{4+5} (Рисунок 8 А) (Шабанова, Сибатаев, 2004). У *An. artemievi* пятна на крыловой пластине слабо выражены, апикальное пятно менее контрастно и располагается ниже, чем у *An. messeae,* – оно начинается чуть ниже ветвления радиальной жилки R_1 и заканчивается посредине между жилками R_{4+5} и разветвлением медиальной жилки – M_1 (Рисунок 8 Б).

Выявленные морфологические и цитогенетические признаки позволяют идентифицировать *An. artemievi* среди изученных палеарктических видов, что важно для практических энтомологов и эпидемиологов в связи с проблемами регуляции численности опасных переносчиков малярии.

При составлении ключей был использован собственные и литературные данные, на основе которых составлены определительные таблицы (Гуцевич и др., 1970; Дубицкий, 1970; Данилов, 1985; Гуцевич, Дубицкий, 1981; Glick, 1992; Darsie, Samanidou-Voyadjoglou, 1997; Amerasinghe et al., 2002).

4.3. Определительные ключи комаров комплекса *«maculipennis»* на стадии яйц

1 Яйца с хорошо выраженными поплавками …… 2

– Поплавки отсутствуют, или имеются слабо выраженные, рудиментарные поплавки ……..…… 6

2(1) Экзохорион яйца с рисунком из темных пятен и полос …..…… 3

– Рисунок экзохориона представлен двумя темными полосами на уровне концов поплавков ……..…… 5

3(2) Поверхность экзохориона с темными поперечными полосами, между которыми имеются темные пятна. Межреберная перепонка морщинистая ……*An.messeae* Falleroni

– Поверхность межреберной перепонки гладкая или слегка морщинистая …4

4(3) Окраска экзохориона одноцветно темная или более светлая, с поперечными полосами и темными пятнами между ними (контрастный рисунок на светлом фоне). ……..*An.melanoon* Hack.

– Рисунок на поверхности яиц образован темными пятнами, отходящими от краев и суживающимися к середине ……..*An.atroparvus* Van Thiel

5(2) Ширина верхней поверхности яйца в его средней части между

поплавками составляет 17±1% от длины яйца. Поверхность яйца шероховатая

…….*An.maculipennis* Meig.

– Ширина верхней поверхности яйца в его средней части между поплавками составляет 12±1% от длины яйца. Поверхность яйца гладкая

…….*An.beklemishevi* Steg. et Kab.

6(1) Поверхность экзохориона однородно серая

……..*An.sacharovi* Favre

Определительные ключи малярийных комаров по личинке IV стадии:

1 Сифон отсутствует, на сегментах брюшка имеются хитинизированные тергальные пластинки и пальмовидные волоски (подсем. *Anophelinae*, род *Anopheles*) …… 2

2(1) Внутренние волоски наличника 2 сближены своими основаниями 3

– Основания внутренних волосков наличника 2 сильно удалены друг от друга 14

3(2) Наружные волоски наличника 3 простые или слабо ветвящиеся на концах или с середины. Передняя лопасть стигмальной пластинки полностью пигментирована …… 4

– Наружные волоски наличника 3 древовидно ветвящиеся. Передняя лопасть стигмальной пластинки пигментирована наполовину …… 7

4(3) Лобные волоски 5, 6, 7 короткие и простые. Боковые волоски на IV-VI сегментах брюшка длинные, перистые

……*An.plumbeus* Steph.

– Лобные волоски 5, 6, 7 длинные и перистые. Боковые волоски на IV-VI сегментах брюшка не перистые, а делятся на несколько ветвей недалеко от основания ……. 5

5(4) Внутренние волоски наличника 2, начиная с середины или концевой трети, несут тонкую вторичную перистость. Лепестки звездчатых волосков длинные и узкие

……..*An.algeriensis* Theob.

– Внутренние волоски наличника 2 гладкие, без вторичной перистости 6

6(5) Лепестки звездчатых волосков брюшка без вытянутой концевой нити, с гладкими или слегка зазубренными краями

……*An.claviger* Meig.

7(3) Волосок на антенне короткий, не превышает ширины последней и отходит недалеко от основания ……. 9

– Волосок на антенне длинный, около половины длины последней, отходит от ее середины ……. 8

8(7) Волоски 9-12 переднегрудной плевральной группы простые Ареал комара - Дальний Восток

……..*An. sinensis* Weid.

– Ареал комара - европейская часть России

……..*An.hyrcanus* Pall.

9(7) Волосок 9 переднегрудной плевральной группы всегда простой и примерно одинаковой длины с волосками 10 и 12

……. *An beklemishevi* Steg. et Kab.

– Волосок 9 переднегрудной плевральной группы ветвится и короче волосков 10 и 12

10(9) Наружные волоски наличника и волосок на антенне относительно длинные, наружные волоски наличника обычно заходят за края боковых лопастей верхней губы
……..*An.sacharovi* Favre

– Наружные волоски наличника и волосок на антенне короче, чем у *A.sacharovi*, наружные волоски наличника обычно не доходят до края боковых лопастей верхней губы …… 11

11(10) Волоски 2 IV, V сегментов брюшка в сумме в среднем ветвятся 10.8, стандартное отклонение 1.62, в диапазоне 7-16
……..*An.atroparvus* Van Thiel

– Волоски 2 IV, V сегментов брюшка в сумме в среднем ветвятся более 10.8 ……... 12

12(11) Волоски 2 IV, V сегментов брюшка в сумме в среднем ветвятся 13.5, стандартное отклонение 1.35, в диапазоне 10-17
……. *An.maculipennis* Meig.

– Волоски 2 IV, V сегментов брюшка в сумме в среднем ветвятся более 13.5 ……. 13

13(12) Волоски 2 IV, V сегментов брюшка в сумме в среднем ветвятся 14.82; стандартное отклонение 2.40; в диапазоне 11-21
……..*An. messeae* Fall.

– Волоски 2 IV, V сегментов брюшка в сумме в среднем ветвятся 24.49, стандартное отклонение 3.30, в диапазоне 16-32
……*An.melanoon* Hack.

14(3) Наружный волосок 3 и задний волосок 4 наличника простые
……..*An.superpictus* Grassi

4.2.3. Определительные ключи по имаго малярийных комаров.

1 Максиллярные пальпы примерно такой же длины, как хоботок Щиток цельнокрайний (род *Anopheles)* …….. 2

2(1) Крылья преимущественно темно-чешуйчатые ……... 3

– Крылья с контрастными темными и светлыми пятнами …… 11

3(2) Пучок узких белых чешуек на лбу отсутствует. Среднеспинка коричнево-желтая, одноцветная, с довольно длинными темно-бурыми волосками, фронтальный пучок темный
……*An.algeriensis* Theob.

– Пучок белых чешуек на лбу явственно развит. Среднеспинка бурая или коричневая, посредине с широкой матовой полосой. Фронтальный пучок светлый …….. 4

4(3) Крылья с очевидными пятнами темных чешуек на жилках и их разветвлениях. На апексе крыла имеется светлое пятно (подрод *Anopheles)* …….. 5

– Чешуйки на крыльях равномерно распределены, не образуют темных пятен ……. 10

5(4) Крылья с перьевидными узкими чешуйками на радиальной жилке (R), постепенно сужающимися к концу (верхушке)
……*An.atroparvus* Van Thiel

– Крылья с широкими перьевидными чешуйками на радиальной жилке (R)
…… 6

6(5) Крылья с перьевидными чешуйками на радиальной жилке (R), остро сужающимися к верхушке

……*An.melanoon* Hack.

– Крылья с перьевидными чешуйками на радиальной жилке (R) шире, чем у *A.melanoon*, менее остро сужающимися к верхушке ……. 7

7(6) Апикальное пятно на бахромке крыла контрастное, начинается от костальной жилки (C) и заканчивается близко к разветвлению медиальной жилки – M_{1+2}

……*An.beklemishevi* Steg. et Kab.

– Апикальное пятно менее контрастно, меньше по размерам 8

8(7) Апикальное пятно на бахромке крыла расположено от ветвления радиальной жилки- R_1 до R_{4+5}

……*An.messeae* Fall.

– Границы апикального пятна шире ……..... 9

9(8) Апикальное пятно на бахромке крыла начинается на 2-3 чешуйки выше ветвления радиальной жилки- R_1 и заканчивается на 2-3 чешуйки ниже R_{4+5}

……..*An.maculipennis* Meig.

– Апикальное пятно отсутствует. Темные пятна на крыльях выражены слабо. Среднеспинка светло-коричневая

……*An.sacharovi* Favr.

10(4) Преобладающая окраска желто-бурая или сероватая. Фронтальный пучок имеет желтоватый оттенок. Срединная полоса среднеспинки с очень узкими светлыми волоскообразными чешуйками. Длина пальпомера 5 не превышает 0,5 длины пальпомера 4. Нижние волоски проэпистернума имеются

……*An.claviger* Meig.

– Преобладающая окраска черно-серая со свинцовым отливом. Фронтальный пучок чисто белого цвета. Срединная полоса среднеспинки покрыта светлыми чешуйками от узких до умеренно широких. Длина пальпомера 5 превышает 0,5 длины пальпомера 4. Нижние волоски проэпистернума отсутствуют

……*An.plumbeus* Steph

11(2) На переднем крае крыла менее 4 темных пятен, включающих жилки костальную (C), радиальную (R) и R_1 12

– Передний край крыла с 4 и более темными пятнами, включающими жилки костальную (C), радиальную (R) и R_1 (подрод *Cellia*) …… 13

12(11) Костальная (C) жилка с двумя светлыми пятнами. IV членик задних лапок белый, иногда белая окраска распространяется и на часть V членика. Ареал комара - Дальний Восток

An. sinensis Weid.

– IV членик задних лапок темный, с узким светлым кольцом у вершины, иногда у основания. Ареал комара - европейская часть России

An.hyrcanus Pall.

13(11) Срединная полоса среднеспинки покрыта светлыми широкими чешуйками. Отсутствуют верхние волоски проэпистернума. Анальная (A) жилка крыла с двумя темными пятнами, дистальное пятно длиннее

An.superpictus Grassi

Глава 5. Молекулярный анализ комаров комплексов «Anopheles maculipennis» и «Culex pipiens»

5.1. Сравнение спектров повторяющихся последовательностей ДНК у комаров методом таксонопринта

Наши исследования были проведены на представителях кровососущих комаров родов Anopheles и Culex. В серии опытов показана воспроизводимость картин распределения ДНК-фракций в геле. Длина фрагментов повторяющихся последовательностей на таксонопринтах комаров варьировала примерно от 30 до 600 п.н. Сравнение таксонопринтов разных видов позволило выявить как сходство, так и различия в спектрах повторов.

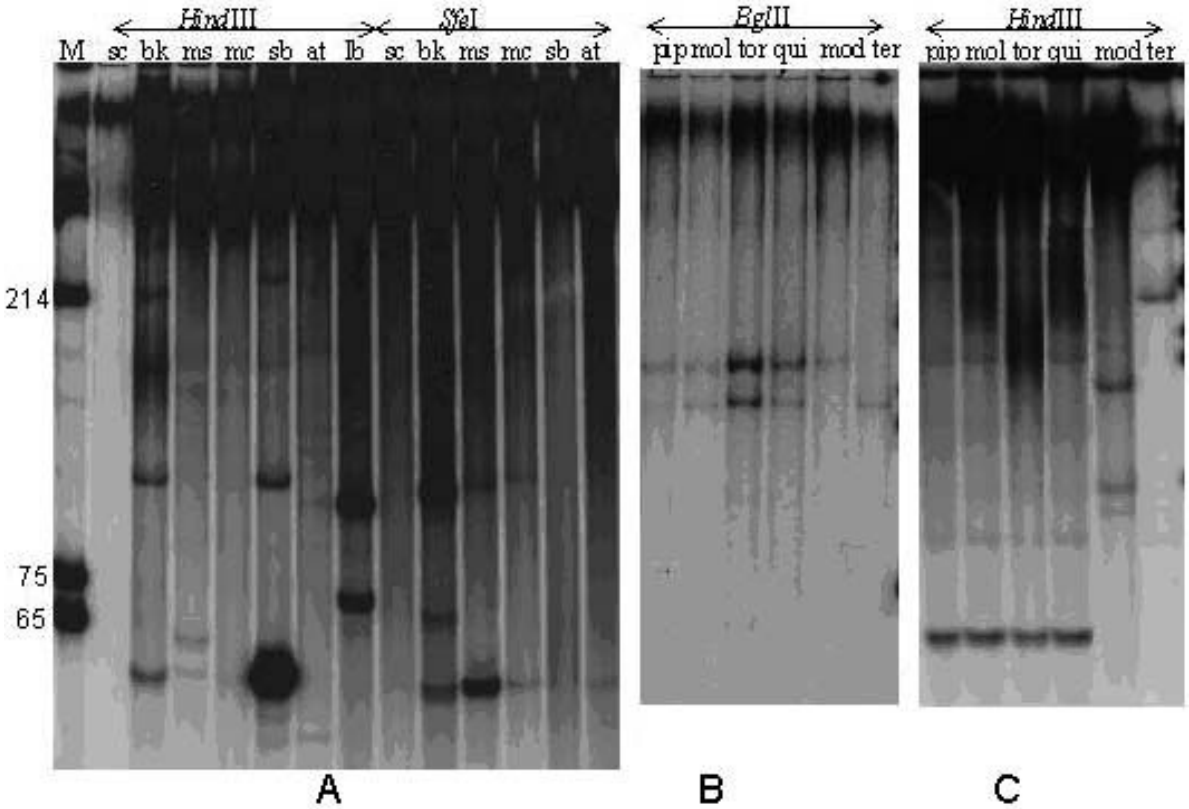

Рисунок. 9 – Таксонопринты видов комаров: А – таксонопринты видов комплекса *«maculipennis»*: *sc - An. sacharovi*, *bk - An. beklemishevi*, *ms - An. messeae, mc - An. maculipennis, sb - An. melanoon, at - An. atroparvus, lb - An. labranchiae* по рестриктазам Hind*III,* Sfe*I;* В, С – таксонопринты видов рода *Culex: pip - C. p. pipiens*, *mol - C. pipiens f. molestus*, *tor - C. torrentium, qui - C. pipiens quinquefasciatus*, *mod - C. modestus*, *ter - C. territans* по рестриктазам Bgl*II,* Hind*III.*

У семи видов-сиблингов малярийных комаров комплекса *Anopheles maculipennis* был проведен анализ таксонопринтов по рестриктазам *Hind*III, *Sfe*I, (Рисунок 9А). Повторяющиеся последовательности были выявлены по всем использованным рестриктазам. Большинство фракций повторов у видов *Anopheles* являлись видоспецифичными или общими для нескольких видов. Одна общая фракция, представляющая собой яркую полосу размером около 450 п.н. в *Bgl*II-таксонопринтах, была обнаружена у всех видов. Кроме того, в *Eco*RI-таксонопринтах выявлена общая фракция размером около 55 п.н., однако для каждого вида имелись значительные вариации по интенсивности и наличию одинарных или двойных полос. Таксонопринты гомосеквентных видов малярийных комаров - *An. maculipennis* и *An. melanoon*, *An. labranchiae* и *An. atroparvus* – также имели четкие отличия. Следует

отметить наличие у *Anopheles* большого количества полос высокой интенсивности, характерных для нескольких, но чаще для одного вида. Наименьшее число фракций повторов выявлено для *An. sacharovi*. Таксонопринтный анализ позволяет дискриминировать практически на любой стадии развития все виды комплекса, в том числе гомосеквентные – идентичные по структуре политенных хромосом.

Для комаров рода *Culex* были получены таксонопринты по следующим рестриктазам*:* Bgl*II,* Hind*III,* (Рисунок 9В, 9С). Число фракций повторов по каждой отдельной рестриктазе варьировало от 1 до 12. У трех представителей комплекса *Culex pipiens - C. p. pipiens, C. p. f. molestus, C. p. quinquefasciatus* и вида *C. torrentium,* относящихся к подроду *Culex*, различий по картине распределения фрагментов не было обнаружено ни по одной из рестриктаз. Таксонопринты *C. modestus* (подрод *Barraudius*) и *C. territans* (подрод *Neoculex*) видоспецифичны по каждой из использованных рестриктаз. Фракции, общей для всех шести видов, не выявлено.

Можно предположить, что различия таксонопринтов между двумя группами видов рода *Culex,* возможно, связаны с наличием двух типов интерсперсии внутри одного рода или с промежуточным типом организации повторов у ряда видов.

5.2.1. RAPD – маркеры.

Скрининг RAPD – праймеров показал, что для идентификации *C. torrentium* и *C. p. pipiens* можно использовать фрагменты ДНК, амплифицирующиеся RAPD – праймерами OPB – 02 и OPA– 11.

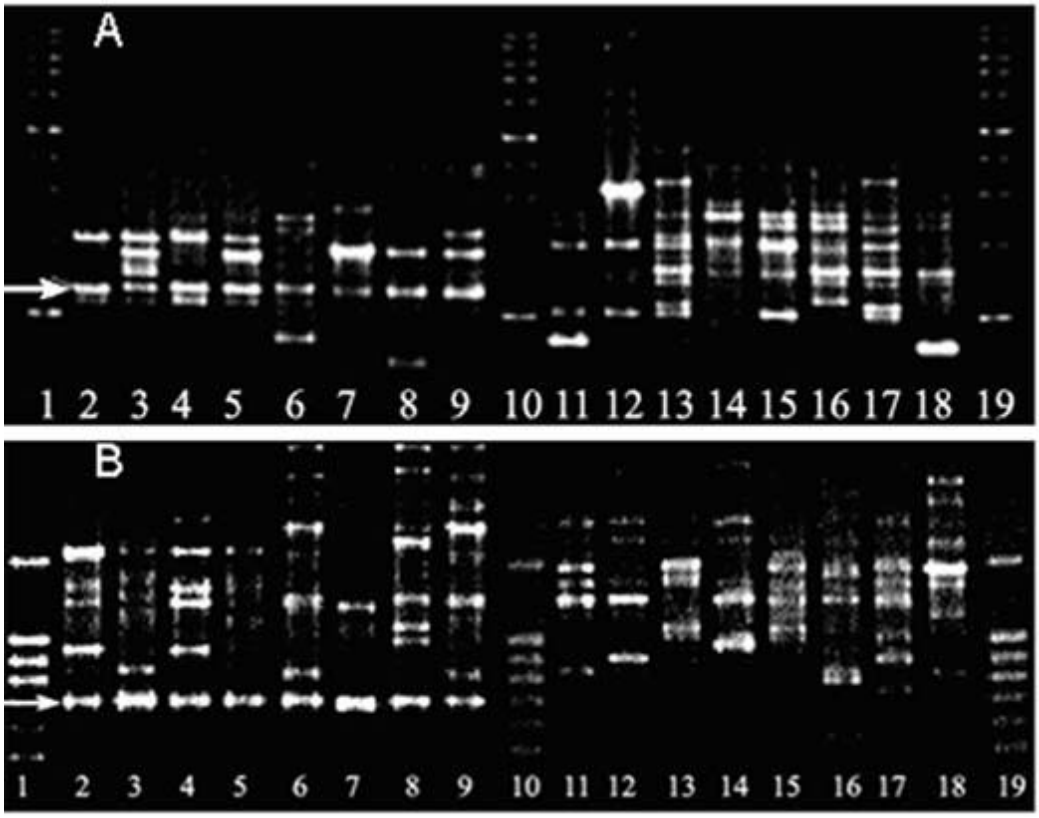

Рисунок 10 – Результаты амплификации ДНК с использованием RAPD – праймеров OPB – 02 (A) и OPA – 11 (B)

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.) (A), 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.) (B)

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 10А).

На рисунке 10В представлены результаты амплификации с использованием праймера OPA – 11 (5' – CAATCGCCGT – 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*.

Использование RAPD – маркеров позволяет надежно идентифицировать особей *C. torrentium*. 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*.

5.2.2. SCAR – маркеры.

Специфичные RAPD – бэнды были клонированы и секвенированы. Определение последовательности нуклеотидов позволило подобрать специфичные SCAR – праймеры. Праймеры SCARcp1 и SCARcp2 (Таблица 1) были созданы на основе нуклеотидной последовательности фрагмента, размером 1183 п.н., амплифицированного RAPD – праймером OPB – 02. Праймеры SCARcp3 и SCARcp4 (Таблица 1) – на основе последовательности RAPD – фрагмента, размером 680 п.н. (RAPD – праймер OPA – 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 11А).

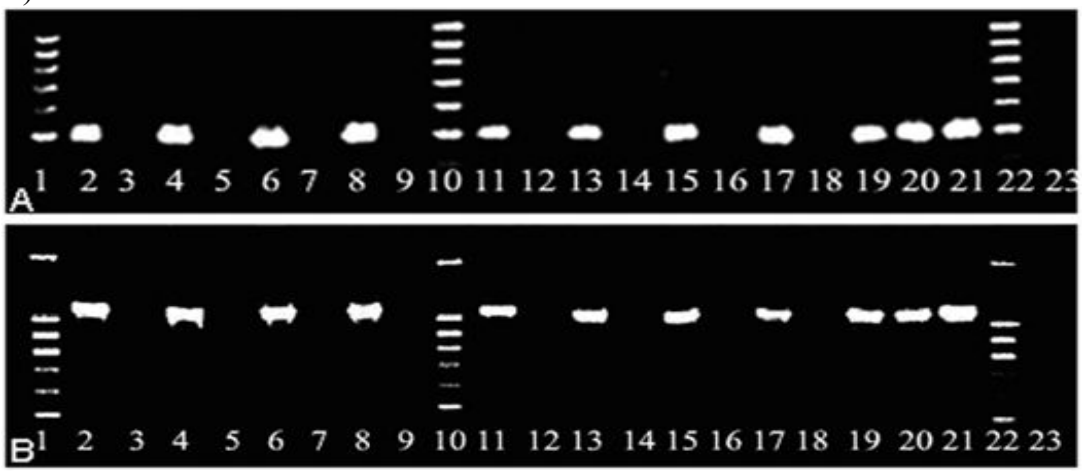

Рисунок 11 – Результаты амплификации ДНК с использованием праймеров SCARcp1 и SCARcp2 (А), SCARcp3 и SCARcp4 (В)

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)

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 11В).

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

Таблица 1 – Праймеры, использованные в работе

Праймер	Последовательность праймера, 5' → 3'	Продукт амплификации
SCARcp1 SCARcp2	CCCTTACGCACGGAGAAA CTAACAAAGTACTCCCTCAA	Специфичный RAPD – фрагмент (SCAR – маркер)
SCARcp3 SCARcp4	ATTTGGATTGGACTTTCTATTTA TTGAATTTTGACATGACGGTTTTT	Специфичный RAPD – фрагмент (SCAR – маркер)
UEA9 UEA10	GTAAACCTAACATTTTTTCCTCAACA TCCAATGCACTAATCTGCCATATTA	Участок митохондриального гена субединицы I цитохромоксидазы ***c***
5.8S 28S 5.8Sa	TGTGAACTGCAGGACACATG ATGCTTAAATTTAGGGGGTA ATCACTCGGCTCGTGGATCGAT	ITS2 регион рДНК
ACEpip ACEtorr B1246s	GGAAACAACGACGTATGTACT TGCCTGTGCTACCAGTGATGTT TGGAGCCTCCTCTTCACGG	Участок второго интрона гена ацетилхолинэстеразы 2

5.2.3. 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 12 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 12).

Использование праймеров, фланкирующих ITS2 регионы, позволяет идентифицировать особей *C. torrentium* и *C. p. pipiens* или *C. p. molestus*, а также гибриды 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.

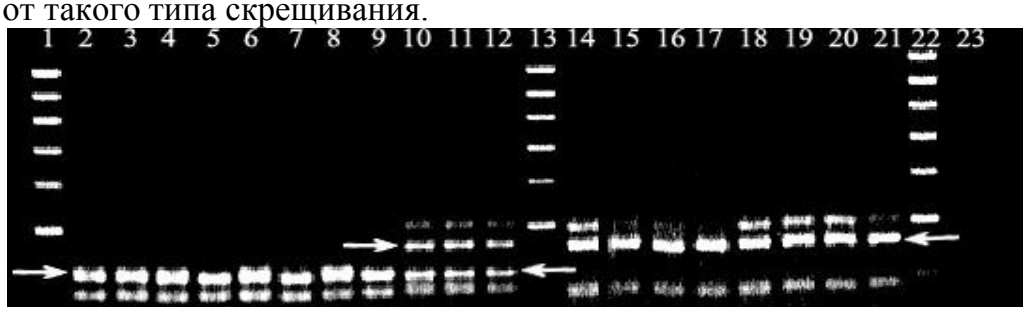

Рисунок 12 – Результаты амплификации ITS2 регионов рДНК с использованием праймеров 5.8S и 28S

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

Однако можно предположить, что у этих гибридов, так же, как у гибридов от скрещивания *C. p. pipiens* и *C. torrentium,* будут представлены два типа ITS2 регионов.

5.2.4. Участок гена субъединицы I цитохромоксидазы *c*.

Анализ последовательностей участка митохондриального гена субъединицы I цитохромоксидазы ***c*** (COI) *C. torrentium* и *C. p. molestus*, 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 1). Амплифицированный участок ДНК, размером 311 п.н., после обработки рестриктазой SspI у *C. torrentium* оставался неизмененным, 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 13), 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 13).

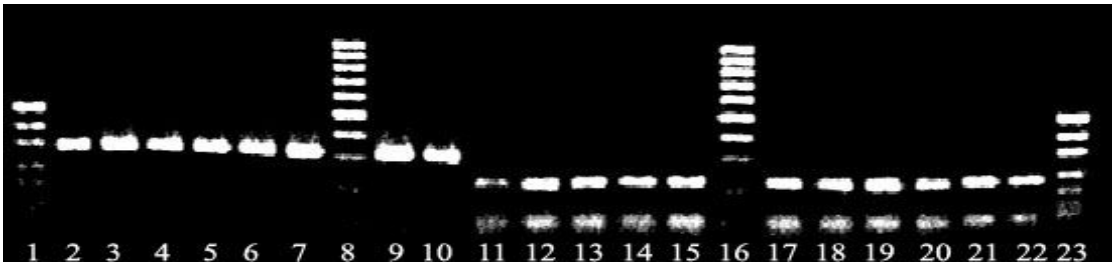

Рисунок 13 – Результаты рестрикции амплифицированного участка гена COI рестриктазой SspI

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

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 и соответствуют последовательности *C. p. molestus*, представленной в работе Шайкевич и Виноградовой (2004).

5.2.5. 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 ACEpip, 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 14).

Рисунок 14 – Результаты амплификации ДНК с использованием праймеров ACEpip, 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

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 ACEpip, 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*.

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.

В таблице 2 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 2, все типы маркеров, рассмотренные в работе, позволяют надежно идентифицировать особей *C. torrentium*. Эти маркеры применимы к любой стадии развития организма. 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).

Таблица 2 – Молекулярно – генетические маркеры для идентификации представителей комплекса *Culex pipiens*

Праймер	Размер продукта амплификации / рестрикции, п.н.			
	C. torrentium	*C. p. pipiens*	*C. p. molestus*	F1: ♀♀ *C. p. molestus* x ♂♂ *C. torrentium*
OPB - 02	1183	нет	нет	1183
OPA - 11	680	нет	нет	680
SCARcp1 SCARcp2	1093	нет	нет	1093
SCARcp3 SCARcp4	474	нет	нет	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. Нет – 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.

5.2.3. 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, 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).

Средние значения генетических расстояний ($\overline{D}_{Nei}$) 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) (Рисунок 15)

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).

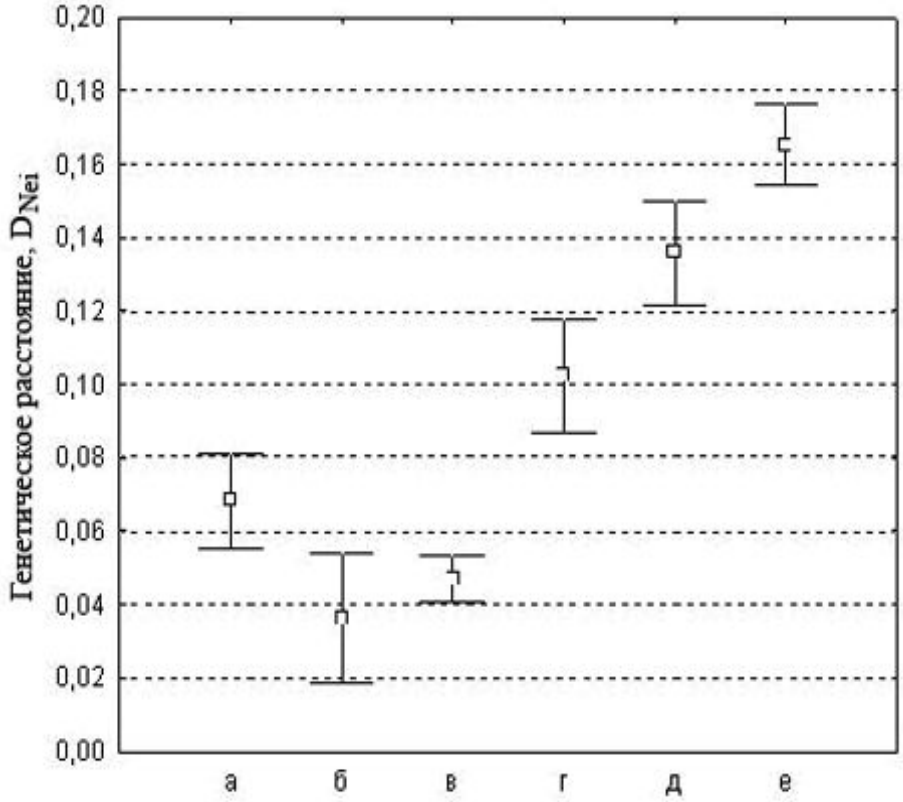

Рисунок 15 – Средние значения генетических расстояний между популяциями *C.p.pipiens*, *C.p.molestus*, *C.torrentium*

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.* Указан 95% доверительный интервал.

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.16).

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 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.

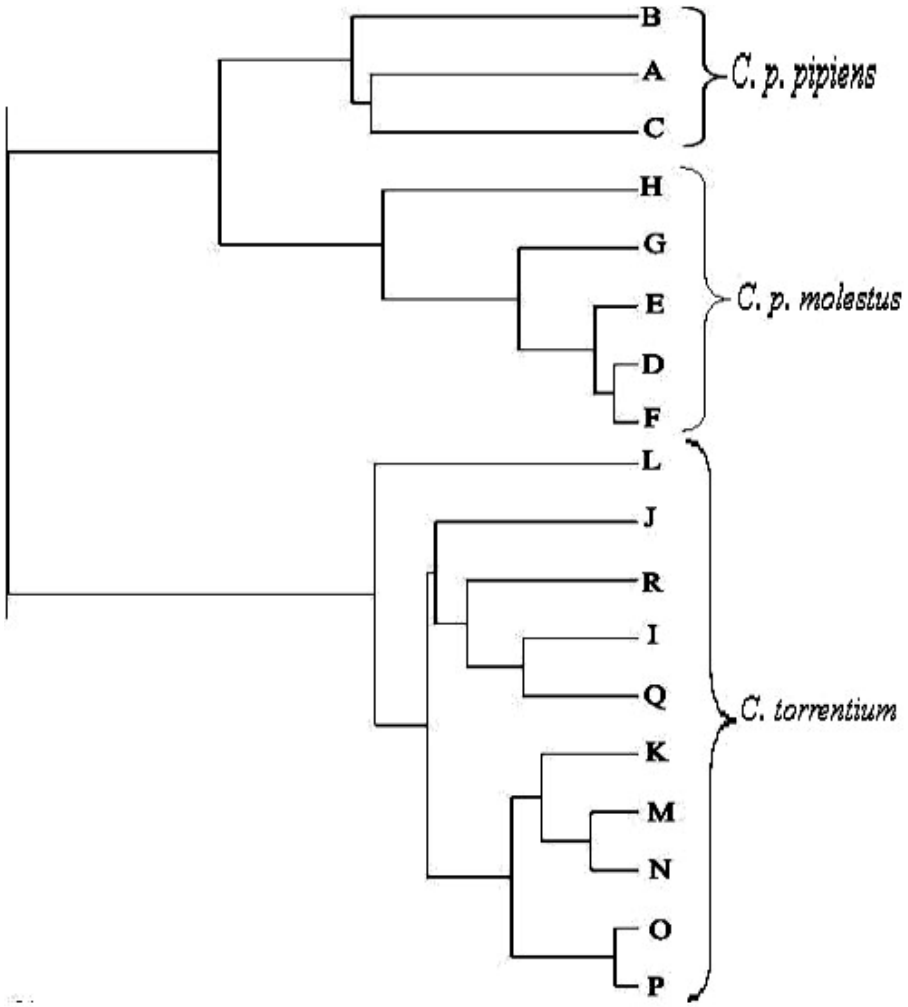

Рисунок 16 – Дендрограмма генетического сходства популяций *C.torrentium*, *C.p.pipiens* и *C.p.molestus*, построенная с использованием метода иерархического кластерного анализа (UPGMA) по результатам RAPD – анализа (RAPD – праймер OPA – 01)

Популяции: A – с. Моряковский Затон, ТО (2003г.); B – г. Алматы, РК (1999г.); C – г. Семипалатинск, РК (2004 г.); D – г. Томск, ул. Короленко, 15 (2004 г.); E – 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.)

Глава 6. Пищевое поведение личинок и его взаимосвязь с морфологическими и генетическими параметрами

Питание насекомых - один из важнейших параметров экологии (внутри- и межвидовые отношения), физиологии (скорость обмена веществ и развития особи) и патологии (вероятность быть инфицированным). Пищевое поведение кровососущих двукрылых в течение длительного времени исследуется не только на имагинальной, но и на личиночной стадии (Беклемишев, 1944; Ивницкий и др., 1984; Николаева,

1986; Dadd, 1970; Nilsson, 1987; Dahl et al, 1988; Merritt et al., 1992). Проведенные наблюдения и эксперименты свидетельствуют о том, что пищевое поведение насекомых адаптивно и отражает особенности занимаемой ими экологической ниши.

Для выяснения этих вопросов был проведен анализ биотопической изменчивости морфологических параметров головной капсулы и антенны у двух видов малярийных комаров *An.beklemishevi* и *An.messeae.*

Изученные выборки различались соотношением видов *An.messeae* и *An.beklemishevi. An.beklemishevi* встречался в водоемах Томского региона (г.Томск, пос. Тегульдет, пос. Киреевск) и не встречался в Средней Азии (окр. г. Бишкека),пос. Кант, пос. Сокулук, пос. Кенес). Соотношение видов в пределах тегульдетской популяции варьировало от 9:1 до 1:4, несмотря на незначительную удаленность водоемов друг от друга.

Средние размеры головы оказались выше у личинок *An.messeae*. При этом изменение средних длины (ДГ) и ширины (ШГ) головы по водоемам, как правило, происходило синхронно у обоих видов. Головной индекс (ГИ) у *An.messeae*, как правило, превышал таковой у *An.beklemishevi* из той же выборки. Приведенные данные указывают на широкую вариабельность экологических условий в пределах одного местообитания. Суммированные данные показывают, что ГИ *An.messeae* возрастал на юге ареала вида (в Средней Азии), хотя ДГ и ШГ при этом уменьшались.

Для исследования скорости поглощения пищи личинками 4-го возраста симпатрических видов малярийных комаров *An. messeae* и *An.beklemishevi* и ее связи с длиной тела, шириной головы и груди, числом зубцов гребня стигмальной пластинки и их асимметрией использовали графит.

Соотношение видов в двух водоемах диаметрально различалось: доля *An.beklemishevi* в первом водоеме составила 13.1 ± 1.95%, во втором -80.1 ± 2.31%. Поэтому в эксперименте идентифицировано 311 личинок *An.messeae* и 275 - *An.beklemishevi.* Личинки *An.messeae* достигали большей длины, чем *An.beklemishevi* (Таблица 3).

Таблица 3 – Морфометрические показатели личинок двух видов малярийных комаров, отобранных в эксперимент

Показатель сравнения	Вид	
	An.messeae	*An.beklemishevi*
Длина тела, мм	**3.3-7.95**	**3.5-7.75**
Ширина груди, мм	**1.319± 0.010 (0.9-1.8)**	**1.269 ±0.010**(0.9-1.65)**
Ширина головы, мм	**0.8125 ±0.0013 (0.74-0.87)**	**0.7734 ±0.0014**(0.71-0.84)**
Головной индекс	**0.9745 + 0.0018**	**0.9639 ± 0.0022***
Число зубцов *($M \pm s_m$)*	**49.6 ±0.03**	**51.4 ±0.02****
у самок	**50.4 ±0.04**	**51.7 ±0.03****
у самцов	**48.6 ±0.06**	**51.1 ±0.04****
Асимметрия	**-0.152 ±0.014**	**+0.111 ±0.008****
у самцов	**-0.029 ±0.027**	**-0.146 ±0.019***
у самок	**-0.247 ±0.028**	**+0.298 ±0.013****

Примечание: *p<0,05; **p<0.001

Заполнение кишечника у личинок обоих видов также уменьшалось с увеличением ширины груди. Максимальная ширина груди оказалась больше у *An. messeae;* распределение особей двух видов по этому показателю также различалось (Таблица 3). Скорость поглощения графита у личинок обоих видов обратно коррелировала с длиной тела: чем длиннее были особи, тем медленнее они заполняли свой кишечник.

Снижение скорости заполнения оказалось неодинаковым для обоих видов: для *An.messeae* эта величина уменьшалась с 26 до 14% (в 1.9 раза), для *An.beklemishevi* с 37 до 14% (в 2.7 раза). Различия в скорости заполнения кишечника касались только начала 4-го возраста, когда личинки имели длину тела 3.5-5 мм ($p < 0.05$).

Ширина головы (ШГ) и головной индекс у *An.messeae* в среднем превышали аналогичные показатели у *An.beklemishevi* (Таблица 3). Распределение исследованных особей по ШГ также различалось. Построение линий регрессии показало, что скорость заполнения кишечника оставалась неизменной у особей *An.beklemishevi* и возрастала с увеличением ШГ у *An.messeae.*

Скорость заполнения кишечника у самцов и самок каждого из видов оказалась неодинаковой. Статистические различия обнаружены между всеми четырьмя группами особей (Рисунок 17А).

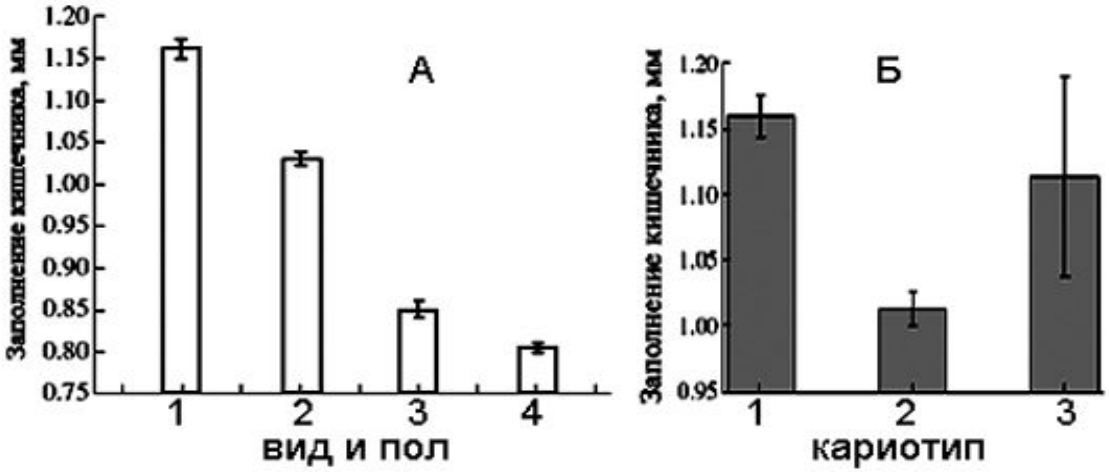

Рисунок 17 – Заполнение графитом кишечника личинок комаров.
А -заполнение кишечника личинок у самцов (1, 3) и самок (2, 4) *An.beklemishevi* (1, 2) и *An.messeae* (3, 4). **Б** - заполнения кишечника у личинок *An.beklemishevi* с разными инверсионными вариантами половой хромосомы. 1 - самцы, 2 - самки гомозиготные, 3 - самки гетерозиготные. Указан 95%-ный доверительный интервал.

Число зубцов гребня стигмальной пластинки в среднем оказалось выше у личинок *An.beklemishevi.* По этому признаку также отмечены внутривидовые различия по полу ($p < 0.001$). С увеличением числа зубцов у личинок *An.messeae* скорость заполнения кишечника уменьшалась, у *An.beklemishevi* - не изменялась.

Неодинаковой оказалась флуктуирующая асимметрия по числу зубцов стигмальной пластинки по видам и у каждого из видов у особей обоих полов ($p<0.001$; Таблица 3). Линии регрессии заполнения кишечника в зависимости от асимметрии показали, что изменения у видов противоположны.

Личинки с разными инверсионными генотипами *An.messeae* и *An.beklemishevi* заполняли кишечник с неодинаковой скоростью.

Комары *An.beklemishevi* имели полиморфизм только по хромосоме XL: наряду с гомозиготными по хромосомной последовательности самками встречались также гетерозиготные; гомозиготные по инверсии самцы и самки отсутствовали. Оказалось,

что самцы поглощали пищу быстрее самок с обоими инверсионными генотипами, а гетерозиготные самки - быстрее гомозиготных (Рисунок 17Б).

У личинок *An.messeae* из популяции пос. Тегульдет полиморфизм наблюдался по четырем плечам трех хромосом. При этом корреляции скорости заполнения кишечника с частотой генотипа не наблюдалось (Таблица 4).

Скорость заполнения кишечника оказалась неодинаковой у личинок с разными инверсионными генотипами. Наиболее быстро заполняли кишечник самцы XL_1, XL_2 и самки XL_{11} и XL_{22}, наименее - самцы XL_0 и самки XL_{00}. Скорость фильтрации также различалась для особей с различными вариантами аутосом.

Таблица 4 – Скорость поглощения графита особями *An. messeae* с разными инверсионными генотипами

Вариант хромосомы	Частота $f \pm s_f$, % (n = 309)	Заполнение кишечника, мм	Ширина, мм		Длина тела, мм
			груди	головы	
Самцы					
XL_0	2.9 ± 0.96	0.72 ± 0.058	1.43 ± 0.018	0.787 ± 0.0023	6.78 ± 0.077
XL_1	29.1 ± 2.58	0.87 ± 0.008	1.34 ± 0.002	0.815 ± 0.0003	6.31 ± 0.010
XL_2	6.8 ± 1.43	0.93 ± 0.034	1.41 ± 0.007	0.821 ± 0.0013	6.76 ± 0.034
Самки					
XL_{00}	1.9 ± 0.78	0.38 ± 0.062	1.32 ± 0.026	0.810 ± 0.0045	6.53 ± 0.154
XL_{01}	2.9 ± 0.96	0.64 ± 0.054	1.31 ± 0.016	0.807 ± 0.0028	6.34 ± 0.102
XL_{11}	39.5 ± 2.78	0.86 ± 0.005	1.29 ± 0.001	0.812 ± 0.0002	6.20 ± 0.007
XL_{12}	15.5 ± 2.06	0.69 ± 0.013	1.30 ± 0.004	0.810 ± 0.0004	6.20 ± 0.020
XL_{22}	1.3 ± 0.64	0.95 ± 0.189	1.41 ± 0.030	0.816 ± 0.0072	6.86 ± 0.102
Самцы + самки					
$2R_{00}$	15.5 ± 2.06	0.67 ± 0.011	1.31 ± 0.003	0.797 ± 0.0005	6.33 ± 0.017
$2R_{01}$	2.3 ± 0.85	0.84 ± 0.110	1.29 ± 0.028	0.808 ± 0.0015	6.21 ± 0.146
$2R_{11}$	82.2 ± 2.18	0.85 ± 0.003	1.32 ± 0.001	0.816 ± 0.0001	6.30 ± 0.003
$3R_{00}$	28.2 ± 2.56	0.75 ± 0.008	1.35 ± 0.002	0.810 ± 0.0003	6.47 ± 0.011
$3R_{01}$	52.1 ± 2.84	0.82 ± 0.004	1.31 ± 0.001	0.814 ± 0.0002	6.23 ± 0.004
$3R_{11}$	19.7 ± 2.26	0.93 ± 0.011	1.30 ± 0.003	0.813 ± 0.0004	6.27 ± 0.013
$3L_{00}$	83.2 ± 2.13	0.84 ± 0.003	1.31 ± 0.001	0.812 ± 0.0001	6.27 ± 0.003
$3L_{01}(_{11})$	16.8 ± 2.13	0.75 ± 0.012	1.36 ± 0.003	0.818 ± 0.0004	6.45 ± 0.015

Предполагается, что последовательность XL_1 адаптирована к условиям резко-континентального климата, XL_0 – умеренного (Стегний, 1991). Вероятно, уменьшенные размеры и более высокая скорость поглощения пищи у самцов XL_1 и самок XL_{11} также являются следствием этой адаптации.

Различие в скорости поглощения графита выявлено у особей при взаимодействии вариантов плеча 3R с гомозиготой $2R_{11}$, тогда как при взаимодействии с генотипом $2R_{00}$ такой дифференциации не оказалось (Рисунок 18А).

Чтобы проверить существование обратной связи между инверсионными генотипами и скоростью заполнения кишечника, совершили обратную операцию: всех личинок поделили на три группы по скорости поглощения графита и сравнили их хромосомный состав – группу 1 составили особи с максимальной скоростью поглощения, группу 3 – с минимальной, группу 2 – с промежуточной. Различия обнаружены между группами 1 и 2 по частоте аутосомных гомозигот $3L_{00}$ ($\chi2$=7.2, fd=1, $p<0.01$), гетерозигот $3L_{01}$ ($\chi2$=5.64, fd=1, $p<0.05$), комбинацией $2R_{11}$-$3L_{00}$

($\chi2$=5.48, fd=1, p<0.05), инверсией $3L_1$ ($\chi2$=7.97, fd=1, p<0.01). Группы 1 и 3 различались частотой последовательностей половой хромосомы XL_0 ($\chi2$=4.5, fd=1, p<0.05), XL_1 ($\chi2$=4.44, fd=1, p<0.05), аутосом 2R ($\chi2$=4.05, fd=1, p<0.05) и $3R_0$ ($\chi2$=4.53, fd=1, p<0.05; Рисунок 18 Б). Различий между группами 2 и 3 не оказалось.

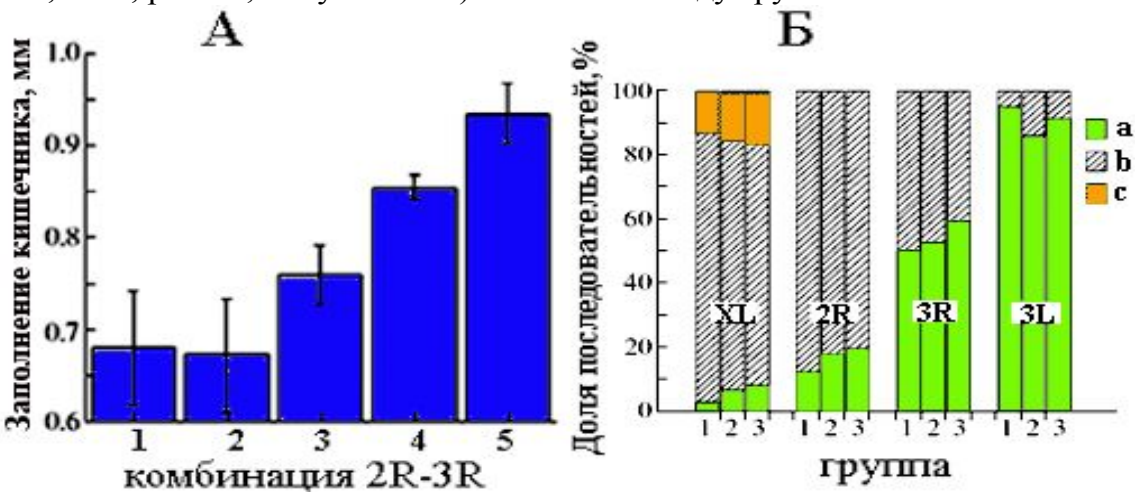

Рисунок 18 – Скорость заполнения кишечника у личинок *An.messeae*
А – личинки *An.messeae* по комбинациям 2R-3R. 1 – $2R_{00}$-$3R_{00}$, 2 – $2R_{01}$-$3R_{01}$, 3 – $2R_{11}$-$3R_{00}$, 4 – $2R_{11}$-$3R_{01}$, 5 – $2R_{11}$-$3R_{11}$. Б – частота хромосомных последовательностей в группах личинок An.messeae с различной скоростью заполнения кишечника: a – XL_0, $2R_0$, $3L_0$; b – XL_1, $2R_1$, $3L_1$; c – XL_2 Указан 95% доверительный интервал.

Результаты проведенного нами эксперимента показывают, что личинки с инверсиями в генотипе по всем трем хромосомам имели различия в скорости поглощения пищи. Из этого мы можем заключить, что регуляция скорости фильтрации у личинок *An.messeae* связана со всеми тремя хромосомами.

Плечо 2R у *An.beklemishevi* сходно по структуре дисков с гомозиготой $2R_{11}$ полиморфной инверсии у *An.messeae*. Это, вероятно, свидетельствует о том, что регуляция скорости поглощения пищи достигалась у обоих видов одним и тем же способом. Последовательность XL_1 у *An.messeae* адаптирована к условиям резкоконтинентального климата, XL_0 - умеренного (Стегний, 1991). Это позволяет рассматривать перестройку XL_2 как элемент генетической адаптации в условиях конкуренции с *An.beklemishevi.*

Состав хромосомных последовательностей в популяциях широко варьировал по частоте. Различия по концентрации инверсий отмечены у личинок из разных водоемов тегульдетской популяции. Частота инверсий неоднозначно коррелировала с долей *An.beklemishevi.* В частности, в восьми выборках из киреевской и тегульдетской популяций последняя слабо положительно коррелировала с частотой инверсий *An.messeae* XL_0, XL_1, $2R_0$, $3R_0$, слабо отрицательно – с частотой инверсии XL_2, не коррелировала с частотой $3L_0$. Эти данные подтверждают ранее сделанные выводы о конкурентном взаимодействии данных видов в зонах симпатрии (Стегний, 1991). Выявлена положительная взаимосвязь длины головы с долей инверсии $2R_1$, отрицательная – с частотой инверсий XL_1, $3R_1$, $3L_1$ (Рисунок 19).

Особи гомозиготные по $2R_{11}$ наполняли кишечник быстрее гомозигот $2R_{00}$ на протяжении всей 4-ой стадий, что, вероятно, указывает на повышенные темпы развития особей с генотипом $2R_{11}$, а также раскрывает один из механизмов дифференцированной чувствительности *An.messeae* к *Bti*. Личинки *An.beklemishevi*

имели сниженную относительную восприимчивость к *Bti,* несмотря на более высокую скорость фильтрации (Бурлак, Сибатаев, 1995; Бурлак, Сибатаев, 1998).

Таким образом, изучение детерминации физиологического параметра – скорости поглощения пищи личинками показало, что особи с разными хромосомными вариантами имеют различия по этим физиологическим параметрам. В популяциях личинок малярийных комаров обоих видов скорость фильтрации у самцов выше, чем у самок.

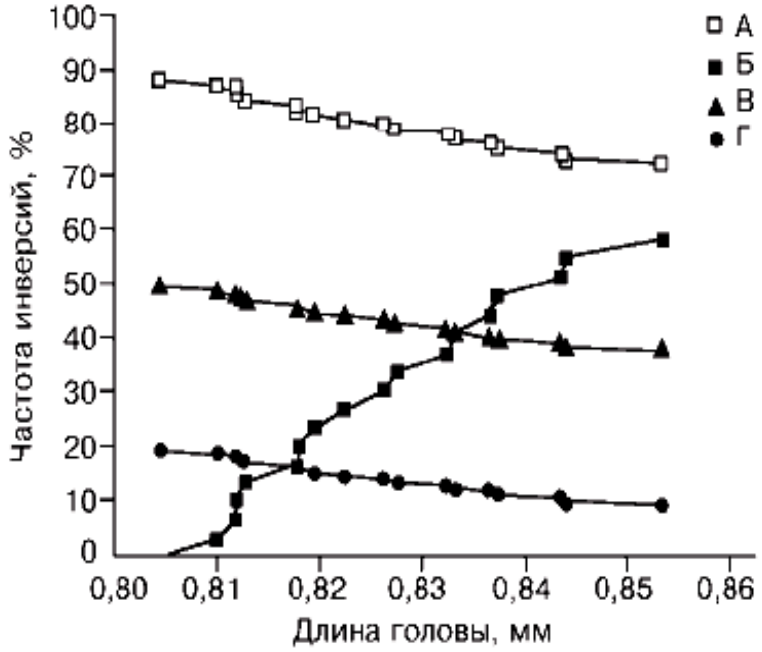

Рисунок 19 – Зависимость длины головы от инверсионного состава популяций *An.messeae.* А – XL_1, Б – $2R_1$, В – $3R_1$, Г – $3L_1$. Приведены линии регрессий.

Глава 7. Морфологическая дифференциация близкородственных видов кровососущих комаров

Комплекс *"maculipennis"*делится на неарктические и палеарктические виды. Неарктические виды по морфологическим параметрам значительно более дифференцированы, и эти виды являются в значительной степени аллопатрическими (White, 1978). В то же время палеарктические виды являются очень сходными по морфологии и среди них есть виды как аллопатрические, симпатрические, так и викарирующие. Виды симпатрические – *An.maculipennis* и *An.messeae; An.messeae* и *An.atroparvus; An. atroparvus* и *A. maculipennis, An.messeae* и *An.beklemishevi.* Викарирующие виды – *An.labranchiae* с *An.atroparvus, An.melanoon* с *An.messeae, An.maculipennis, An.sacharovi* с *An.martinius* и *An.maculipennis* с *An.beklemishevi* (Новиков, Алексеев, 1989; Стегний, 1991). Предполагается, что эволюция неарктических видов по сравнению с палеарктическими видами происходила более длительное время (Kitzmiller et al., 1967).

На основе результатов, полученных цитогенетическими методами, предлагался ряд схем филогенетических отношений комплекса «*maculipennis*» (White, 1978; Стегний, 1979). На данный момент существует около 10 различных схем филогенеза, построенных на основании молекулярных данных, которые часто изменяются с появлением новых методов (Collins, Paskewitz, 1996; Новиков и др., 2004; Гордеев и

др., 2004). Для анализа филогении по фенотипу палеарктических видов малярийных комаров использовали схемы филогении, основанные на цитогенетическом методе и гибридологическом анализе (Стегний, 1979).

По этой схеме исходные виды в каждой из двух филетических линий - *An.labranchiae* и *An.melanoon* - являются в максимальной степени стенобионтными и имеют самые узкие ареалы (Стегний, 1991).

Предметом рассмотрения в данной главе является морфологическая дифференциация близкородственных видов комплекса «*maculipennis*» на различных стадиях развития.

Яйца. Экологические особенности обитания видов комаров тесно связаны с формами яиц. Стадия яиц является промежуточным звеном развития гемипопуляций комаров. Наиболее примитивным типом у *Anophilinae* считается форма яиц *An.plumbeus* (Mattingly, 1969).

Эти комары развиваются в дуплах деревьев и не нуждаются в поплавках. По этой схеме от типа в дальнейшем отходят типы «*algeriensis*» и «*concolor*». Тип «*concolor*» появляется у многих видов подродов *Anopheles*.

Палеарктические виды комплекса «*maculipennis*» произошли от неарктических видов. Все неарктические виды комаров комплекса *«maculipennis» An.occidentalis*, *An.freeeborni*; *An.earlei*; *An.aztecus* имеют поплавок (Aitken, 1945). Палеарктические виды, более молодые по сравнению с неарктическими, имеют несколько вариантов формы яиц (Рисунок 20).

В филетической линии *An.sacharovi – An.martinius* в процессе эволюции и продвижении видов на юг возникает тип яиц без поплавков – *An.concolor* (Рисунок 21Б). Данный тип характеризуется вторичной потерей поплавков. Особи филетической линии *An.sacharovi – An.martinius* отличаются повышенной солевыносливостью и теплоустойчивостью, они обитают в условиях резкоконтинентального климата со значительными перепадами зимне-летних температур. Считается также, что серебристая окраска яиц является одним из способов защиты от хищников (Mattingly, 1969). Это окраска дает возможность яйцам сливаться с поверхностью воды снизу и быть незаметными. Недавно открытый новый вид *An.artemievi* имеет форму яиц как у *An.sacharovi – An.martinius* (Гордеев и др., 2005).

Нами отмечено, что при принудительном скрещивании комаров ♀*An.beklemishevi* x ♂ *An.atroparvus* и ♀*An.maculipennis* x ♂ *An.atroparvus,* фенотип яиц наследуется по отцовской линии родительского вида.

Личинки. Следующая стадия развития комаров – личинки. Среди неарктических видов четко отличаются личинки *An.aztecus*, которые имеют большие, широко расставленные внутренние волоски наличника (Pratt, 1952). У других трех видов эти волоски более мелкие и ближе расположены (Рисунок 22). У *An.earlei* внутренние волоски наличника раздвоены на конце. Головы личинок *An.freeborni* и *An.occidentalis* очень похожи, внутренние волоски наличника близко расположены. Однако пальмовидные (звездчатые) волоски на четвертых брюшных сегментах у этих видов значительно различаются.

Личинки палеарктических видов комплекса очень сходны по морфологии. При детальном анализе нами были выявлены некоторые различия. Палеарктические виды делятся на несколько групп по внутренним волоскам наличника (Рисунок 7.8). Первая группа включает *An.beklemishevi,* у которого внутренние волоски простые или в конце ветвятся на две ветви (Рисунок 23А). В этом определяется их сходство с личинками

An.earlei. По структуре политенных хромосом *An.beklemishevi* происходит от *An.earlei* (Стегний, 1991).

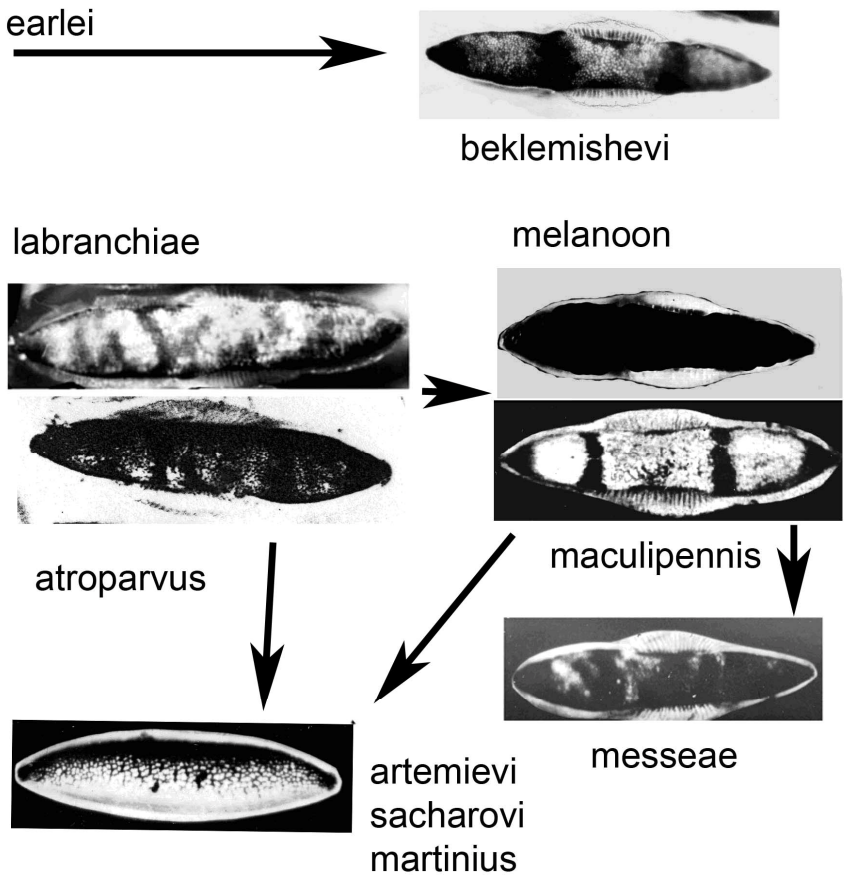

Рисунок 20 – Формы яиц комаров комплекса «*maculipennis*»

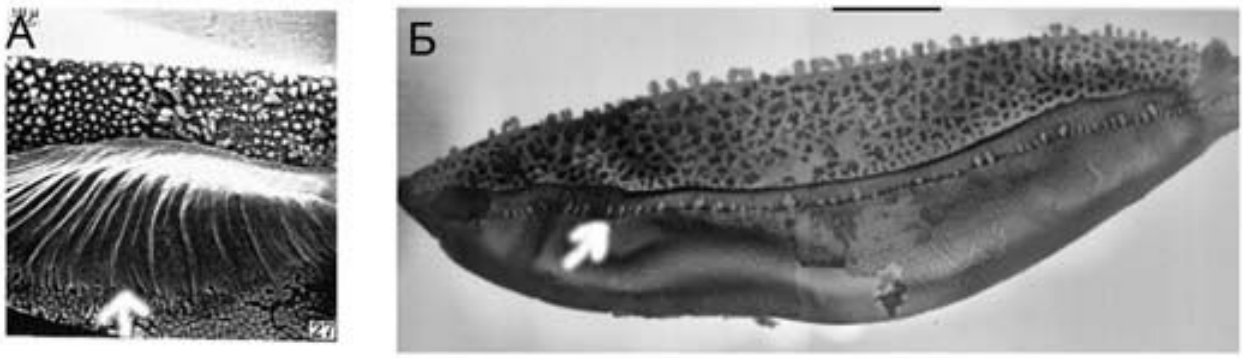

Рисунок 21 - Форма поплавков яиц малярийных комаров
А – *An.atroparvus*; Б – *An.artemievi*. Стрелками указано поплавок яиц.

Вторая группа видов имеет ветвление внутренних волосков переднегрудной плевральной группы, что является одним из систематических признаков личинок комаров (Рисунок 23Б). Происхождение этой группы возможно от комаров *An.freeborni* или *An.occidentalis* (Стегний, 1991). У личинок *An.beklemishevi* волоски 9, 10, 12 простые (Рисунок 23А), чем он отличается от остальных палеарктических видов (Рисунок 23Б).

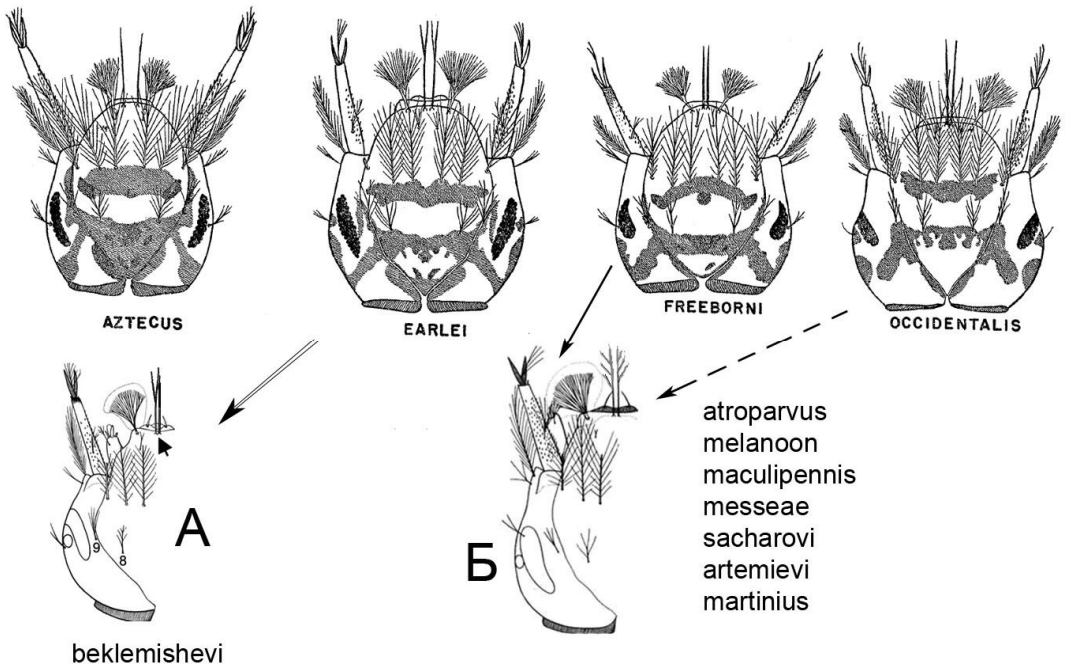

Рисунок 22 – Головы личинок Голарктических видов комплекса *«maculipennis».*

Стрелками указаны возможные пути видообразования по нашим данным и данным В.Н.Стегния (1991).

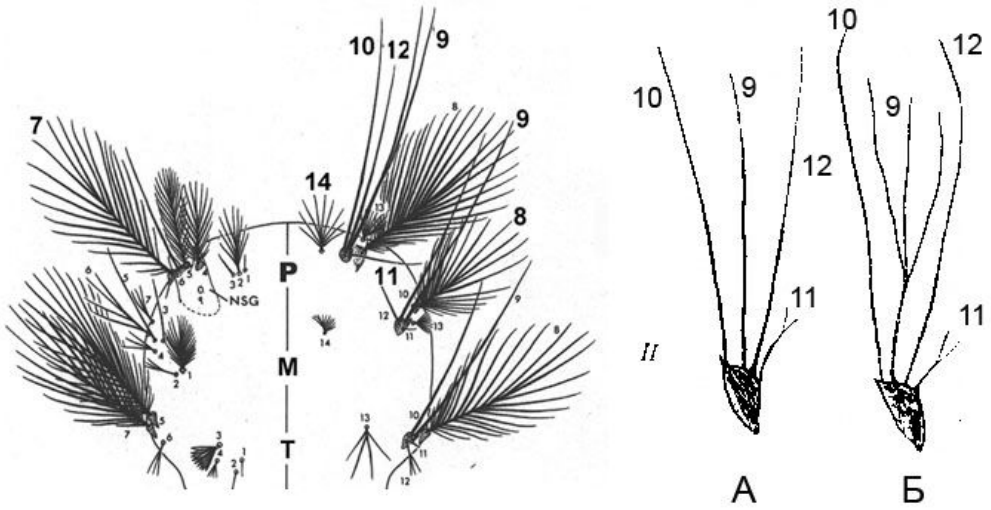

Рисунок 23 – Грудные волоски личинки. А, Б – переднегрудная группа волосков груди. А, Б – соответствует видам, обозначенным в рис. 22

Вторая группа видов, в свою очередь, делится на 2 подгруппы по характеру ветвления наружных волосков наличника. I подгруппа: *An.atroparvus, An.melanoon, An.maculipennis* и *An.messeae.* (Рисунок 24А); II подгруппа: *An.sacharovi, An.artemievi, An.martinius* (Рисунок 24Б). У личинок *An.sacharovi, An.artemievi, An.martinius* наружные волоски наличника длинные и обычно заходят за края боковых лопастей верхней губы.

Куколки. На стадии развития куколки палеарктические виды комаров практически не различаются.

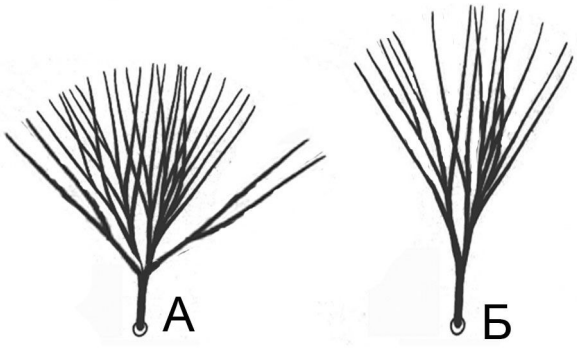

Рисунок 24 – Наружные волоски наличника
А – *An.atroparvus, An.melanoon, An.maculipennis* и *An.messeae.* Б – *An.sacharovi, An.artemievi, An.martinius.*

Имаго. Все имаго близкородственных видов комплекса «*maculipennis*» имеют пятнистые крылья. По интенсивности окраски крыла можно выделить две группы. Эти группы полностью совпадают с группами, которые выделяются на основе особенностей наружных волосков наличника (Рисунок 25).

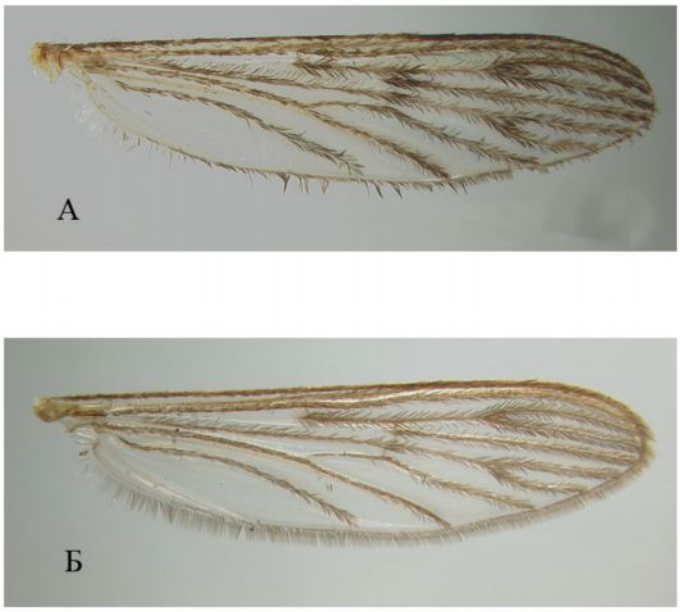

Рисунок 25 – Крыло комаров комплекса «*maculipennis*»
А – *An.atroparvus, An.melanoon, An.maculipennis* и *An.messeae;* Б – *An.sacharovi, An.artemievi, An.martinius.*

При суммировании выявленных признаков у комаров комплекса «*maculipennis*» на различных стадиях развития выделяется три группы (Таблица 5). Большинство видов имеют сходные признаки и в таблице 5 выделены серым цветом. Вторая группа включает три вида.

Таблица 5 – Основные морфологические признаки Голарктических видов комплекса *«maculipennis»*

Виды	Наличие поплавка яиц рисунок 21	Ветвление внутренних волосков наличника рисунок 22	Наружные волоски наличника сильно разветвленные рисунок 24	Ветвление переднегрудных плевральных волосков рисунок 23	Интенсивность окраски крыла рисунок 25
*aztecus**	+	–	+	–	–
*freeborni**	+	–	+	–	+
*occidentalis**	+	–	+	–	+
*earlei**	+	–	+	–	+
beklemishevi	+	–	+	–	+
atroparvus	+	+	+	+	+
labranchiae	+	+	+	+	+
melanoon	+	+	+	+	+
maculipennis	+	+	+	+	+
messeae	+	+	+	+	+
artemievi	–	+	–	+	–
sacharovi	–	+	–	+	–
martinius	–	+	–	+	–

«+» означает присутствие данного признака, «–» отсутствие.

* – описание неарктических видов (Pratt, 1952)

Сравнительный анализ морфологических и хромосомных признаков

По дисковой структуре политенных хромосом *An.artemievi* отличается от видов *An.messeae*, *An.atroparvus*, *An.labranchiae*, *An.beklemishevi*, *An.sacharovi*, *An.martinius*, но является гомосеквентным *An.melanoon* и *An.maculipennis* (Гордеев и др., 2005, Андреева и др., 2007). В связи этим интересно сравнить организацию политенных хромосом питающих клеток яичников *An.artemievi*, *An.melanoon* и *An.maculipennis*. По хромосоме XL эти виды различаются по морфологии прицентромерного участка. Для *An.maculipennis* характерен асинапсис гомологов в прицентромерном районе, что не характерно для *An.melanoon* и не всегда наблюдается у *An.artemievi*. В отличие от *An.melanoon* в прицентромерном районе *An.artemievi* не формируется яркоокрашенный гетерохроматиновый блок. Отличительной чертой политенных хромосом *An.artemievi* является формирование крупных гетерохроматиновых блоков в прицентромерном районе 15 2L плеча хромосомы 2 и в районе 33 3L плеча хромосомы 3. По этим признакам вид *An.artemievi* отличается от всех ранее изученных палеарктических видов.

По морфологии *An.artemievi* сходен с видами *An.sacharovi, An.martinius.* Однако по структуре прикрепления хромосом *An.artemievi* сходен с видами *An.maculipennis* и *An.melanoon.* По гипотезе Mattingly (1969), конечные виды в эволюции имеют формы яиц типа *concolor* – без поплавков (Рисунок 21). На основании этой гипотезы мы предполагаем, что *An.artemievi* занимает конечное положение в филетической линии *An.maculipennis – An.melanoon* (Рисунок 26). На основании хромосомных перестроек комары *An.beklemishevi* происходят от *An.earlei* (Стегний, 1991). По морфологическим параметрам *An.beklemishevi* более сходны с неарктическими видами (Таблица 5).

На основании цитогенетических, морфологических данных мы предлагаем уточненную филогенетическую схему Голарктического комплекса «*maculipennis*» (Рисунок 26).

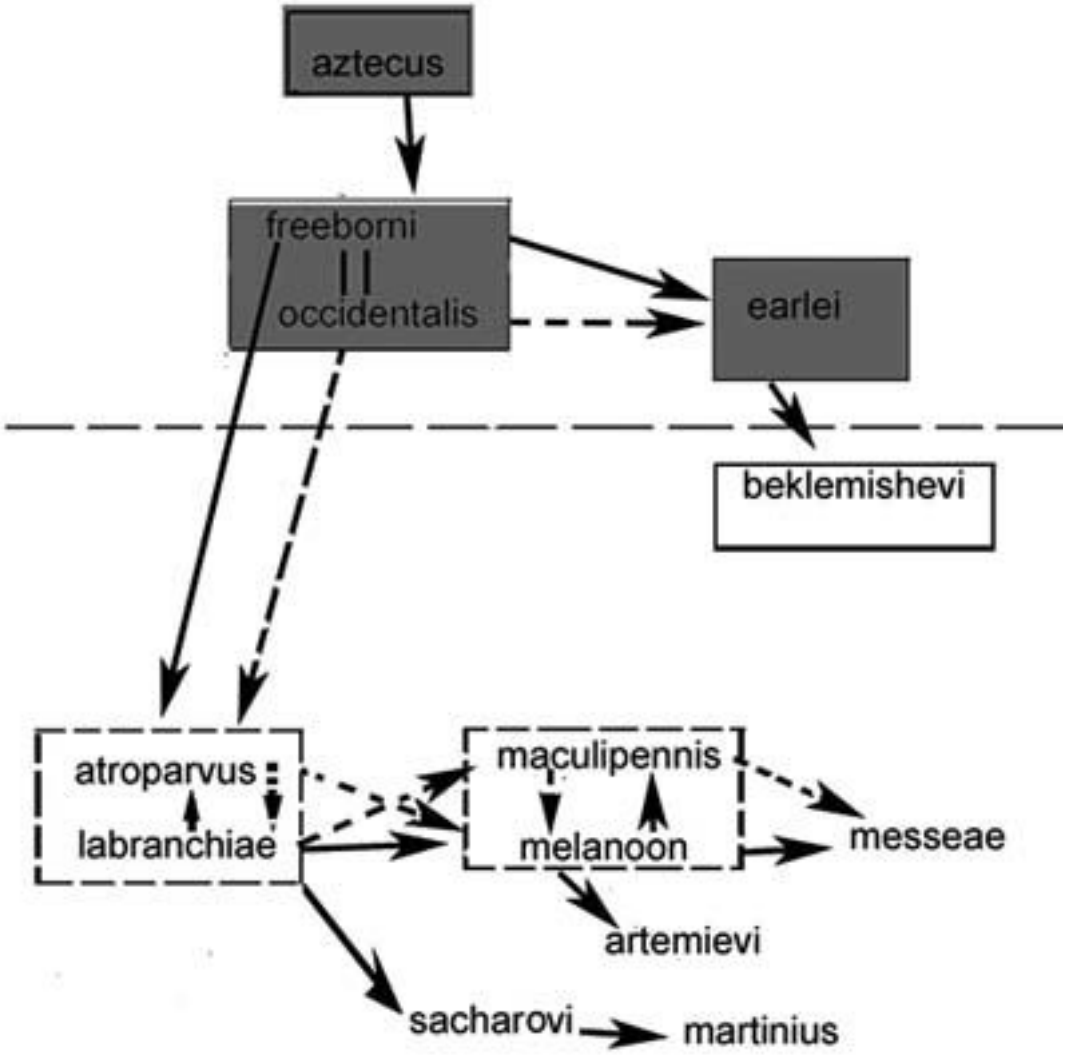

Рисунок 26 – Филогенетическая схема Голарктического комплекса «*maculipennis*»
Серым цветом выделены неарктические виды.

Таким образом, проведенный анализ эволюции близкородственных видов малярийных комаров по морфологическим признакам позволил уточнить филогению комплекса “maculipennis”. Данные по морфологическим признакам соответствуют филогенетической схеме, составленной ранее на основе гибридологического и цитогенетического анализа.

Выводы

1. Выявлена фенотипическая изменчивость в популяциях кровососущих комаров р.р. *Anopheles, Culex.* Показано, что она коррелирует со степенью хромосомной изменчивости. Выявлен фенотипический признак - "флуктуирующая асимметрия" в популяциях личинок *An. messeae*. Виды комаров комплекса «*Culex pipiens»* статистически различаются по фенотипам.

2. Сравнительный морфологический анализ видов-двойников позволил уточнить видовой состав палеарктической группы *«Anopheles maculipennis»*. Впервые описаны по морфологии виды *An. beklemishevi* и *An.artemievi.* Составлены определительные таблицы по морфологии на различных стадиях развития для видов комплекса «*Anopheles maculipennis*».

3. Анализ спектров повторяющихся последовательностей ДНК у кровососущих комаров показал межвидовую и межродовую изменчивость геномов *Anopheles, Culex* по составу семейств повторяющихся ДНК. Показано, что видоспецифичная фракция на таксонопринте *An. messeae* представляет собой тандемный повтор с длиной мономера около 53 п.н. Разнообразие в организации повторов в пределах одного семейства и низкое содержание общих фракций отличает *Culicidae* от всех изученных ранее групп организмов.

4. Впервые были найдены видоспецифичные RAPD – маркеры для идентификации *Culex torrentium*. Определение нуклеотидной последовательности RAPD – фрагментов позволило создать специфичные SCAR – праймеры. ПЦР с использованием SCAR – праймеров является простым, быстрым и надежным методом идентификации *C. torrentium*. 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*.

5. Анализ изменчивости RAPD – маркеров в популяциях *C. p. pipiens*, *C. p. molestus* и *C. torrentium* из г. Томска, Томской области и Республики Казахстан. позволил 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.

6. Изучение детерминации физиологического параметра – скорости поглощения пищи личинками – показало, что особи малярийных комаров с разными хромосомными вариантами имеют различия по этим физиологическим параметрам. В популяциях личинок малярийных комаров скорость фильтрации у самцов выше, чем у самок.

7. Проведенный анализ эволюции близкородственных видов малярийных комаров по морфологическим признакам позволил уточнить филогению комплекса “maculipennis”. Данные по морфологическим признакам соответствуют филогенетической схеме, составленной ранее на основе гибридологического и цитогенетического анализа.

Список основных работ, опубликованных по теме диссертации

1. **Сибатаев А.К.,** Гордеев М.И. Морфологический и цитогенетический анализ личинок видов-двойников малярийных комаров Западной Сибири // Известия СО РАН. ***Сибирский биологический журнал***. – 1993. – №2. – С.3–9.

2. **Сибатаев А.К.** Изменчивость количества зубцов гребня у личинок малярийных комаров комплекса «Anopheles maculipennis» / Естественные науки. Материалы региональной научно-практической конференции для молодых ученых. Томск. – 1994. – С.11.

3. Гордеев М.И., **Сибатаев А.К.** Возрастной отбор и способность к каннибализму у личинок малярийных комаров с разными кариотипами // ***Генетика.*** – 1995. – Т. 31. – № 7. – С. 939–946.

4. Гордеев М.И., **Сибатаев А.К.** Процессы отбора личинок малярийных комаров под влиянием хищного растения пузырчатки Utricularia vulgaris // ***Экология***. – 1995. – №.3 – С. 241-245.

5. Бурлак В.А., **Сибатаев А.К.** Абсолютна и относительная чувствительность личинок двух видов малярийного комаров из природных популяций к *Bacillus thuringiensis israelensis* и *Bacillus thuringiensis fukuokaensis* // Известия СО РАН. ***Сибирский биологический журнал***. – 1995. – № 5. – С. 448–456.

6. **Сибатаев А.К.** Процессы отбора личинок малярийных комаров под влиянием хищного растения пузырчатки Utricularia vulgaris // Генетика. – 1994. – Т. 30. – Приложение. – С. 142–143.

7. Burlak V.A., Gordeev M.I., **Sibataev A.K.,** Nikolaeva N.V. Susceptibility of natural populations of malaria mosquitoes to the toxins of Bacillus thuringiensis subsp. israelensis (B.t.i.) // Program and abstracts of II En Gebi Conference on bacterial control of agricultular insect pests and vectors of human diseases (Shoresh, Israel, August 12-16, 1996). Shoresh: Ben-Gurion Univ. of Negev. – 1996. P.11.

8. **Sibataev A.K.,** Nikolaeva N.V. Morphological and ecological aspects of the larval feeding of malaria mosquito // Proceedings of 10th. European SOVE Meeting, Strasbourg, France, September 2-6. – 1996. – P.54–55.

9. Stegnii V.N., Sharakhov I.V., Sharakhova M.V., **Sibataev A.K.**, Wasserlauf I.E. Evolution-genetic analysis of the palearctic Anopheles maculipennis (Diptera: Culicidae) complex // Proceedings of XX International Congress of Entomology, Firence, Italy, August 25-31. – 1996. – P. 256.

10. Stegnii V.N., Sharakhov I.V., Sharakhova M.V., **Sibataev A.K.,** Wasserlauf I.E., Burlak V.A. Evolution-genetic analysis of the palearctic Anopheles maculipennis (Diptera: Culicidae) complex // Proceedings of 10th. European SOVE Meeting, (Strasbourg, France, September 2-6 1996). – 1996. – P. 41.

11. Бурлак В.А., **Сибатаев А.К.** Асимметрия в природных популяциях личинок малярийных комаров и ее связь с чувствительностью к двум подвидам Bacillus thuringiensis патотипа А. // Паразиты и паразитарные болезни в Западной Сибири: Тез. докладов I научной конф. Новосибирского отделения Паразит. общества РАН. – Новосибирск. – 1996. – С.17–18.

12. Гордеев М.И. **Сибатаев А.К.** Цитогенетическая и фенотипическая изменчивость в центральных и периферийных популяциях малярийного комара Anopheles messeae Fall. (Diptera, Culicidae) // ***Генетика.*** – 1996. – Т. 32. – № 9. – С.1199–1205.

13. **Сибатаев А.К.,** Бурлак В.А. Изменчивость числа зубцов гребня стигмальной пластинки в личиночных популяциях малярийных комаров (Diptera; Culicidae) / Паразиты и паразитарные болезни в Западной Сибири: Тез. докладов I научной конф. Новосибирского отделения Паразит. общества РАН. – Новосибирск. – 1996.– С.87–88.

14. Бурлак В.А., **Сибатаев А.К.** Характер взаимоотношений природных популяций малярийных комаров Anopheles группы maculipennis mg. (Diptera, Culididae) и кристаллообразующих бактерий Bacillus thuringiensis israelensis // Пробл. энтомол. в России. – Тезисы энтомологического съезда. С-Петербург. – 1998. – Т1. – С. 51.

15. Бурлак В.А., **Сибатаев А.К**. Частота встречаемости фенотипа stripe у личинок малярийных комаров в природных водоемах // Известия СО РАН. – ***Сибирский экологический журнал.*** – 1997. – №6. – С. 589-594.

16. Бурлак В.А., **Сибатаев А.К**. Чувствительность личинок малярийных комаров к энтомопатогенной бактерии Bacillus thuringiensis israelensis и экстенсивность заражения их микроспоридиями // Успехи энтомологии на Урале. – Екатеринбург. – 1997. – С. 166-167.

17. **Сибатаев А.К.** Детерминация пищевого поведения личинок в популяциях малярийных комаров // Проблемы эволюционной цитогенетики, селекции и интродукции: Материалы научных чтений, посвященные 100-летию проф. В.П. Чехова, Томск, 1997. – С. 52-54.

18. **Сибатаев А.К.** Хромосомный полиморфизм *Anopheles messeae* в природных популяциях Казахстана / Проблемы эволюционной цитогенетики, селекции и интродукции. Материалы научных чтений, посвященные 100-летию проф. В.П. Чехова, Томск, 1997. – С. 54-56.

19. **Сибатаев А.К.,** Бурлак В.А Некоторые закономерности полосатой окраски личинок малярийных комаров комплекса Anopheles maculipennis // Успехи энтомологии на Урале. – Екатеринбург. – 1997. – С. 198-199.

20. **Сибатаев А.К**., Стегний В.Н. Морфологический и цитогенетический анализ филогении малярийных комаров комплекса "maculipennis" // Место и роль двукрыл. насекомых в экосистемах: материалы докл. на 6 Всерос. симп. диптерологов, – Санкт-Петербург, 21-25 апр., 1997. – СПб, –1997. – С. 119.

21. Шарахов И.В., **Сибатаев А.К**., Бурлак В. А Морфологические закономерности эволюции яиц при видообразовании малярийных комаров // Эволюция жизни на земле: Материалы I Междунар. симпозиума . – Томск: Изд-во НТЛ. – 1997. – С. 145.

22. Бурлак В.А **Сибатаев А.К**. Микроспоридиозы в природных популяциях малярийных комаров *Anopheles messae* Fall // Проблемы энтомологии в России, сборник науч. трудов – С-Петербург. –1998 – С. 50-51

23. Бурлак В.А., **Сибатаев А.К.** Скорость поглощения пищи и ее связь с морфометрическими показателями у личинок двух видов малярийных комаров (Diptera; Culicidae) // ***Экология***. – 1998. – № 1. – С. 55–61.

24. **Сибатаев А.К.** Изменчивость параметров головы личинок малярийных комаров (Diptera; Culicidae) в зонах симпатрии Западной Сибири // Биологическое разнообразие животных Сибири: Материалы конф., посвященные 110-летию зоолог. исслед. и образов. в Сибири. – г.Томск. – 1998. – С.100-101.

25. Бурлак В.А., Шарахова М.В., Шарахов И.В, Лапик Е.Р., **Сибатаев А.К**. Связь морфотипов хромосом самок малярийного комара *Anopheles atroparvus* с чувствительностью их потомства к *Bacillus thuringiensis israelensis* // ***Генетика***. – 1998. – Т. 34. – № 7. – С. 992-995

26. Бурлак В.А., **Сибатаев А.К**., Перевозкин В.П., Гордеев М.И. Взаимосвязь

скорости поглощения пищи личинками двух видов малярийных комаров (Diptera; Culicidae) с их инверсионными генотипами // ***Экология***. – 1999. – № 5. – С. 379–381.

27. Braginets O.P., Sharakhova M.V., **Sibataev A.K**. Variability of repetitive DNA in two genera of the blood-sucking mosquitoes (Culicidae, Diptera) // Biodiversity and Dynamics of Ecosystems in North Eurasia. – V. 1. – Part 3: Molecular-genetic bases of biodiversity (animals and plants).- Novosibirsk, 2000. – P. 22-24

28. Брагинец О.П., **Сибатаев А.К**., Стегний В.Н. Рестриктазный анализ повторяющихся последовательностей ДНК у представителей кровососущих комаров рода Culex // Проблема вида и видообразования: Тезисы докладов 1-ой Междунар. конф.. – г. Томск. – 2000 – С. 16-17.

29. Бурулько М.Л., Штумпф О.В., **Сибатаев А.К**. Фенотипическая изменчивость комаров комплекса Culex pipiens / Естественные и точные науки: III Сибирская школа молодого ученого. Материалы конф. Студентов, аспирантов, и молодых ученых (22-23 декабря 2000 г). Т.1.– Томск. Изд-во ТГПУ. – 2000 – С.83-84.

30. **Сибатаев А. К**., Бурлак В. А.. Изменчивость параметров головы и антенны у личинок двух видов малярийных комаров из различных биотопов Западной Сибири и Средней Азии // Известия СО РАН. ***Сибирский экологический журнал*** – 2000 – в. 4. – С. 477-483.

31. Храброва Н.В. **Сибатаев А.К**. Анализ генетической изменчивости комаров *Culex pipiens (Diptera, Culicidae)* с использованием микросателлитного локуса CQ46 в качестве маркера// Проблема вида и видообразования: Тезисы докладов 2-ой Междунар. конференции, 24-26 октября 2001г., г. Томск. – Т. 2. – 2002. – С. 392-393.

32. **Sibataev A.K.,** Gordeev M.I. The morphological analysis of malarial mosquito larva of Western Siberia // Vector-Borne Diseases and Problems of Genetic Safety – Proceedings of the First International Workshop, Moscow, 6-12 October 2002 – 2003. – P. 10.

33. **Сибатаев А.К**., Гордеев М.И., Унгер М.Ф. Фенотипическая и цитогенетическая изменчивость двух видов малярийных комаров – *Anopheles messeae* и *Anopheles beklemishevi (Diptera, Culicidae)*/ Материалы XII съезда Русского энтомологического общества, Санкт-Петербург, 19-24 августа 2002 г. –2002 – С. 317-318.

34. Штумпф О.В., **Сибатаев А.К.** Скрещивание Culex pipiens pipiens и Culex pipiens molestus// Материалы VII общероссийской межвузовской конференции студентов, аспирантов и молодых ученых "Наука и образование" – Естественные и точные науки. Т1. – 2003. – С.126-127

35. Храброва Н.В., **Сибатаев А.К.,** В.Н. Стегний RAPD-маркеры для идентификации представителей рода *Culex* – переносчиков вируса западно-нильской лихорадки // ***Вестник Томского государственного университета***. – 2004. – №10. – С.128- 130.

36. Шабанова Ю.В., **Сибатаев А.К**. Сравнительный анализ морфологии имаго малярийных комаров азиатской части территории России // ***Вестник Томского государственного университета***. – №10. – 2004. – С. 141-144.

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

38. 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. 520.

39. 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.

40. Храброва Н.В., **Сибатаев А.К.,** Стегний В.Н.. Генетическая идентификация комаров группы Culex pipiens (Diptera: Culicidae) методом RAPD-анализа// ***Доклады Академии Наук***. – 2005. – Т.402. – №3. – С. 1–2.

41. Храброва Н.В., **Сибатаев А.К.**, Стегний В.Н. Распространение комаров комплекса Culex pipiens (Diptera, Culicidae) // Энтомологические исследования в Северной Азии. Материалы VII Межрегиональное совещание энтомологов Сибири и Дальнего Востока . – Новосибирск. – 2006. – С. 434–435.

42. Шабанова Ю.В., **Сибатаев А.К.** Малярийные комары (Diptera, Culicidae) Сибири и Дальнего Востока // Энтомологические исследования в Северной Азии. Материалы VII Межрегиональное совещание энтомологов Сибири и Дальнего Востока . Новосибирск. – 2006. –С. 438–439.

43. Шабанова Ю.В., **Сибатаев А.К**. Проблемы морфологической таксономии малярийных комаров комплекса Anopheles maculipennis (Diptera, Culicidae)// Материалы I Всероссийского совещания по кровососущим насекомым. (24 .– 27 октября 2006 г., Санкт-Петербург). СПб.: ЗИН РАН, – 2006. – С.289–290.

44. Храброва Н.В., **Сибатаев А.К**., Стегний В.Н. Молекулярно-генетические маркеры для идентификации представителей комплекса Culex pipiens (Diptera, Culicidae) // Материалы I Всероссийского совещания по кровососущим насекомым. (24- 27 октября 2006 г., Санкт-Петербург). – СПб.: ЗИН РАН. – 2006 –. С.211–213.

45. Шабанова Ю.В., **Сибатаев А.К**., Стегний В.Н. Морфологическая и цитогенетическая характеристика малярийного комара Anopheles beklemishevi Stegnii et Kabanova // ***Медицинская паразитология и паразитарные болезни***. – 2007. – №1. С.33–37.

46. **Сибатаев А.К**., Шабанова Ю.В. Малярийные комары Республики Кыргызстан // ***Вестник Томского государственного университета***. – 2007. – №296. март. – С.227–231.

47. **Сибатаев А.К.** Андреева Ю.В. Морфология малярийных комаров комплекса *Anopheles maculipennis* на территории России // В кн.: Научно-практическое руководство по малярии (эпидемиология, систематика, генетика). – 2007. – С. 146-185.

48. Шабанова Ю.В., **Сибатаев А.К**. Изменчивость морфологии класпет гипопигиев самцов малярийных комаров комплекса *Anopheles maculipennis* // ***Вестник Томского государственного университета***. – 2007. – №300 (II). – С.252-256.