

На правах рукописи

Шайкевич Елена Владимировна

**ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ИДЕНТИФИКАЦИЯ БЛИЗКОРОДСТВЕННЫХ ВИДОВ
НАСЕКОМЫХ И РОЛЬ СИМБИОНТОВ В ИХ ЭВОЛЮЦИИ (НА ПРИМЕРЕ
КОМПЛЕКСА ВИДОВ *Culex pipiens* И *Adalia* spp).**

03.02.07 – генетика

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
доктора биологических наук

Москва – 2014

Работа выполнена в лаборатории генетики насекомых Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института общей генетики имени Н.И. Вавилова Российской академии наук

Научный консультант

член-корр. РАН, доктор биологических наук, профессор **Захаров-Гезехус Илья Артемьевич**

Официальные оппоненты:

член-корр. РАН, доктор биологических наук, профессор

Рысков Алексей Петрович,

заведующий лабораторией организации генома

Федерального государственного бюджетного учреждения науки

Института биологии гена Российской академии наук, г.Москва

доктор биологических наук,

Куликов Алексей Михайлович,

заместитель директора по науке Федерального государственного

бюджетного учреждения науки Института биологии развития

им. Н. К. Кольцова Российской академии наук, г.Москва.

доктор биологических наук, доцент

Климов Евгений Александрович,

в.н.с. кафедры генетики биологического факультета

Федерального государственного бюджетного образовательного

учреждения высшего профессионального

образования «Московский государственный университет

им. М.В. Ломоносова», г.Москва

Ведущее учреждение:

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Зоологический институт РАН г.

Санкт-Петербург

Защита диссертации состоится «12» марта 2015 г. в 13 часов на заседании диссертационного совета Д 002.214.01 на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН по адресу: 119991, ГСП-1, г. Москва, ул. Губкина, д. 3. Факс: (499) 132-89-62, e-mail: aspirantura@vigg.ru

С диссертацией и авторефератом можно ознакомиться в библиотеке и на сайте Института www.vigg.ru, тел. 8-499-135-14-31.

Автореферат разослан «__» _____ 201_ г.

Ученый секретарь диссертационного совета,

кандидат биологических наук

Синельщикова Т.А.

Общая характеристика работы

Актуальность и степень разработанности проблемы. Насекомые являются самой крупной таксономической группой животных и играют решающую роль в экосистемах, среди них много паразитов человека и животных. В классической таксономии насекомых существуют проблема морфологического сходства представителей разных видов, так называемых видов-двойников, и проблема выраженной морфологической изменчивости в пределах политипического вида, которые обуславливают необходимость исследовать корреляцию традиционно используемых в систематике морфологических и эколого-физиологических признаков и полиморфизма ДНК. Генетические процессы, такие как мутационные изменения, гибридизация и взаимодействие генома насекомого-хозяина с геномом симбионта, приводят к изменению генетической структуры и являются основой микроэволюционных изменений в популяциях насекомых на ранних стадиях видообразования. Хорошей моделью для исследования подобных процессов являются комплексы видов насекомых, включающие как несколько близких видов, так и формы подвидового статуса с хорошо выраженными физиологическими или поведенческими особенностями, у которых генетическая дифференциация находится на начальном этапе. В отличие от медленно формирующихся различий по морфологическим признакам, мутационные процессы в ДНК, последующая миграция и изоляция, возможно формирующаяся за счет вызываемых симбиотическими бактериями нарушений репродукции насекомого-хозяина, происходят сравнительно быстро и, поэтому, анализ ДНК позволяет выявить различия на начальных стадиях дивергенции форм, разработать методы определения таксономической принадлежности насекомого. В настоящей работе проблема разрабатывается на примере комплексов близкородственных видов и внутривидовых форм в двух отрядах насекомых - отряд Diptera (двукрылые) и отряд Coleoptera (жесткокрылые).

Комары комплекса *Culex pipiens* (Diptera, Culicidae) имеющие всеветное распространение, известны как активные кровососы и переносчики возбудителей серьезных заболеваний, таких как лимфатический филяриоз, лихорадка долины Рифт и нескольких форм энцефалита, в том числе западно-нильского (ЛЗН). Последнее заболевание, распространенное ранее в странах Африки, в Индии и Израиле, с 1998 года стало давать вспышки в южной Европе, южной России и США. Климатические изменения способствуют быстрому распространению и увеличению численности насекомых за счет возрастающего количества генераций за сезон. В популяциях идет развитие резистентности к инсектицидам, усложняющее борьбу с потенциальными переносчиками возбудителей инфекционных заболеваний. Для успешного контроля переносчиков необходима точная идентификация видов комаров, выяснение роли каждого члена комплекса в эпидемиологических процессах. Исследование генетических процессов в популяциях переносчиков - основа для развития программ противодействий распространению опасных заболеваний человека и животных.

С идентификацией представителей комплексов видов, таких как *Culex pipiens*, возникают особенные трудности. При изучении структуры природных популяций *C. pipiens* и степени дифференциации экотипов применяют традиционный морфофизиологический подход с использованием среднего сифонального индекса личинок, генитального индекса самцов, автогенности и стеногамности имаго и т.д., который очень трудоемок и зачастую не дает четкого ответа, особенно если это касается южных популяций вида. Формы, входящие в комплекс, слабо или совсем не отличаются по морфологии личинок и имаго, взрослые самки не имеют морфологических отличий. В то же время, они значительно различаются по

экологическим, физиологическим характеристикам и пищевым предпочтениям. Различно и их эпидемиологическое значение. Комплекс кровососущих комаров *Culex pipiens* включает политипический вид *Culex pipiens*, в который входят несколько подвидов: *C. p. pipiens*, включая экотипы *pipiens* и *molestus* (во всех регионах с умеренным климатом), *C. p. quinquefasciatus* (в тропиках и субтропиках), *C. p. pallens* (Юго-Восточная Азия), *C. p. australicus* (Австралия) и близкие к ним виды *Culex torrentium* (Евразия) и *Culex vagans* (Забайкалье, Дальний Восток) (Виноградова, 1997; Vinogradova, 2000). В Европейской части России распространены *C. torrentium* и *C. p. pipiens* форм *pipiens* и *molestus*. *C. torrentium* – вид-двойник *C. p. pipiens*, эти виды трудно различаются морфологически, заселяют одни и те же водоемы и обладают сходными биологическими особенностями, в лабораторных условиях скрещиваются и дают жизнеспособное потомство. Таксономический статус членов комплекса до сих пор является предметом дискуссий, в частности *C. p. quinquefasciatus* некоторые авторы считают видом.

У видов божьих коровок р. *Adalia* (Coleoptera, Coccinellidae), напротив, наблюдается ярко выраженный внутривидовой полиморфизм и географическая изменчивость в пределах видов по таким общепринятым морфологическим признакам как окраска и рисунок пронотума и надкрылий. Виды божьих коровок р. *Adalia* имеют широкие ареалы распространения, что позволяет изучать географические тенденции изменения генофонда и выделить факторы, влияющие на генетическую структуру популяций. Известно существование на протяжении продолжительного времени гетероморфных популяций адалий, состоящих из нескольких достаточно резко различающихся друг от друга типов. Анализ ДНК адалий практически не проводился. В Палеарктической области некоторые систематики насчитывают десять видов р. *Adalia*. Ранее было показано, что вид *A. bipunctata* является политипическим видом, состоящим из четырех географических популяций или подвидов: *A. b. bipunctata* L. (Европа и Азия), *A. b. fasciatopunctata* Fald. (Монголия, Тува, Забайкалье и прилегающая часть Сибири), *A. b. turanica* Lus (Средняя Азия) и *A. b. revelierei* Muls. (Малая и Передняя Азия, Закавказье) (Лусис, 1973). Генетические основы разделения перечисленных форм на таксономические единицы не выяснены. Не известна и степень генетической дивергенции между видами рода *Adalia*.

Известно, что около 60 % видов артропод заражено внутриклеточными симбиотическими бактериями (Hilgenboecker et al., 2008). Доказано, что симбиоз является одним из факторов эволюции видов насекомых. Симбиотические бактерии передаются как правило по материнской линии и могут вызывать различные эффекты (цитоплазматическую несовместимость, феминизацию, гибель самцов и пр.), изменяющие характер размножения хозяина. Известно, что комары рода *Culex* инфицированы симбиотической бактерией *Wolbachia* (Hertig, Wolbach 1924; Yen, Barr, 1971; Guillemaud et al., 1997; Jiggins et al., 2002). У божьих коровок *Adalia bipunctata* до начала нашей работы было обнаружено заражение симбиотической бактерией *Rickettsia*, вызывающей гибель особей мужского пола (Werren et al., 1994). Симбиотические бактерии вступают в различные взаимодействия с хозяевами, оказывая "изошренные и искусные" эффекты (Werren et al., 2008), не только манипуляцию репродукцией хозяина, но и защиту хозяина от естественных врагов. Каждый из этих эффектов позволяет симбионтам быстро распространяться по популяции насекомых, поскольку он выгоден инфицированным самкам. Эти эффекты являются также экологически и эволюционно значимыми и для конкретного инфицированного вида-хозяина, вызывая в ряде случаев репродуктивную изоляцию или направляя изменения в половом поведении (Werren et al., 2008; Engelstadter, Hurst, 2009; Saridaki, Bourtzis, 2010; Dumas et al., 2013). Для ряда видов насекомых известно, что инфицированность

симбионтами приводит к снижению полиморфизма мтДНК (Turelli et al., 1992; Jiggins, 2003).

Цель и задачи исследования. Основной целью исследования являлась генетическая идентификация близкородственных форм насекомых со спорным или неясным таксономическим статусом, выяснение генетических процессов, протекающих в популяциях комаров комплекса *Culex pipiens* и жуков комплекса *Adalia bipunctata* и роли симбиотических бактерий в их эволюции.

Для достижения этой цели были поставлены следующие задачи:

1. Определить изменчивость гена цитохромоксидазы с субъединицы I (*COI*) мтДНК у близких видов, подвидов и внутривидовых форм комплекса *Culex pipiens*.
2. Изучить разнообразие нуклеотидных последовательностей внутреннего транскрибируемого (ITS2) и межгенного (IGS) спейсеров рибосомного кластера генов у членов комплекса *Culex pipiens*.
3. На основании данных об изменчивости изученных нуклеотидных последовательностей ДНК оценить степень генетической дифференциации и разработать ДНК-маркеры для точной идентификации близкородственных форм комплекса *Culex pipiens*.
4. С помощью разработанных молекулярно-генетических маркеров проанализировать географическое распространение видов и форм комплекса *Culex pipiens* и определить происхождение антропофильной формы *Culex pipiens* f. *molestus*.
5. Изучить распространение симбиотической альфа-протеобактерии *Wolbachia* в естественных и антропогенных популяциях комаров комплекса *Culex pipiens*.
6. Изучить связь полиморфизма симбиотической бактерии *Wolbachia* с изменчивостью ДНК комаров комплекса *Culex pipiens*.
7. Изучить распространение симбиотических бактерий в популяциях жуков рода *Adalia*.
8. Изучить изменчивость гена *COI* мтДНК у жуков рода *Adalia*.
9. Оценить связь изменчивости мтДНК с зараженностью симбиотическими бактериями у жуков рода *Adalia*.
10. Изучить изменчивость нуклеотидных последовательностей внутреннего транскрибируемого спейсера кластера генов рРНК (ITS2) у жуков рода *Adalia*.
11. На основании данных об изменчивости последовательностей мтДНК и ДНК области ITS2 уточнить филогенетические связи жуков рода *Adalia*, в частности - определить степень генетической дифференциации и таксономическое положение географических форм политипического комплекса *Adalia bipunctata* – *A. b. bipunctata*, *A. b. fasciatopunctata*, *A. b. revelierei*, *A. b. turanica* и *A. frigidata*.

Научная новизна. Проведено комплексное изучение генетической структуры популяций исследованных видов и внутривидовых форм насекомых по митохондриальной и ядерной ДНК. Изучена изменчивость ДНК комаров комплекса *Culex pipiens* по таким маркерам как ITS2 и IGS кластера рибосомных генов, гену *COI* мтДНК. Впервые определена структура полного гена *COI* комаров комплекса *Culex pipiens*, нуклеотидные последовательности зарегистрированы в GeneBank под номерами FN395171-FN395206. Впервые описана структура межгенных спейсеров кластера генов рРНК видов *C. torrentium*, *C. modestus* и подвида *C. p. pallens* (JX500436 - JX500439). Разработан метод ПЦР-ПДРФ диагностики видов комплекса *Culex pipiens* на основе полиморфизма гена *COI* мтДНК. Проведенное исследование комплекса *Culex pipiens* позволило впервые установить единое происхождение географически удаленных популяций подвальной формы *C. p. pipiens* f.

molestus на территории Европейской части России. Разработаны методы дифференциации *C. torrentium* и *C. pipiens*. Выявлены случаи ошибочной диагностики природных популяций. Впервые, на основании результатов, полученных современными методами анализа видового состава комаров комплекса *Culex pipiens* на Европейской части России, очерчены границы ареала представителей комплекса. Впервые обнаружены гибриды между *C. p. pipiens* и *C. p. quinquefasciatus* и выявлены случаи цитоплазматической интрогрессии у членов комплекса в районе Средиземноморья. Впервые проведено изучение видов жуков р. *Adalia* из географически удаленных мест обитания Евразии методами молекулярно-генетического анализа, что позволило оценить полиморфизм ДНК, географическую изменчивость, уточнить филогенетические отношения между видами р. *Adalia* и подвидами комплекса *A. bipunctata*. Впервые определены последовательности генов мтДНК и рРНК для подвидов *A. b. turanica* и *A. b. revelierei* и видов *A. frigida* и *A. tetraspilota* (JQ757048-JQ757053) и проведен сравнительный анализ эволюционных связей этих видов с *A. bipunctata* и *A. decempunctata*. Впервые показано, что комары *C. torrentium* в отличие от симпатрических *C. pipiens* f. *pipiens* не инфицированы эндосимбионтом - *Wolbachia*. Доказано совместное распространение цитоплазматических компонентов – мтДНК и типов *Wolbachia pipientis* в популяциях у *C. pipiens* и их связь с таксонами комплекса. Соответствие генетических расстояний между гаплотипами *COI* и группами *W. pipientis* указывает на ведущую роль бактерии в дивергенции таксонов комплекса *Culex pipiens*. Впервые обнаружено, что эффект - «неравновесия по сцеплению» с мтДНК, неоднократно описанный для *Wolbachia*, точно также имеет место и при распространении *Spiroplasma* в популяциях *A. bipunctata*. Зараженность симбиотической бактерией снижает гаплотипическое разнообразие мтДНК у комаров *C. pipiens*. Аналогичный эффект был впервые обнаружен и для жуков *A. bipunctata*.

Практическая значимость работы. Кровососущие насекомые наделены различной способностью к переносу возбудителей трансмиссивных заболеваний человека и животных. Точная диагностика позволяет оценить роль представителей близких видов в распространении опасных заболеваний и соответственно разработать способы защиты. Разработаны оригинальные методы дифференциации морфологически трудно различимых комаров *C. pipiens* и *C. torrentium* с помощью молекулярно-генетических методов (Виноградова, Шайкевич, 2005) и приведены примеры ошибочной идентификации *C. pipiens* (Федорова, Шайкевич, 2007). Впервые предложен способ диагностики форм комаров *C. p. pipiens* (форм *pipiens* и *molestus*) методом рестрикционного анализа продуктов амплификации (ПЦР ПДРФ), разработанный на основе полиморфизма нуклеотидной последовательности 5' конца гена *COI* митохондриальной ДНК (Shaikevich, 2007; Шайкевич, 2009) и уточнен видовой состав популяций кровососущих комаров *C. pipiens* Европейской части России. Этот способ был применен к исследованию природных популяций в России и ближнем зарубежье (Vinogradova et al., 2007; Виноградова и др., 2012), в северной Италии (Talbalaghi, Shaikevich, 2011), в Германии (Becker et al., 2012), в Англии (Danabalan et al., 2012) и в зоне Средиземноморья (Шайкевич, Виноградова, 2013). Виды р. *Adalia*, относящиеся к семейству хищных жуков Coccinellidae, являются естественными регуляторами численности вредителей деревьев и кустарников – тлей, что позволяет широко использовать их для биологической защиты растений, особенно в антропогенных ландшафтах. Нами были проведены исследования генетической структуры географически удаленных природных популяций этого рода. Связь зараженности симбионтами и типа митохондриальной ДНК была изучена в популяциях божьих коровок р.

Adalia и комаров комплекса *Culex pipiens*. Полученные результаты важны для понимания роли симбиотических бактерий в эволюции близких видов.

Положения, выносимые на защиту:

1. Анализ ДНК гена цитохромоксидазы с субъединицы I и переменных спейсеров рРНК позволяет обнаружить различия, разработать дифференцирующие маркеры и определить степень генетических различий между таксонами исследованных насекомых рода *Culex* и рода *Adalia*.
2. Природные биотопы Северной Евразии заселены преимущественно *C. torrentium*, который замещает здесь *C. p. pipiens f. pipiens*. Заражение *C. pipiens* симбиотической бактерией *Wolbachia* могло привести к дивергенции видов *C. pipiens* и *C. torrentium*.
3. Комары *C. p. pipiens f. molestus* не происходят от симпатрических природных популяций *C. p. pipiens f. pipiens* и географически удаленные популяции этой формы имеют единое происхождение.
4. Нередко описываемые как самостоятельные виды *A. fasciatopunctata*, *A. revelierei* и *A. turanica* являются лишь географическими формами политипического вида *Adalia bipunctata*.
5. По совокупности различий в нуклеотидном составе мтДНК и рРНК *A. frigida* можно считать близкородственным видом *A. bipunctata*.
6. Заражение симбиотическими бактериями снижает разнообразие мтДНК у комаров комплекса *Culex pipiens* и у божьих коровок *Adalia bipunctata* за счет экспансии связанных с бактериями митотипов в популяциях в результате адаптивности симбиоза и не влияет на полиморфизм ядерных генов.
7. Обнаружение сцепленных с инфекцией симбиотическими бактериями *Spiroplasma* и *Rickettsia* митохондриальных гаплотипов в популяциях, географически далеко удаленных друг от друга, свидетельствует о древности первого контакта бактерий с коровками вида *A. bipunctata*. Особи близкого вида *Adalia decempunctata* также инфицированы *Rickettsia*. Вероятно, инфекция имела место до расхождения этих двух видов. Сохранение бактерионосительства на протяжении миллионов лет свидетельствует о биологической полезности явления бессамцовости, которое вызывается у *Adalia* симбиотическими бактериями.
8. Связь зараженности симбиотическими бактериями *Wolbachia*, *Spiroplasma* и *Rickettsia* с определенными мт-гаплотипами у *Culex pipiens* и *Adalia bipunctata*, отсутствие инфицированных особей *C. torrentium* даже в смешанных с зараженными *C. p. pipiens f. pipiens* популяциях и зараженность *A. bipunctata* и *A. decempunctata* разными бактериями в смешанной популяции являются следствием отсутствия или редкости горизонтального переноса симбионтов в популяциях насекомых исследованных родов.

Апробация результатов диссертации. Материалы диссертации были представлены на 16 конференциях: First International Workshop: Vector-Borne Diseases and Problems of Genetic Safety, Moscow, 2003; I Всероссийском совещании по кровососущим насекомым, Санкт-Петербург, 2006; Отчетной конференции по программе фундаментальных исследований РАН "Биоразнообразие и динамика генофондов", Москва, 2007; 4th European Mosquito Control Association Workshop, Prague, Czech Republic, 2007; Международной научно-практической конференции "Актуальные проблемы биоэкологии", Москва, 2008; XX International Congress of Genetics, Berlin, Germany, 2008; V съезде ВОГИС, Москва, 2009; 5th European Mosquito Control Association Workshop, Turin, Italy, 2009; Emerging Diseases in a

changing European Environment (EDEN), Montpellier, France, 2010; международной конференции «Проблемы популяционной и общей генетики», Москва, 2011; Role of Microorganisms on Adaptation and Evaluation on Animals and Plants, Bat-Sheva de Rothschild Seminar, Israel, 2011; международной научно-практической конференции "Актуальные проблемы биологической и химической экологии", Москва, 2012; 7th International Wolbachia Conference, L'Oleron, France, 2012; Международной конференции Фундаментальные и прикладные аспекты изучения паразитических членистоногих в XXI веке, Санкт-Петербург, 2013; VI съезде ВОГИС, Ростов-на-Дону 2014; 8th International Congress of Dipterology, Potsdam, Germany, 2014.

Публикации. Материал диссертации опубликован в 43 работах в международных и отечественных журналах и сборниках, их них 27 статей в российских и международных рецензируемых журналах, включенных в перечень рекомендованных ВАК Минобрнауки.

Личный вклад автора. Сборы комаров, их характеристика по морфологическим и физиологическим признакам и опыты по скрещиванию проводились коллегами-энтомологами, главным образом Е.Б. Виноградовой и М.В. Федоровой. Жуки рода *Adalia* были собраны и охарактеризованы морфологически И.А. Захаровым-Гезехусом. Все результаты анализа ДНК получены лично или с непосредственным участием автора. Исследования структуры межгенных спейсеров кластера генов рРНК комаров проводилось совместно с Д.М. Муха. Обсуждение результатов проводилось вместе с И.А. Захаровым-Гезехусом, М.В. Федоровой и Е.Б. Виноградовой.

Структура диссертации. Диссертация состоит из пяти глав: Введение, Обзор литературы, Материалы и методы, Результаты, Обсуждение и Выводы. Текст изложен на 223 страницах, сопровождается 24 таблицами и 30 рисунками. Список литературы включает 361 источник.

Материалы и методы. В работе использовались личинки, куколки и имаго комаров р. *Culex* из природных популяций Ленинградской, Ярославской, Краснодарской, Нижегородской областей, Северного Кавказа, Грузии и Азербайджана (предоставленные Е.Б. Виноградовой), Московской и Волгоградской обл. (М. Федоровой), Карелии (С. Карповой), Екатеринбурга (Н. Николаевой), Свердловской обл. (Ю. Вигоровым и Л. Некрасовой), Томска (А. Сибатаевым), Абхазии (О. Безжоновой), Казахстана (О. Лопатиным), лабораторной линии МГУ (Ивницким С.Б.), Италии (Е. Виноградовой и А. Talbalaghi), Португалии (Р. Almeida), Туниса (А. Bouattour), Франции (О. Duron), Греции (Е. Виноградовой) и Марокко (А.-В. Failloux). Куколки и имаго божьих коровок р. *Adalia* из природных популяций Кеми, Архангельска, Санкт-Петербурга, Улан-Уде, Ташкента, Швеции были собраны и охарактеризованы И. А. Захаровым-Гезехусом, Читы - О. Корсуном и Якутска - П. Ноговицыным.

Выделение ДНК из образцов проводилось фенол-хлороформным методом и с помощью коммерческих наборов DNAprep (Изоген, Москва). ПЦР проводили с использованием наборов GenePak™ PCR Core (Изоген, Москва) и Encyclo PCR kit (Евроген, Россия). В работе использовались стандартные методы ПЦР, ПЦР-ПДРФ, элюция из геля (наборы QIAquick Gel Extraction ("Qiagen", США), клонирование с использованием наборов pGEM-T Easy Vector Systems ("Promega", США). Для подбора праймеров использовали программу Oligo6, для подбора сайтов рестрикции – In silico simulation of molecular biology experiments. Для анализа нуклеотидных последовательностей использовали программы ChromasPro, BLASTN, ClustalW, MAFFT V.6., MEME, MEGA version 4 и 5, dnasp5, TCS1.21.

Результаты и обсуждение.

Culex pipiens

1. Морфо-биологические особенности городских подвальных комаров *C. p. pipiens* f. *molestus*. На территории России широко распространен подвид *C. p. pipiens*, представленный двумя экотипами или формами (f. *molestus* и f. *pipiens*), и близкий к ним *C. torrentium*. Комары *C. p. pipiens* f. *molestus* способны к автогенному овогенезу - откладывают первую порцию яиц без предварительного кровососания за счет личиночных запасов питательных веществ, способны спариваться в ограниченном пространстве без образования роя (стеногамны) и размножаться круглогодично в отапливаемых, подвальных помещениях в условиях умеренного климата (гомодинамны). *C. p. pipiens* f. *pipiens*, также как и *C. torrentium*, обладают альтернативными по отношению к комарам f. *molestus* физиологическими характеристиками: нуждаются в питании кровью для первой кладки яиц (неавтогенные), спариваются только в роях (эвригамные) и диапаузируют зимой (гетеродинамные), личиночное развитие проходит исключительно в открытых биотопах. Генетическая дифференциация двух форм *C. p. pipiens* и определение происхождения подвальной формы *molestus*, распространившейся широко только к середине XX века, составляли цель нашей работы. Были исследованы основные морфо- и физиологические особенности комаров из локальных популяций подвальных биотопов Европейской части России (Петрозаводска, С.Петербурга, Москвы, Нижнего Новгорода, Волгограда и Краснодара) и из Азербайджана (Баку). Способность к автогенному овогенезу была обнаружена у большинства особей из 9 исследованных подвальных биотопов. Доля автогенных самок была всегда высокой, 75 - 100 %. При исследовании морфометрического признака - среднего сифонального индекса личинок в 6 локальных популяциях из Петрозаводска, С.Петербурга, Н.Новгорода и Краснодара отмечен большой размах его значений - от 3.8 до 4.4. Наблюдалась и большая амплитуда индивидуальной изменчивости сифонального индекса личинок, максимальное значение которого иногда находилось в области величин, характерных для формы *pipiens*, т.е. более 4.5. Таким образом, вследствие большой вариабельности этот признак не может быть использован для идентификации отдельных особей комаров, что отмечалось и ранее многими отечественными авторами. Физиологические особенности (основными из которых являются автогенность, стеногамность и неспособность формировать зимнюю диапаузу), в противоположность морфологическим признакам, более определенно отличают особей формы *molestus* от формы *pipiens*.

2. Инфицированность природных популяций *Wolbachia*. Симбиотическая бактерия *Wolbachia* была обнаружена у *C. pipiens*, и доказано, что с ней связаны по меньшей мере 17 вариантов цитоплазматической несовместимости при скрещивании комаров из разных популяций (Laven, 1967). Распространение бактерии среди российских популяций *C. pipiens* было неизвестно. Молекулярно-генетическими методами мы изучили присутствие симбиотической бактерии *Wolbachia* у 827 комаров комплекса *Culex pipiens* из 29 природных популяций. Для обнаружения *Wolbachia* в тотальной ДНК использовали праймеры, специфичные к гену *wsp* *Wolbachia* (Braig et al., 1998), при амплификации образуется фрагмент размером 600 п.н. Качество выделенной ДНК контролировалось с помощью праймеров, специфичных к гену *COI* мтДНК (Juan et al., 1996): для всех исследованных образцов ДНК мы получили характерные продукты ПЦР, размером примерно 311 п.н. (рис.1).

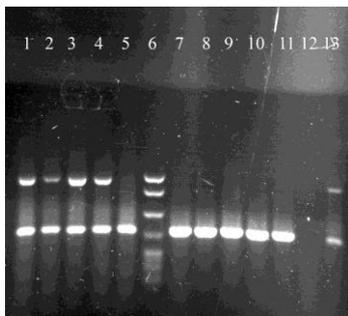


Рисунок 1. - Результаты ПЦР с праймерами для *wsp* и *COI* генов одновременно: (1-5 – ДНК подвальных комаров г.Санкт-Петербурга: 1-4 – комары, у которых обнаружена *Wolbachia*, 5 – подвальный комар без *Wolbachia*, 6 – маркер молекулярного веса pBR322/MspI, 7-11 – ДНК комаров из пригородных биотопов окрестностей г.Санкт-Петербурга, 12 – отрицательный контроль, 13 – положительный контроль – ДНК *Adalia bipunctata* T171 с *Wolbachia*.

Комары *C. pipiens* из исследованных сборов оказались в той или иной степени зараженными бактерией *Wolbachia*: доля зараженных особей во всех подвальных популяциях была достаточно высокой, 71-100%. Комары, собранные в открытых наземных биотопах севернее Москвы в большинстве случаев не были инфицированы этой бактерией. В окрестностях Москвы обнаружены как инфицированные *Wolbachia*, так и незараженные, а также смешанные популяции. Особи, собранные в открытых местообитаниях в Краснодаре, Волгограде и южнее не отличались по зараженности от подвальных. Мы исследовали генетическую структуру зараженных и незараженных *Wolbachia* представителей комплекса, с целью выявления диагностических маркеров. Поскольку во многих частях ареала *C. torrentium* обитает симпатрично с *C. p. pipiens*, от которого морфологически отличается с трудом (Гуцевич и др., 1970; Dahl, 1988), мы предприняли комплексное изучение морфологических, биологических и генетических характеристик представителей двух видов.

3. Дифференциация *C. pipiens* и *C. torrentium*. Ранее предлагались разные диагностические признаки для идентификации этих видов, но до сих пор идентификация имаго *C. torrentium* и *C. pipiens* по морфологическим признакам затруднена. Основным признаком идентификации самок служит отношение жилок крыла R_2 к R_{2+3} , у *C. torrentium* <4 и *C. pipiens* >4 , самцы различаются строением гениталий. Мы провели сравнительный анализ некоторых морфологических, биологических и молекулярно-генетических признаков комаров *C. p. pipiens* и *C. torrentium* из 8 популяций г. Москвы и Московской области. Согласно результатам, идентификация самок *C. p. pipiens* и *C. torrentium* по отношению жилок крыла R_2 к R_{2+3} невозможна из-за вариабельности признака, а по строению гениталий самцы хорошо различаются. В подвальной популяции *C. p. pipiens* из Москвы все самки были стеногамными и 70% автогенными. Во всех остальных популяциях самки оказались неавтогенными и эвригамными (Федорова, Шайкевич, 2007).

Генетические характеристики исследованных популяций. Сравнительный анализ последовательностей 3' конца гена *COI* показал, что *C. p. pipiens* и *C. torrentium* различаются, как правило, 6 заменами среди 246 нуклеотидов (AY303550, AJ633083-AJ6330891, AJ557889-AJ557892), что составляет 2,4%-2,8%. Разница в нуклеотидном составе изученного участка гена *COI* мтДНК у двух видов позволила подобрать рестриктазу *SspI*, которая имела бы сайт рестрикции на последовательности гена *COI* только одного типа (Виноградова, Шайкевич, 2005; Шайкевич и др., 2005). При сравнении ПЦР продуктов области второго внутреннего транскрибируемого спейсера кластера генов рРНК (ITS2)

обнаружено, что ITS2 *C. torrentium* меньше ITS2 *C. p. pipiens* на 52 п.н. (рис. 2). Эта разница возникает за счет множественных делеций, разбросанных по всему участку и составляет 14% (AJ85083, AJ850084).

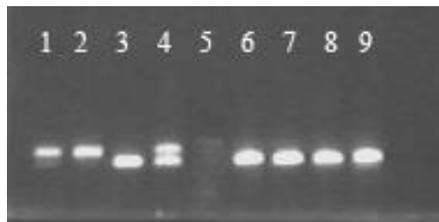


Рисунок 2. Электрофореграмма продуктов ПЦР области ITS2. *C. torrentium* (3, 6-9) и *C. p. pipiens* (1, 2), гибрид (4). 5 – маркер молекулярного веса М-50 (500, 450, 400, 350, 300, 250, 200, 150, 100 п.н.).

Полученные данные свидетельствуют о возможности использования *COI* и ITS2 для идентификации комаров *C. torrentium* и *C. p. pipiens* из природных популяций. Все незараженные *Wolbachia* особи оказались *C. torrentium*. ДНК автогенной и неавтогенной форм *C. p. pipiens* по изученным нами маркерам не отличается. Использование ITS2 в качестве дифференцирующего маркера позволяет выявлять гибриды от скрещивания комаров *C. torrentium* и *C. p. pipiens* (рис. 2). В лабораторных скрещиваниях были получены жизнеспособные гибриды между комарами этих близкородственных видов. В природе гибриды нами обнаружены не были, хотя оба вида нередко обитают совместно.

Таким образом, впервые обнаружено, что неинфицированные бактерией *Wolbachia* особи относятся к виду *C. torrentium*. Впервые были выявлены различия по гену *COI* мтДНК у комаров *C. torrentium* и *C. p. pipiens* из природных популяций, соответствующие уровню межвидовых различий. Проведен анализ ДНК и выявлены различия между данными видами в области ITS2 в российских популяциях. Используя ПЦР-ПДРФ 3' конца гена *COI* рестриктазой *SspI*, размер ITS2 и зараженность *Wolbachia* было проверено всего 346 особей *C. torrentium* и 481 комар *C. p. pipiens* (368 из подвальных и 113 из открытых водоемов). Все незараженные *Wolbachia* особи оказались *C. torrentium*.

4. Изменчивость гена *COI* мтДНК у комаров комплекса *Culex pipiens*. Поскольку различия в нуклеотидных последовательностях ДНК области ITS2 рРНК и 3' конца гена *COI* мтДНК между двумя формами *C. p. pipiens*, f. *pipiens* и f. *molestus*, обнаружить не удалось, мы исследовали изменчивость полной последовательности гена *COI* мтДНК (1548 п.н.), включая область 5' конца гена (603 п.н.), предложенную в качестве стандартного участка для видовой идентификации эукариот, т.н. штрихкодирования. В анализ были включены также комары *C. p. quinquefasciatus* и *C. p. pallens* из трех лабораторных линий, *C. torrentium* и *C. modestus*. Последний не относится к комплексу *Culex pipiens* и имеет явные морфологические отличия, но является предположительно основным переносчиком вируса ЛЗН на юге России и, поэтому, важно было разработать простой способ идентификации эпидемиологически опасных видов. Специфические праймеры были подобраны по известным последовательностям полного генома *C. p. quinquefasciatus* и других видов комаров.

Обнаруженный уровень эволюционной дивергенции (число нуклеотидных различий в пересчете на сайт, выраженное в процентах) в нуклеотидном составе ДНК 5' конца гена *COI* мтДНК между морфологически хорошо дифференцированными видами *Culex modestus* и *Culex pipiens* составляет 5,14 %. Для близких видов *Culex torrentium* и *Culex pipiens*, морфологически различающихся только строением гениталий самцов и способных скрещиваться в лаборатории, этот показатель составляет 3,5%.

Уровень дивергенции ДНК полной последовательности гена *COI* между морфологически трудноразличимыми подвидами *C. p. quinquefasciatus* и *C. p. pipiens* и морфологически неразличимыми (внутривидовыми) формами *C. p. pipiens* (форма *pipiens* и форма *molestus*) очень низкий (0,1 - 0,3 %) (табл. 1), однако, были обнаружены фиксированные замены нуклеотидов у представителей таксонов из аллопатрических популяций. У формы *pipiens* обнаружены 3 митохондриальных гаплотипа, которые различаются заменой одного нуклеотида и были обозначены нами как А, В и С (рис. 3). У формы *molestus* обнаружен один мт-гаплотип D, который отличается двумя фиксированными нуклеотидными заменами от гаплотипов других членов комплекса. У *C. p. quinquefasciatus* обнаружен мт-гаплотип Е, отличающийся также двумя мутациями от гаплотипов *C. p. pipiens*. У особей из Португалии был обнаружен новый мт-гаплотип, отличающийся от типа Е одной нуклеотидной заменой А-С в сайте 830, обозначенный Е1 (рис. 3).

Таблица 1. Уровни эволюционной дивергенции между последовательностями гена *COI* (1548 п.н.) видов, подвигов и форм комплекса *Culex pipiens*

Таксон	1	2	3	4
1 <i>C. p. pipiens</i> f. <i>pipiens</i>				
2 <i>C. p. pipiens</i> f. <i>molestus</i>	0,15%			
3 <i>C. p. quinquefasciatus</i>	0,1%	0,3%		
4 <i>C. p. pallens</i>	0%	0,1%	0,1%	
5 <i>C. torrentium</i>	3,5%	3,5%	3,5%	3,5%

[1246888]
 [1067349]
 [9677086]
 #haplotypeA GAGAAAA
 #haplotypeB GAAAAAA
 #haplotypeC GAGGAAA
 #haplotypeD AAGAAAG
 #haplotypeE GGGAAAG
 #haplotypeE1 GGGAGGA

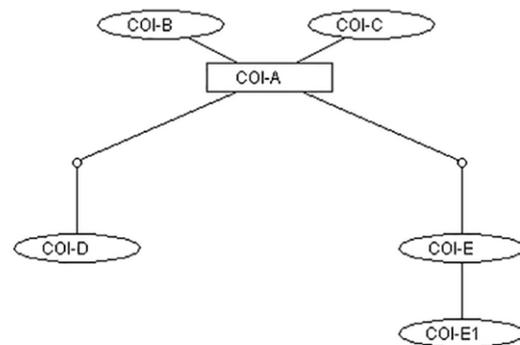


Рисунок 3. Сравнение переменных сайтов нуклеотидных последовательностей шести гаплотипов гена *COI* комаров *C. pipiens* (слева). Номера сайтов указаны сверху, сайты, использованные в ПЦР-ПДРФ анализе подчеркнуты. Медианная сеть гаплотипов (справа).

Анализ 59 полных последовательностей гена *COI* размером 1548 п.н. выявил следующее распределение гаплотипов в популяциях *C. pipiens*: среди 14 особей формы *pipiens* мт-гаплотипы А и С обнаружены в образцах из России и Германии в одинаковых количествах по 6 из 14 (43%). Мт-гаплотип В встретился только в образцах из России, в 2х из 14 (14%). Мт-гаплотип А характерен также для 2 особей из лабораторной линии *C. p. pallens*. Мт-гаплотип D отличается абсолютным мономорфизмом: были обнаружены две фиксированные замены относительно других мт-гаплотипов в позициях 119 и 896 последовательности гена *COI* (рис. 3) у всех 23 исследованных особей из географически удаленных мест сбора от Туниса на юге, до Карелии на севере и Томска на востоке. Мт-

гаплотип Е мы обнаружили у 18 особей: *C. p. quinquefasciatus* из двух лабораторных линий, ведущих свое происхождение из Индии и в сборах из Италии, Греции, Португалии и Израиля; у 6 (43%) образцов из Португалии был обнаружен его вариант Е1.

Разработанный нами метод ПЦР-ПДРФ на основе анализа нуклеотидного состава 5' конца гена *COI* мтДНК позволил предложить быстрый способ идентификации комаров *C. p. pipiens* (форм *pipiens* и *molestus*), *C. p. quinquefasciatus*, *C. torrentium* и *C. modestus* (Shaikovich, 2007, 2009). Сайтом узнавания фермента *HaeIII* является последовательность GG'CC, которая имеется на участке гена *COI* у комаров f. *pipiens*, *C. p. quinquefasciatus*, *C. p. pallens* и отсутствует у комаров f. *molestus* и *C. modestus* (рис. 4А). Эндонуклеазе *BclI* требуется последовательность узнавания T'GATCA. На ДНК *C. p. pipiens*, *molestus*, *pallens*, *quinquefasciatus* и *C. modestus* есть два сайта для *BclI*. На ДНК *C. torrentium* - один (рис. 4В). На электрофореграмме продуктов рестрикции *AluI* у *C. p. quinquefasciatus* остается фрагмент 144 п.н., тогда как у остальных представителей комплекса этот фрагмент разрезается на два - 99 и 45 п.н. (рис. 4С). Разработанный метод ПЦР-ПДРФ гена *COI* не позволяет различать гаплотипы А, В, С и Е, Е1, поэтому под "А" мы подразумеваем группу гаплотипов А, В, С, под "Е" - Е и Е1. С использованием ПЦР-ПДРФ гена *COI* был проведен скрининг 526 образцов ДНК особей из 36 природных популяций (8 подвальных популяций и 28 популяций открытых наземных водоемов) и из трех лабораторных линий (табл. 2).

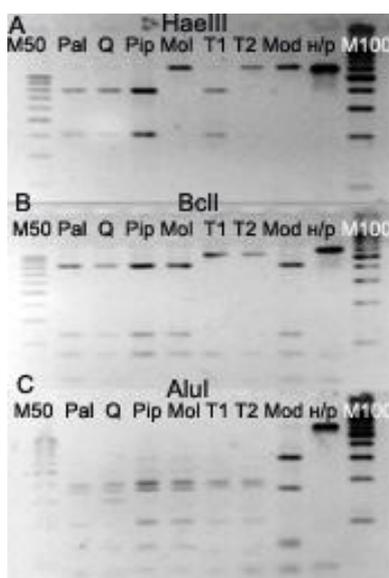


Рисунок 4. Электрофореграмма фрагментов рестрикции после обработки ПЦР-продуктов эндонуклеазами: А – *HaeIII*, В – *BclI*, С – *AluI*. М50 – маркер молекулярного веса М-50 (500, 450, 400, 350, 300, 250, 200, 150, 100, 50 п.н.), Pal – *C. p. pallens*, Q – *C. p. quinquefasciatus*, Pip – *C. p. pipiens* (f. *pipiens*), Mol – *C. p. pipiens* (f. *molestus*), T1 и T2 – *C. torrentium*, Mod – *C. modestus*, н/р – продукт амплификации гена *COI* не обработанный рестриктазами, М100 – маркер молекулярного веса М-100 (1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100 п.н.).

Метод был проверен при изучении популяций *C. p. pipiens* в Волгограде, где случаи заболеваний ЛЗН среди людей регистрируются ежегодно. Были исследованы 545 комаров из 5 подвальных и 10 наземных биотопов (Федорова, Шайкевич, 2013). В качестве биологического признака для дифференциации форм использовали способность к автогенности. Было доказано, что все самки с мт-гаплотипом А (206 и 397 п.н. после обработки *HaeIII*) неавтогенны, т.е. соответствуют характеристике формы *pipiens*. Мт-гаплотип D (603 п.н.) был обнаружен у особей как автогенных, так и неавтогенных (от 7,7 до 15% в разных подвальных популяциях, собранных в 2003 и 2006 гг). Чтобы проверить правильность идентификации неавтогенных особей в популяциях, было проанализировано потомство (F1) 14 автогенных самок формы *molestus*. В потомстве 6 из них были получены неавтогенные дочери (7,8 % от общего числа потомков) и все имели мт-гаплотип D - "*molestus*" (603 п.н). Присутствие неавтогенных особей в потомстве автогенных самок - явление, отмеченное ранее в лабораторных культурах, созданных на основе автогенных

Таблица 2. Результаты анализа популяций комплекса *C. pipiens* методом ПЦР-ПДРФ 5' участка гена *COI*. (*указаны только дифференцирующие фрагменты)

№	Место сбора	Тип биотопа	Кол-во особей	Размер фрагментов (п.н.)			Вид, форма
				BclI	HaeIII	AluI*	
1	Петрозаводск	подвал	10	406,118,79	603	99 и 45	<i>f.molestus</i>
2	Санкт-Петербург	подвал	10	406,118,79	603	99 и 45	<i>f.molestus</i>
3	Ленингр.обл., п.Скачки	открытый	18	524,79		99 и 45	<i>C.torrentium</i>
4	Москва	подвал	10	406,118,79	603	99 и 45	<i>f.molestus</i>
5	Московск.обл, п.Лужки	открытый	10	406,118,79	206,397	99 и 45	<i>f.pipiens</i>
6	Московск.обл, с.Чашниково	открытый	10	524,79		99 и 45	<i>C.torrentium</i>
			18	406,118,79	206,397	99 и 45	<i>f. pipiens</i>
7	Московск.обл, с.Стариково	открытый	10	524,79		99 и 45	<i>C.torrentium</i>
			19	406,118,79	206,397	99 и 45	<i>f. pipiens</i>
8	Москва, Битца	открытый	16	524,79		99 и 45	<i>C.torrentium</i>
9	Москва, Останкино	открытый	15	524,79		99 и 45	<i>C.torrentium</i>
			3	406,118,79	206,397	99 и 45	<i>f. pipiens</i>
10	Н.Новгород	подвал	10	406,118,79	603	99 и 45	<i>f.molestus</i>
11	Н.Новгород	открытый	3	524,79		99 и 45	<i>C.torrentium</i>
			5	406,118,79	206,397	99 и 45	<i>f. pipiens</i>
12	Н.Новгород, д.Глиницы	открытый	4	524,79		99 и 45	<i>C.torrentium</i>
			5	406,118,79	206,397	99 и 45	<i>f.pipiens</i>
13	Волгоград	подвал	30	406,118,79	603	99 и 45	<i>f.molestus</i>
14	Волгоград, о.Сарпинский	открытый	30	406,118,79	206,397	99 и 45	<i>f. pipiens</i>
15	Краснодар, КАУ I	подвал	10	406,118,79	603	99 и 45	<i>f. molestus</i>
16	Краснодар, коллектор	открытый	31	406,118,79	603	99 и 45	<i>f.molestus</i>
17	Краснодар, пригород	открытый	12	406,118,79	206,397	99 и 45	<i>f.pipiens</i>
			1	406,118,79	603	99 и 45	<i>f.molestus</i>
18	Краснодар	открытый	8	406,118,79	206,397	99 и 45	<i>f.pipiens</i>
19	Краснодар, КАУ II	открытый	8	406,118,79	603	99 и 45	<i>f.molestus</i>
20	Краснодар, КАУ III	открытый	8	406,118,79	206,397	99 и 45	<i>f.pipiens</i>
			2	406,118,79	603	99 и 45	<i>f.molestus</i>
21	Астрахань	открытый	10			99 и 45	<i>f.pipiens</i>
22	Кабардино-Балкария, Нальчик	открытый	8	406,118,79	206,397	99 и 45	<i>f.pipiens</i>
23	Северная Осетия, с.Кизляр	открытый	8	406,118,79	206,397	99 и 45	<i>f.pipiens</i>
24	Ставропольский край, г.Георгиевск	открытый	7	406,118,79	206,397	99 и 45	<i>f.pipiens</i>
25	Владикавказ	подвал	5	406,118,79	206,397	99 и 45	<i>f. pipiens</i>
			1	406,118,79	603	99 и 45	<i>f. molestus</i>
	Абхазия						
26	Сухуми	открытый	3	406,118,79	206,397	99 и 45	<i>f.pipiens</i>
27	Приморское	открытый	6	406,118,79	206,397	99 и 45	<i>f.pipiens</i>
28	Аджакуа	открытый	6	406,118,79	206,397	99 и 45	<i>f.pipiens</i>
29	Гудаута	открытый	9	406,118,79	206,397	99 и 45	<i>f.pipiens</i>
30	Очамчире	открытый	11	406,118,79	206,397	99 и 45	<i>f.pipiens</i>
	Грузия						
31	Тбилиси, окр.	открытый	3	406,118,79	206,397	99 и 45	<i>f.pipiens</i>
32	Батуми 1	открытый	18	406,118,80	207,397	99 и 45	<i>f.pipiens</i>
33	Батуми 2	открытый	5	406,118,81	208,397	99 и 45	<i>f.pipiens</i>
			1	406,118,79	603	99 и 45	<i>f.molestus</i>
	Азербайджан						
34	Евлах	открытый	2	406,118,80	207,397	99 и 45	<i>f.pipiens</i>
			3	406,118,79	603	99 и 45	<i>f.molestus</i>
35	Баку 3	подвал	20	406,118,79	603	99 и 45	<i>f.molestus</i>
	Казахстан						
36	Алма-Аты	открытый	24	406,118,79	603	99 и 45	<i>f.molestus</i>
	Индия						
37	Гидерабад	лаб. линия	20	406,118,80	207,397	144	<i>quinquefasciatus</i>
38	Пондишерри	лаб. линия	20	406,118,80	207,397	144	<i>quinquefasciatus</i>
	Япония						
39	Хиросима	лаб. линия	20	406,118,79	206,397	99 и 45	<i>pallens</i>

кладок (Виноградова, 1997). Эту особенность северной формы *molestus* связывают с ее происхождением от североафриканских и ближневосточных популяций *C. pipiens*, где количество автогенных самок варьирует очень широко: 10-90% в Египте (Gad et al., 1995) и 4-55% в Израиле (Nudelman et al., 1988).

Таким образом, на основе анализа полиморфизма ДНК гена *COI* у особей с известными физиологическими характеристиками, впервые разработан метод идентификации комаров двух биотипов или форм *C. p. pipiens: pipiens* и *molestus*, позволяющий выяснить роль каждой формы в передаче патогенов человека и животных.

5. Изменчивость ядерной ДНК комаров рода *Culex*. Уровень эволюционной дивергенции в ядерной ДНК между эволюционно далекими видами *Culex modestus* и *Culex pipiens* в ДНК области межгенного спейсера кластера генов рРНК (IGS) составляет 56,5 %, между *Culex modestus* и *C. torrentium* - 59,5 %.

Дифференциация близких видов, *C. pipiens* и *C. torrentium*, по нуклеотидному составу области второго внутреннего транскрибируемого спейсера (ITS2) кластера генов рРНК составляет 14,7 %. Большие различия обнаружены между видами *C. pipiens* и *C. torrentium*, 37 %, в ДНК области IGS (табл. 3). Внутри вида, между особями *C. torrentium* полиморфизм изученных участков ДНК, ITS2 и IGS, оказался одинаков (0,8 %).

Среди подвидов и экотипов *C. pipiens* не было выявлено значительных и характерных для какого-либо одного таксона особенностей структуры ITS2 и IGS. Различия в ДНК области ITS2 среди подвидов и форм *C. pipiens* составляют 0,1-0,6 %. Как ожидалось, изменчивость ДНК области IGS у изученных *C. pipiens* значительно выше, чем ITS2, уровень дивергенции между подвидами *C. p. quinquefasciatus* и *C. p. pipiens* и между формами *pipiens* и *molestus* составляет около 2 %. Различия между *C. p. quinquefasciatus* и *C. p. pipiens* формы *pipiens* (2,2 %) или формы *molestus* (2,4 %) оказались сравнимы с

Таблица 3. Уровень эволюционной дивергенции между последовательностями ITS и IGS кластера генов рРНК исследованных видов, подвидов и форм комаров.

виды и формы	1	2	3	5	1	2	3	4	5
	ITS2				IGS				
1 <i>C. p. pipiens f. pipiens</i>	0.001				0.038				
2 <i>C. p. pipiens f. molestus</i>	0.003	0.006			0.028	0.013			
3 <i>C. p. quinquefasciatus</i>	0.003*	0.003*	0.003*		0.022	0.024	0.027		
4 <i>C. p. pallens</i>	н/о	н/о	н/о	н/о	0.04	0.045	0.037	н/о	
5 <i>C. torrentium</i>	0.147	0.147	0.147	0.008	0.365	0.366	0.374	0.373	0.008
6 <i>C. modestus</i>	н/о	н/о	н/о	н/о	0.565	0.563	0.565	0.565	0.595

*по данным GenBank

различиями между комарами *C. p. quinquefasciatus* из двух популяций Индии (2,7 %) и с величинами дивергенции между формами *C. p. pipiens* (табл. 3). Наименьший полиморфизм IGS был обнаружен в ДНК комаров формы *molestus* (0,13 %), комары формы *molestus* из Москвы группируются вместе с *molestus* из Волгограда, демонстрируя большее сходство *molestus* из удаленных популяций друг с другом, чем с особями из соседней подмосковной популяции формы *pipiens* (Шайкевич и др., 2013).

6. Степень изменчивости ДНК у зараженных и незараженных видов комплекса *Culex pipiens*. У представителей комаров комплекса *Culex pipiens* мы определили всего 16 гаплотипов (А-О), из них 10 в популяциях незараженного симбионтами *C. torrentium*. Среди подвидов и форм *C. pipiens* обнаружено 6 мт-гаплотипов, различия между ними составили

от одного до трех нуклеотидных замен в последовательности гена *COI* размером 1542 п.н. (рис. 3) Все обнаруженные замены оказались транзициями А↔G, которые находятся в третьих положениях кодонов и не меняют аминокислотную последовательность. Для формы *pipiens* характерны три митохондриальных гаплотипа – А, В и С, нуклеотидное разнообразие (Pi) составило 0,00077, среднее количество различий (K) 0,889 и гаплотипическое разнообразие (Hd) 0,71 при сравнении 10 особей из шести популяций (табл. 4). Отсутствует изменчивость полных последовательностей гена *COI* типа D у особей формы *molestus* (табл. 4).

Напротив, для каждого из десяти изученных неинфицированных *Wolbachia* комаров *C. torrentium* из трех различных популяций обнаружены собственные гаплотипы (F-O) (рис. 5). При этом полиморфизм гена *COI* мтДНК *C. torrentium* выражается не только в нуклеотидных различиях, но и замене некоторых аминокислот. У особей этого вида обнаружены два случая гетероплазмии (Shaikovich, Zakharov, 2010). Уровень нуклеотидного разнообразия (Pi) полного гена *COI* у 10 изученных особей *C. torrentium* из трех удаленных популяций составил 0,00386 и среднее количество различий (K) 4,44, что в 5 раз больше, чем уровень разнообразия *C. p. pipiens* формы *pipiens*. Величина гаплотипического разнообразия (Hd) у *C. torrentium* составляет 1, у *C. p. pipiens* (формы *pipiens*) Hd=0,71, у формы *molestus* разнообразия ДНК нет, Pi=0 и Hd=0. При попарном сравнении нуклеотидных последовательностей гена *COI* методом Максимального правдоподобия, среднее значение нуклеотидных замен на сайт в выборке из 20 зараженных бактерией особей обеих форм *C. p. pipiens* составляет 0,001, в выборке из 10 незараженных *C. torrentium* – 0,004 (табл. 4).

Отсутствие уменьшения нуклеотидного разнообразия в ядерной ДНК у *C. pipiens*, по сравнению с *C. torrentium* (табл. 3) доказывает, что снижение гаплотипического разнообразия мтДНК в зараженных популяциях не произошло вследствие того, что популяция прошла через «бутылочное горлышко» до распространения на обширной территории: при попарном сравнении нуклеотидных последовательностей ITS2 методом Максимального правдоподобия, среднее значение нуклеотидных замен на сайт в выборке из 8 зараженных бактерией *C. p. pipiens* формы *molestus* составляет 0,006, в выборке из 13 незараженных *C. torrentium* – 0,008; показатель изменчивости последовательностей IGS в среднем у *C. p. pipiens* обеих форм 0,025, а у *C. torrentium* составляет 0,008 (табл. 3). Проведенное нами исследование ядерной ДНК переменных участков кластера генов рРНК доказывает, что уровень нуклеотидного разнообразия ядерной ДНК у инфицированных *Wolbachia C. p. pipiens* не меньше, чем у незараженного *C. torrentium*, а уменьшение гаплотипического разнообразия мтДНК у зараженных *Wolbachia* комаров связано с инфекцией симбиотической бактерией, которая способствовала экспансии связанных с ней митохондриальных гаплотипов.

Таблица 4. Генетические различия между членами комплекса *Culex pipiens*, данные получены по программе DnaSP (Rozas et al., 2009) на основе анализа ДНК гена *COI*. Оценка генетической дифференциации (Fst) рассчитана по Нею (Nei, 1973).

Таксоны комплекса	Значения генетических различий внутри таксона						Fst	
	h	S	Hd	Pi	K	d	<i>f.pipiens</i>	<i>f.molestus</i>
<i>C.p.p.f.pipiens</i> W+	3	3	0,71	0,0008	0,89	0,001		
<i>C.p.p.f.molestus</i> W+	1	0	0	0	0		0,78	
<i>C.torrentium</i> W-	10	21	1	0,00386	4,44	0,004	0,93	0,94

(W+)-зараженные и (W-)-незараженные *Wolbachia*;h–количество гаплотипов;S–число полиморфных сайтов;Hd–гаплотипическое и Pi – нуклеотидное разнообразие; K–среднее количество различий; d-среднее значение нуклеотидных замен в пересчете на сайт

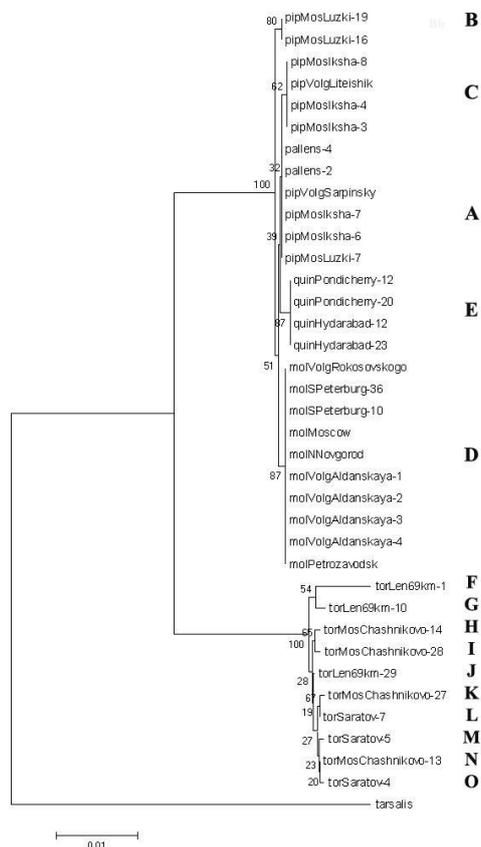


Рисунок 5. Дендрограмма сходства последовательностей нуклеотидов гена *COI* комаров комплекса *Culex pipiens*, построенная с использованием метода Neighbor-Joining (NJ). Цифрами указаны бутстреп-коэффициенты, рассчитанные для 1000 повторов. Гаплотипы обозначены латинскими буквами справа. Нуклеотидная последовательность аналогичного участка гена *COI C. tarsalis* (AF425847) использована в качестве внешней группы.

7. Корреляция мт-гаплотипов и типа бактерии *Wolbachia* у *Culex pipiens*.

Инфицированность разных популяций *C. pipiens* (30 популяций, 481 комар) варьировала, но всегда была высокой, 70-100%. Метод идентификации различных групп *W. pipientis*, основанный на полиморфизме ДНК генов *pk1* и *ank2* *W. pipientis* (Atyame et al., 2011) позволил нам обнаружить различия между штаммами бактерии в изученных популяциях и выявить связь между гаплотипом гена *COI* и зараженностью определенным вариантом этой бактерии. Митохондриальные гаплотипы А, В и С выявляются совместно с бактериями близких и совместимых групп *wPip-II* и *wPip-III*. Мт-гаплотип D связан с группой бактерии *wPip-IV*, а мт-гаплотипы Е и Е1 с группой *wPip-I*. Эта корреляция строгая и не было обнаружено других вариантов распределения цитоплазматических компонентов у 380 особей из 32 мест сбора от Португалии до Томска и от Санкт-Петербурга до Индии (табл 5, 7).

Впервые обнаруженная существующая связь мт-гаплотипов хозяина по гену *COI* и штаммов *Wolbachia* с подвидовой принадлежностью комаров среди зараженных популяций *C. pipiens* (табл. 5) может свидетельствовать о том, что первоначальное заражение *C. pipiens* эндосимбиотической бактерией произошло раньше дивергенции подвидов и что расхождение таксонов проходило одновременно с дивергенцией штаммов бактерии, и это не поддерживает предположение о случайном заражении комаров комплекса разными штаммами. Полиморфизм мт-гаплотипов А, В, С, связанных с *wPip-II* и *wPip-III*, и гаплотипов Е и Е1, связанных с *wPip-I*, свидетельствует о древности этих последовательностей, по сравнению с мт-гаплотипом D, идентичным у особей из

удаленных популяций и встречающимся совместно с wPip-IV (рис. 6).

Таблица 5. Типы штаммов *W. pipientis* и мт-гаплотип по гену *COI* среди таксонов *C. pipiens*.

Место сбора	Таксономич.	N	Аллель <i>pk1</i>	Аллель <i>ank2</i>	Тип wPip	Тип <i>COI</i>
Чашниково, Моск. обл.	<i>f. pipiens</i>	16	c	b	II	A (B,C)
Рассудово, Моск. обл.	<i>f. pipiens</i>	10	c	b	II	A (B,C)
Краснодар	<i>f. pipiens</i>	6	c	b	II	A (B,C)
Волгоград	<i>f. pipiens</i>	12	c	b	II	A (B,C)
	<i>f. pipiens</i>	7	b	d	III	A (B,C)
	<i>f. molestus</i>	8	d	c	IV	D
С.-Петербург1	<i>f. molestus</i>	8	d	c	IV	D
С.-Петербург2	<i>f. molestus</i>	7	d	c	IV	D
Москва	<i>f. molestus</i>	20	d	c	IV	D
лаб. культура МГУ	<i>f. molestus</i>	11	d	c	IV	D
Екатеринбург	<i>f. molestus</i>	6	d	c	IV	D
Томск	<i>f. molestus</i>	9	d	c	IV	D
Алма-Ата, Казахстан	<i>f. molestus</i>	21	d	c	IV	D
Берлин, Германия	<i>f. molestus</i>	2	d	c	IV	D
	<i>f. pipiens</i>	2	c	b	II	A (B,C)
Ганновер, Германия	<i>f. molestus</i>	1	d	c	IV	D
	<i>f. pipiens</i>	1	c	b	II	A (B,C)
Пондишерри, Индия	<i>quinquefasciatus</i>	23	a	a	I	E (E1)
Гидарабад, Индия	<i>quinquefasciatus</i>	20	a	a	I	E (E1)
Всего		220				

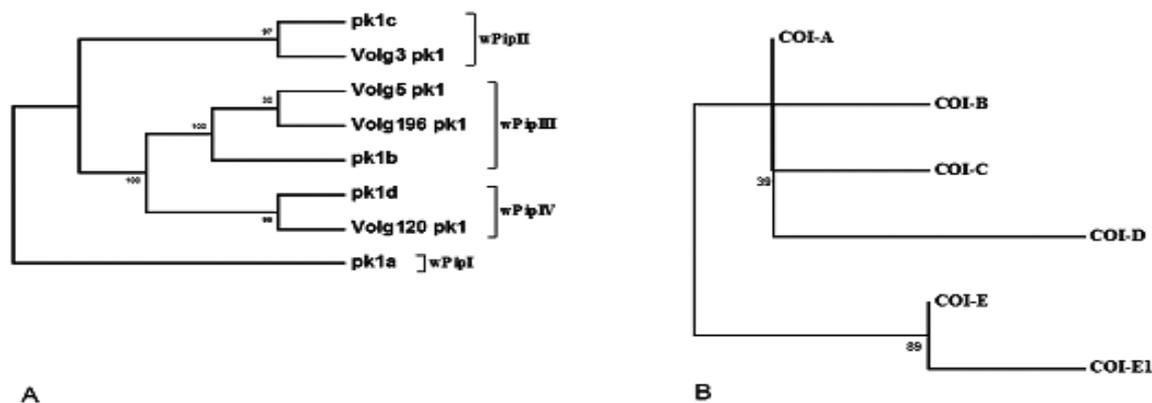


Рисунок 6. Дендрогаммы сходства нуклеотидных последовательностей А- гена *pk1* *W. pipientis*, В - гена *COI* комаров *Culex pipiens*, построенные методом Neighbor-Joining (NJ). Цифрами указаны бутстреп-коэффициенты, рассчитанные для 1000 повторов. На рисунке А, pk1a-d обозначают последовательности гена *pk1* wPip, зарегистрированные в GenBank под номерами AM397075-AM397078, Volg_ pk1 - wPip особей из Волгограда; группы *W. pipientis*, I-IV, обозначены справа. На рисунке В представлены мт-гаплотипы по гену *COI*-A-E, E1.

Зараженность *C. p. quinquefasciatus* бактериями группы wPip-I и *C. p. pipiens* (*f. pipiens*) бактериями групп wPip-II и wPip-III была обнаружена нами при исследовании 823 комаров со всего света с большой статистической достоверностью (Fisher exact test, $P < 10^{-4}$) (Dumas et al., 2013). Возможно, бактерия сыграла главную роль в дивергенции подвидов,

поскольку известно, что *Wolbachia* вызывает цитоплазматическую несовместимость у *C. pipiens*, которая могла привести к обособлению популяций. По литературным данным известно, что комары линии Is, инфицированные wPip-IV, проявляют двустороннюю несовместимость в скрещиваниях с комарами линий Ko и Tn, зараженными wPip-I, так же как и линии Lv, несущей wPip- II (Duron et al., 2012). Рекомбинации в бактериальной ДНК привели к дивергенции групп wPip и изоляции между популяциями за счет ЦН. Обнаруженные нами различия в ДНК гена *COI* у таксонов являются следствием экспансии в популяциях связанных с бактерией мт-гаплотипов.

8. Географические закономерности в распространении мт-гаплотипов *Culex*. Разработанные нами молекулярные методы диагностики (табл. 6), хорошо зарекомендовали себя при изучении географического распространения и структуры локальных популяций комаров комплекса *Culex pipiens* в России. Обнаруженные замены нуклеотидов специфичны для подвидов, корреляции между гаплотипом и географическими координатами местообитания нет, но есть корреляция гаплотипов и физиологических признаков комаров комплекса *Culex pipiens*.

Таблица 6. Молекулярные маркеры для изучения комаров комплекса *Culex pipiens* из России и ближнего зарубежья.

Зараженность <i>Wolbachia</i>	Размер ITS2 (п.н.)	ПЦР-ПДФФ 5' участка <i>COI</i> (размер фраг-ов рестрикции, п.н.)			Вид, подвид, форма	Количество проверенных особей
		/BclI	/HaeIII	/AluI		
70-100%	460	406,118,79	397,206	99, 45	<i>f.pipiens</i>	556
90-100%	460	406,118,79	603	99, 45	<i>f.molestus</i>	723
70-100%	460	406,118,79	397,206	144	<i>quinquefasciatus</i>	43
0%	410	524,79		99, 45	<i>C.torrentium</i>	442
Всего						1764

Всего, по результатам проведенного анализа полиморфизма гена *COI* у 1721 комаров в 65 природных популяциях комплекса *Culex pipiens* из России и ближнего зарубежья однородные популяции *C. torrentium* обнаружены в Ленинградской области (пос. 69 км) и окрестностях Петербурга (Скачки), в Подмосковье и Свердловской области. Впервые однородные популяции этого вида отмечены в Карелии, в окрестностях Ярославля, Ивановской (г. Кохма), Саратовской и Нижегородской (г. Выкса и пос. Дивеево) областях (рис. 7). Особый интерес представляет первое обнаружение на территории России смешанных популяций *C. torrentium* и неавтогенного *C. p. pipiens* (*f. pipiens*). Они найдены в Москве (Останкино) и Подмосковье (пос. Чашниково, дер. Стариково) и Свердловской обл. (дер. Талица). Южнее Саратова, в Волгоградской области и в окрестностях Краснодара мы не обнаружили *C. torrentium* (рис. 7).

Однородные популяции *C. p. pipiens* формы *molestus* с мт-гаплотипом D были обнаружены в 18 городских подвальных биотопах из Петрозаводска, Санкт-Петербурга, Москвы, Нижнего Новгорода, Екатеринбурга, Томска, Краснодара, Волгограда, Баку (Азербайджан) и в городском открытом водоеме в Алма-Аты (Казахстан). Мт-гаплотипы A (B и C) обнаружены в однородных популяциях формы *pipiens* в 17 наземных водоемах из окрестностей Москвы, Краснодара, Волгограда и Астрахани, 3 городов Сев. Кавказа: Нальчик, Кизляр и Георгиевск и в 5 населенных пунктах в Абхазии, в Тбилиси и Батуми (Грузия). Смешанные популяции особей с мт-гаплотипами A и D были найдены в южных

популяциях в окрестностях Краснодара, Волгограде и Владикавказе, в Батуми (Грузия) и в Евлахе (Азербайджан).



Рисунок 7. Карта распределения *COI* гаплотипов *C. pipiens*.

Мт-гаплотипы А, В, С обозначены кружками, D - треугольниками, E и E1 обозначены квадратами, *C. torrentium* – звездочками. Области средиземноморского климата выделены на карте белым цветом.

Наблюдаемые варианты гена *COI* у особей из географически-удаленных мест обитания свидетельствуют о том, что это не случайные мутации, а появившиеся однажды мт-гаплотипы распространились по ареалу вида. Распределение мт-гаплотипов *Culex pipiens* демонстрирует выраженную географическую ориентацию (рис. 7). Мт-гаплотипы E и E1, обнаруженные в популяциях Средиземноморья и в тропических странах, не встречаются в северных странах. Самая северная точка регистрации этого типа - г. Витербо, Италия. Мт-гаплотипы А, В, С и D встречаются в странах умеренного климата и на севере Африки, но не встречаются в зоне тропиков (по данным GenBank). На большей части ареала распространения мт-гаплотипы E и E1 не перекрываются с мт-гаплотипами А - С и D. Согласно нашим результатам и по литературным данным известно, что последовательности гена *COI* типа E отсутствуют в странах умеренного климата между 40-45° и 62-68° с. ш. Последовательности такого типа, зарегистрированные в GenBank, принадлежат как правило *C. p. quinquefasciatus* (Уганда GQ165791, GQ165796, GQ165798; Иран JQ958373, FJ210909; Таиланд HQ398883; Индия AY729977, DQ267689, EU259297; Бразилия GQ255650; США GU188856), но и *C. p. pipiens* (Иран JQ958371, Тунис HQ724614, Греция HQ724615) из субтропических и тропических стран. Не исключено, что последние могут быть результатом ошибочного определения таксономического статуса или гибридами с мтДНК *C. p. quinquefasciatus*.

9. Гибридизация и интрогрессия ДНК в зонах симпатрии комаров комплекса *Culex pipiens*. Для того, чтобы выяснить, является ли Средиземноморье зоной гибридизации *C. p. pipiens* и *C. p. quinquefasciatus* или зоной интрогрессии мт-гаплотипа E, мы проверили полиморфизм ядерной ДНК по таким маркерам, как второй интрон гена ACE2 (Bank, Fonseca, 2004) и микросателлитный маркер CQ11 (Smith, Fonseca, 2006). Маркер ACE2 предложен для дифференциации *C. p. pipiens* (без разделения на формы) и *C. p. quinquefasciatus*. По маркеру ACE2 характерным для *C. p. pipiens* ПЦР-продуктом, размером 610 п.н. обладали все исследованные нами комары, кроме особей, собранных на греческом острове Кос и в Танжере, Марокко (табл. 7). У половины образцов этих сборов мы обнаружили амплификаты, специфичные как для *C. p. pipiens*, 610 п.н. так и для *C. p. quinquefasciatus*, 274 п.н., т.е. эти образцы соответствовали гибридам между *C. p. pipiens* и *C. p. quinquefasciatus*.

Тест на основе полиморфизма фланкирующей области микросателлитного локуса CQ11 был разработан для идентификации обеих форм *C. p. pipiens* (*pipiens* и *molestus*) и их гибридов. Для формы *pipiens* характерен ПЦР-продукт размером около 200 п.н., для формы *molestus* и для *C. p. quinquefasciatus* - 250 п.н. Размеры амплификатов CQ11 для формы *molestus* и *C. p. quinquefasciatus* совпадают, поэтому авторы рекомендуют использовать комбинацию обоих тестов, ACE2 и CQ11, в зонах симпатрии двух видов (Smith, Fonseca, 2006). По результатам анализа 253 особей по локусу CQ11 в районе Средиземного моря 30,5% (49 из 160) особей соответствуют гибридам. В России и Германии только 6,5% (6 из 93), причем все шесть особей это комары формы *molestus* из подвальных популяций (табл. 7). Причина, по которой мы обнаружили гибриды в подвальных популяциях Москвы и Петербурга, где комары обеих форм разобщены биотопически, может заключаться в том, что маркер CQ11 является микросателлитным локусом и потому нельзя исключить возможность существования у особей f. *molestus* аллеля того же размера, который Bahnck и Fonseca (2006) приписывают форме *pipiens*, даже если этот аллель мономорфен в комарах *C. p. pipiens* формы *pipiens* и наоборот (Kothera et al., 2010). Поэтому, малая доля аллеля размером, характерным для альтернативной формы, может присутствовать в популяции и проявляться, в основном, в гетерозиготном состоянии.

Проведенный нами анализ ДНК *C. pipiens* подтвердил данные о снижении степени репродуктивной изоляции между членами комплекса в южных популяциях Средиземноморья, по сравнению с северными европейскими популяциями, полученные ранее на основе изучения белкового полиморфизма (Villani et al., 1986; Farid et al., 1991) и поведенческих признаков (Pasteur et al., 1977). По результатам анализа маркера ACE2 и микросателлитного маркера CQ11 в зоне Средиземноморья мы обнаружили чистые и смешанные популяции комаров форм *pipiens* и *molestus* подвида *C. p. pipiens* и гибриды между ними; гибриды между подвидами *C. p. pipiens* и *C. p. quinquefasciatus*; а также особей с ядерной ДНК *C. p. pipiens* и мтДНК *C. p. quinquefasciatus*, которую они, скорее всего, получили в результате межподвидовой гибридизации и представляют собой примеры цитоплазматической интрогрессии.

Таким образом, район Средиземноморья выступает как зона перекрытия ареалов этих мт-гаплотипов. Средиземноморский регион имеет специфический климат, теплый и влажный с относительно мягкой зимой и очень теплым летом. Такие условия позволяют предположить, что здесь находится центр происхождения таксонов комплекса и именно поэтому мы нашли здесь различные варианты мтДНК. Но наши данные анализа ядерной ДНК, в частности, результаты изучения ACE2 (табл. 7) показали отсутствие «чистых» популяций *C. p. quinquefasciatus* и редкость существования гибридов между *C. p. quinquefasciatus* и *C. p. pipiens* в этой области. Скорее можно предположить, что самки *C. p. quinquefasciatus* завозятся в данный регион транспортом, а подходящие климатические условия позволяют им существовать и оставлять потомство.

Другая ситуация наблюдается у комаров формы *molestus*. Такие автогенные особи из подвальных биотопов Европы могут иметь разное происхождение 1) быть потомками североафриканских *C. pipiens*, описанных когда-то Форскалем (Forsk., 1775) как вид *Culex molestus*, которые расселились по подвальным биотопам в северных странах умеренного климата и 2) быть потомками симпатрических *C. p. pipiens* (формы *pipiens*), автогенность которых возникла недавно как приспособление к условиям обитания в ограниченном пространстве, такие случаи описывались при изучении популяций Северной Америки (Kothera et al., 2010).

Результаты анализа ДНК позволили установить единообразие линии, объединяющей

Таблица 7. Результаты анализа *COI* и *wPip* гаплотипов и локусов *ACE2* и *CQ11* у *C. pipiens* из некоторых областей Средиземноморья и северной Европы.

Место сбора	N	тип <i>COI</i>	тип <i>wPip</i>	<i>ACE2</i> **			<i>CQ11</i> ***			
				<i>pip</i>	<i>quin</i>	hybrid	<i>Pip</i>	<i>mol/ quin</i>	hybrid	0
Подмосковье	7	A,B,C	II	7	-	-	7	-	-	-
Германия, Берлин	9	A,C	II	9	-	-	9	-	-	-
Германия, Ганновер	17	A(B,C)	II	17			17	-	-	-
Франция, Prades-le-Lez 1	16	A(B,C)	II	16	-	-	14	-	2	-
Франция, Prades-le-Lez 2	22	A(B,C)	II	22	-	-	16	3	3	-
Франция, StNazaire de Pezan	12	A(B,C)	II	12	-	-	9	-	2	1
Т7линия, Франция	11	A(B,C)	II	11	-	-	-	8	1	2
Марокко, Касабланка	2	A(B,C)	II	2	-	-	-	-	2	-
Волгоград	12	A(B,C)	II	12	-	-	12	-	-	-
	8	D	IV	8	-	-	-	8	-	-
Санкт-Петербург 1*	8	D	IV	8	-	-	-	6	1	1
Санкт-Петербург 2*	7	D	IV	7	-	-	-	3	2	2
Томск*	9	D	IV	9	-	-	н/о	н/о	н/о	н/о
Екатеринбург*	6	D	IV	6	-	-	н/о	н/о	н/о	н/о
Москва*	20	D	IV	20	-	-	-	18	2	-
Германия, Берлин*	4	D	IV	4	-	-	-	3	1	-
Германия, Ганновер*	1	D	IV	1			-	1	-	-
Италия, Пьемонт	18	D	IV	18	-	-	9	-	5	4
Тунис, Нефза	16	D	IV	16	-	-	7	4	2	3
Тунис, Табарка	12	D	IV	12	-	-	4	2	4	2
Марокко, Касабланка	1	D	IV	1	-	-	-	-	1	-
Португалия	4	E	I	4	-	-	3	1	-	-
Португалия	6	E1	I	6	-	-	1	4	1	-
Греция, о. Кос	24	E	I	11	-	13	3	7	14	-
Греция, о. Кипр	3	E	н/о	3					2	1
Марокко, Танжер	13	E	I	6	-	7	3	-	10	-
Индия, Пондишерри	6	E	I	-	6	-	н/о	н/о	н/о	н/о
Total	274									

pip – *pipiens*; *mol* – *molestus*; *quin* – *quinquefasciatus*. * место сбора в подвале или в помещении, ** *ACE* маркер: *C. p. pipiens* (обе формы) - 610 п.н., *C. p. quinquefasciatus* - 274 п.н., *hybrid* - 610 п.н. и 274 п.н.; ****CQ11* маркер: *C. p. pipiens f. pipiens* - 200 п.н., *C. p. pipiens f. molestus/ C. p. quinquefasciatus* - 250 п.н., *hybrid* - 250 п.н. и 200 п.н., 0 - отсутствие ПЦР-продукта, н/о - не определяли из-за недостатка ДНК.

географически удаленные популяции подвальных комаров *C. p. pipiens* формы *molestus* на территории Европейской части России (рис. 5, табл. 5). Идентичность цитоплазматических компонентов, гаплотипа *COI* и группы *wPip*, у особей формы *molestus* в России и комаров из Туниса и Марокко свидетельствует о том, что исследованные комары формы *molestus* из удаленных мест обитания имеют общее происхождение, предположительно на севере Африки, а не происходят от симпатрических наземных популяций формы *pipiens* в результате адаптации к обитанию в подвалах. Отсутствие способности к формированию диапаузы у комаров формы *molestus* с мт-гаплотипом D в России и в сходных климатических зонах заставляет этих комаров заселять подземные биотопы и только в

летнее время личинки комаров формы *molestus* могут встречаться в открытых наземных, как правило, городских водоемах. Отсутствие изменчивости ДНК гена *COI* у особей из разных популяций свидетельствует о том, что комары *C. p. pipiens* f. *molestus* заселили эти территории относительно недавно. Подразделенность популяций *pipiens* и *molestus* в природе ($F_{st}=0,78$ табл. 4) поддерживается такими факторами как неспособность гибридов к диапаузированию, стено- и эвригамность и биотопическая изоляция. Однако, и при симпатрическом существовании особей обеих форм *C. p. pipiens* в южных регионах России, среди 20 особей, отловленных в открытых биотопах Волгограда и окрестностей, микросателлитный анализ не выявил ни одного гибрида (табл. 7). Эти данные позволяют предположить наличие по крайней мере частичной репродуктивной изоляции между *molestus* и *pipiens*, которая может быть связана с цитоплазматической несовместимостью, вызванной генетически различными штаммами *W. pipientis* в отсутствие географической и биотопической изоляции популяций.

Возможно, мы обнаружили не только цитоплазматическую интрогрессию мт-гаплотипа E и последующее распространение на север гибридных особей, но и сдвиг на север зоны гибридизации между *C. p. pipiens* и *C. p. quinquefasciatus* в Палеарктике. Комары-переносчики постоянно распространяются с помощью человека на новые территории. Это способствует интрогрессии и перемешиванию генетических и физиологических характеристик. Вместе с вариантом цитоплазмы комары *C. p. pipiens* могут приобретать и физиологические особенности, свойственные *C. p. quinquefasciatus*, более опасному для человека. Косвенным свидетельством того, что комары *C. p. pipiens* с мт-гаплотипами E и E1 отличаются по физиологии, может служить их отсутствие в умеренном климате. Возникает вопрос о существовании других экотипов *C. p. pipiens*, помимо известных *pipiens* и *molestus*, которые могут представлять разную эпидемиологическую опасность.

Божьи коровки рода *Adalia*.

Двухточечная божья коровка *Adalia bipunctata* распространена в палеоарктической области Старого и Нового света, где нередко достигает наибольшей численности в городах и поселениях. В Старом свете ареал распространения охватывает всю Европу, Сибирь и Среднюю Азию. В краевых областях ареала, особенно на юге и юго-востоке, типичная форма замещается формами, отличающимися от типичной по окраске. Для типичной *A. bipunctata* характерны две черные точки, по одной на каждом надкрылье красного цвета. Существуют черные формы *A. bipunctata*, так называемые меланисты, которые имеют по 2-4-6 красных пятен на черном фоне. Другие формы *A. bipunctata* характеризуются наличием многих пятен на надкрыльях, образующих своеобразные узоры. На основании морфологических признаков и того, что каждая специфическая популяция занимает определенный характерный эколого-географический ареал и имеет, очевидно, свою историю развития, многие исследователи относили формы с различной морфологией к самостоятельным систематическим единицам - видам или подвидам: *A. bipunctata* Linneaus, 1758 (Евразия), *A. revelierei* Mulsant, 1866 (Малая и Передняя Азия, Закавказье), *A. turanica* Lusus, 1947 (Средняя Азия), *A. fasciatopunctata* Mader, 1931 (Монголия, Тува, Забайкалье и прилегающая часть Сибири).

Наиболее близки к *A. bipunctata* три вида рода *Adalia*: *A. decempunctata* Linneaus, 1758, *A. tetraspilota* Hope и *A. frigida* Schneider, 1792. Виды *A. decempunctata* и *A. tetraspilota* не

дают гибридов с *A. bipunctata* и между собой, чем подтверждается их видовая самостоятельность (Лусис, 1973). Ареал *A. decempunctata* охватывает области умеренного климата Европы, где *A. decempunctata* и *A. bipunctata* сосуществуют. Спаривание между ними возможно, но развитие яиц не происходит. *A. tetraspilota* – индийский вид, встречающийся и в южной части территории государств – бывших республик советской Средней Азии. Циркумполярный вид *A. frigida* обитает в приполярных районах на севере Евразии, от Скандинавии до Якутии, и по морфологии очень близок к формам комплекса *A. bipunctata* (Лусис, 1976). Таксономическое положение *A. frigida* до сих пор не ясно. Разные авторы рассматривают *A. frigida* как подвид или форму *A. bipunctata* (Захаров, 1990; Кузнецов, 2006, Корсун, 1997) или как отдельный вид *A. frigida* (Лусис, 1976; Томилова, Плешанов, 1977; Bielawski, 1984).

В проведенных на этом объекте исследованиях обычно учитывается изменчивость по одному гену *S*, определяющему окраску и характер рисунка на надкрыльях. Разнообразие ДНК у жуков рода *Adalia* и в комплексе *A. bipunctata* почти не изучалось, известны только несколько исследований (Schulenburg et al., 2001, 2002; Паленко и др., 2004; Jiggins, Tinsley, 2005). Ранее, до начала наших исследований, было обнаружено заражение божьих коровок рода *Adalia* симбиотической бактерией *Rickettsia*. Нами была обнаружена зараженность адалий симбиотическими бактериями еще 2 видов *Spiroplasma* и *Wolbachia* (Захаров и др., 1998; Захаров и др., 2000; Zakharov, Shaikevich, 2001). Мы предприняли масштабное исследование популяций комплекса *Adalia bipunctata* на территории России и других видов р. *Adalia* с учетом как зараженности жуков симбиотическими бактериями, так и разнообразия митохондриальной и ядерной ДНК. Мы исследовали один из наиболее изменчивых районов митохондриального генома адалий – ген *COI*; последовательности ITS2 изучали при определении изменчивости ядерной ДНК. Для видов *A. tetraspilota* и *A. frigida* и подвидов *A. b. revelierei* и *A. b. turanica* последовательности ДНК были определены впервые.

Коровки *A. bipunctata* (Coleoptera: Coccinellidae) для настоящей работы были собраны на стадиях имаго и куколок в следующих популяциях: район озера Иссык-Куль, Киргизия (1997г.), Стокгольм (2001г.), Кемь (2010г.), Архангельск (2010г.), Санкт-Петербург (2009г.), Бурятия (2010 г), Ташкент (2011 г.), Чита (2012 г.), Хангалас, республика Саха Якутия (2011 г.), Ереван, Армения (2013 г.). *Adalia decempunctata* были собраны в Стокгольме (2001 г.), *A. frigida* в Архангельске (2005 г.), в Якутске (2009 г.), *A. tetraspilota* в Ташкенте (2011 г.).

1. Изменчивость мтДНК и зараженность симбиотическими бактериями *A. bipunctata* из Петербурга. Среди популяций *A. bipunctata* петербургская выделяется очень высоким содержанием форм-меланистов (Лусис, 1961; Сергиевский, Захаров, 1983; Захаров, 2009). Выборка была представлена перезимовавшими жуками, т.е. собравшимися в место сбора из разных колоний, где происходило их размножение. Среди изученных 84 жуков 21 оказался зараженным *Spiroplasma* (частота инфекции соответствует данным, полученным нами в 1998 - 2000 годах (Захаров и др., 1998, 2000). При анализе жуки не были разделены по полу; если самки составляют около 50% выборки, то среди них доля зараженных оказывается равной около 50% (самцы зараженными быть не могут, *Spiroplasma* является андроцидным агентом).

По составу мт-гаплотипов петербургская популяция *A. bipunctata* оказалась высоко полиморфной (рис. 8), в ней обнаружено 7 из 10 ранее описанных мт-гаплотипов (отсутствуют № 5, 7, 8). Номера мт-гаплотипов обозначены в соответствии с предложенными Шуленбургом и др. (Schulenburg et al., 2002). Кроме того, нами найдены новые, которые были обозначены 11-17 (рис. 8). Хотя петербургская популяция

располагается близко к северной границе ареала вида *A. bipunctata*, и можно было бы ожидать в ней низкий уровень полиморфизма как эффект бутылочного горлышка при основании этой антропогенной популяции (жуки размножаются в основном на растениях интродуцентах), она оказалась по мтДНК высоко полиморфной: в выборке из 34 особей было обнаружено 14 мт-гаплотипов, из которых численно преобладает тип 1 (18 особей). Два мт-гаплотипа, Н9 и Н10, значительно отличаются от остальных, соответственно названы древними (Schulenburg et al., 2002).

	11111111 1112223333 3333333333 4444444455 55555	Мт-гаплотип
[1122367788 9912455666 7791890012 3346677889 1233389901 23444	
[3623340358 1467547069 2504081468 4891769587 2403616984 02147	
#SP8	TGTCATATAA ATTTACTTAG TACAGACATT TCTTATACCA GTAAATTTAC GATGG	1
#SP9+C.....	3
#SP10+G.....	2
#SP11G.....	4
#SP12	.ACT...TG G.C...GA .T.AG.G.. CT.....G AC.TTC....CAA	9
#SP13+	1
#SP14	AT.T...T.. GCCCGTC... C..GA.T..C .TCCGCGTT. A.GGTCCCGT ...T	10
#SP15	1
#SP16	1
#SP17	AT.T...T.. GCCCGTC... C..GA.T..C .TCCGCGTT. A.GGTCCCGT ...T	10
#SP18	1
#SP19G.....C.....	12
#SP20	1
#SP21+	1
#SP22+G.....	11
#SP23G.....	11
#SP25	1
#SP26	...T....G...A...C.....	13
#SP27	...A....G...A...C.....	14
#SP28	...G....G...A...C.....	15
#SP29C.....	3
#SP30C.....	3
#SP32C.....T	16
#SP33	1
#SP35+	1
#SP37+	1
#SP40+	1
#SP43+	1
#SP44+G...	17
#SP49+	1
#SP62+	1
#SP65+	1
#SP68+	1
#SP79+	1
#AJ313070type1	1
#AJ313061type2G.....	2
#AJ313062type3C.....	3
#AJ313063type4G.....	4
#AJ313064type5G.....	5
#AJ313065type6C.....A...T	6
#AJ313066type7A.....	7
#AJ313060type8T.....C.....G.....	8
#AJ313067type9	.ACT...TG G.C...GA .T.AG.G.. CT.....G AC.TTC....CAA	9
#AJ313068type10	AT.T...T.. GCCCGTC... C..GA.T..C .TCCGCGTT. A.GGTCCCGT ...T	10

Рисунок 8. Сравнение переменных нуклеотидных сайтов средней области гена *COI Adalia bipunctata* из Санкт-Петербурга (SP) и ранее обнаруженных мт-гаплотипов (GenBank: AJ313060-AJ313070). Плюс обозначены особи, зараженные *Spiroplasma*.

2. Географические закономерности в распространении мт-гаплотипов и симбиотических бактерий у *A. bipunctata*. В географически удаленных популяциях комплекса *A. bipunctata* Евразии мы исследовали мт-гаплотипы по гену *COI* и зараженность симбиотическими бактериями *Spiroplasma*, *Rickettsia*, *Wolbachia*. Последние в изученном материале не были обнаружены. Полученные результаты сведены в таблицу 9, где также для сравнения приведены данные по ранее изученным популяциям Москвы и Германии (Schulenburg et al., 2002). В результате проведенного исследования показано, что все изученные популяции различаются по разнообразию мтДНК и зараженности симбиотическими бактериями. В Российских популяциях нами обнаружено 14 мт-гаплотипов. Во всех популяциях, кроме популяции Кемь, преобладающим является мт-гаплотип Н1 (табл. 8). В популяции Ташкента были обнаружены мт-гаплотип Н1 и ранее не встречавшийся Н18, близкий к мт-гаплотипу Н1 (рис. 9). В популяции Еревана были

Таблица 8. Тип *COI* и зараженность жуков *Adalia bipunctata* симбиотическими бактериями в географически удаленных популяциях.

популяция	тип <i>COI</i>	кол-во	из них заражено		
			<i>Spiroplasma</i>	<i>Rickettsia</i>	
С.-Петербург	1	18	11		
	2	1	1		
	3	3	1		
	4	1			
	9	1			
	10	2			
	11	2	1		
	12	1			
	13	1			
	14	1			
	15	1			
	16	1			
	17	1	1		
	всего		34	15	
	Архангельск	1	8		
		7	5		
		9	4		
10		3			
всего		20			
Кемь	2	1			
	7	15			
	10	16		16	
всего		32		16	
Москва*	1	11	4		
	2	1			
	3	4			
	5	1			
	6	1			
	8	1			
	9	1			
	10	2		2	
	всего		22	4	2
	Бурятия <i>A. bipunctata</i>	1	8		
10		2			
<i>A.b. fasciatopunctata</i>		1	8		
10		2		1	
всего		20		1	
Ташкент	1	14			
	18	1			
всего		15			
Ереван <i>A. bipunctata</i>	1	8			
	4	1			
	9	2			
	19	1			
	<i>A.b. revelierei</i>	1	6		
	3	1			
20	1				
всего		20			
Киргизия <i>A.b. turanica</i>	1	1			
Германия*	1	7	3		
	2	4	1		
	3	1			
	4	1			
	7	1			
	9	3		2	
	10	2		2	
всего		19	4	4	
во всех популяциях		167	24	23	

* данные из Schulenburg et al., 2002

обнаружены еще два мт-гаплотипа Н19 и Н20. Всего нами у 132 особей вида *A. bipunctata* были обнаружены 17 различающихся гаплотипов. Большая часть, 52 особи *A. bipunctata*, обладали гаплотипом Н1, 35 особей обладали гаплотипом Н10, 19 особей – гаплотипом Н7, 7 особей – гаплотипом Н9, 4 особи – гаплотипом Н3, по 2 особи - Н2, Н4 и Н11, также были обнаружены по одной особи с гаплотипами Н12-Н20. В Архангельске у 20 особей зараженность симбионтами не выявлена. В Кеми все 16 особей с мт-гаплотипом Н10 оказались заражены *Rickettsia*. В Бурятии у 20 особей были обнаружены мт-гаплотипы Н1 и Н10, единственная зараженная *Rickettsia* особь имела мт-гаплотип Н10. В Ташкенте и Ереване симбионты не обнаружены (табл. 8).

Гаплотип Н9, который встречается в популяциях *A. bipunctata* северных районов Европы (Schulenburg et al., 2002; Jiggins, Tinsley, 2005), обнаружен нами у *A. b. bipunctata* в северных популяциях в Санкт-Петербурге и Архангельске, но также и в Ереване. Мт-гаплотип Н10 был обнаружен нами в популяциях *A. b. bipunctata* на севере Европейской части России в Санкт-Петербурге, Архангельске и Кеми, а также и у особей *A. b. fasciatopunctata* на востоке страны в Забайкалье, в Улан-Уде: дифференциация на две группы мт-гаплотипов – Н10 и остальные, произошла до разделения евразийских популяций на географические подвиды *Adalia b. bipunctata* и *Adalia b. fasciatopunctata*. Обнаружение сцепленных с инфекцией симбиотическими бактериями *Spiroplasma* и *Rickettsia* митохондриальных гаплотипов в популяциях, географически далеко удаленных друг от друга, свидетельствует о древности первого контакта бактерий с коровками вида *A. bipunctata*. Нам не удалось выявить каких-либо четких закономерностей в географическом распространении как мт-гаплотипов, так и симбиотических бактерий у *Adalia* (табл. 8). По-видимому, важнейшим фактором, определяющим распространение бактерий и связанных с ними мт-гаплотипов, является «эффект основателя». Этот эффект особенно заметно проявляется в северных, краевых популяциях адалии. Наиболее ярким примером является популяция Кемь, где с высокой частотой встречается *Rickettsia*, которая редко выявляется в других популяциях России.

3. Разнообразие мтДНК у божьих коровок рода *Adalia*. Среди исследованных видов рода *Adalia* по мтДНК наибольшая степень дивергенции наблюдается между *A. decempunctata* и остальными видами и составляет в среднем 12,5 % (табл. 9). Различия между далекими в эволюционном отношении и генетически изолированными видами *A. tetraspilota* и *A. bipunctata* составляют 6,2 %, *A. tetraspilota* и *A. frigida* – 6,6 %. Минимальная величина эволюционной дивергенции - 4,3 %, обнаружена между близкими видами *A. bipunctata* и

Таблица 9. Уровень эволюционной дивергенции между последовательностями *COI* гена исследованных видов р. *Adalia*.

	Вид, подвид	1	2	3	4	5	6	7
1	<i>A. bipunctata</i> *							
2	<i>A. b. fasciatopunctata</i>	0.001						
3	<i>A. b. turanica</i>	0.001	0.001					
4	<i>A. frigida</i>	0.043	0.043	0.043				
5	<i>A. tetraspilota</i>	0.062	0.062	0.062	0.066			
6	<i>A. decempunctata</i>	0.120	0.120	0.120	0.138	0.129		
7	<i>A. bipunctata</i> Н9	0.043	0.043	0.043	0.023	0.067	0.136	
8	<i>A. bipunctata</i> Н10	0.067	0.067	0.067	0.070	0.069	0.135	0.067

Уровни дивергенции выражены в величинах, обозначающих среднее число нуклеотидных замен между двумя сравниваемыми последовательностями в пересчете на один сайт. * *A. bipunctata* (все мт-гаплотипы *A. bipunctata*, за исключением Н9 и Н10)

A. frigida (табл. 9). В то же время внутри вида *A. bipunctata* (за исключением гаплотипов Н9 и Н10) изменчивость ДНК гена *COI* не превышала 0,4 %.

Среди популяций четырех подвидов *A. b. bipunctata*, *A. b. fasciatopunctata*, *A. b. revelierei* и *A. b. turanica* обнаружены 20 вариабельных мт-гаплотипов по гену *COI*, но ни один из них не был уникальным для какой-либо из форм (табл. 8). Различия 18 из обнаруженных 20 мт-гаплотипов между собой составляют от 1 до 4 нуклеотидов. Мт-гаплотип Н1 является самым распространенным гаплотипом во всех выборках и на медианной сети (рис. 9) видно, что он является корневым, предковым гаплотипом по отношению к остальным семнадцати.

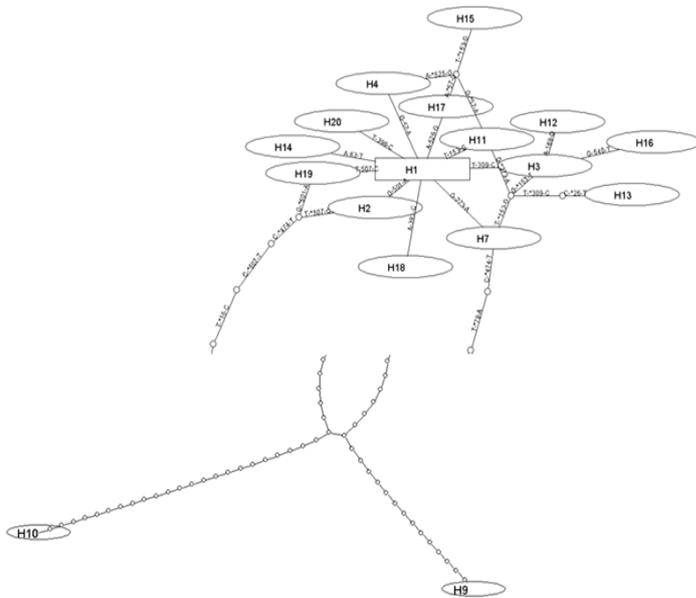


Рисунок 9. Медианная сеть митохондриальных гаплотипов двуточечной божьей коровки *Adalia bipunctata* L. (Coleoptera, Coccinellidae). Длина ветвей, соединяющих гаплотипы Н9 и Н10 с гаплотипами Н19, Н2 и Н7, пропорциональна количеству мутационных шагов и представлена внизу в меньшем масштабе. На линиях, соединяющих гаплотипы, указаны различающие их мутации.

4. Изменчивость ядерной ДНК божьих коровок рода *Adalia*. Важно было показать, что особи с мт-гаплотипами Н9, Н10 и с другими мт-гаплотипами составляют единую популяцию. Для этого мы сопоставили последовательности ядерной ДНК, области ITS2, в выборках особей мт-гаплотипов Н9, Н10 и других мт-гаплотипов. Размер амплифицированного фрагмента области ITS2 составил 900 п.н. Были изучены 8 особей *A. b. bipunctata*, 1 особь *A. b. turanica* и 2 особи *A. b. fasciatopunctata* с типичным гаплотипом Н1, 5 особей *A. b. bipunctata* с гаплотипом Н9, 7 особей *A. b. bipunctata* и 2 особи *A. b. fasciatopunctata* с гаплотипом Н10, а также 3 *A. frigida*, 8 *A. tetraspilota* и 1 *A. decempunctata*. В отличие от мтДНК область ITS2 оказалась абсолютно консервативной внутри видов. Все изученные *A. bipunctata*, вне зависимости от мт-гаплотипа, обладали практически идентичными последовательностями ITS2 (рис. 10). Средне число нуклеотидных замен на сайт у 25 особей *A. bipunctata* составляет 0,001.

Отсутствует, или является крайне низкой, внутривидовая изменчивость данного участка и у других изученных видов рода *Adalia*. Как и по результатам сравнения мтДНК, минимальные различия в области ITS2 обнаружены между *A. bipunctata* и *A. frigida*, 1,8 %. Коровки вида *A. decempunctata* отличаются от коровок видов *A. bipunctata* и *A. frigida* на 41,5 %. Наиболее эволюционно далеким по составу нуклеотидов области ITS2 оказался вид *A. tetraspilota*, различия с другими видами составляют 57-58 %.

Относительная степень межгрупповой генетической дифференциации, G_{st} , (Nei 1973) между четырьмя изученными видами *Adalia* по мтДНК (G_{st} : 0,25945) почти в 4 раза меньше, чем по ITS2 rRNA (G_{st} : 0,82393), хотя гаплотипическое разнообразие, H_d по мтДНК (H_d 0,98814) выше, чем по ITS2 (H_d 0,59459). Скорость мутаций в межгенном

спейсере выше, но отсутствие рекомбинации позволяет сохранять редкие мутационные события в митохондриальном геноме и как следствие, гаплотипическое разнообразие у разных видов рода *Adalia* больше в мтДНК, а степень различий больше по рРНК.

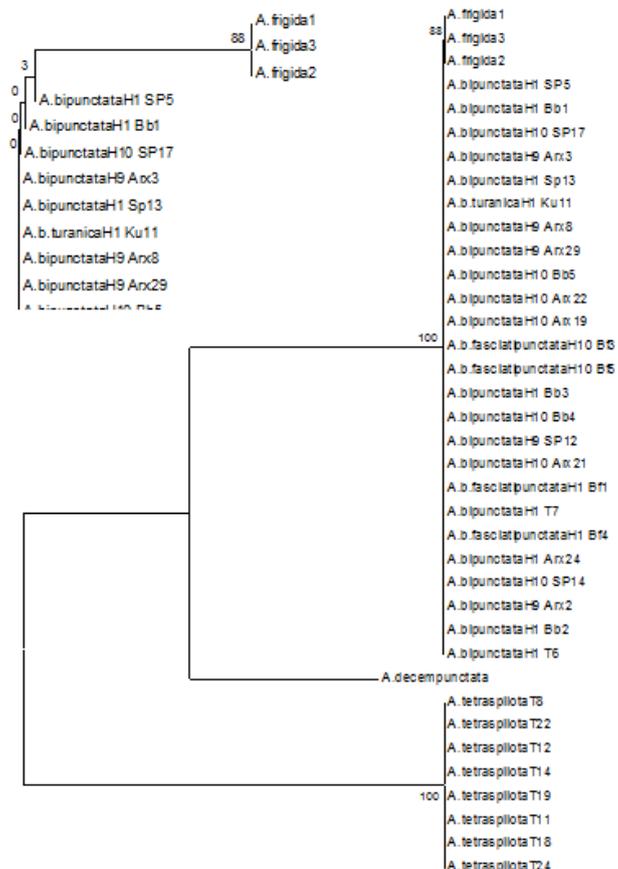


Рисунок 10. Филогенетическая дендрограмма, построенная на основе сравнения ITS2 *Adalia* методом Neighbor-Joining. Цифрами указаны бутстреп-коэффициенты, рассчитанные для 1000 повторов. На дополнительной дендрограмме показана субклада *A. bipunctata* и *A. frigida* в большем масштабе. SP – Санкт Петербург, Arx – Архангельск, Bb – Бурятия f. *bipunctata* Bf – Бурятия f. *fasciataopunctata*, Ku – Киргизия, T – Ташкент.

Среди четырех изученных видов жуков рода *Adalia* наиболее эволюционно близкими оказались *A. bipunctata* и *A. frigida*. *A. frigida* обитает на севере Евразии, от Скандинавии до Якутии. По нашим наблюдениям в Архангельске *A. bipunctata* и *A. frigida* обитают совместно. Степень их репродуктивной изоляции до конца не известна. Как показали результаты наших исследований близкие виды *A. bipunctata* и *A. frigida* различаются по нуклеотидному составу области ITS2 на 1,8 %, гена *COI* на 4,3 %, при этом степень дивергенции по двум исследованным нами участкам генома между особями двух видов сохраняется в удаленных друг от друга популяциях Архангельска и Якутска.

Проведенный анализ ДНК *A. b. turanica*, *A. b. revelierei* и *A. b. fasciataopunctata*, отличающихся от европейской формы *A. b. bipunctata* узором на надкрыльях и распространенных в краевых областях ареала, не обнаружил отличий последовательности ITS2 от номинальной формы *A. bipunctata* и разницы в гаплотипическом разнообразии по гену *COI* митохондриальной ДНК. Следовательно, на основании анализа ДНК нельзя считать морфологически различающиеся формы *A. b. bipunctata*, *A. b. fasciataopunctata*, *A. b. revelierei* и *A. b. turanica* отдельными самостоятельными видами. Можно утверждать, что *A. b. fasciataopunctata*, *A. b. revelierei* и *A. b. turanica*, иногда описываемые как отдельные виды, являются лишь географическими формами политипического вида *Adalia bipunctata*.

5. Корреляция мт-гаплотипов и типа бактерии у *A. bipunctata*. У *A. bipunctata* наблюдается корреляция мт-гаплотипа H10 с зараженностью бактерией *Rickettsia*, в Кеми все 16 особей с мт-гаплотипом H10 оказались заражены *Rickettsia*. По литературным

данным известно заражение риккетсией божьих коровок с гаплотипом H9 (Schulenburg et al., 2002; Jiggins and Tinsley, 2005). Бактерии рода *Spiroplasma* инфицируют жуков с мт-гаплотипом H1 и с гаплотипами H2, H3, H11 и H17 (табл. 8), отличающимися от H1 одной нуклеотидной заменой (рис. 8). Скорее всего, наиболее распространенный мт-гаплотип H1 по отношению к ним является предковым. Определить изменчивость ДНК бактерий *Spiroplasma* и оценить связь полиморфизма цитоплазматических компонентов в системе *Adalia* - *Spiroplasma* пока не представляется возможным из-за малой изученности бактерии. Впервые обнаружено, что эффект - «неравновесия по сцеплению» с мтДНК, неоднократно описанный у насекомых для *Wolbachia*, точно также имеет место и при распространении *Spiroplasma* в популяциях *A. bipunctata*.

6. Степень изменчивости ДНК *A. bipunctata* в связи с зараженностью симбиотическими бактериями. Влияние зараженности симбиотической бактерией на разнообразие мтДНК впервые показано и для жуков *A. bipunctata*. У зараженных *Spiroplasma* особей Санкт-Петербурга обнаружены 5 мт-гаплотипов, преобладает мт-гаплотип H1. В то же время, среди жуков, для которых зараженность *Spiroplasma* не выявлена, определены 10 мт-гаплотипов (табл. 10). Среди зараженных *Spiroplasma* жуков в Санкт-Петербургской популяции уровень полиморфизма мтДНК снижен на порядок – средние нуклеотидные различия между зараженными *Spiroplasma* жуками равны 0,002, в выборке незараженных *Spiroplasma* - 0,021. Такой высокий уровень разнообразия в незараженных *Spiroplasma* популяциях достигается главным образом за счет значительно отличающихся по составу ДНК мт-гаплотипов H9 и H10. Но и без учета гаплотипов H9 и H10 в выборке незараженных, изменчивость в группе зараженных *Spiroplasma* особей *A. bipunctata* ($S+ = 0,002$) в 2 раза меньше, чем в группе незараженных ($S- = 0,004$). Выборки зараженных и незараженных особей не различались в изменчивости области ITS2.

Таблица 10. Генетическая дифференциация между зараженной и незараженной *Spiroplasma* выборками популяции *A. bipunctata*, данные получены по программе DNA Sequence Polymorphisms (Dna SP, Rozas et al., 2009) на основе анализа ДНК гена *COI*.

Выборки	N	h	S	Hd	Pi	K	d
<i>A. bipunctata</i> S+	15	5	4	0,48	0,001	0,53	0,002
<i>A. bipunctata</i> S-	19	10	52	0,85	0,019	9,95	0,021

S+ - зараженные *Spiroplasma*; h – количество гаплотипов; S – число сайтов сегрегации; Hd – гаплотипическое разнообразие; Pi – нуклеотидное разнообразие; K – среднее количество различий; d - среднее значение нуклеотидных замен в пересчете на сайт

7. Митохондриальная интрогрессия в популяциях *Adalia*. У божьих коровок *A. bipunctata* можно предполагать интрогрессию мт-гаплотипов H9 и H10 и мы показали, что виды, от которых были заимствованы гаплотипы H9 и H10 в природе не сохранились: последовательности митохондриальной и ядерной ДНК, характерные для мт-гаплотипов H9 и H10, сравнивали с гомологичными последовательностями ДНК подвидов *A. bipunctata* и видов рода *Adalia*: *A. decempunctata*, *A. frigida* и *A. tetraspilota* с целью установить возможное происхождение «древних» мт-гаплотипов в генофонде *A. bipunctata*. Мт-гаплотип H10 генетически одинаково далек от *A. bipunctata*, *A. frigida* и *A. tetraspilota*, большая генетическая дистанция отделяет его и от *A. decempunctata* (рис 11). Последовательности типа H10 отличаются от группы типичных для *A. bipunctata* гаплотипов почти на 7 %, так же, как от *A. frigida* и *A. tetraspilota*, а от *A. decempunctata* на 13,5%. Мт-гаплотип H9 в два раза ближе к *A. frigida* (2,3%), чем к *A. bipunctata* (4,3 %). Генетические дистанции H9 с *A. tetraspilota* (7 %) и *A. decempunctata* (13,5 %) идентичны

таковым для Н10 (табл. 9). Сравнение ядерных последовательностей ITS2 в выборках особей мт-гаплотипов Н9, Н10 и других мт-гаплотипов не выявило различий между особями с Н9 и Н10 и *A. bipunctata* с другими мт-гаплотипами, все они составляют единую популяцию (рис. 10).

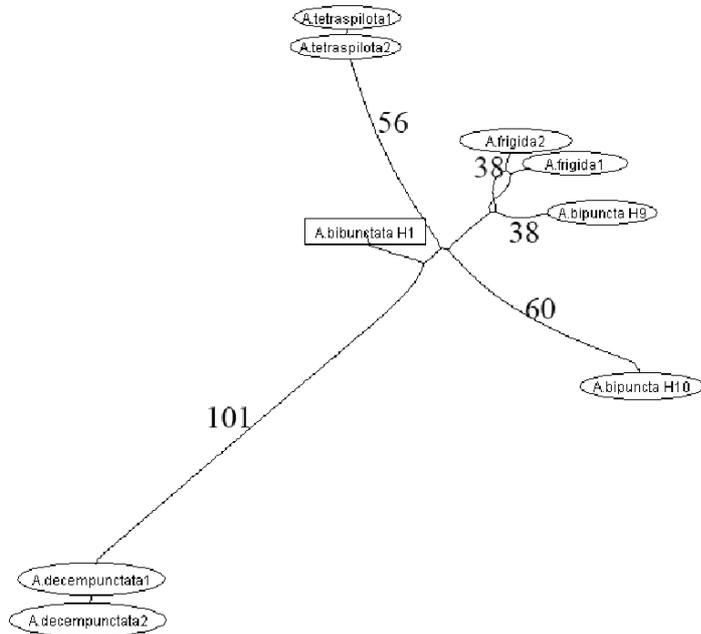


Рисунок 11. Медианная сеть митохондриальных гаплотипов божьих коровок рода *Adalia*. На линиях, соединяющих гаплотипы, указано количество, различающих их мутаций.

Для понимания того, какие факторы обеспечили сохранение в генофонде *A. bipunctata* привнесенных в результате межвидовой гибридизации мт-гаплотипов Н9 и Н10, важным является следующее обстоятельство. Особи мт-гаплотипов Н9 и Н10 в большинстве заражены цитоплазматической симбиотической бактерией *Rickettsia*, которая проявляет способность убивать самцов на ранней стадии эмбрионального развития. Зараженные самки оставляют только женское потомство, при этом имеют определенное преимущество перед незараженными: вылупляющиеся личинки поедают неразвившиеся яйца с мужскими эмбрионами и таким образом получают с самого начала запас корма для прохождения первых стадий развития. Цитоплазматические бактерии и митохондрии, передаются потомству трансвариально, т.е. по женской линии, обнаруживая своеобразный эффект «неравновесия по сцеплению» с мтДНК. Биологическое преимущество самок, дающих бессамцовое потомство, может обеспечить как сохранение в популяции зараженных линий, так и поддержание «сцепленных» с инфицированностью мт-гаплотипов. Можно предположить следующий сценарий происхождения современного генофонда *A. bipunctata*. Некогда симпатрически сосуществовали три близких вида - *A. bipunctata*, *Adalia Y* и *Adalia Z*, последние с мтДНК типа Н9 и Н10, соответственно. Особи *Adalia Y* и *Adalia Z* оказались зараженными *Rickettsia*, инфекция привела к резкому сокращению числа самцов этих видов. Дефицит самцов способствовал скрещиванию самок *Adalia Y* и *Adalia Z* с самцами *A. bipunctata*. Гибридные самки повторно осеменялись самцами *A. bipunctata*. В дальнейшем виды *Adalia Y* и *Adalia Z* исчезли, а их мтДНК вошли в генофонд *A. bipunctata*. При расселении последнего вида по территории Евразии и его дифференциации на подвиды, мт-гаплотипы Н9 и Н10, «сцепленные» с *Rickettsia*, сохранились до сих пор в большинстве популяций *A. bipunctata* и уже не проявляют никакой географической ассоциации. Время дивергенции мт-гаплотипов Н1 и Н10 можно оценить от 750 тысяч до 2 миллионов лет, Н1 и Н9 около 500 тыс. лет назад.

Интрогрессия митохондриальной ДНК обнаружена и у божьих коровок, морфологически схожих с *A. frigida* из Читы и Якутии. Анализ нуклеотидных

последовательностей *COI* и *ITS2* выявил случаи, когда особи с фенотипом одного вида обладали ДНК другого вида. В Чите обнаружена особь с мтДНК *A. frigida* и *ITS2 A. bipunctata*.

Заключение.

Различия по мтДНК между морфологически отличающимися видами, для которых известны репродуктивные барьеры и между внутривидовыми формами оказались сравнимы у насекомых двух родов, *Adalia* и *Culex* (табл. 11). Наши результаты коррелируют и с данными Ю.Ф. Картавцева, который свел результаты штрихкодирования по тысячам видов животных, включая и насекомых: различия между популяциями составляют в среднем 0,89%, между подвидами и близнецовыми видами – 3,78 %, между морфологически отличающимися видами одного рода – 11,06 % (Kartavtsev, 2011).

По ядерной ДНК различия между близкими видами рода *Culex*: *C. pipiens* и *C. torrentium* (14,7 %) оказались намного больше, чем различия между близкими видами рода *Adalia*: *A. bipunctata* и *A. frigida* (1,8 %), различия по мтДНК сравнимы (табл. 11). Бóльшая степень обособленности близких видов рода *Culex* связана с тотальной зараженностью комаров одного из этих видов, *C. pipiens*, симбиотической бактерией *Wolbachia*, которая вызывает цитоплазматическую несовместимость в скрещиваниях с незараженными комарами вида *C. torrentium*, делая невозможным обмен генетическим материалом между двумя видами в природе. *Wolbachia* также способствовала распространению связанных с ней митохондриальных гаплотипов в популяциях *C. pipiens*.

Таблица 11. Уровень эволюционной дивергенции между ядерными и митохондриальными последовательностями у особей родов *Adalia* и *Culex*.

область генома	Далекие виды		Близкие виды		Подвиды/формы	
	<i>Culex</i>	<i>Adalia</i>	<i>Culex</i>	<i>Adalia</i>	<i>C.pipiens</i>	<i>A.bipunctata</i>
<i>ITS2</i>	н/о	41; 57 %	14,7%	1,8%	0,1- 0,6 %	0,1%
<i>COI</i>	5,1%	12,5; 6,2%	3%	4,3%	0,1 - 0,3%	0,1-0,4%

У насекомых двух родов обнаружено снижение гаплотипического разнообразия мтДНК в выборках зараженных симбиотическими бактериями особей, разнообразие ядерной ДНК при этом не снижается (табл. 12). И *Wolbachia*, и *Spiroplasma* в изученных симбиотических системах являются мутуалистами и придают хозяевам определенные преимущества, что способствует распространению связанных с ними мт-гаплотипов и уменьшает разнообразие мтДНК в зараженных симбионтами популяциях *C. pipiens* и *A. bipunctata*.

Распределение мт-гаплотипов в популяциях изученных насекомых безусловно связано с симбиотическими бактериями. Популяции *Culex pipiens* заражены одной симбиотической бактерией - *Wolbachia*, частота заражения больше 90%, причем бактерия недавно и стремительно распространилась в популяциях за счет эффекта цитоплазматической несовместимости, который привел к репродуктивной изоляции и дивергенции таксонов. Время первичного заражения комаров *Wolbachia* оценивается в 0-47 тыс. лет (Rasgon et al., 2006), а время расхождения групп бактерии 0-21 тыс. лет (Atyame et al., 2011), обе оценки сделаны по изменчивости связанных с бактерией вариантов мтДНК. Поскольку наблюдается связь групп *wPip* с определенным таксоном, то последующая миграция комаров привела к географическому распространению связанных с бактерией митохондриальных вариантов.

Таблица 12. Сравнение разнообразия ДНК у зараженных и незараженных симбионтами особей

область генома	<i>C.pipiens</i> W+	<i>C.torrentium</i> W-	<i>A.bipunctata</i> S+	<i>A.bipunctata</i> S-
<i>COI</i>	0,001	0,004	0,002	0,021(0,004*)
<i>ITS2</i>	0,006	0,008	0,001	0,001

*значение без отличающихся гаплотипов H9 и H10

Adalia bipunctata могут быть инфицированы четырьмя разными симбионтами. Мы не обнаружили заражение одной популяции *A. bipunctata* несколькими симбионтами одновременно, хотя, по литературным данным, известно заражение особей одной популяции *Rickettsia*, *Spiroplasma* и *Wolbachia* двух типов Z и Y (Shulenburg et al., 2002). *Rickettsia* была привнесена в генофонд *A. bipunctata* вместе с мт-гаплотипами H9 и H10 от вероятно вымерших видов более 700 тыс. лет назад. Время заражения *Spiroplasma* оценить трудно, но среднее значение нуклеотидных различий между зараженными и незараженными бактерией особями составляет 6 сайтов, что соответствует времени расхождения около 200 тыс. лет назад. За это время успели сложиться определенные отношения между симбионтами и их хозяевами. Андроцидные симбионты способствуют отклонению в соотношении полов в сторону самок. В ответ ядерные гены хозяина развивают защиту против отклонения от нормального соотношения полов, блокируя их передачу или действие (Jiggins, Tinsley, 2005). Предполагается наличие т.н. генов-супрессоров хозяина, которые по-разному влияют на передачу различных андроцидных агентов и поддерживают полиморфизм по статусу инфицированности в популяции (Randerson et al., 2000; Veneti et al., 2005; Cordaux et al., 2011). В популяциях адалий всегда существует зараженная и незараженная группы особей, причем зараженных, как правило, меньше. У большинства видов *Adalia* имеет место несовершенная вертикальная передача бактерий, что приводит к появлению неинфицированных сыновей и дочерей. Случайное расселение зараженных и незараженных жуков привело к отсутствию географических закономерностей распределения митохондриальных гаплотипов, связанных с симбионтами, в популяциях адалий. Связь зараженности симбионтами с определенным мт-гаплотипом и отсутствие передачи симбионтов при симпатрическом сосуществовании особей с разным инфекционным статусом: *C. pipiens*(*Wolbachia*+) и *C. torrentium*(*Wolbachia*-), *A. bipunctata*(*Spiroplasma*+) и *A. decempunctata*(*Rickettsia*+), доказывает отсутствие или редкость горизонтального переноса симбионтов у изученных видов насекомых.

У насекомых двух родов, комаров комплекса *Culex pipiens* и у близких видов божьих коровок рода *Adalia* обнаружены случаи интрогрессии митохондриальных гаплотипов в зонах симпатрии и разница в структуре ДНК на большей части ареала. Выявленные генетические различия совпадают с морфологическими или физиологическими диагностическими признаками и, при исследовании аллопатрических популяций, отличающиеся формы образуют монофилетичные кластеры на филогенетических дендрограммах. Аккумуляция части митохондриального генофонда происходит в результате поглотительных скрещиваний у близких видов при совместном сосуществовании. Обнаруженные различия по ядерным молекулярным маркерам, специфичным для таксономических форм, доказывает, что эти случаи являются именно митохондриальной интрогрессией, а не свидетельствами предкового полиморфизма или неполного расхождения линий. Интрогрессия ДНК при межвидовой гибридизации наряду с мутационным процессом является важным источником генетической изменчивости в природных популяциях и одной из причин видообразования в симпатрических популяциях.

Успешно использованные в нашей работе методы ДНК-идентификации близких видов и внутривидовых форм, основанные на совместном анализе маркеров митохондриальной и ядерной ДНК, могут применяться в изучении и других видовых комплексов насекомых.

Выводы:

1. На основе изучения изменчивости ДНК у насекомых родов *Culex* (Culicidae) и *Adalia* (Coccinellidae) разработаны методы идентификации морфологически неразличимых или трудно различимых таксонов в видовых комплексах на любой стадии развития особи. Для идентификации видов и внутривидовых форм в роде *Culex* вместо секвенирования ДНК может быть использован разработанный на основе полиморфизма гена *COI* метод ПЦР-ПДРФ.
2. Различия между *C. torrentium* и *C. pipiens*, обнаруженные в результате проведенного анализа нуклеотидных последовательностей митохондриальной и ядерной ДНК, достигают межвидового уровня и устойчивы на всем ареале распространения. Различный статус инфицированности симбиотической бактерией *Wolbachia* проявляется в односторонней цитоплазматической несовместимости при скрещивании *C. torrentium* и *C. pipiens* в лабораторных условиях; в природе гибриды не обнаружены. Разработанные методы идентификации *C. torrentium* и *C. pipiens* дали возможность впервые очертить ареалы распространения этих видов комаров на территории Европейской части РФ.
3. У внутривидовых таксонов *C. pipiens* обнаружено 3 группы митохондриальных гаплотипов по гену *COI*, которые коррелируют с физиологическими признаками их представителей. Существует строгая корреляция между группами митохондриальных гаплотипов по гену *COI* и группами *wPip Wolbachia*, предполагающая участие симбиотической бактерии в дивергенции членов комплекса *Culex pipiens*.
4. Единообразие ДНК цитоплазматических компонентов *C. p. pipiens* f. *molestus* свидетельствует о том, что особи этой формы, размножающиеся на территории бывшего СНГ в подвалах, заселили ее относительно недавно и при этом географически удаленные популяции комаров формы *molestus*, имеют общее происхождение.
5. Распределение штаммов *W. pipientis* и связанных с ними митохондриальных гаплотипов в популяциях комплекса *Culex pipiens* демонстрирует выраженную географическую ориентацию. Регион Средиземноморья является центром генетического разнообразия комаров комплекса. Здесь имеет место регулярная гибридизация экологических форм комаров одного подвида, комаров разных подвидов, а также встречаются популяции, в генофонде которых митохондрии замещены митохондриями другого подвида, то есть имела место интрогрессия митохондриальной ДНК.
6. У божьих коровок *Adalia bipunctata* из географически удаленных популяций Евразии обнаружено 17 мт-гаплотипов, 10 из которых выявлены нами впервые. Два мт-гаплотипа, Н9 и Н10, отличаются от остальных на 4 и 6 %, что соответствует уровню межвидовых различий. Эти гаплотипы вошли в генофонд современных *Adalia bipunctata* от вымерших видов в результате митохондриальной интрогрессии.
7. На основании анализа ДНК нельзя считать морфологически различающихся *Adalia bipunctata*, *A. fasciatopunctata*, *A. revelierei* и *A. turanica* отдельными самостоятельными видами. *A. b. fasciatopunctata*, *A. b. revelierei* и *A. b. turanica* являются лишь географическими формами политипического вида *Adalia bipunctata*. Проведенный анализ подтвердил видовой статус *A. tetraspilota* и *A. decempunctata*.
8. Результаты анализа ДНК *A. frigida* и *A. bipunctata* показали, что они являются близкими видами, скрещивающимися в зонах симпатрии.

9. Зараженность бактерией *Spiroplasma* характерна для *A. bipunctata* с мт-гаплотипом Н1 и близкими к нему в популяциях из Санкт-Петербурга и Стокгольма. Особи *A. bipunctata* из Карелии и Забайкалья, зараженные симбиотической бактерией *Rickettsia*, имеют мт-гаплотип Н10. Обнаружение мт-гаплотипов, сцепленных с *Rickettsia* и *Spiroplasma*, в географически отдаленных популяциях свидетельствует о древности первого контакта бактерий с коровками вида *A. bipunctata* и адаптивной ценности явления бессамцовости.
10. Симбиотические бактерии *Wolbachia* и *Spiroplasma* влияют на структуру генофонда популяций комаров рода *Culex* и божьих коровок рода *Adalia*, уменьшая разнообразие митохондриальной ДНК за счет экспансии в популяциях связанных с ними митохондриальных гаплотипов в результате адаптивности симбиоза. Связь зараженности симбионтами с определенным мт-гаплотипом является следствием отсутствия или редкости заражения изученных насекомых путем горизонтального переноса симбионтов.
11. Симбиотические бактерии могут обеспечить сохранение в генофонде вариантов мтДНК, привнесенных в результате отдаленной гибридизации.

СПИСОК ОСНОВНЫХ ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в рецензируемых научных журналах из перечня ВАК:

1. **Шайкевич, Е.В.** Козволюция симбиотической бактерии *Wolbachia* и мтДНК хозяина в российских популяциях комаров комплекса *Culex pipiens* / Е.В. Шайкевич, И.А. Захаров // Генетика. - 2014. - Т. 50. - № 11. - С. 1390 - 1393.
2. Захаров, И.А. Молекулярно-генетическое изучение географических форм жуков *Adalia bipunctata* и *A. frigida* / И.А. Захаров, **Е.В. Шайкевич** // Экологическая генетика. - 2014. - Т.12. - №3. - С. 48-55.
3. **Шайкевич, Е.В.** Установление гибридного происхождения комаров комплекса *Culex pipiens* (Diptera, Culicidae) на греческом острове Кос помощью молекулярных маркеров / Е.В. Шайкевич, Е.Б. Виноградова // Энтомологическое обозрение. - 2013. - Т 92. - №3. - С. 480-485.
4. Федорова, М. В. Роль комаров *Culex pipiens* f. *pipiens* и *Culex pipiens* f. *molestus* (Diptera, Culicidae) в распространении вируса Западного Нила на юге России / М. В. Федорова, **Е. В. Шайкевич** // Мед. паразитология и паразитарные болезни. - 2013. - №3. – С. 36-40.
5. Dumas, E. Population structure of *Wolbachia* and cytoplasmic introgression in a complex of mosquito species/ E. Dumas, С.М. Atyame, P. Milesi, D.M. Fonseca, **E.V. Shaikевич**, S. Unal, P. Makoundou, M. Weill, O. Duron // BMC Evol Biol. - 2013. - V.13(1). – P. 181. doi:10.1186/1471-2148-13-181
6. Zakharov, I. Comparative study of mtDNA in species of the genus *Adalia* (Coleoptera: Coccinellidae) and the origin of ancient mitochondrial haplotypes in gene pool of *Adalia bipunctata*/ I. Zakharov, **E. Shaikевич** // European J. Entomology. - 2013. - V110 (3). - P. 427-433.
7. **Шайкевич, Е. В.** Сравнительная характеристика межгенных спейсеров кластера генов рибосомной РНК комаров рода *Culex* (Diptera: Culicidae) / Е.В. Шайкевич, М.В. Загоскин, Д.В. Муха // Молекулярная биология. - 2013. - V. 47. - No. 3. - С. 413–422.
8. **Шайкевич, Е.В.** Полиморфизм митохондриальной ДНК и распространение цитоплазматических симбионтов в популяциях двуточечной божьей коровки *Adalia bipunctata* / Е.В. Шайкевич, Е.В. Ившина, И.А. Захаров // Генетика. - 2012. - Т. 48. - No. 5. - С. 666–671.

9. Виноградова, Е.Б. Изучение биотопического распределения комаров *Culex pipiens* L.(Diptera, Culicidae) из Закавказья молекулярными методами их идентификации/ Е.Б. Виноградова, Е.В. Ившина, **Е.В. Шайкевич** // Энтомологическое обозрение. - 2012. - Т.91. - Вып.3. - С. 492-497.
10. Захаров, И.А. Полиморфизм мтДНК в Петербургской популяции *Adalia bipunctata* и его связь с зараженностью симбиотической бактерией *Spiroplasma* / И.А. Захаров, **Е.В. Шайкевич** // Экологическая генетика. - 2011. - Т.1. - С. 27-31.
11. Talbalaghi, A. Molecular approach for identification of mosquito species (Diptera: Culicidae) in Province of Alessandria, Piedmont, Italy / A. Talbalaghi, **E. Shaikевич** // European J. Entomology.- 2011. - V. 108. - No. 1. - P. 35–40.
12. **Shaikевич, E.V.** Polymorphism of mitochondrial *COI* and nuclear ribosomal ITS2 in *Culex pipiens* complex and in *Culex torrentium* (Diptera, Culicidae) / E.V. Shaikевич, I.A. Zakharov. // Comparative Cytogenetics. - 2010. - V. 4. - No. 2. - P. 161-174.
13. **Шайкевич, Е. В.** Идентификация комаров рода *Culex* (Diptera, Culicidae) методом рестрикционного анализа продуктов амплификации/ Шайкевич Е. В. // Медицинская паразитология и паразитарные болезни. - 2009. - №3. - С. 28-32.
14. Федорова, М.В. Морфологические и молекулярно-генетические различия имаго комаров *Culex torrentium* и *C.pipiens* (Diptera, Culicidae) Московского региона / М.В. Федорова, **Е.В. Шайкевич** // Энтомологическое обозрение. - 2007. - Т. 86. - № 1. - С. 32-41.
15. Vinogradova, E.B. Some morphometrical, physiological and molecular characteristics of underground populations of the urban mosquito, *Culex pipiens pipiens* f. *molestus* (Diptera: Culicidae), from several areas of Russia / E.B. Vinogradova, **E.V. Shaikевич** // European mosquito Bulletin. - 2007. - V.22. -P. 17-24.
16. **Shaikевич, E.V.** PCR-RFLP of the COI gene realibly differentiates *C. pipiens*, *C. pipiens* f. *molestus* and *C. torrentium* of the Pipiens Complex / E.V. Shaikевич // European mosquito Bulletin. - 2007. - V.22. - P. 25-30.
17. Vinogradova, E.B. The study on the distribution of the *Culex pipiens* complex mosquitoes in the European part of Russia by molecular methods of their identification / E.B.Vinogradova, **E.V. Shaikевич**, A.V. Ivanitsky // Comparative Cytogenetics. - 2007. - V. 1. - № 2. - P. 129-138.
18. Виноградова, Е.Б. Дифференциация городского комара *Culex pipiens pipiens* f. *molestus* (Diptera, Culicidae) и *Culex torrentium* молекулярно-генетическими методами/ Е.Б. Виноградова, **Е.В. Шайкевич** // Паразитология. - 2005. - Т. 39. - С. 574-576.
19. **Шайкевич, Е.В.** Полиморфизм митохондриальной ДНК и зараженность цитоплазматической симбиотической бактерией *Wolbachia pipientis* комаров комплекса *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) из России / Е.В. Шайкевич, Е.Б. Виноградова, А.Е. Платонов, Л.С. Карань, И.А. Захаров // Генетика. - 2005. - Т. 41.- № 3. - С. 320-325.
20. **Шайкевич, Е.В.** Молекулярно-генетические методы идентификации городского комара *Culex pipiens pipiens* f. *molestus* (Diptera, Culicidae) / Е.В. Шайкевич, Е.Б. Виноградова // Паразитология. - 2004. - Т. 38. - № 5. - С. 406-412.
21. Vinogradova, E.B. Distribution of the cytoplasmic bacteria *Wolbachia pipientis* in *Culex pipiens* in connection with origins of urban populations of these mosquitoes / E.B. Vinogradova, I.A. Zakharov, M.V. Fedorova, **E.V. Shaikевич** // European mosquito Bulletin. - 2004. - V. 17. - P. 29-30.
22. Паленко, М.В. Молекулярно-генетические подходы к филогении жуков семейства Божьи коровки (Coleoptera: Coccinellidae) / М.В. Паленко, **Е.В. Шайкевич**, Д.В. Муха, И.А. Захаров // Энтомологическое обозрение. - 2004. - Т.83. - № 4. - С. 876-879.
23. Виноградова, Е.Б. Эндосимбиотическая бактерия *Wolbachia pipientis* в синантропных популяциях комаров *Culex pipiens pipiens* L. (Diptera, Culicidae) / Е.Б.Виноградова, М.В.Федорова, **Е.В. Шайкевич**, И.А. Захаров // ДАН. - 2003. - Т. 389. - № 6. - С. 837-841.

24. Zakharov, I.A. The Stockholm populations of *Adalia bipunctata* (L) (Coleoptera: Coccinellidae)--a case of extreme female-biased population sex ratio / I.A. Zakharov , **E.V. Shaikevich** // Hereditas. -2001. - V. 134. - № 3. - P. 263-266.
25. Захаров, И.А. Распространение в популяциях *Adalia bipunctata* L. Евразии цитоплазматически наследуемой бактерии рода *Spiroplasma*, влияющей на соотношение полов / И.А. Захаров, И.И. Горячева, **Е.В. Шайкевич**, Ч.М. Доржу // Генетика. - 2000. - Т.36. - № 2. - С. 191-194.
26. Захаров, И.А. *Wolbachia* - новая бактерия, вызывающая сдвиг в соотношении полов у двуточечной божьей коровки *Adalia bipunctata* L./ И.А. Захаров, И.И. Горячева, **Е.В. Шайкевич**, Х. Г. фон Шуленбург, М.Е.Н. Мажерес // Генетика. - 2000. - Т.36. - № 4. - С. 482-486.
27. Захаров, И.А. Бактерии рода *Spiroplasma* инфицируют двуточечную божью коровку (*Adalia bipunctata* L.) в России / И.А. Захаров, **Е.В. Шайкевич**, И.И. Горячева // ДАН. - 1998. - Т.362. -№ 4. - С. 570-573.

Публикации в сборниках конференций (избранные)

1. **Shaikevich, E.** DNA polymorphism in mosquito species (Diptera: Culicidae) / E. Shaikevich // 8 International Congress of Dipterology. Potsdam. Germany. 2014. P. 319.
2. **Шайкевич, Е.В.** Цитоплазматическая интрогрессия в симпатрических популяциях насекомых двух родов: р. *Culex* (Culicidae, Diptera) и р. *Adalia* (Coleoptera, Coccinellidae) / Е.В. Шайкевич, И.А. Захаров // IV съезд ВОГИС. Ростов на Дону. 2014. С.14-15.
3. Федорова, М.В. Эпидемическое значение комаров комплекса *Culex pipiens* (Diptera, Culicidae) в природных очагах лихорадки Западного Нила на юге России / М. В.Федорова, **Е. В. Шайкевич** // Международная конференция Фундаментальные и прикладные аспекты изучения паразитических членистоногих в XXI веке. Санкт-Петербург. 2013. С.152-154.
4. Zakharov-Gezekhus, I.A. Symbiotic bacteria as a factor of gene pool dynamics in insect populations / I.A. Zakharov-Gezekhus, **E.V. Shaikevich** // 7th International Wolbachia Conference. 2012. P. 102.
5. **Шайкевич, Е. В.** Полиморфизм мтДНК комаров комплекса *Culex pipiens* в различных биотопах / Е.В. Шайкевич // Сборник материалов международной научно-практической конференции "Актуальные проблемы биологической и химической экологии". Москва. 2012. С.61-62.
6. **Шайкевич, Е.В.** Полиморфизм мтДНК и эволюция жуков рода *Adalia* / Е.В. Шайкевич, И.А. Захаров // Сборник тезисов международной конференции «Проблемы популяционной и общей генетики». Москва. 2011 С.95-96.
7. **Shaikevich, E.** Identification of mosquito species in the Province of Alessandria, Piedmont Italy – a high-risk ecosystem for species composition of mosquitoes / E. Shaikevich, N.Oyun, A. Talbalaghi // Emerging Diseases in a changing European Environment (EDEN). Montpellier, France. 2010 P. 80.
8. **Шайкевич Е. В.** Полиморфизм митохондриальной ДНК у *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) в связи с зараженностью симбиотической бактерией *Wolbachia* / Е.В. Шайкевич // V съезд ВОГИС. Москва. 2009. С. 219.
9. **Shaikevich, E.** Ecological study of *Culex pipiens* f. *pipiens* and *Cx. pipiens* f. *molestus* in Volgograd region, Russia, based on ovarian status and two molecular markers/ E.V. Shaikevich, M.V. Fyodorova, L. S. Karan // Abstract book of 5th European Mosquito Control Association Workshop. Turin. Italy. 2009. P. 42-44.
10. Федорова, М.В. Пространственное распределение личинок и пищевые предпочтения самок *Culex pipiens* f. *pipiens* и *Culex pipiens* f. *molestus* (Diptera, Culicidae) в очаге лихорадки западного Нила / М. В.Федорова, **Е. В. Шайкевич** // Сборник материалов Международной научно-практической конференции Актуальные проблемы биоэкологии. Москва. 2008. С. 98-100.

11. **Shaikovich, E.V.** Infection with a Symbiotic Bacterium Wolbachia Affects Mitochondrial DNA Polymorphism in Populations of the *Culex pipiens* Complex Mosquitoes/ E.V. Shaikovich // XX International Congress of Genetics. Berlin. Germany. 2008. P 253.
12. **Шайкевич, Е.В.** ДНК-штрихкод жизни и идентификация некоторых видов насекомых / Е.В. Шайкевич // Сборник материалов Международной научно-практической конференции Актуальные проблемы биоэкологии. Москва. 2008. С. 100-101.
13. **Шайкевич, Е.В.** Мониторинг генофондов популяций комаров в связи с задачами селекции и изучением филогении / Е.В. Шайкевич, А.В. Иваницкий, И.А. Захаров-Гезехус // Материалы отчетной конференции по программе фундаментальных исследований РАН "Биоразнообразие и динамика генофондов". Москва. 2007. С. 150-151.
14. **Shaikovich, E.V.** Cytochrome oxidase I as a DNA marker for identification of mosquito species of the *CULEX* genus/ E.V. Shaikovich // Abstract book of 4th European Mosquito Control Association Workshop. Prague. Czech Republic. 2007. P. 79.
15. **Шайкевич, Е.В.** ДНК- Диагностика представителей комплекса *Culex pipiens* (Culicidae, Diptera) из России/ Е.В. Шайкевич, М.В.Федорова, Е.Б.Виноградова // Материалы I Всероссийского совещания по кровососущим насекомым. Санкт-Петербург. 2006. С. 227-228.
16. Vinogradova, E.B. The distribution of the cytoplasmic bacteria *Wolbachia pipientis* in mosquitoes *Culex pipiens pipiens* and *Culex pipiens molestus* in connection with origination of urban mosquito populations / E.B. Vinogradova, I.A. Zakharov, **E.V. Shaikovich** // Proceedings of the First International Workshop: Vector-Borne Diseases and Problems of Genetic Safety. Moscow. 2003. P.13-14.

БЛАГОДАРНОСТИ

Приношу искреннюю благодарность моему научному руководителю – член-корр. РАН, профессору Илье Артемьевичу Захарову-Гезехусу за руководство и всемерную поддержку в работе. Я глубоко признательна д.б.н. Елене Борисовне Виноградовой за плодотворное многолетнее сотрудничество и своей многолетней коллеге и соратнику к.б.н. Марине Вадимовне Федоровой. Без вашего участия было бы невозможно выполнить данную работу. Я благодарна д.б.н., проф. Дмитрию Владимировичу Мухе за то, что он обучил меня методам анализа ДНК и за плодотворную совместную работу. Благодарю весь коллектив лаборатории генетики насекомых и лаборатории сравнительной генетики животных за поддержку в течение всей моей работы. Я искренне признательна всем коллегам, предоставившим мне насекомых для анализа. Выражаю свою признательность д.б.н. Дмитрию Владиславовичу Политову за конструктивные замечания, высказанные им на стадии апробации диссертации. Исследования, положенные в основу данной работы, в разные годы выполнялись благодаря финансовой поддержке РФФИ и Программ фундаментальных исследований Президиума РАН «Динамика генофондов растений, животных и человека» и «Живая природа».