

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ  
ИНСТИТУТ ОБЩЕЙ ГЕНЕТИКИ им. Н.И. ВАВИЛОВА  
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК**

*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**

**ДИССЕРТАЦИЯ  
на соискание ученой степени  
доктора биологических наук**

**Научный консультант**

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

**МОСКВА – 2014**

## ОГЛАВЛЕНИЕ

|   |     |
|---|-----|
| <b>ВВЕДЕНИЕ</b>   | 4   |
| <b>Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ</b>  | 12  |
| <b>1.1 Комары комплекса <i>Culex pipiens</i> и <i>Culex torrentium</i></b>                                | 12  |
| 1.1.1 Таксономия <i>Culex pipiens</i>   | 12  |
| 1.1.2 Генетика комаров рода <i>Culex</i>  | 16  |
| 1.1.3 Экология (местообитание, поведение, размножение, питание)   | 22  |
| 1.1.4 <i>Culex torrentium</i> и <i>C. pipiens</i>   | 29  |
| 1.1.5 <i>C. p. pipiens</i> и <i>C. p. quinquefasciatus</i>  | 32  |
| 1.1.6 Две формы <i>Culex pipiens</i> : форма <i>pipiens</i> и форма <i>molestus</i>                       | 34  |
| 1.1.7 Роль в переносе патогенов   | 39  |
| 1.1.8 Точная идентификация представителей комплекса   | 42  |
| <b>1.2 Божьи коровки рода <i>Adalia</i></b>   | 62  |
| 1.2.1 Таксономия божьих коровок рода <i>Adalia</i>  | 63  |
| 1.2.2 Генетика <i>Adalia bipunctata</i>   | 71  |
| 1.2.3 Изменчивость ДНК <i>Adalia bipunctata</i>   | 73  |
| <b>1.3 Симбиотические бактерии</b>  | 75  |
| 1.3.1 <i>Wolbachia</i> у <i>Culex pipiens</i>   | 78  |
| 1.3.2 Симбионты <i>Adalia</i>   | 85  |
| <b>Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ</b>  | 89  |
| <b>Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ</b>  | 98  |
| <b>3.1 Комары комплекса <i>Culex pipiens</i></b>  | 95  |
| 3.1.1 Морфо-биологические особенности комаров комплекса <i>Culex pipiens</i> из изученных популяций       | 95  |
| 3.1.2 Инфицированность природных популяций <i>Culex pipiens</i> симбиотической бактерией <i>Wolbachia</i> | 96  |
| 3.1.3 Вариабельность 3' участка гена <i>COI</i> мтДНК у комаров комплекса <i>Culex pipiens</i>            | 99  |
| 3.1.4 Различия между <i>C. pipiens</i> и <i>C. torrentium</i>   | 101 |

|   |            |
|---|------------|
| 3.1.5 ПЦР-ПДФФ 5' конца гена <i>COI</i>   | 106        |
| 3.1.6 Изменчивость гена <i>COI</i> мтДНК в связи с зараженностью  | 110        |
| 3.1.7 Разнообразие рДНК   | 120        |
| 3.1.7.1 Анализ эволюционной изменчивости ITS2 комаров <i>C. pipiens</i>   | 121        |
| 3.1.7.2 Анализ изменчивости IGS комаров рода <i>Culex</i>   | 123        |
| 3.1.8 Разнообразие штаммов <i>Wolbachia</i> у <i>C. pipiens</i>   | 133        |
| 3.1.9 Гибридизация и митохондриальная интрогрессия в южных популяциях   | 139        |
| <b>3.2 Божьи коровки рода <i>Adalia</i></b>   | <b>150</b> |
| 3.2.1 Влияние зараженности бактерией <i>Spiroplasma</i> на изменчивость мтДНК <i>A. bipunctata</i> из Петербурга              | 151        |
| 3.2.2 Связь разнообразия мтДНК и зараженности симбиотическими бактериями у жуков <i>A. bipunctata</i> из удаленных мест сбора | 155        |
| 3.2.3 Изменчивость мтДНК в популяциях <i>A. bipunctata</i>  | 159        |
| 3.2.4 Сравнение мтДНК разных видов рода <i>Adalia</i>   | 163        |
| 3.2.5 Разнообразие ядерной ДНК у жуков рода <i>Adalia</i>   | 165        |
| 3.2.6 Древние митохондриальные гаплотипы в генофонде <i>A. bipunctata</i>   | 167        |
| 3.2.7 <i>A. bipunctata</i> и <i>A. frigida</i>  | 168        |
| 3.2.8 Таксономический статус географических форм <i>A. bipunctata</i>   | 171        |
| <b>Глава 4. ОБСУЖДЕНИЕ</b>  | <b>173</b> |
| 4.1 Генетические различия между таксонами в родах <i>Culex</i> и <i>Adalia</i>  | 173        |
| 4.2 Влияние симбионтов на разнообразие мтДНК в популяциях <i>Culex</i> и <i>Adalia</i>  | 176        |
| 4.2.1 Корреляция мт-гаплотипов и типа бактерии  | 176        |
| 4.2.2 Степень изменчивости ДНК у зараженных и незараженных видов, популяций   | 178        |
| 4.3 Географические закономерности в распространении мт-гаплотипов <i>Culex</i> и <i>Adalia</i>                                | 181        |
| 4.4 Гибридизация и интрогрессия мтДНК в зонах симпатрии   | 185        |
| <b>ВЫВОДЫ</b>   | <b>190</b> |
| <b>БЛАГОДАРНОСТИ</b>  | <b>192</b> |
| <b>СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ</b>  | <b>193</b> |

## ВВЕДЕНИЕ

### Актуальность проблемы

Насекомые являются самой крупной таксономической группой животных и играют решающую роль в экосистемах, а также часто имеют важное эпидемиологическое значение. 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 вызываемой симбиотическими бактериями цитоплазматической несовместимости, 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 повсеместное 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. Кроме того, укусы этих комаров у людей вызывают зуд и аллергические реакции. 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 и прогнозирование изменений в структурах популяций. 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*), *C. p. quinquefasciatus*, *C. p. pallens* и *C. p. australicus* (некоторые авторы считают их отдельными видами) и близкие к ним виды *Culex torrentium* и *Culex vagans* (Виноградова, 1997). 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.

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. Известно существование на протяжении продолжительного времени гетероморфных популяций адалий, состоящих из нескольких

достаточно резко различающихся друг от друга типов. Выявлена зависимость структуры популяций адалий от экологических условий обитания, в том числе от таких антропогенных факторов, как загрязнение окружающей среды. Изменчивость популяций *A. bipunctata* по легко учитываемым морфологическим признакам, имеющим простую генетическую обусловленность, дает возможность для изучения эволюционного значения полиморфизма, как фактора популяционной адаптивности. 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. Неизвестна и степень генетической дивергенции между видами рода *Adalia*.

Не менее 65 % 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). 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), такие как манипуляции репродукцией хозяина или защита хозяина от естественных врагов (Werren et al., 2008; Engelstadter, Hurst, 2009; Saridaki, Bourtzis, 2010; Dumas et al., 2013). 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). 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. frigida*.

### Практическая и теоретическая 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 комаров *C. pipiens* и *C. torrentium* (Виноградова, Шайкевич, 2005) и показано, что в некоторых популяциях *C. torrentium* ранее был ошибочно идентифицирован как *C. pipiens* из-за отсутствия морфологических отличий на личиночной стадии развития и схожести биологических особенностей (Федорова, Шайкевич, 2007). Впервые предложен способ диагностики комаров двух форм *C. p. pipiens* (формы *pipiens* и формы *molestus*) методом рестрикционного анализа продуктов амплификации (ПЦР ПДРФ), разработанным на основе полиморфизма нуклеотидной последовательности 5' конца гена цитохромоксидазы I (*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 (Shaikevich, Vinogradova, 2013; Шайкевич, Захаров, 2014).

Нами были проведены исследования генетической структуры географически удаленных природных популяций божьих коровок р. *Adalia*. Впервые определены последовательности генов мтДНК и рРНК для среднеазиатских подвидов *A. bipunctata* и для видов *A. frigida* и *A. tetrspilota*, проведен сравнительный анализ эволюционных связей этих видов с *A. bipunctata* и *A. decempunctata*. Эти данные вносят вклад в понимание закономерностей географической изменчивости, видообразования и эволюции у насекомых. Виды р. *Adalia*, относящиеся к семейству хищных жуков Coccinellidae, являются естественными регуляторами численности вредителей деревьев и кустарников – тлей. Эта особенность кокцинеллид позволяет широко использовать их для биологической защиты растений, особенно в антропогенных ландшафтах.

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 связанных 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 определенным мт-гаплотипом, 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, из них 27 статей в российских и международных рецензируемых журналах.

### **Личный вклад автора**

Сборы комаров, их характеристика по морфологическим и физиологическим признакам и опыты по скрещиванию проводились коллегами-энтомологами, главным образом Виноградской Е.Б. и Федоровой М.В. Жуки рода *Adalia* были собраны и охарактеризованы морфологически Захаровым-Гезехусом И.А. 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 Захаровым-Гезехусом И.А, Федоровой М.В. и Виноградской Е.Б.

## Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 1.1 Комары комплекса *Culex pipiens* и *Culex torrentium*

#### 1.1.1 Таксономия *Culex pipiens*

Изучение комаров *Culex pipiens* началось в 1758 году, когда Карл Линней описал номинативную форму, но только в 1960 году специалисты признали, что комары этого комплекса являются глобальной проблемой. Комары *Culex pipiens* активно нападают на людей и представляют большое медицинское и ветеринарное значение в качестве переносчиков и распространителей инфекций. Необходимость исследования комплекса *Culex pipiens* была официально подтверждена на Международном семинаре ВОЗ в 1964 году. К этому времени уже удалось установить тесную связь между обилием этих комаров и активной урбанизацией во всем мире. Один из членов комплекса, подвальный комар *C. pipiens* f. *molestus* появился в Европе в 1921 г. его нашли сначала в Лондоне, а затем ещё в трех местах в Англии; в 1930-х годах — в Стокгольме, Осло, Париже, Тихани и Метреверебили (Венгрия); в 1950-х — во многих других крупных и небольших городах Германии, Чехии, Словакии и других европейских стран (Виноградова, 2004). Елена Борисовна Виноградова в своей книге "Городские комары или "дети подполья" пишет, что "впервые городской комар в России был обнаружен известным энтомологом И. А. Порчинским, который описал процесс зимнего кровососания комаров на спящих людях в одной из квартир в центре Санкт-Петербурга". В 1926 году личинки были найдены в Днепропетровске, а в 1939 г. в подземном туннеле метро в Москве. Потом стали поступать сведения о его нахождении во многих городах бывшего СССР. Скорость распространения специально не изучалась, но в Москве в 1950-1965 гг. существовало только 20 мест подвального размножения комаров, к 1977 г. их число возросло в 37 раз, достигнув 740, и с каждым годом их становилось всё больше. В Екатеринбурге в 1983 г. отмечено 25 домов с комарами, к 1987 г. их было уже 175, а к 1992 г.— 325 (Виноградова, 2004). С течением времени взгляды на структуру комплекса и таксономический статус его членов меняются, но комплекс *Culex pipiens* по-прежнему остается предметом актуальных исследований и обсуждения (Vinogradova, 2003; Harbach, 2012; Cornel, 2012). Главный вопрос заключается в том, является ли *Culex pipiens* одним политипическим видом или комплексом видов-двойников? Всемирное передвижение представителей комплекса продолжается и по сей день, что проявляется в быстром расширении устойчивости к

инсектицидам (Raymond et al., 1991) и в недавнем вторжении в отдаленные районы, как например Галапагосские острова (Bataille et al., 2009).

Таксономия комаров началась с описания *Culex pipiens*, первого из шести номинальных видов *Culex* перечисленных в 10-м издании "Systema Naturae" Линнея (1758), определенного отправной точкой зоологической номенклатуры. Семейство Culicidae (Stephens 1829) основано на роде *Culex*, для которого *C. pipiens* L. является типичным видом (Harbach, 2012).

Египетские комары, отличающиеся автогенностью и антропофилией, были описаны Петером Форскалем в 1775 (Petrus (Reter) Forskal) как *C. molestus*. Было предпринято много попыток охарактеризовать *C. molestus* Forskal как отдельный вид морфологически (Marshall, Staley, 1937; Jobling, 1938; Marshall, 1944; Knight, 1951; Christophers, 1951 цитировано по Виноградова, 1997), но, после того, как систематика *C. pipiens* была пересмотрена Mattingly и соавторами (1951), становится общепринятым определять *C. molestus* на основе поведенческих и физиологических черт. За редкими исключениями было принято считать, что *C. molestus* имеет подвидовой статус (биотип), пока он заново не был возведен в статус вида на основе полученных доказательств существования предкопуляционных поведенческих барьеров при спаривании *C. molestus* и *C. quinquefasciatus* (ранее *C. fatigans*) в Австралии (Miles, 1977). Никаких попыток последующего пересмотра оценки Mattingly и соавторов (1951) не было сделано, чтобы описать *C. molestus* так, как первоначально описывал его Forskal, до того как Harbach и соавторы (1984) определили неотип и описали таксон по образцам, собранным в городе Rosetta на севере Египта, одном из типичных населенных пунктов, перечисленных Forskal (1775). Harbach и соавторы (1984) не смогли определить статус вида или подвида для Египетских образцов, потому что они были неотличимы от шведских образцов, которые считались неотипом серии *C. pipiens* (Harbach et al., 1985). Следовательно, *C. molestus* считается физиологическим вариантом и одним из синонимов *C. pipiens* (Harbach, 2012).

*Culex quinquefasciatus* был описан Say (1823) на основе образцов, собранных "в большом количестве на реке Миссисипи" (Harbach, 2012). Это обстоятельство привело Belkin и соавторов (1966) к тому, чтобы ограничить ареал распространения *C. quinquefasciatus* окрестностями Нового Орлеана, США (Harbach, 2012). Комары, населяющие Африку и Азию, были описаны как *C. fatigans* Wiedemann (1928). В течение большей части двадцатого века два имени - *C. fatigans* Wiedemann и *C. quinquefasciatus* использовались для одного вида. В 1957 году Stone (1957) перечислил причины для

принятия *C. quinquefasciatus* как единственного допустимого имени для данного вида, но имя *C. fatigans* продолжало широко использоваться для популяций в Старом Свете, пока Sirivanakarn и White (1978) не определили неотип для *C. quinquefasciatus* из Нового Орлеана для уточнения и стабилизации номенклатуры. Было признано, что название *C. quinquefasciatus* Say, 1823 имеет приоритет перед *C. fatigans* Wiedemann, 1928 и постепенно *C. quinquefasciatus* заменил *C. fatigans* в научной литературе. *Culex fatigans* является одним из 40 названий, которые в настоящее время рассматриваются в качестве младших синонимов *C. quinquefasciatus* (Harbach, 2012).

*Culex pallens* был описан Coquillett (1898) из образцов, собранных в неизвестном месте в Японии. Tanaka (2004) рассматривал *C. pallens* как подвид *C. pipiens*. Поскольку Tanaka является последним из ревизоров, *C. pallens* указывается в качестве подвида *C. pipiens* в каталоге комаров и ему предоставляется подвидовой статус в современной литературе. Была выдвинута гипотеза о гибридном происхождении *C. pallens* от *C. pipiens* и *C. quinquefasciatus* (Barr 1982), на том основании, что *C. pallens* обладают промежуточным значением морфологического признака - различий в строении гениталий самцов, индекса DV/D. Однако, недавнее исследование микросателлитов обнаружило у *C. pallens* собственные, отличные от других таксонов аллели (Fonseca et al., 2009).

*C. australicus* был описан в 1953 году по образцам из Австралии Dobrotworsky и Drummond. Эти комары распространены только в Австралии и Меланезии. Только в Австралии встречается также *C. globocoxitus* Dobr. *C. pipiens* там не встречается, а *C. molestus*, как считается, был завезен в Австралию во время Второй мировой войны (Виноградова, 1997; Farajollahi et al., 2011).

*C. torrentium* Martini, 1925 распространен в Палеарктике, считается видо-двойником *C. pipiens*. *C. torrentium* и *C. pipiens* обладают идентичными эколого-физиологическими характеристиками, симпатрическим распространением на большей части ареала, морфологически различаются только взрослые самцы.

*C. vagans* Wiedemann, 1828 распространен в Юго-Восточной Азии и в юго-восточной части России. В морфологическом и биологическом отношении близок к *C. torrentium* и *C. pipiens* (Виноградова, 1997).

Представляют ли таксоны *C. pipiens*, *C. molestus*, *C. quinquefasciatus* и *C. pallens* один или несколько биологических видов остается спорным, поскольку существуют доказательства как свободных скрещиваний между формами и существования фертильных гибридов, так и отсутствия гибридизации в симпатрических популяциях. По мнению одних исследователей, *C. quinquefasciatus* представляет собой отдельный вид в составе комплекса (Farajollahi et al., 2011; Harbach, 2012). Другие исследователи (Weitzel et

al., 2009; Becker et al., 2012) считают *C. quinquefasciatus* подвигом *C. pipiens*. Нет единого мнения также и по таксономическому статусу *C. pallens*. Большинство авторов рассматривают *C. pallens* как подвид *C. pipiens* и обозначают как *C. pipiens pallens* (Виноградова 1997; Farajollahi et al., 2011 и др.). Harbach (2012) на симпозиуме "Symposium Global Perspective on the *Culex pipiens* Complex in the 21st Century" предложил лишить *C. pallens* статуса таксономической единицы на основании предположений о его гибридном происхождении. По актуальному определению Systematic Catalog of Culicidae (<http://www.mosquitocatalog.org>) вид *C. pipiens* состоит из двух подвидов: *C. pipiens pipiens* и *C. pipiens pallens*. Подвид *C. pipiens pipiens* состоит из двух форм или экотипов или вариететов - *pipiens* и *molestus*. Таксономический статус последних двух форм до сих пор неясен и варьирует от экотипов (Barr, 1982; Harbach, 1984 и др.) до самостоятельных видов (Knight, Stone, 1978, Miles, 1977). В настоящее время господствует мнение, что *C. pipiens* формы *molestus* ранее был известен как *C. molestus* Forskal, но отсутствие надежных морфологических диагностических признаков привело к тому, что его актуальный таксономический рейтинг сводится до вариетета или формы (Harbach et al., 1984; Becker et al., 2010). В зависимости от точки зрения на статус представителей, в литературе нет единого образца для обозначения членов комплекса. В российской научной литературе принято, что *C. p. pipiens*, *C. p. quinquefasciatus* и *C. p. pallens* являются подвидами, *C. torrentium* - близкий вид в составе комплекса *Culex pipiens*. Подвид *C. p. pipiens* включает автогенную форму *molestus* и неавтогенную форму *pipiens*. В зарубежной научной литературе в настоящий момент принято обозначать *C. quinquefasciatus* и *C. pipiens* как отдельные виды (например, Farajollahi et al., 2011), последний состоит из двух подвидов *C. pipiens pipiens* и *C. pipiens pallens*. *C. p. pipiens* включает две формы: form *pipiens* и f. *molestus*.

Так же, как отсутствует точное понимание таксономического статуса комаров комплекса *Culex pipiens*, не существует до сих пор определенного представления о составе комплекса. Представления о структуре комплекса изменялись во времени от разделения всех, различающихся по какому-либо признаку, членов в отдельные виды до объединения всех морфологически близких форм в единый политипический вид. Со временем и с развитием новых методов диагностики изменяются и представления о структуре комплекса и о ранге его представителей. Разное понимание состава комплекса существует также и в различных географических регионах, в зависимости от распространенности его членов. "Theobald's Genera Insectorum" опубликованный в 1905 был первым "Каталогом комаров". Теобальд перечислял номинальную форму *pipiens*, *fatigans*, *pallens* и *molestus* как виды рода *Culex*, но не включал в комплекс *quinquefasciatus*

ни как вид, ни как синоним какого-либо вида (Harbach, 2012). Согласно представлению о составе комплекса, сформулированному в 1953 году, в его состав включали *C. pipiens* L., *C. quinquefasciatus* Say, *C. molestus* Forskal и *C. pipiens* var. *pallens* Coq. (Виноградова, 1997). Согласно современному Systematic Catalog of Culicidae (<http://www.mosquitocatalog.org>) к комплексу *Culex pipiens* относят следующие виды: *C. pipiens*, *C. quinquefasciatus*, *C. australicus* Dobrotworsky и Drummond и *C. globocoxitus* Dobr. (Farajollahi et al., 2011) и это соответствует представлению о составе комплекса североамериканских исследователей. Существует также более широкое понимание комплекса, когда европейские виды *C. torrentium* и *C. vagans* также включают в состав комплекса *Culex pipiens* (Service, 1968; Onyeka, 1980; Dahl, 1988; Ishii, 1991; Tanaka, 2004). В Европе следующим образом определяют состав комплекса: *C. p. pipiens* как номинальную форму, *C. p. pipiens* формы *molestus* как биотип, *C. p. quinquefasciatus* как подвид и *C. torrentium* как близкородственный вид в составе комплекса (Becker et al., 2010). *C. torrentium* Martini как член комплекса (Pipiens Group member) трактуется также английскими исследователями (Danabalan et al., 2012).

### 1.1.2 Генетика комаров рода *Culex*

Основы генетики комаров *C. pipiens* в подробностях изложены в одноименной главе книги "Комары комплекса *Culex pipiens* в России", написанной И. А. Захаровым (Виноградова, 1997). Хромосомный набор *C. pipiens* состоит из 3 пар хромосом, хромосомы первой пары короче остальных. У *C. pipiens* отсутствуют половые хромосомы, а пол определяется одним геном (*M*), локализованным в первой хромосоме (Gilchrist, Haldane, 1947; Drenth, 1975). По гену, определяющему пол комара, самки гомозиготны и имеют генотип *mm*, а самцы гетерозиготны - *Mm*. Аллель, определяющий развитие по мужскому типу, всегда доминантный. Механизм генетической детерминации пола у *C. pipiens* был определен после открытия мутации *white* (*w*) - белоглазость (Gilchrist, Haldane, 1947). В генетических экспериментах удалось установить связь этой мутации с геном, определяющим пол (Захаров, 1997).

Локализация кластера генов рРНК на 1-ой хромосоме была доказана с помощью метода гибридизации *in situ* с митотическими хромосомами (Kumar, Rai, 1990). У *C. pipiens* число копий кластера составляет  $87 \pm 3.2$ , что намного меньше, чем у комаров рода *Aedes*, у которых число копий достигает 1000.

У *C. pipiens* в геноме обнаружено много копий полной длины повторяющегося элемента, обозначенного Juan-C (Mouches et al., 1990). Полноразмерные элементы Juan-C



имеют длину 4,48 кб. Они терминируются на одном конце аденозин-богатой последовательностью, которой предшествует сигнал полиаденилирования ААТААА, не имеют концевых повторов и вызывают дупликацию ДНК хозяина в месте их интеграции. Полноразмерная копия Juan-C имеет две длинные открытые рамки считывания и потенциально кодирует два белка. Первый включает в себя домен типичного белка, связывающего нуклеиновые кислоты, в то время как второй похож на обратные транскриптазы. Таким образом, Juan-C элементы похожи на LINE ретрозоны в их общей генетической организации. Juan-C элементы наиболее близки по нуклеотидной последовательности и потенциалу кодирования к элементам Juan-A, которые встречаются у комаров видов, принадлежащих к роду *Aedes*. Они также показывают гомологию с некоторыми LINE ретропозонами *Drosophila*, такими как Jockey. Вероятно, все эти элементы возникли из общего предшественника. Почти идентичные полноразмерные Juan-C амплифицируются в *C. pipiens* из разных континентов. Происхождение Juan-C последовательностей из гомогенного семейства ретротранспозонов доказывает, что эти элементы распространились в популяциях *C. pipiens* относительно недавно (Agarwal et al., 1993).

У комаров рода *Culex*, как и у других комаров, в слюнных железах и мальпигиевых сосудах личинок наблюдаются политенные хромосомы как результат последовательно происходящих в клетках эндомитозов. Были проведены генетические эксперименты по скрещиванию нескольких линий комаров с выявленными мутациями. Удалось установить расположение некоторых генов на хромосомах путем сравнения темпов мутаций у гибридных особей с точками разрывов при хромосомных абберациях в хромосомах слюнных желез личинок (Dennhöfer, 1975): эти эксперименты подтвердили группы сцепления и их локализацию на хромосомах. Ген *M*, определяющий пол расположен рядом с геном белоглазости *w*. На первой хромосоме расположен также ген *r*, определяющий красную окраску глаз. На второй хромосоме расположены ген *d*, определяющий окраску глаз личинок и ген *ru*, рубиновые глаза. На третьей хромосоме - ген *kps*, определяющий укорочение пальп у самцов. Более полный список генов, которые удалось генетически картировать и карта групп сцепления представлен в обзоре Захарова (1997).

Мутации морфологических признаков служат генетическими маркерами при анализе наследования сложных физиологических признаков. Одним из таких признаков, который варьирует у членов комплекса *Culex pipiens*, является проявление автогенности.

Признак автогенности - способность самок к откладке первой порции яиц без предварительного кровососания. Автогенность определяется генетически и регулируется аллелями в локусе на третьей хромосоме, так же, как и локусом на половой хромосоме. Генетические эксперименты, которые прояснили наследование автогенности, выполнены Khan в 1963г. (Захаров 1997). Скрещивались две линии, автогенная из Европы и неавтогенная - из Северной америки. Видимые мутации маркировали все три хромосомы первой линии, что позволяло контролировать состав хромосом потомства от скрещиваний. Были изучены гибриды 1-го и 2-го поколения и потомство от скрещивания гибридов с родительскими формами (беккроссов). Гибриды первого поколения в большинстве случаев оказались автогенными, что свидетельствует о доминантности признака. Потомство 2-го поколения и потомки беккроссов проявляли свойство автогенности пропорционально количеству в их генофонде хромосом от автогенного родителя. Было обнаружено, что вклад второй хромосомы в проявление автогенности отсутствует, максимальное проявление автогенности наблюдалось когда гибрид получал 1-ю и 3-ю хромосомы от автогенного родителя. Из этого эксперимента следует, что за автогенность отвечают несколько генов, расположенные в 1-ой и 3-ей хромосомах. Более того, было обнаружено, что разные варианты 3-ей хромосомы по-разному влияют на проявление признака, по-видимому, существуют разные по силе проявления аллели гена. Khan обозначил ген в первой хромосоме как  $D/d$ , а ген в третьей хромосоме как серию аллелей  $a_1$ ,  $a_2$  и  $a_3$ . Генотип автогенной особи, согласно этой гипотезе, выглядит  $D/D a_1/a_2$ , а неавтогенной -  $d/d a_2/a_3$ . Эту гипотезу подтвердили Aslamkhan и Laven (1970), которые также пришли к выводу, что автогенность определяется доминантным геном  $D$ , сцепленным с фактором пола на первой хромосоме, и одним из аллелей гена, расположенного на 3-ей хромосоме. Гетерозиготность родительских особей по гену  $a$ , согласно этой гипотезе, объясняет неполное проявление признака уже в первом поколении (Захаров, 1997).

Однако, возможно, имеет место различная пенетрантность проявления такого сложного физиологического признака, как автогенность у *C. pipiens*, и именно с этим может быть связано появление неавтогенных особей среди гибридов первого поколения (Захаров, 1997). Действительно, во многих экспериментах автогенность наследовалась как доминантный признак (Spielman, 1971; Виноградова, 1997; Shaikovich, Fyodorova, Karan, 2009; Kassim et al., 2012). Однако, проявление способности к автогенной откладке яиц может зависеть от запаса питательных веществ. Генетически неавтогенные комары не могут стать автогенными путем избыточного питания личинок, но автогенное развитие

может быть подавлено недостатком или переизбытком питания генетически автогенных личинок (Spielman, 1971). Доля автогенных самок варьировала в экспериментах по частоте проявления автогенности, но никогда не достигала 100% (Spielman, 1971; Виноградова, 1997; Shaikevich, Fyodorova, Karan, 2009; Kassim et al., 2012).

### **Наследование способности спариваться в замкнутом пространстве (стеногамности)**

У большинства комаров спаривание происходит в роях на открытом пространстве, это свойство названо эвригамностью. Способность спариваться в замкнутом пространстве названа стеногамностью. Эксперименты Сичинава Ш. Г. по изучению наследования типов спаривания описаны в монографии Виноградовой (1997). В опытах по скрещиванию неавтогенных, стено-эвригамных, гетеродинамных, экзофильных комаров с комарами автогенной формы (в обоих направлениях) роения не наблюдалось, а единичные пары скрещивались на стенках садков. Доля осемененных при скрещивании самок неавтогенной формы с самцами автогенной формы составляла 28,6%, при реципрокном скрещивании доля осемененных самок составляла 41,2% (Сичинава, 1975). Гибриды 1-8 поколения спаривались также не роясь, единичные особи спаривались в воздухе, доля осемененных составляла 66-100%. Это были эксперименты в лабораторных садках, которые доказали, что гибриды в основном, начиная с первого поколения, наследуют стеногамность, и только небольшая часть гибридов копулировала с роением в воздухе. Описаны и другие эксперименты, подтверждающие доминирование признака стеногамности (Виноградова, 1997).

### **Наследование способности к формированию диапаузы**

Способность формировать зимнюю диапаузу является рецессивным признаком, им обладают *C. p. pipiens* формы *pipiens* и *C. torrentium*. Все гибриды первого поколения не диапаузируют. Скрещивания лабораторных линий диапаузирующих *C. p. pipiens* и неспособных к диапаузе *C. p. quinquefasciatus* подтвердили, что состояние неспособности к формированию диапаузы является доминирующим, и лишь 7% гибридов первого поколения диапаузируют (Wilton, Smith, 1985). Действительно, различные возвратные скрещивания показывают, что 75% генома должны быть *C. p. pipiens* по происхождению, прежде чем значительное число образцов (43%) проявят свойство диапаузировать (Wilton, Smith, 1985). Таким образом, вероятно, существует определенная степень

приспособленности, связанная с диапаузой, которая и помогает поддерживать чистоту подвидов на обоих концах ареалов распространения *C. p. pipiens* и *C. p. quinquefasciatus* (Kothera et al., 2009). Подобное явление было показано в исследованиях, проведенных на *Drosophila melanogaster*, результаты которых позволили авторам предположить, что баланс преимуществ и недостатков приспособленности существует для форм, которые диапаузируют по сравнению с теми которые этого не делают (Harshman, Hoffmann, 2000; Schmidt et al., 2005). Формы, которые не диапаузируют зрелыми, воспроизводятся скорее, имеют более короткие продолжительности жизни, и меньше способны реагировать на экологический стресс по сравнению с особями, способными к диапаузе (Tatar et al., 2001). Члены комплекса *Culex pipiens* вероятно испытывают аналогичные компромиссы, которые могут ограничивать площадь интрогрессии между подвидами (Kothera et al., 2009). Исследования наследования локусов количественных признаков (QTL) в лабораторных скрещиваниях *C. p. pipiens* и *C. p. quinquefasciatus* выявило наличие гетерозиса у гибридов, когда некоторые QTL фенотипы, гетерозиготные по признакам, связанным с диапаузой, были вне диапазона обоих родителей (Mori et al., 2007). Авторы предполагают, что гетерозис во всей гибридной зоне может позволить популяциям адаптироваться к местным условиям окружающей среды. Таким образом, гетерозис в средних широтах в сочетании с сильным отбором способности к диапаузе в северных регионах и селекции против диапаузы в южных областях делают возможным поддержание подвидовой идентичности в северных и южных районах и существование широкой, стабильной гибридной зоны в США (Kothera et al., 2009).

### **Генетика устойчивости к инсектицидам**

Применение инсектицидов в борьбе с комарами привело к возникновению устойчивых популяций. Проведенный генетический анализ показал, что резистентность является следствием мутаций в отдельных генах. У *Culex pipiens* были картированы ген устойчивости к ДДТ (*DDT*), ген устойчивости к фентиону (*FR*) и ген устойчивости к малатиону (*MR*). Все они расположены на 2-ой хромосоме (Захаров, 1997). Устойчивость комаров к фосфорорганическим инсектицидам была изучена подробно и обнаружены механизмы развития резистентности и распространение устойчивости к инсектицидам в популяциях комаров. Фосфорорганические соединения нейтрализуются ферментами из группы эстераз путем гидролиза. Увеличение количества копий эстераз усиливает резистентность комаров к инсектициду. У *Culex pipiens* с помощью электрофореза белков обнаружены два фермента-эстеразы, А и В. Гены, кодирующие белки эстеразы А и

эстеразы В тесно сцеплены, располагаются на 2-ой хромосоме и наследуются совместно (Pasteur et al., 1981). Найдены несколько аллельных вариантов каждого гена эстераз. При появлении резистентности выработка эстеразы *A1* у *C. p. pipiens* увеличилась в 70 раз, у *C. p. quinquefasciatus* в устойчивых линиях увеличилась выработка эстеразы *B1* в 500 раз (Mounches et al., 1986). Обнаружено, что у устойчивых линий произошла амплификация участка хромосомы, размером 25 кб, в состав которого входит ген эстеразы *B1* (2,8 кб). В этот же участок включены две копии повтора *Juan*, который вероятно способствует амплификации (Mounches et al., 1986). Устойчивость стабильно сохраняется в поколениях, амплифицированные копии наследуются моногенно, как единый блок и уровень резистентности сохранялся на протяжении 60 поколений в течение 3 лет (Raymond et al., 1993).

Позже были обнаружены и другие варианты эстераз. В устойчивых популяциях Средиземноморья обнаружен вариант *A1*, в Северной Америке – *B1*, в восточном Средиземноморье – *A4-B4*, на Кипре – *A5-B5*. Было обнаружено, что вариант *A2-B2* наследуется всегда сцепленно (Vaughan et al., 1997) и распространен в разных странах на трех континентах – Африке, Евразии и Северной Америке (Quiao, Raymond, 1995; Vaughan et al., 1997).

Чтобы определить, являются ли эстеразы *B2* и *B1*, выявленные в электрофоретических исследованиях комаров *C. pipiens* из разных стран, продуктом сверхпроизводства из-за амплификации одних и тех же участков ДНК, амплифицированные области, охватывающие структурные гены эстераз *B2* (Raymond et al., 1991) и *B1* (Quiao, Raymond, 1995) охарактеризовали рестрикционным картированием. Было обнаружено, что во всех устойчивых популяциях *C. pipiens*, обладающих амплифицированным вариантом гена эстеразы *B2*, встречается его одинаковый вариант, независимо от их географического происхождения. Идентичный амплифицирующийся гаплотип был найден в комарах с белком эстеразы *B1* из Французской Гвианы, Венесуэлы, Пуэрто-Рико, Калифорнии и Китая. У особей из устойчивых линий наблюдались различия в уровнях амплификации. У комаров из чувствительных популяций обнаружен значительный полиморфизм гена эстеразы *B*. Был сделан вывод, что произошло однократное возникновение устойчивой формы и амплификация *B1* имеет единое происхождение, либо в Америке либо в Азии, и впоследствии распространилась путем миграции. Эта миграция носит более ограниченный характер, чем у эстераз *A2-B2*, так как обнаружение *B1* ограничивается территорией Америки, Карибского моря и части Китая, в то время как распределение *A2-B2* включает Северную и Южную Америку, Карибский бассейн, Азию, Африку, острова Тихого океана и Европу (Quiao, Raymond, 1995). Позже

для аллеля *B1* были обнаружены новые варианты и независимое увеличение копий генов эстераз на Кубе (Vaughan et al., 1995), в Средиземноморье (Quiao, Raymond, 1995), на Шри-Ланке и на Карибских островах (Small et al., 1999), однако, для амплифицированного аллеля *B2* доказано единое происхождение и последующее распространение комаров со сверхпродукцией эстераз *A2-B2* (Small et al., 1999). Распространение комаров с увеличенным количеством копий эстераз *A2-B2* произошло в течение одного десятилетия (Raymond et al., 1991).

### 1.1.3 Экология

В отличие от морфологии, поведение и физиология представителей комплекса характеризуются рядом определенных особенностей. К основным поведенческим и физиологическим различиям относятся тип спаривания, способность к автогенному овогенезу и формированию диапаузы, пищевые предпочтения и суточные ритмы летной активности. Эти характерные признаки поведения комаров детально рассмотрены в монографии Виноградовой (1997). Особенностью комплекса является то, что имеются значительные экофизиологические различия между морфологически схожими видами и формами (табл. 1). Комары *C. pipiens* – переносчики возбудителей таких заболеваний человека и животных, как энцефалиты, филляриоз, ЛЗН и др. *C. torrentium* известен как переносчик вируса Синдбис (Sindbis). Морфологически неразличимые виды по-разному участвуют в переносе возбудителей особо опасных инфекций. Обнаружение многочисленных очагов опасных инфекционных заболеваний требует анализа роли каждого из возможных переносчиков и, соответственно, их точной идентификации.

Таблица 1. Обзор признаков, используемых для разделения членов комплекса *Culex pipiens* (Vinogradova, 2003; Cornel et al., 2003; Harbach, 2012)

| Признак                    | <i>C. p. quinquefasciatus</i> | <i>C. p. pipiens f. pipiens</i> | <i>C. p. pipiens f. molestus</i> | <i>C. p. pallens</i> | <i>Culex torrentium</i> |
|----------------------------|-------------------------------|---------------------------------|----------------------------------|----------------------|-------------------------|
| Диапауза                   | варьирует                     | +                               | -                                | +                    | +                       |
| Автогенность               | варьирует                     | -                               | +                                | -                    | -                       |
| Роение:                    |                               |                                 |                                  |                      |                         |
| Стеногамность              | +                             | -                               | +                                | +                    | -                       |
| Эвригамность               | -                             | +                               | -                                | -                    | +                       |
| Место спаривание           | наземное                      | наземное                        | на- и подземное                  | наземное             | наземное                |
| Генитальный индекс самцов  | DV/D индекс >0,4              | DV/D индекс <0,2                | DV/D индекс <0,2                 | DV/D индекс 0,2-0,4  |                         |
| Сифональный индекс личинок | <3.5                          | >4.7                            | <4.5                             | 4                    | 6-7                     |

## Роение и спаривание

Роятся самцы комаров, в сумерках, на высоте 2-3 (Bullini, Coluzzi, 1980) или 5-10 (Ганушкина, Дремова, 2006) метров над землей. Способность спариваться в большом пространстве с образованием роя называют эвригамностью. Способность спариваться в небольшом пространстве, без роения, называют стеногамностью. Эвригамными считаются *C. p. pipiens* формы *pipiens*, *C. australicus*, *C. torrentium* и *C. vagans*. Стеногамными - *C. p. pipiens* f. *molestus*, *C. p. pallens* и *C. p. quinquefasciatus*. Самцы разных подвидов образуют отдельные рои, хотя яйца самки откладывают в одни и те же водоемы (Service, 1968). Описаны и стено-эвригамные популяции *C. p. pipiens* в южных регионах с теплым климатом, таких как Север Африки, Юг Франции, Грузия (Виноградова, 1997).

## Автогенность

Вторая черта, которая варьирует у членов комплекса *Culex pipiens* это проявление автогенности, или способность откладывать яйца без предварительного питания кровью позвоночных животных (включая человека). Автогенным путем развивается первая порция яиц только у *C. p. pipiens* формы *molestus*. Сразу после выхода самки формы *molestus* из куколки автоматически выделяется гонадотропный гормон, что, при достаточном запасе питательных веществ, приводит к созреванию яичников. У самок неавтогенной формы *pipiens* стимулом к выделению этого гормона является кровососание (Виноградова, 1997). Автогенность является признаком характеризующим комаров *C. p. pipiens* формы *molestus*, которые в холодном климате выживают в подземных местах обитания, таких, как затопленные водой подвалы домов и сточные воды в городских тоннелях, например, метро (Fonseca et al., 2004; Spielman, 2001; Виноградова, 2008). Но автогенность также распространена в наземных популяциях *C. p. pipiens* формы *molestus* в мягком климате, например, в южной Европе (Gomes et al., 2009), Северной Африке (Knight, Malek, 1951), Калифорнии (Iltis, 1966; Strickman, Fonseca, 2012) и Австралии (Kassim et al., 2012). *C. p. pipiens* формы *pipiens*, *C. australicus*, *C. torrentium* и *C. vagans*, *C. p. pallens* и *C. p. quinquefasciatus* считаются неавтогенными, но известны случаи проявления автогенности в двух африканских популяциях *C. p. quinquefasciatus* в Сенегале (Hamon et al., 1967) и в Танзании (Bushrod, 1978) и выделение автогенной колонии из лабораторной культуры *C. p. pallens* в Японии (Sasa et al., 1966).



## Диапауза

В условиях умеренного климата самки *C. p. pipiens* формы *pipiens*, *C. p. pallens*, *C. torrentium* и *C. vagans* зимуют в состоянии репродуктивной диапаузы. Для *C. quinquefasciatus* и *C. p. pipiens* формы *molestus* характерно гомодинамное развитие, они размножаются круглый год. В Северной Америке южная граница распределения *C. p. pipiens*, как полагают, ограничивается в широтах, где фотопериод достаточно длинный, чтобы сломать диапаузу (Spielman, 2001). В противоположность этому, *C. p. quinquefasciatus* не входит в диапаузу зимой и неспособность *C. p. quinquefasciatus* и гибридных образцов со значительной долей генома *C. p. quinquefasciatus* к диапаузе при воздействии коротких световых дней, предшествующих суровым зимним условиям, является вероятным ограничением северной границы распространения этого подвида (Wilton, Smith, 1985). *C. p. pipiens* формы *molestus* приспособились к условиям влажных подвальных помещений в умеренном климате и таким образом переживают зиму. При скрещивании автогенных самок и неавтогенных самцов *C. p. pipiens* в подходящих условиях диапаузу формировали только самки отцовской линии (Spielman, Wong, 1973). Проявление диапаузы у гибридов и беккроссов *C. p. quinquefasciatus* и *C. p. pipiens* отрицательно коррелировало с долей генома *C. p. quinquefasciatus* (Wilton, Smith, 1985), в других исследованиях гибриды от скрещиваний *C. p. pipiens* и *C. p. quinquefasciatus* вообще не диапаузировали (Mori et al., 2007).

Диапауза индуцируется сигналами окружающей среды, которые испытывают комары уже на стадии куколки: в первую очередь укороченными фотопериодами (длительность светового дня) и во вторую очередь пониженной температурой воды в конце лета и начале осени в северных широтах. Синдром диапаузы включает в себя набор событий, таких как гормонально обусловленное прекращение развития яичников, снижение поисковой активности, метаболические изменения, ведущие к постепенному накоплению запасов жирового тела (до 66% от сухого веса) и изменение модели поведения. Последнее включает в себя отрицательный фототаксис (перемещение организма в сторону от света), пониженную двигательную активность и изменения поведения, ориентированного на прокормителя - у диапаузирующих самок в периферических рецепторах теряется чувствительность к аттрактантам хозяина (молочной кислоте), что объясняет их низкую активность как кровососущих (Vinogradova, 2003). В конце лета при понижении температуры среды примерно до 16°C и сокращении светлого времени суток до 9 часов у самок происходит изменение обмена веществ, которое приводит к накоплению жировых запасов. Накопление питательных веществ происходит

еще на преимагинальной стадии, стадии куколки. Зимуют обычно оплодотворенные, не питавшиеся кровью самки в пещерах, подвалах и погребах жилых домов при температуре 5-10°C. Выход из состояния диапаузы и вылет комаров происходит при температуре воздуха 10-15°C и увеличении длины светового дня до 15 часов. Для насекомых характерно и спонтанное прекращение диапаузы. Пережившие зиму особи как правило не составляют более 10-20% от первоначальной популяции (Виноградова, 1997). Способность к формированию диапаузы может служить изолирующим механизмом в условиях умеренных широт. Не способные к диапаузированию гибриды погибнут в холодное время года. Этот признак является относительно стабильным в пределах таксонов в комплексе.

### Предпочтения в питании

Третья черта, которая значительно варьирует в пределах комплекса, это склонность к питанию кровью птиц или кровью млекопитающих для производства яиц. *C. p. pipiens* f. *pipiens* считается преимущественно орнитофильным; *C. p. pipiens* f. *molestus*, *C. p. pallens* и *C. p. quinquefasciatus* охотно питаются кровью как птиц, так и млекопитающих, включая человека; *C. torrentium* считается исключительно орнитофильным видом (табл. 2).

Важная роль в передаче возбудителей инфекций связана с широким спектром хозяев, на которых эти комары питаются и с высокой распространенностью комаров в урбанизированных областях. Их точная роль и значение в различных аспектах передачи (например, среди птиц, или от птиц к людям или другим млекопитающим, таким как домашний скот) в последнее время интенсивно обсуждается, и становится все более очевидной. Вариации в питании между различными видами комаров и разными популяциями внутри вида играют важную роль в передаче патогенов. Например, в Юго-Восточной Азии *C. p. quinquefasciatus* питается преимущественно на людях и является основным переносчиком человеческого лимфатического филяриоза, в то время как на Гавайях *C. p. quinquefasciatus* питается преимущественно на птицах, и поэтому является эффективным переносчиком местных видов птичьей малярии (*Plasmodium relictum*) и птичьей оспы среди эндемичных, находящихся под угрозой исчезновения птиц (Fonseca et al., 1998; Van Riper et al., 1986).

**Таблица 2.** Распространение, пищевые предпочтения членов комплекса *Culex pipiens* и основные заболевания, возбудителей которых переносят.

| Таксон                                     | Место обитания   | Пищевые предпочтения   | Основные инфекционные заболевания, возбудителей которых переносят  |
|--|--|--|--|
| <i>C. p. pipiens</i><br><i>f. pipiens</i>  | Зона умеренного климата:<br>Европа, Африка,<br>нетропическая<br>Азия и Америка | орнито- зоо- и,<br>в отсутствии<br>прокормителя,<br>антропофилия | филяриоз, западный лошадиный энцефалит, японский энцефалит, энцефалит Сан-Луи, лихорадка Западного Нила, лихорадка долины Рифт, Иссык-Кульская лихорадка, малярия домашней птицы и туляремия |
| <i>C. p. pipiens</i><br><i>f. molestus</i> | Там же, где и<br><i>f. pipiens</i> и в<br>Австралии                            | антропофилия   | филяриоз, западный лошадиный энцефалит, японский энцефалит, энцефалит Сан-Луи, лихорадка Западного Нила, лихорадка долины Рифт, вирус Тягиня   |
| <i>C. p.</i><br><i>quinquefasciatus</i>    | Тропики и субтропики: США, Индия, Китай, Азия, Япония, Африка, Австралия       | антропо- орнито- и зоофилия                                      | филяриоз, дирофиляриоз, японский энцефалит, энцефалит Сан-Луи, вирус Оропуш, малярия домашней птицы, птичья оспа, лихорадка долины Рифт, лихорадка Западного Нила                            |
| <i>C. p.</i><br><i>pallens</i>             | Япония, Китай, Сев. Америка  | антропо- и орнитофилия   | филяриоз, дирофиляриоз, японский энцефалит   |
| <i>Culex torrentium</i>                    | Европа, Зап. Сибирь, Малая Азия  | орнитофилия  | Карельская лихорадка   |

Считается, что комары *C. p. pipiens* формы *pipiens* питаются преимущественно на птицах, а формы *molestus* - на людях (Виноградова, 1997), что определяет их разное эпидемиологическое значение: первые осуществляют циркуляцию вируса по цепи птица-комар-птица, тогда как вторые передают возбудителя от птицы к человеку. Принято считать, что заражение человека арбовирусными инфекциями происходит в результате именно такой, смешанной модели питания. Однако отсутствие морфологических различий между формами затрудняет решение этого вопроса. До сих пор остается неясной точная роль различных комаров в циклах передачи арбовирусов.

### Биотопические предпочтения

Комары комплекса обладают поразительной способностью к адаптации. Они распространены повсеместно как в тропических, так и в умеренных континентальных регионах. Как у всех двукрылых, жизненный цикл комаров *C. pipiens* проходит с полным превращением, особь проходит четыре стадии развития: яйцо, личинка (четыре стадии), куколка и взрослая особь. Три первые стадии проходят в водной среде. Типы водоемов, в которых способны откладывать кладки самки *Culex*, многообразны: естественные и искусственные, наземные и подземные, открытые и закрытые, городские и за пределами населенных пунктов. Эти комары способны размножаться в любом подходящем водоеме, канаве, бочке и т.д. *C. pipiens* могут размножаться даже в очень небольших водных контейнерах, таких как использованные шины, кладбищенские вазы и глиняные кувшины (Becker et al., 2010). Самки откладывают кладки размером несколько миллиметров на поверхность воды.

Среди всех членов комплекса *C. pipiens*, только *C. p. pipiens* формы *molestus* способны выплываться в закрытых водоемах - залитых водой подвалах или туннелях. Но если температурные условия позволяют, то и самки формы *molestus* охотно откладывают яйца в открытых водоемах, например, в южных странах или летом в умеренном климате (Виноградова, 1997; Gomes et al., 2009). Остальные члены комплекса предпочитают открытые водоемы. Низкая численность *C. pipiens* отмечается в первой половине лета и её резкое возрастание во второй половине июля — августе. Ко второй половине лета приурочена и максимальная активность нападения комаров *C. pipiens* на людей.

### 1.1.4 *Culex torrentium* и *C. pipiens*

*Culex torrentium* Martini встречается в западных регионах Палеарктики, где, в связи с его близким морфологическим сходством с *C. pipiens*, ситуация до недавнего времени была запутанная. Вид был описан в 1925 году, когда систематика комаров уже значительно продвинулась (Harbach, 1985). *C. torrentium* - эвригамные, диапаузирующие, неавтогенные, орнитофильные комары, и по этим физиологическим характеристикам не отличаются от *C. p. pipiens* формы *pipiens*. *C. torrentium* является также, как и *C. p. pipiens* палеарктическим видом, распространенным в Северной и Центральной Европе, Малой Азии, Иране и на востоке до Западной Сибири (Виноградова, 1997). В Западной Европе *C. torrentium* распространен повсеместно от Скандинавского полуострова до Португалии, включая Англию (Mattingly, 1951; Service 1968; Dahl, 1988; Ribeiro, Ramos, 1999; Hesson et al., 2013). По сравнению с *C. p. pipiens*, комары *C. torrentium* приспособлены к более низким температурам воды и доминируют в холодных регионах или на больших высотах (Weitzel et al., 2011). Южная граница распространения *C. torrentium* не ясна, но ареал *C. p. pipiens* распространяется много южнее и доходит до севера Африки. До 1950-х годов *C. torrentium* считался редким в Центральной и Западной Европе, в 1969 году наличие *C. torrentium* сообщалось только в четырех населенных пунктах в центральной и южной Германии (Rudolf et al., 2013). Кроме того, *C. torrentium* является единственным видом рода *Culex*, обнаруженным в дуплах деревьев (Онуека, 1980). По наблюдениям Becker и соавторов (2003), развитие личинок *C. torrentium* происходит медленнее, чем у *C. p. pipiens*, что в северных странах может привести к появлению только одного поколения в год. Взрослые особи живут в течение лета до первых морозов. Зимуют у *C. torrentium*, также как и у *C. p. pipiens*, оплодотворенные, диапаузирующие самки в подходящих убежищах, таких как полые стволы деревьев, пещеры или подвалы (Виноградова, 1997; Becker et al., 2003). Взрослые особи питаются нектаром цветов, в основном ночью, самки считаются орнитофильными и, в отличие от *C. pipiens*, никогда не кусали человека (Becker et al., 2003). Комары *C. torrentium* являются переносчиками вируса Sinbis (Ockelbo) среди птиц (Service, 1968; Jöst et al., 2010). Исследования переносчиков и программы по борьбе с ними требуют разделения чисто орнитофильного *C. torrentium* и частично антропофильного *C. pipiens*. Виды комаров, питающиеся на птицах, могут действовать как переносчики между особями, популяциями и видами, увеличивая частоту вирусов в популяциях птиц.

На территории России *C. torrentium* был отмечен в Ленинградской (Мончадский, 1951), Новгородской (Кункова, Федорова, 2003), Московской (Виноградская, 1970), Пензенской, Саратовской и Волгоградской областях (Оленев, 1940), а также на юге Карелии (Шарков, 1980). На востоке, по данным Кухарчук (1980), доходит до Иртыша и Оби, в частности найден в Северном Зауралье (Сюткина, Котельникова, 1965), Томской области (Красикова, 1966) и Омске (Федоров и др., 1970).

Во многих частях ареала *C. torrentium* обитает симпатрично с *C. pipiens*, от которого морфологически отличается с трудом (Гуцевич и др., 1970; Dahl, 1988). Предлагались разные диагностические признаки для идентификации этих видов. Мончадский (1951), и, вслед за ним, большинство отечественных специалистов (Гуцевич и др., 1970; Дубицкий, 1970; Кухарчук, 1980; Горностаева, Данилов, 1999) используют в качестве основного отличительного признака личинок расположение пучков волосков на сифоне: у *C. torrentium* наиболее боковое положение занимает последняя из четырех пар пучков, а у *C. pipiens* – третья пара. В Западной Европе был предложен другой признак: волосок, расположенный на X сегменте (1-X) у *C. pipiens* является простым, а у *C. torrentium* состоит из двух ветвей. Однако специальные исследования показали, что у *C. torrentium* наиболее боковое положение на сифоне также обычно занимает третья пара пучков волосков (Виноградская, 1970), и у обоих видов щетинка на X сегменте может быть как простой, так и удвоенной (Service, 1968). Harbach с соавторами указывают, что у личинок *C. torrentium* щетинки 3-I, 3-VII и 1-X чаще состоят из двух волосков, (3-I иногда из трех), чем у *C. pipiens*, причем все три щетинки не бывают у *C. torrentium* одновременно простыми, а у *C. pipiens* - одновременно удвоенными (Harbach et al., 1984). В дальнейшем эти положения не подтвердились (Dahl, 1988), в связи с чем в настоящее время идентификацию этих видов по личинкам вряд ли можно считать возможной.

Для различения самок *C. torrentium* и *C. pipiens* в западных определительных таблицах используется следующий признак: отношение  $R_2$  к  $R_{2+3}$  у *C. torrentium* меньше 4, а у *C. pipiens* - больше 4 (Ribeiro, Ramos, 1999). В отечественной литературе обычно подчеркивается отсутствие морфологических отличий у самок этих видов (Гуцевич и др., 1970; Дубицкий, 1970; Кухарчук, 1980; Горностаева, Данилов, 1999).

Всеми исследователями признается, что наиболее надежным диагностическим признаком имаго является строение гениталиев самцов (Гуцевич и др., 1970; Dahl, 1988 и др.), однако и здесь нет единого мнения, поскольку некоторые важные для диагностики признаки обладают значительной изменчивостью и перекрываются (Dahl, 1988). На

основании анализа большого материала Дал (Dahl, 1988) предлагает использовать следующие признаки: 1) у *C. torrentium* X сегмент имеет длинный, изогнутый и сильно склеротизованный базальный отросток, а у *C. pipiens* такой отросток либо отсутствует либо представлен небольшим палочковидным слабо склеротизованным выступом; 2) латеральная пластинка у *C. torrentium* имеет хорошо выраженный листовидный базальный отросток, который отсутствует у *C. pipiens*. Виноградская (1970), изучавшая комаров из подмосковных популяций, указывает в качестве второго признака следующую особенность: у *C. torrentium* дорсальная лопасть второго отдела фаллосомы направлена дистально, а у *C. pipiens* нет “лопасти, направленной дистально”.

*C. torrentium* практически неотличимы по строению гипопигия от *C. vagans*. Но по окраске оба вида хорошо отличаются: у *C. vagans* спереди на бедрах и голених развиты продольные полосы белых чешуек, отсутствующие у *C. torrentium*. Степень развития этого признака варьирует. Встречаются экземпляры с едва выраженными полосками, почти неотличимые от *C. torrentium*. Существует мнение, что *C. torrentium* следовало бы рассматривать как подвид *C. vagans*, тем более что обе формы сходны экологически (Гуцевич и др., 1970).

Дифференциация имаго *C. torrentium* и *C. pipiens* по морфологическим признакам является трудоемкой и может быть сделана только специалистом. К тому же признаки по которым проводится диагностика подвержены изменчивости (Федорова, Шайкевич, 2007). Возможно, ранее ошибочно определяли *C. torrentium* как *C. pipiens* и наоборот. Часто исследователи обозначают эти виды как комплекс *C. pipiens* / *C. torrentium* (например, Francy et al., 1989; Schäfer et al., 2004; Rudolf et al., 2013; Hesson et al., 2013), подчеркивая сложность точной идентификации и ранее, вероятно, пренебрегали существованием *C. torrentium* при исследовании природных популяций, не только в России, но и в Европе (Lundström, 1994; Rydzanicz, Lonc, 2003).

Таким образом, представления о количественном, пространственном и временном распределении обоих видов являются до сих пор неясными и неполными на большей территории распространения *C. torrentium* и *C. pipiens*. В последние годы, благодаря развитию методов молекулярно-генетического анализа ареал распространения *C. torrentium* пересматривается. Такие исследования проведены на европейской части России (Виноградова, Шайкевич, 2005; Федорова, Шайкевич, 2007; Vinogradova et al., 2007), на территории Западной Сибири (Храброва и др., 2005), в центральной и южной Европе (Weitzel et al., 2011, Hesson et al., 2013), в Швеции (Hesson et al., 2011), в Англии

(Danabalan et al., 2012), в Германии (Rudolf et al., 2013). Анализ данных последних лет позволяет предположить, что явное увеличение численности и распространенности *C. torrentium* в последние годы, может объясняться экологическими адаптациями и антропогенным распространением (Rudolf et al., 2013), но также может быть результатом более тщательного анализа популяций после разработки молекулярно-генетических методов диагностики (Виноградова, Шайкевич, 2005; Федорова, Шайкевич, 2007). В настоящее время, доказано, что *C. torrentium* является широко распространенным в Европе, хотя точные границы распределения должны быть еще определены. Таксономический статус *C. torrentium* в комплексе *C. pipiens* и его филогенетические связи с членами комплекса до конца не установлены и являются предметом обсуждения.

### 1.1.5 *C. p. pipiens* и *C. p. quinquefasciatus*

Подвиды *C. p. pipiens* и *C. p. quinquefasciatus* являются наиболее многочисленными членами комплекса. Взрослые самки и личинки *C. p. pipiens* и *C. p. quinquefasciatus* морфологически неотличимы. Единственным надежным морфологическим признаком, который может использоваться для идентификации подвидов является строение мужских половых органов взрослых насекомых: индекс DV/D (Sundaraman, 1949), выраженный как отношение расстояния между вершинами дорзального и вентрального отростков к расстоянию между вершинами дорзальных, широко используется для идентификации (Виноградова, 1997). Подвиды также отличаются по поведению во время спаривания, пищевым предпочтениям, личиночным средам обитания, способности переносить вирусы, способности к автогенности и диапаузированию (табл. 1). *C. p. quinquefasciatus* – преимущественно неавтогенный, стеногамный, антропофильный, не имеет диапаузы. *C. p. pipiens* - преимущественно неавтогенный, эвригамный, орнитофильный, диапаузирует. Разными авторами было доказано, что большинство этих признаков обладают клинальной изменчивостью и, соответственно, не могут быть использованы для идентификации отдельных особей (Ittis, 1966; Spielman, 1967; Hardy, Reeves, 1990).

Распределение подвидов варьирует по широте, *C. p. pipiens* присутствует в регионах с умеренным климатом от субарктических районов Сибири и Скандинавии до полупустынных районов севера Африки (Виноградова, 1997; Harbach, 2012). *C. p. quinquefasciatus* распространен в тропических и субтропических регионах с высокой степенью влажности (Виноградова, 1997; Fonseca et al., 2006). Тем не менее, их диапазон



распределения перекрывается в определенных областях и были зарегистрированы многочисленные случаи гибридизации между подвидами (например Urbanelli et al., 1995; Numeres et al., 1998; McAbee et al., 2008; Kothera et al., 2009; Alves et al., 2010).

В Северной Америке, на основании морфологического анализа - идентификации самцов по соотношению DV/D, было показано наличие только *C. p. pipiens* на широтах выше 39° северной широты в то время как *C. p. quinquefasciatus* был единственным видом, обитающим на широтах ниже 36° с.ш. В районах, расположенных между 36° и 39° с.ш., была впервые описана гибридная зона между двумя видами (Barr, 1957). Исследования полиморфизма белков и ДНК расширили географические рамки "гибридной зоны Барра", предполагая более широкую область между 30° и 40° с.ш. в Северной Америке (Urbanelli et al., 1997; Smith, Fonseca 2004; Cornel et al., 2003; Kothera et al., 2009).

В отличие от американского континента, предполагается, что наличие пустыни Сахара является природным барьером потока генов между *C. p. pipiens* и *C. p. quinquefasciatus* в Палеарктике (Subra, 1981). Однако, есть данные о том, что зоны перекрывания ареалов *C. p. pipiens* и *C. p. quinquefasciatus* существуют в северо-восточной части африканского континента (Harbach, 2012). В регионе Макаронезийских островов была обнаружена зона контакта *C. p. pipiens* и *C. p. quinquefasciatus* в Западной Африке (Gomes et al., 2012): Мадейра, Канарские острова, острова Зеленого Мыса лежат в широтном интервале пустыни Сахары, между 15° и 33° с.ш. На острове Мадейра была найдена однородная популяция *C. p. pipiens*, тогда как на Кабо-Верде обнаружена обширная гибридизация. На островах Брава и Сантьяго, был найден только *C. p. quinquefasciatus*, а в Фогу и Маю была обнаружена высокая частота гибридов (~ 40%) между двумя подвидами. В смешанной популяции было получено второе поколение гибридов (~ 50%), что предполагает отсутствие механизмов изоляции. Наблюдаемые уровни гибридизации, по мнению авторов, могут локально усиливать попадание в организм человека зоонозных арбовирусов, таких как ЛЗН (Gomes et al., 2012).

Были предложены две основные гипотезы о расселении *C. p. pipiens* и *C. p. quinquefasciatus* и о формировании современного комплекса *Culex pipiens* в Северной Америке. Росс (Ross, 1964) предположил, что *C. p. pipiens* формы *pipiens* и *C. p. quinquefasciatus* были независимо ввезены в Северную Америку. *C. p. pipiens* формы *pipiens* пришли из Европы на парусниках колонизаторов, а *C. p. quinquefasciatus* из Африки на невольничьих судах.

Однако Барр (Barr, 1967) выдвинул гипотезу, что исходная форма *C. p. pipiens* формы *pipiens* из тропической Африки (эфиопская область) вторглась в умеренные области Северной Америки. Некоторые из *C. p. pipiens* адаптировались к этому региону,

что привело к формированию современных популяций *C. p. pipiens*, а другие впоследствии медленно распространялись в южную часть региона для создания современной популяции *C. p. quinquefasciatus*. Исследования микросателлитов показали, что популяции *C. p. quinquefasciatus* в Соединенных Штатах обладают гораздо меньшим генетическим разнообразием по сравнению с *C. p. pipiens* формы *pipiens* (Fonseca et al., 2004; Huang et al., 2008; Kothera et al., 2009), что подтверждает гипотезу о том, что *C. p. quinquefasciatus* произошли от *C. p. pipiens* формы *pipiens*. Обнаружение у *C. p. quinquefasciatus* в Северной Америке не только специфических аллелей в кластере рибосомных генов, но и аллелей, характерных всем членам комплекса *C. pipiens* (Huang et al., 2011), поддерживает гипотезу, выдвинутую Барром.

Проверка этих гипотез представляет очень непростую задачу, которая осложняется множественными завозами комаров из-за увеличения мировой торговли и транспортных перевозок. Были доказаны повторные завозы *C. p. quinquefasciatus* на Гавайи (Fonseca et al., 2006) и Галапагосские острова (Bataille et al., 2009). Фонсека и соавторы (2006) обнаружили, что популяции *C. p. quinquefasciatus* тихоокеанских островов отличаются от популяций Северной Америки и в значительной степени заменили первоначально ввезенных из Нового Света *C. p. quinquefasciatus* (Fonseca et al., 2000; Fonseca et al., 2006). Кроме того, на основе микросателлитного анализа популяций *C. p. quinquefasciatus* со всего мира получены свидетельства недавнего повторного введения *C. p. quinquefasciatus* в Западную Африку из Нового Света. Было показано, что генетические профили *C. p. quinquefasciatus* Старого и Нового Света различаются между собой. На сегодняшний день, анализ генетической структуры популяций комаров не позволяет четко определить происхождения *C. p. quinquefasciatus* в Северной Америке (Fonseca et al., 2004; Fonseca et al., 2006). Однако, генетические различия популяций *C. p. quinquefasciatus* между востоком и западом Африки, Азии и тихоокеанскими популяциями коррелируют с эпидемиологией человеческого филяриоза (Fonseca et al., 2006).

### 1.1.6 Две формы *C. p. pipiens*: форма *pipiens* и форма *molestus*

Между двумя формами *C. p. pipiens* морфологические различия перекрываются и в умеренных широтах для дифференциации этих форм как правило используют физиологические признаки: способность к диапаузе, автогенность и стеногамность (табл. 1). В северных странах умеренного климата значение имеет и место обитания: открытый

или закрытый водоем. *C. pipiens* формы *molestus* как правило развиваются круглогодично в закрытых подвальных помещениях. *C. pipiens* формы *pipiens* размножаются в открытых биотопах и зимуют в состоянии диапаузы. В более южных широтах и странах с субтропическим климатом, где нет необходимости формирования диапаузы для переживания холодного времени года, обе формы заселяют открытые водоемы. В зоне субтропиков перекрываются также ареалы распространения *C. p. pipiens* форм *molestus* и *pipiens*, а также и *C. p. quinquefasciatus*, где комары всех типов заселяют открытые водоемы.

В Европе Ficalbi (1890) впервые описал две различные формы *C. p. pipiens* которые отличаются в их пищевом поведении. Одна форма кусает человека, а вторая нет. Roubaud (1929), de Boissezon (1929) и Huff (1929) охарактеризовали две формы *C. p. pipiens* более точно. Одна форма спаривается только тогда, когда есть много свободного места для спаривания в рое, самкам необходимо напитаться крови для созревания яйцекладок, кусает, как правило, только птиц, выплывает в основном в наземных водоемах и диапаузирует в зимний период. Эта форма принимается в качестве типичной формы *C. p. pipiens* биотип *pipiens*. Вторая форма может спариваться в маленьких помещениях без роения (стеногамны) и первая партия яиц созревает у самок без предварительного кровососания (автогенность). Эта форма называется *C. p. pipiens* биотип *molestus*. После откладки первой порции яиц самки питаются кровью млекопитающих, в том числе и человека, и используют ее для увеличения количества яиц в яйцекладках. Эти комары не диапаузируют зимой и обычно размножаются в подземных биотопах с ограниченным доступом к внешнему миру, таких как септики, затопленные подвалы, цистерны. Водоемы такого типа, как правило, сильно загрязнены органическими веществами и не подвергаются охлаждению в зимнее время.

Одной из интерпретаций существования этих двух различных биотипов *C. p. pipiens* является то, что быстрые изменения физиологических и поведенческих черт являются следствием адаптации к местным подземным условиям обитания, связанным с деятельностью человека. Автогенные самки формы *molestus* должны иметь запас питательных веществ из личиночной стадии для производства яиц. Следовательно, автогенные самки должны иметь больший вес тела, чем неавтогенные самки биотипа *pipiens*. Высказано предположение, что экспрессия автогенности находится под влиянием таких факторов окружающей среды, как ограниченный доступ к местам размножения, личиночное питание и длина светового дня (Becker et al., 1999). За счет давления отбора

вполне вероятно, что большинство спариваний в таких типичных подземных местах размножения происходят между особями, которые имеют гены автогенности. Состояние источников питания для личинок, отсутствие хозяев для питания кровью и ограниченное пространство для спаривания влияет на экспрессию автогенности у взрослых особей. Когда самки *C. p. pipiens* попадают в среду обитания с ограниченным доступом (например, цистерны, затопленные подвалы или канализационные канавы), где они вряд ли смогут найти хозяина для питания кровью, потомство погибнет, если самка не сможет производить яйца автогенно, путем использования для производства яиц на взрослой стадии резервов из своей личиночной стадии. Большой запас питательных веществ личинки получают, когда развиваются в местах, богатых питательными веществами. Кроме того, произойдет строгий отбор для спаривания в ограниченном пространстве. Диапаузирование больше не будет необходимым, так как в этих подземных местообитаниях подходящий микроклимат. Поскольку подходящие места для размножения комаров автогенной и стеногамной формы техногенные и тесно связаны с человеком, "выгодно" кусать именно человека вместо птиц. В сельской местности более многочисленны неавтогенные и орнитофильные комары *C. p. pipiens* формы *pipiens*, потому что имеются в достатке природные места размножения - открытые водоемы, и легко доступны птицы в качестве источника пищи.

Альтернативной интерпретацией существования двух поведенческих и физиологических форм является то, что они соответствуют двум отдельным, генетически различным таксонам. Преимущественно северный вид, *C. p. pipiens*, это питающиеся на птицах и неавтогенные комары, которые диапаузируют и нуждаются в открытых пространствах для спаривания. Его южный родственник, *C. molestus*, не диапаузирует и способен спариваться без образования роя в замкнутом пространстве. В этом случае, подвальные популяции, происходящие от автогенного *C. molestus* южной Европы и Северной Африки, колонизировали северные страны, как только были созданы теплые и богатые питательными веществами подземные сооружения - подвалы домов (Mattingly et al., 1951). В южных популяциях сосуществуют как автогенные, так и неавтогенные особи (например Gomes et al., 2009), но автогенность обычно связана с предпочтением крови млекопитающих и, в частности с антропофагией (Mattingly et al., 1951). Действительно, антропофагия была признаком, который первоначально привел к описанию *C. molestus* Forskal 1775 по автогенным Египетским образцам, хотя этот вид позже был синонимизирован с *C. p. pipiens* из-за отсутствия диагностических морфологических признаков (Harbach et al., 1984).

Эти две гипотезы подразумевают различные предположения о генетическом сходстве среди популяций автогенных *molestus* и неавтогенных *pipiens*. Если подземные автогенные популяции северной Европы произошли от наземных *C. p. pipiens*, то они должны быть генетически более тесно связаны с соседними наземными популяциями, чем с автогенными популяциями других географических районов. Если же, автогенные и неавтогенные популяции принадлежат к различным видам, то все автогенные популяции должны представлять собой монофилетическую группу (Fonseca et al., 2004).

Шпильман (Spielman, 1964) постулировал, что *C. p. pipiens* биотип *pipiens* и *C. p. pipiens* биотип *molestus* генетически различны. Он обнаружил, что от автогенных самок рождаются почти исключительно автогенные дочери и от неавтогенных самок соответственно неавтогенные дочери. Но Барр (Barr, 1982) утверждал, что, несмотря на ограниченный поток генов между двумя формами, все же можно предположить значительное количество генных обменов.

Известны несколько изолирующих механизмов в умеренном климате для комаров *pipiens-molestus*. Первый механизм связан со специализацией среды обитания личинок, комары формы *molestus* в северных широтах России, Европы и Северо-Восточных США развиваются в основном в подвалах и других закрытых водоемах, в то время как комары формы *pipiens* предпочитают наземные места разведения (Маркович, Заречная, 1992; Виноградова, 1997; Вугне, Nichols 1999, Vinogradova 2000, Huang et al. 2008, Becker et al., 2012). Эта среда обитания может действовать как барьер для потока генов между формами. Многочисленные данные о морфологических и физиологических различиях биотипов в российских популяциях из открытых и подвальных биотопов обобщены в книге Виноградовой (1997). Методом гель-электрофореза белков были обнаружены различия между двумя формами *C. p. pipiens* в Верхнем Рейне, Германия (Becker et al., 1999), причем 100% популяций из подземных водоемов (более 90% самок в каждой группе) были автогенными. Другим доказательством биотопической изоляции может служить генетическая дифференциация белковых локусов между популяциями из подземных и наземных биотопов в Лондоне, что указывало на отсутствие потока генов между близко расположенными популяциями различных форм, в то же время были обнаружены небольшие различия между различными популяциями каждой формы (Вугне, Nichols, 1999). Механизм биотопической изоляции работает в природе, но он далек от совершенства. Смешанные популяции относительно редко, но все же возникают в обеих средах обитания (Vinogradova, 2003).

Вторым изолирующим механизмом является наследование диапаузы при скрещиваниях форм *pipiens* и *molestus* (Виноградова, 1997). Способность к диапаузе наследуется как рецессивный признак, так что гибриды первого поколения не диапаузируют и обречены в умеренном климате на смерть зимой: лишь немногие особи из гибридов второго поколения диапаузируют (Vinogradova, 2003).

Третьим изолирующим механизмом является их различное поведение при спаривании, т.е. им требуется различный объем пространства для спаривания (стеногамность - эвригамность) и различные места спаривания (Vinogradova, 2003). Полевые наблюдения в Италии (Bullini, Coluzzi, 1980; Urbanelli et al., 1981), где особи формы *molestus* были выпущены на площади, занимаемой популяцией формы *pipiens*, показали, что средняя частота гибридизации минимальна, около 0.01. Кроме того, самцы *molestus* группируются вблизи земли, в то время как рои самцов формы *pipiens* обычно образуются вблизи листвы деревьев, на высоте 2-3 м над поверхностью земли.

Степень репродуктивной изоляции между двумя формами имеет тенденцию к уменьшению с севера на юг. Исследование 17 ферментных локусов в популяциях *C. p. pipiens* из Египта и Израиля не представили никаких доказательств возникновения двух генетически дифференцированных форм, соответствующих формам *pipiens* и *molestus* в Европе (Villani et al., 1986). *C. p. pipiens* в Египте не дифференцирован в генетически изолированные популяции, а представляет одну панмиктическую популяцию (Farid et al., 1991). Нередко в Южной Европе и средиземноморских регионах, популяции обеих форм были найдены в открытых наземных водоемах (Chevillon et al., 1995; Fonseca et al., 2004; Gomes et al., 2009). Такое симпатрическое проживание в наземных местах обитания по мнению некоторых авторов может способствовать гибридизации между *molestus* и *pipiens* (Fonseca et al., 2004; Kent et al., 2007; Amraoui et al., 2012). Популяции с промежуточным поведением между двумя формами были описаны в Средиземноморье: на юге Франции были найдены стеногамные и гомодинамные (признаки *molestus*) популяции *C. pipiens*, которые не могли откладывать яйца без питания кровью (признак *pipiens*) (Pasteur et al., 1977). В Португалии подземные популяции *molestus* не были обнаружены, и автогенные (*molestus*) и неавтогенные (*pipiens*) комары размножались в открытых водоемах. Несмотря на симпатрическое существование анализ микросателлитов показал, что поток генов между *molestus* и *pipiens* в районе исследований существенно не увеличился (Gomes et al., 2009). Данный аргумент свидетельствует в пользу гипотезы о, по крайней мере, частичной репродуктивной изоляции между *molestus* и *pipiens*. Вероятно, физический разрыв в

подземных/наземных биотопах не единственный фактор, способствующий расхождению двух форм.

Четвертым механизмом изоляции может быть цитоплазматическая несовместимость, вызываемая симбиотической бактерией *Wolbachia pipientis*. Известно, что симбиотические бактерии являются действенным фактором эволюции. *Wolbachia* может нарушать репродукцию и обеспечивать преимущественное размножение хозяина, меняя состав популяции. У комаров *C. pipiens* инфицированность бактерией *W. pipientis* приводит к проявлениям одно- и двусторонней цитоплазматической несовместимости (Guillemaud et al., 1997; Atyame et al., 2011a). В настоящий момент роль внутриклеточных симбионтов в формировании структуры природных популяций комплекса *Culex pipiens* до конца не ясна.

Изоляции между близкими видами может способствовать несколько механизмов, которые могут действовать одновременно. Отсутствие или неполное действие презиготического (например, поведение при спаривании) и постзиготического (например, цитоплазматическая несовместимость) механизмов изоляции позволяет гибридизацию и появление первого поколения гибридов. Тем не менее, другие постзиготические механизмы, такие как гибридная стерильность или низкая жизнеспособность гибридов может ограничить поток генов одним поколением, избегая интрогрессии (Gomes et al., 2012).

### 1.1.7 Роль в переносе патогенов

Арбовирусы (вирусы позвоночных, переносимые членистоногими) широко распространены на земном шаре, особенно в странах жаркого климата. Известно не менее 170 видов арбовирусов, из которых более 50 видов патогенны для человека. В природе арбовирусными инфекциями болеют различные животные, в частности грызуны и птицы. Инфекцию передают от больного животного человеку кровососущие насекомые (клещи, комары, москиты, мокрецы), в организме которых возбудитель размножается. Распространение арбовирусной инфекции ограничено областью естественного распространения переносчика. В связи с этим, заболеваниям свойственна природная очаговость (эндемичные очаги) и определенная сезонность. Подъемы заболевания совпадают с наибольшей интенсивностью размножения и активностью кровососущих

переносчиков (весна, лето, осень) (Медицинская энциклопедия, [www.Medical-Enc.ru](http://www.Medical-Enc.ru) 2007-2012).

Вирусы, вызывающие арбовирусные болезни человека принадлежат к семействам тогавирусов (Togaviridae), буньявирусов (Bunyaviridae), реовирусов (Reoviridae) и рабдовирусов (Rhabdoviridae). К наиболее значимым арбовирусным заболеваниям относятся комариные восточный, западный и венесуэльский лошадиные энцефаломиелиты (встречаются в Северной, Центральной, Южной Америке) и лихорадка Чикунгунья; комариные лихорадки, желтая лихорадка (встречаются в Африке, Центральной и Южной Америке), японский энцефалит (Восточная и Юго-Восточная Азия), денге, энцефалит Сент-Луис (Северная, Центральная и Южная Америка), энцефалит Западного Нила (Африка, Азия, Европа); флеботомные лихорадки сицилийского и неаполитанского типов (встречаются в Европе, Азии, Африке), флеботомные лихорадки (Центральная Америка), комариная геморрагическая лихорадка долины Рифт (Африка), североамериканские комариные энцефалиты и клещевая крымская геморрагическая лихорадка ([www. http://medkarta.com/](http://www.medkarta.com/)). Основные заболевания, возбудителей которых переносят члены комплекса *Culex pipiens* представлены в таблице 2.

В основном, арбовирусные заболевания распространены в зонах с тропическим климатом. Но в последние десятилетия увеличившаяся миграция населения, глобальное потепление и завоз экзотических животных способствует появлению тропических болезней в более северных регионах, включая Европу и Россию. К таким болезням относится лихорадка Западного Нила, ежегодно выявляемая теперь в южных областях России. Вирус западного Нила (ВЗН) - член серокомплекса вирусов японского энцефалита - самый распространенный в мире флавивирус, передающийся членистоногими (Briton, 2002). Впервые ВЗН был изолирован в 1937 году у женщины в районе Западного Нила в Уганде. В 1953 г. он был выявлен у птиц (ворон и голубеобразных) в районе дельты Нила. Инфекции людей, обусловленные ВЗН, регистрируются во многих странах мира на протяжении более чем 50 лет. В 1999 г. ВЗН, циркулирующий в Тунисе и Израиле, был ввезен в Нью-Йорк, где привел к крупной вспышке болезни со смертельными исходами, которая в последующие годы распространилась на континентальной территории Соединенных Штатов Америки (США). Вспышки ВЗН в США (1999-2010 гг.) показали, что ввоз и закрепление трансмиссивных патогенных микроорганизмов за пределами их нынешней среды обитания представляют серьезную опасность для мира. (ВОЗ, Информационный бюллетень № 354). Хотя нагрузка Лихорадки Западного Нила (ЛЗН) на



здоровье человека может быть не так сильна, как налагаемая флавивирусами Денге или желтой лихорадкой, очевидно, что эта инфекция играет важную роль и часто недооценивается. ЛЗН имеет сложный естественный цикл, с участием энзоотической передачи между комарами и видами птиц в качестве резервуаров, при этом млекопитающие, включая человека, ведут себя как случайные тупиковые хозяева.

В последние 20 лет ЛЗН становится все более актуальной для стран с умеренным климатом, таких как Россия, Европейские страны и Северная Америка, хотя еще совсем недавно это заболевание считалось исключительно тропическим. Только за лето 2012 г. в Европе медики зафиксировали более 100 заболевших, в России - 154, а в США - 1993. На сегодняшний день вакцины против лихорадки нет. Симптомы связаны с общей интоксикацией, а в 50% случаев развивается серозный менингит.

Переносчиками вируса, по данным Центра по контролю заболеваемости (Centers for Disease Control), могут быть комары больше, чем 60 видов. Но именно комары рода *Culex*, и особенно комары *Culex pipiens* L. считаются основными переносчиками вируса среди птиц, т.н. *enzootic vectors*. Исследования последних лет доказывают, что комары *C. pipiens* могут с успехом питаться как на птицах, так и на млекопитающих, включая человека (Apperson et al., 2004; Kilpatrick et al., 2005). В 2008 г. РНК вируса ЗН была выделена из комара *C. pipiens* s.l., который питался кровью человека. Этим было экспериментально доказано, что *C. pipiens* действительно может быть переносчиком вируса от птиц к человеку (Hammer et al., 2008).

Смешанная модель питания видов комплекса *Culex pipiens* играет главную роль в передаче патогенов от птиц к человеку. Неоднородность характеристик, найденная среди популяций *C. pipiens* s.l. может иметь важные эпидемиологические последствия. Гибридизация между антропофильными *molestus* и орнитофильными *pipiens* может привести к более приспособленной манере кусаться у *C. pipiens* s.l. Это в свою очередь может привести к случайной передаче арбовирусов, которые имеют энзоотический цикл у птиц, млекопитающим, включая человека. ВЗН как раз относится к такому случаю. Например, в северо-восточных и центральных штатах Америки основным переносчиком являются *C. pipiens* (Turell et al., 2002; Andreadis et al., 2004; Kilpatrick et al., 2005; Hamer et al., 2008), которые переносят вирус среди различных видов птиц и также от птиц к человеку (Kilpatrick et al., 2005; Hamer et al., 2008), особенно в поздний период передачи (Kilpatrick et al., 2006). Значение комаров *C. pipiens* как переносчиков вируса ЛЗН было установлено после получения множества экспериментальных выделений вируса из собранных в природе комаров (Andreadis et al., 2004; Lukacik et al., 2006), их

эффективностью в передаче ЛЗН (Sardelis et al., 2001; Tiawsirisup et al., 2005; Turell et al., 2005), их численностью в городских условиях (Andreadis et al., 2004; Kilpatrick et al., 2005; Lukacik et al., 2006; Savage et al., 2006; Ruiz et al., 2010), их смешанным пищевым поведением (Apperson et al., 2004; Kilpatrick et al., 2006; Hamer et al., 2008), их способностью передавать вирус вертикально, от зараженных самок их потомству (Dohm et al., 2002), их способностью служить резервуаром вируса ЛЗН при диапаузировании и таким образом сохранять вирус для следующего сезона передачи (Nasci et al., 2001; Farajollahi et al., 2005). Кроме того, предполагается, что высокая численность *C. pipiens* в городских условиях является ключевым фактором усиливающейся передачи ЛЗН в урбанизированных районах (Farajollahi et al., 2011). Значение каждого члена комплекса и, в частности, форм *pipiens* и *molestus* в процессе передачи вируса неизвестно. В оценку значимости орнитофильной формы *C. pipiens* в распространении трансмиссивных заболеваний необходимо включить и выделение морфологически неразличимых комаров *C. torrentium*, вида-двойника *C. pipiens*. Комары *C. torrentium* считаются строго орнитофильными. И хотя *C. torrentium* не являются переносчиками трансмиссивных заболеваний человеку, комары этого вида могут переносить вирусы внутри популяций, между популяциями и даже, между различными видами птиц. Скорость распространения вирусов среди птиц зависит от численности популяций комаров *C. torrentium*. Точная идентификация этих видов-двойников важна для планирования санитарно-эпидемиологических мероприятий.

*C. torrentium* является переносчиком вируса Синдбис в Швеции, Норвегии, России (Lundström, 1994) и Германии (Jöst et al., 2010). У людей вирус Синдбис вызывает болезнь, называемую в России карельской лихорадкой. Переносчиками человеку могут служить *C. pipiens*. Исследование видового состава комаров является необходимой частью программ слежения, прогнозирования и борьбы с распространением арбовирусных заболеваний.

### 1.1.8 Точная идентификация представителей комплекса

Точная идентификация переносчика имеет решающее значение для контроля эпидемиологической ситуации, так как способность комаров к передаче возбудителей определенных инфекционных заболеваний варьирует в пределах комплекса, виды и подвиды *C. pipiens* проявляют различную степень антропофилии (табл. 2). Наличие на определенной территории различных векторов часто указывает на разные уровни риска возникновения очагов заражения.

### Идентификация по морфологическим признакам

Широко распространенным методом диагностики комаров комплекса *Culex pipiens* является средний сифональный индекс личинок IV стадии: у *C. torrentium* и *C. vagans* величина индекса составляет 6, у *C. p. quinquefasciatus* > 3,5, у *C. p. pallens* 4, у *C. p. p.* формы *pipiens* > 4,7, у *C. p. p.* формы *molestus* < 4,5 (Виноградова, 2003). Существуют и другие важные для диагностики морфологические признаки - например, идентификация самок по жилкам крыла (Ribeiro, Ramos, 1999). Как и в случае с поведенческими и физиологическими особенностями, морфологические признаки демонстрируют значительную изменчивость, часто перекрываются и ни один из них не может быть строго диагностическим (Dahl, 1988; Harbach, 1988; Виноградова, 1997). Исключением является строение мужских половых органов взрослых насекомых. Общеизвестно, что основным морфологическим, дифференцирующим все виды комплекса, признаком является индекс DV/D (Гуцевич и др., 1970; Dahl, 1988; Harbach, 1988; Виноградова, 1997; Harbach, 2012 и др.). Однако, этот признак не может быть использован для идентификации личинок и самок. Трудности и ошибки в классификации случаются из-за отсутствия черт, которые закреплены только за одним из членов комплекса и часто аналогичны у близкородственных видов. Традиционно таксономия была построена на дифференциации по морфологическим признакам и в настоящее время уточняется на основании данных молекулярно-генетического анализа.

### Молекулярные маркеры в исследовании комаров комплекса *Culex pipiens*

Постоянный и давний интерес исследователей к кровососущим комарам рода *Culex* и поиску различий между членами комплекса *Culex pipiens* проявился в том, что история развития молекулярных методов идентификации совпадает с историей исследования комаров. Первыми молекулярными маркерами были маркеры, созданные на основе анализа белкового полиморфизма - биохимические маркеры (Алтухов, 2003). Использование метода гель-электрофореза позволяет исследовать изменчивость ферментов - генетически детерминированных признаков. Исследуемый фермент может иметь один или несколько электрофоретических вариантов, и следовательно, быть моно- или полиморфным у данного вида. Считается, что достоверно установленные различия между совокупностями особей по спектрам электрофоретических вариантов ферментов

являются серьезным аргументом в пользу генетических различий между ними, а в симпатрических популяциях они свидетельствуют о возможной репродуктивной изоляции (Лопатин, 2000).

Электрофоретические исследования белков были использованы для дифференциации морфологически сходных видов рода *Culex*, например группы *Culex sitiens* (Chapman et al., 2000), четырех видов из Флориды: *C. nigripalpus* Theobald, *C. p. quinquefasciatus* Say, *C. restuans* Theobald и *C. salinarius* Coquillett (Knight, Nayar, 2004), было установлено наличие дифференцирующих аллелей у *C. p. pipiens* и *C. p. quinquefasciatus* (например Urbanelli et al., 1995, Cornel et al., 2003; Cui et al., 2007, Weitzel et al., 2009). Между биотипами *pipiens* и *molestus* были обнаружены различия в частотах некоторых аллелей, различные спектры изоферментов, а также степень гетерозиготности у формы *pipiens* значительно больше, чем у формы *molestus* (Лопатин, 1997; Chevillon et al., 1995; Byrne, Nichols; 1999; Weitzel et al., 2009). Urbanelli и соавторы (1981) обнаружили диагностические белковые маркеры, различающие *C. pipiens* и *C. torrentium* в Италии. Dahl (1988) определила дифференциацию по трем локусам между шведскими популяциями *C. pipiens* и *C. torrentium*. На основании изученного полиморфизма ферментов были установлены генетические различия между членами комплекса в России (Лопатин, 2000) и в Европе (Weitzel et al., 2009), в то же время было высказано предположение о происхождении популяции формы *molestus* в Лондонском метро от наземной популяции *C. pipiens* формы *pipiens* (Byrne, Nichols, 1999). Было обнаружено также большое сходство всех исследованных *molestus* между собой и стабильность наблюдаемых отличий от *pipiens* в географически разобщенных местах сборов на территории бывшего СССР (Лопатин, 2000).

Метод анализа белкового полиморфизма имеет ряд ограничений и, прежде всего, это то, что анализ белков позволяет исследовать изменчивость только белок-кодирующих последовательностей и только экспрессирующихся генов. Поэтому в дальнейшем широкое развитие получили методы на основе полиморфизма нуклеотидных последовательностей ДНК, позволяющих тестировать генетическое разнообразие как кодирующих, так и некодирующих участков генома и использовать для анализа любые ткани организма вне зависимости от стадии развития (Сулимова и др., 2006). В изучении комаров рода *Culex* применялись практически все известные типы молекулярно-генетических маркеров, разработанных на основе полиморфизма ДНК участков структурных генов - цитохромоксидазы субъединицы II, *COII* (Guillemaud et al., 1997) и субъединицы I, *COI* (Шайкевич и др., 2005; Shaikevich, 2007); некодирующих участков структурных генов - интрона гена ацетилхолинэстеразы (Aspen, Savage, 2003; Smith,

Fonseca, 2004), некодирующих участков между генами - A+T богатый район мтДНК (Guillemaud et al., 1997), ITS (Crabtree et al., 1995; Miller et al., 1996) и IGS (Huang et al., 2011) кластера рибосомных генов, маркеры последовательностей ДНК, отношение которых к структурным генам неизвестно - SH60 (Crabtree et al., 1995), RAPD — случайно амплифицируемая полиморфная ДНК (Храброва и др., 2004, 2005) и микросателлитные локусы (Fonseca et al., 2004; Vanck, Fonseca, 2006). Хотя этими методами были достигнуты значительные результаты в понимании структуры комплекса, были обнаружены множественные несоответствия ожидаемым результатам при использовании каждого отдельного метода.

### SH60

Разработка молекулярных методов диагностики комаров комплекса на основе полиморфизма ДНК началась в 1995 году, когда был разработан первый метод ПЦР, позволяющий дифференцировать *C. p. pipiens* и *C. p. quinquefasciatus* (Crabtree et al., 1995). С помощью метода вычитающей гибридизации авторы выделили фрагмент ДНК, содержащий последовательность, которая является уникальной для *C. p. pipiens* из двух популяций США и одной популяции из Швеции. Этот фрагмент был клонирован, амплифицирован и секвенирован, а последовательность была использована для разработки праймеров для ПЦР, SH60F4 и SH60R4, которые амплифицировали специфический продукт из геномной ДНК *C. p. pipiens*, но не амплифицировали ДНК *C. p. quinquefasciatus* из популяций США. Предложенные праймеры также амплифицировали специфический для *C. p. pipiens* фрагмент из ДНК гибридных особей *C. p. pipiens* / *C. p. quinquefasciatus* лабораторной популяции и из ДНК *C. p. pallens* из популяций Японии, что подтверждало гипотезу Бара (Barr, 1982) о гибридном происхождении *C. p. pallens*. Метод имел два основных недостатка. Во-первых, он не позволял выявлять гибриды так как наличие продукта амплификации, характерного для *C. p. pipiens*, могло означать как чистую особь, так и гибридную. Во-вторых, идентификация *C. p. quinquefasciatus* основана на отсутствии продукта амплификации, что невозможно отделить от отсутствия ДНК или неудачной ПЦР. Тем не менее, это был первый метод молекулярного анализа, основанный на различиях ДНК *C. p. pipiens* и *C. p. quinquefasciatus*, предложенный для дискриминации членов комплекса *Culex pipiens*.

### Кластеры генов рибосомной РНК (ITS, IGS)

Кластеры генов рибосомной РНК (рРНК) являются удобным и широко используемым районом генома для поиска молекулярно-генетических различий, поскольку в их составе имеются как консервативные участки (гены 18S, 5.8S и 28S рРНК), так и переменные участки (внутренние транскрибируемые (ITS) и межгенные спейсеры кластеров генов рРНК (IGS)). Гены рРНК у *C. p. quinquefasciatus* локализованы на первой хромосоме и организованы в виде 87 тандемно повторяющихся транскрипционных единиц, формирующих мультигенное семейство, у комаров других родов, например *Aedes*, число копий достигает 1000 (Kumar, Rai, 1990). Внутри повторов, гены 18S и 5.8S разделяются последовательностью ITS1, далее ITS2 отделяет 5.8S от 28S гена.

Сравнение внутренних транскрибируемых спейсеров (ITS1 и ITS2) стало популярным в филогении близких видов насекомых, так как было доказано, что эти участки генома эволюционируют относительно быстро у насекомых из семейств Culicidae, Drosophilidae, Cicindelidae и у Acrididae (Miller et al., 1996). ITS2 является основным молекулярно-генетическим маркером, используемым для определения видовой принадлежности комаров рода *Anopheles*, так как структура и длина ITS2 варьирует среди разных видов малярийных комаров (например Porter, Collins, 1991; Gordeev et al., 2004).

Обнаруженные различия нуклеотидных последовательностей ITS1 и ITS2 позволили Crabtree, Miller и Savage (Grabtree et al., 1995) разработать праймеры для дифференциации *C. pipiens* от *C. restuans* и *C. salinarius*. Позже эти же авторы (Miller et al., 1996) исследовали последовательности ДНК внутренних транскрибируемых спейсеров кластера рибосомных генов у представителей 14 видов из 4 подродов рода *Culex*. Среди исследованных комаров были и члены комплекса *Culex pipiens*. Кроме популяций *C. p. quinquefasciatus*, *C. p. pipiens* и одной лабораторной линии формы *molestus* из Северной Америки, были исследованы также и *C. p. quinquefasciatus* из Пуэрто-Рико и Белиза (Южная Америка), *C. p. pipiens* и *C. torrentium* из Швеции и Англии, и *C. p. pallens* Японии. Анализ последовательностей ITS1 и ITS2 показал, что *C. pipiens* и *C. torrentium* формируют на филогенетическом дереве один монофилетический кластер. У комаров комплекса *C. pipiens* размер ITS1 варьирует от 530 до 570 п.н., ITS2 - 317-333 п.н.

Среди особей комплекса *Culex pipiens* обнаружен значительный полиморфизм: 16% сайтов области ITS-1 и 8% области ITS-2 были переменными. Различий, специфических для таксонов, выявлено не было. Анализ последовательностей ITS1 и ITS2 членов комплекса *Culex pipiens* позволил авторам отделить популяции севера США и Европы от популяций Южной Америки и Карибского острова Пуэрто-Рико получив подтверждение об ограниченном потоке генов между географическими популяциями комплекса. Однако

популяции, обитающие в или около зоны гибридизации (например, Вирджиния, США), содержали отдельных комаров, которые морфологически характеризовались как *C. p. pipiens*, но по генотипу соответствовали *C. p. quinquefasciatus*. Полиморфизм последовательностей внутренних транскрибируемых спейсеров кластера рибосомных генов рРНК (ITS1 и ITS2) среди географически-удаленных популяций *C. p. pipiens* и *C. p. quinquefasciatus* оказался недостаточным для дифференциации членов комплекса и разработки метода диагностики (Miller et al., 1996).

В том же году вышла работа Severini и соавторов (1996) "Sequence and secondary structure of the rDNA second internal transcribed spacer in the sibling species *Culex pipiens* L. и *C. quinquefasciatus* Say (Diptera, Culicidae)". ITS2 последовательности образцов, принадлежащих к трем популяциям *C. p. pipiens* из Италии и четырем популяциям *C. p. quinquefasciatus* (трех из Африки и одной из Северной Америки) анализировали, чтобы определить наличие потенциальных видоспецифических диагностических сайтов рестрикции. ITS2 последовательности *C. p. pipiens* и *C. p. quinquefasciatus* были 297 и 298 пар оснований в длину, соответственно, и показали 97%-ную идентичность. Содержания G + C (58%) у них были также идентичны и наблюдались лишь шесть различий (три транзиции и три трансверсии), шесть однонуклеотидных замен и одна тринуклеотидная делеция / вставка (Severini et al., 1996).

Отсутствие различий между *C. p. pipiens* и *C. p. quinquefasciatus*, по мнению Miller и соавторов (1996), не поддерживало традиционное разделение таксонов комплекса как монофилетических единиц. Несмотря на то, что *C. p. pipiens* и *C. p. quinquefasciatus* не отвечают критериям, установленным для определения вида (Mayr, Ashlock, 1991), авторы предложили сохранить их подвидовой статус поскольку результаты подтверждают утверждение, что комплекс *Culex pipiens* состоит из географических рас, которые проявляют поведенческие, физиологические и генетические различия, очевидно, из-за экологической сегрегации. Названия *pipiens* и *quinquefasciatus*, по мнению авторов, действительно передают значимую географическую и биологическую информацию для кулицидологов и других работников здравоохранения, и поэтому должны быть сохранены на уровне подвида (Miller et al., 1996). Позже другие маркеры позволили обнаружить различия между этими двумя подвидами.

Межгенные спейсеры кластера генов рибосомной РНК (IGS) расположены между 3'-концом гена 28S рРНК и 5'-концом гена 18S рРНК. Участки IGS состоят из прилегающих к 18S гену рРНК внешнего транскрибируемого спейсера (ETS) и нетранскрибируемого спейсера (NTS). В NTS, на границе между ETS и NTS, располагается промотор РНК

полимеразы I и важные регуляторные факторы транскрипции. Структурная организация IGS эукариот консервативна и включает позиции рРНК промотора и ассоциированных с промотором коротких субповторов (Wu, Fallon, 1998). Нуклеотидные последовательности IGS эволюционируют быстро в сравнении с консервативными последовательностями кодирующих районов рРНК и даже между близкородственными видами наблюдаются большие различия. Высокая степень изменчивости IGS делает этот участок рРНК привлекательным для поиска маркеров, позволяющих идентифицировать трудноразличимые виды, и успешно использовалась например для разработки молекулярных маркеров в комплексе видов малярийных комаров *Anopheles gambiae* (Favia et al., 1997). Размеры IGS варьируют у комаров разных родов и могут различаться как у близкородственных видов: *Ae. aegypti* (1.8 kb) (Wu, Fallon, 1998), *An. albanus* (1,5 kb) (De Merida et al., 1995) и *An. gambiae* (1.4 kb) (Scott et al., 1993), так и среди особей одного вида: *Ae. albopictus* (2–10 kb) (Black et al., 1989) и *An. sinensis* (3.2–4.3 kb) (Whang et al., 2002).

Межгенные спейсеры рРНК были исследованы у комаров *C. p. quinquefasciatus*, *C. p. pipiens* формы *pipiens* и *molestus* из популяций США с целью обнаружения дифференцирующих маркерных последовательностей (Huang et al., 2011). Авторам удалось обнаружить два полиморфных сайта, которые отличают *C. p. quinquefasciatus* от других членов комплекса в изученных популяциях: замену одного нуклеотида (G-T) в сайте GxpG2T на последовательности NTS и одну делецию SxpA2d на границе гена 28S. Аллель G специфичен для *C. p. quinquefasciatus*, аллель T и делеция присутствует в ДНК всех членов комплекса *C. pipiens*. Для *C. p. pipiens* обеих форм, *pipiens* и *molestus*, характерны аллели TT. *C. p. quinquefasciatus*, также как и гибридам между *C. p. pipiens* f. *pipiens* и *C. p. quinquefasciatus* соответствуют аллели GT. Используя обнаруженные однонуклеотидные полиморфизмы (SNPs), авторы разработали метод рестрикционного анализа ПЦР ПДРФ для уточнения границ зоны гибридизации *C. p. quinquefasciatus* и *C. p. pipiens* на территории США. По полученным авторами данным северная граница зоны, где встречаются гибридные особи в США сдвигается с 39° с.ш. на 42,4° с.ш. У особей из подвальной популяции Нью-Йорка не было обнаружено аллелей, характерных для *C. p. quinquefasciatus*, по мнению авторов, скорее всего, из-за биотопической разобщенности этих комаров. Сравнение 44 полных последовательностей IGS североамериканских *C. p. quinquefasciatus*, *C. p. pipiens* форм *pipiens* и *molestus* выявило большее сходство *C. p. pipiens* форм *pipiens* и *molestus* между собой в сравнении с особями *C. p. quinquefasciatus*. Однако, некоторые особи *C. p. pipiens* формы *pipiens* проявляли большее сродство к *C. p.*



*quinquefasciatus*. Обнаруженные нуклеотидные замены позволили авторам дифференцировать *C. p. pipiens* и *C. p. quinquefasciatus*, формы *pipiens* и *molestus* между собой не различались (Huang et al., 2011).

### Гены ацетилхолинэстеразы

У *Culex pipiens* были описаны два белка ацетилхолинэстеразы, AChE1 и AChE2 (Bourguet et al., 1996). Картирование генов *Ace.1* и *Ace.2*, показало, что *Ace.2* тесно сцеплен с половым локусом на наименьшей по размеру 1-ой хромосоме, а ген *Ace.1* сцеплен с локусом *plum-eye* на средней по размеру 2-ой хромосоме. *Ace.1* является аутомсомным геном и кодирует белок AChE1, который связан с устойчивостью к инсектицидам и поэтому подвергается давлению естественного отбора. Идентичные варианты гена *Ace.1* были обнаружены в географически удаленных популяциях земного шара, что доказывает возможность быстрого распространения комаров через транспортные перевозки по миру (Raimond et al., 1991). *Ace.2* кодирует отличающийся биохимически белок AChE2, который не связан с устойчивостью к органофосфатам (Bourguet et al., 1996; Malcolm et al., 1998). Функции этого гена и селективное действие на него отбора неизвестны.

В 1998 году Bourguet и соавторы (Bourguet et al., 1998) определили 37 вариабельных сайтов последовательности второго интрона гена *Ace.2* при сравнении *C. p. pipiens* и *C. p. quinquefasciatus* из США, Европы, Африки и Азии и разработали ПЦР ПДРФ метод идентификации этих подвидов. *C. p. pipiens f. molestus* не отличался от *C. p. pipiens f. pipiens*. С этого времени полиморфизм исследованного участка активно используется в разработке маркеров для идентификации видов *Culex* и, в частности, комаров комплекса *Culex pipiens*.

В 2003 и 2004 годах вышли сразу две работы, предлагающие методы анализа на основе полиморфизма одного и того же участка ДНК - второго интрона гена *Ace.2*. Aspen и Savage (2003) подобрали специфические праймеры внутри интрона и предложили метод ПЦР для дифференциации *C. p. pipiens* (без разделения на формы) и *C. p. quinquefasciatus* из США и их гибридов первого поколения. (Позже был предложен и модифицированный метод *HotAce.2* (Savage et al., 2007), повышающий специфичность реакции). Smith и Fonseca (2004) разработали праймеры, специфичные для *C. p. pipiens* (без разделения на формы), *C. p. quinquefasciatus*, *C. p. pallens*, *C. australicus*, *C. pervigilans* и *C. torrentium* и предложили серию мультилокусных ПЦР для диагностики этих видов и подвидов. Комбинации праймеров оптимизированы для каждого из пяти географических регионов

на основе сведений о распространении видов в настоящее время. Так, набор праймеров, рекомендованный авторами для Америки и Африки, позволяет получить фрагменты размером 610 п.н. для *C. p. pipiens*, 274 п.н. для *C. p. quinquefasciatus* и оба фрагмента в случае гибридной особи. Кроме фрагментов, характерных для *C. p. pipiens* и *C. p. quinquefasciatus*, специфичный для *C. australicus* фрагмент размером 437 п.н. диагностируется в Австралии и 668 п.н для *C. pervigilans* в Новой Зеландии. В Евразии, 610 п.н. для *C. p. pipiens* (одинаково у обеих форм *f. pipiens* и *f. molestus*) и 416 п.н. для *C. torrentium*. В Юго-Восточной Азии у *C. p. pallens* амплифицируются фрагменты размером 478 п.н. и, очень часто у особей с морфологическими признаками *C. p. pallens*, фрагменты размером 274 п.н., специфичные для *C. quinquefasciatus*. (Smith, Fonseca, 2004).

Этот метод диагностики, названный ACE2, считается надежным, однако в исследовании зараженности комаров комплекса *Culex pipiens* в Калифорнии вирусом ЗН McAbee и соавторы (2008) столкнулись с рядом проблем при определении собранных в природе комаров (McAbee et al., 2008). При использовании диагностического теста, предложенного Smith и Fonseca (2004), регистрировались неоднозначные результаты, которые, по мнению авторов, не являются интерпретируемыми в гибридной зоне. Также тест часто ошибочно определял гибриды, созданные путем искусственных скрещиваний комаров *C. p. pipiens* и *C. p. quinquefasciatus* в лаборатории (McAbee et al., 2008). Для того, чтобы выяснить причину этих неоднозначных и неправильных идентификаций, авторы провели измерения индекса гениталий самцов (DV/D) в скрещиваниях *C. p. pipiens* и *C. p. quinquefasciatus*, происходящих из Северной и Южной Калифорнии соответственно. Результаты этих скрещиваний показали, что соотношение DV/D также не является априорно надежным маркером для идентификации таксонов и особенно гибридов (McAbee et al., 2008). Результаты McAbee и соавторов (2008) поставили под сомнение надежность метода ACE.2 и даже измерения индекса гениталий самцов (DV / D) для того, чтобы отличить *C. p. pipiens* от *C. p. quinquefasciatus* и их гибриды в области, где все три таксона совместно проживают (т.е. в гибридной зоне Северной Америки). Эти результаты, по мнению авторов, имеют важные последствия для систематических и экологических исследований и выявления вреда от каждого из видов-двойников в гибридной зоне для здоровья населения (McAbee et al., 2008; Cornel et al., 2012).

## RAPD

Метод выявления различий ДНК с помощью случайной амплификации полиморфных последовательностей, т.н. RAPD анализ, часто используют при поиске дифференцирующих маркеров, и, в частности, у кровососущих комаров (например,

Kambhampati et al., 1992). Данный метод был использован при изучении комаров комплекса *Culex pipiens* из г. Томска, Томской области, и Республики Казахстан (Храброва и др., 2004а). Анализ генетического полиморфизма RAPD–маркеров позволяет сделать вывод о значительной дифференциации популяций *C. p. pipiens*, *C. p. molestus* и *C. torrentium* в районе проведенных исследований (Храброва и др., 2004а). Скрининг RAPD–праймеров показал, что для идентификации *C. torrentium* и *C. p. pipiens* можно использовать фрагменты ДНК, амплифицирующиеся двумя RAPD–праймерами ОРВ–02 и ОРА–11. В спектре фрагментов ДНК, амплифицированных праймером ОРВ–02, был выявлен мономорфный фрагмент, размером 1183 п.н., идентифицирующий *C. torrentium*. У *C. torrentium* с использованием праймера ОРА–11 выявляется специфичный фрагмент ДНК, размером 680 п.н., отсутствующий в спектре амплифицированных фрагментов ДНК *C. p. pipiens* и *C. p. molestus*. Маркеры не подвержены внутри– и межпопуляционной изменчивости, они представлены в спектрах RAPD–фрагментов у всех особей *C. torrentium* всех изученных популяций, но отсутствуют в спектрах амплифицированных фрагментов ДНК *C. p. pipiens* и *C. p. molestus*, т.е., присутствие RAPD – маркера среди продуктов амплификации характеризует особей *C. torrentium*, а его отсутствие – особей *C. p. pipiens* и *C. p. molestus* (Храброва и др., 2004а).

Специфичные RAPD – фрагменты были клонированы и секвенированы. Определение последовательности нуклеотидов позволило подобрать специфичные SCAR – праймеры. Результатом использования SCAR – праймеров является амплификация одного специфичного фрагмента ДНК (SCAR – маркера). В ходе SCAR – ПЦР у особей *C. torrentium* и гибридов между ♀♀ *C. p. molestus* и ♂♂ *C. torrentium* амплифицируется характерный фрагмент ДНК, тогда как особи *C. p. pipiens* и *C. p. molestus* характеризуются отсутствием амплификации фрагмента ДНК соответствующего размера. Применение SCAR – маркеров позволило усовершенствовать метод RAPD – идентификации *C. torrentium*, т.к. в случае использования SCAR – маркеров отпадает необходимость в анализе набора фрагментов ДНК разных размеров. Однако, эти маркеры не позволяют идентифицировать гибриды, т.к. гибридные особи от скрещивания ♀♀ *C. p. molestus* x ♂♂ *C. torrentium* идентичны по SCAR – маркерам с особями *C. torrentium* (Храброва и др., 2004б; Храброва и др., 2005).

### Микросателлиты

Микросателлиты - это тандемные повторы очень коротких фрагментов из 1-5, 1-6 или 2-8 п.н, которые не повторяются многократно в конкретном локусе, но относительно

равномерно распределены на множестве различных, в основном некодирующих, локусов генома. Микросателлиты, как маркеры, пользуются большой популярностью из-за их высокого уровня полиморфизма, кодоминантного типа наследования (метод анализа маркера позволяет выявить сразу оба аллеля), относительно небольших размеров, и возможности быстрого анализа. По сравнению со скоростью мутаций геномной ДНК эукариот -  $10^{-9}$  на поколение, микросателлитные последовательности мутируют значительно быстрее -  $>10^{-4}$  в течении одного поколения. Они широко используются в различных фундаментальных и прикладных областях биологических наук в исследовании как растений, так и животных (Madesis et al., 2013). В изучении комаров комплекса *Culex pipiens* микросателлиты используют для установления родственных связей, выявления гибридных популяций и характеристики аллельного вклада каждого родителя. После появления, этот метод анализа популяций комплекса *Culex pipiens* стал очень популярным, особенно в изучении популяций США (Fonseca et al., 2004; Fonseca et al., 2006; Huang et al., 2008; Kothera et al., 2009; McAbee et al., 2008; Cornel et al., 2012).

Микросателлитные локусы были описаны сначала для *C. p. quinquefasciatus* Fonseca и соавторами (1998). Затем Keyghobadi и соавторы (2004) охарактеризовали микросателлиты для *C. pipiens*. Позже, Edillo и соавторы (2007) исследовали микросателлитные маркеры, выделенные и разработанные для южно-африканских *C. p. quinquefasciatus*, чтобы определить те, которые полезны для анализа популяций комплекса *Culex pipiens* между континентами.

Панель из восьми микросателлитных локусов (CQ11, CQ26, CxqGT4, CxqGT6b, CxprGT4, CxprGT9, CxprGT12 и CxprGT46) использовалась для идентификации автогенных и неавтогенных комаров *C. p. pipiens* и *C. p. quinquefasciatus* из популяций Европы, Америки, Африки и Азии (Fonseca et al., 2004). По результатам выполненного анализа, наземные и подземные популяции Северной Европы (рассматривались популяции Германии и Великобритании) формируют два отдельных кластера. Популяции из подземных мест обитания кластеризуются с популяциями Северной Африки и Средиземноморья, а также с автогенными популяциями Японии и Австралии. В подвальных популяциях оказалось меньше среднее число аллелей на локус по сравнению с наземными популяциями ( $2,06 \pm 0,20$  и  $7,64 \pm 0,43$ , соответственно,  $P < 0,01$  в среднем как между локусами, так и популяциями). Аллели, наиболее распространенные среди автогенных, подвальных комаров, также многочисленны в популяциях Африки и Средиземноморья и часто не обнаруживаются в наземных неавтогенных популяциях Северной Европы. По результатам анализа восьми микросателлитных локусов 641 комара,

были определены три генетически отдельных кластера. Кластер А включает большинство Европейских наземных популяций *C. p. pipiens*. Кластер В состоит из автогенных особей *C. p. pipiens f. molestus*, кластер С формируют особи *C. p. quinquefasciatus*. Генетическое расстояние между *C. p. quinquefasciatus* и *C. p. pipiens* значительно больше, чем между формами *C. p. pipiens*, что указывает на возраст расхождения таксонов (Fonseca et al., 2004). По результатам анализа панели из восьми микросателлитов разделение *C. p. pipiens* на две формы произошло совсем недавно. Микросателлитные профили *C. p. pipiens f. pipiens* и *C. p. pipiens f. molestus* хотя и различаются, но много меньше, чем *C. p. pipiens* и *C. p. quinquefasciatus*. *C. p. pipiens f. molestus* может быть комменсалом *C. p. pipiens f. pipiens*, который появился с развитием человеческих поселений после становления земледелия или в результате изоляции в ледниковый период. В обоих случаях, время расхождения оценивается примерно в 10000 лет назад, что может объяснить, почему медленно эволюционирующие белки или морфологические черты не всегда различают эти две формы (Fonseca et al., 2004).

Анализ микросателлитов показал, что все американские популяции *C. p. pipiens* включают гибриды, в среднем, более чем 40% образцов в каждой локальной популяции США имели гибридное происхождение от кластера А и Б и отличались от гибридов между *C. p. pipiens* и *C. p. quinquefasciatus*. Гибридное происхождение может объяснять тот факт, что североамериканские *C. p. pipiens* охотно питаются как на людях, так и на птицах (Spielman, 2001). В северных европейских популяциях гибриды практически отсутствовали. Небольшое количество гибридных особей было обнаружено на юге Франции, в двух из шести южных европейских популяциях (в среднем, 10,2% в популяции). На юге Франции были обнаружены как чистые популяции *C. p. pipiens f. pipiens* и *C. p. pipiens f. molestus*, так и смешанные популяции чистых *C. p. pipiens f. pipiens* и чистых *C. p. pipiens f. molestus*. Северные и южные наземные Европейские популяции *C. p. pipiens f. pipiens*, исследованные по отдельности, не различались в аллельном разнообразии ( $7,64 \pm 0,43$  и  $7,9 \pm 0,46$ , соответственно), тогда как популяции *C. p. pipiens* США имели значительно меньшее число аллелей на локус и на популяцию ( $5,90 \pm 0,30$ ,  $P < 0,01$ ) (Fonseca et al., 2004).

Позже Huang и соавторы (2008) показали, что только 12 % особей в популяциях Северо-восточных Штатов имели гибридное происхождение с некоторой долей аллелей *C. p. pipiens f. molestus* в геноме. Различия в процентном содержании гибридов могут быть связаны с количеством и комбинацией маркеров и популяций *C. p. pipiens f. molestus*, использованных в двух исследованиях. Эти же авторы подтвердили, что популяции *C. p.*

*pipiens* f. *molestus* в США не идентичны популяциям формы *molestus* южной Европы или североафриканским популяциям. Локусы SxpGT9 и SxpGT46 значительно отличаются по частотам аллелей и в распределении основных аллелей. Кроме того, несколько аллелей в этих двух локусах не являются общими для популяции формы *molestus* США и других двух групп популяций (Huang et al., 2008). Было доказано, что городские популяции из открытых водоемов в городах, где существуют подвальные популяции *C. p. pipiens* f. *molestus* не содержат гибридных примесей. В исследовании Huang и соавторов (2008) популяция формы *molestus* из Нью-Йорка не содержала уникальных аллелей, а только набор аллелей, также найденных в популяциях *C. p. pipiens* формы *pipiens*. Поэтому различия между *C. p. pipiens* f. *molestus* и *C. p. pipiens* f. *pipiens*, найденные с помощью анализа микросателлитов, не исключают возможности того, что популяции формы *molestus* в США происходят от местных наземных популяций *C. p. pipiens* f. *pipiens*. Авторы отметили, что генотипирование *C. p. pipiens* f. *pipiens* из лабораторной линии показало аналогичную картину уменьшения аллельного разнообразия, сравнимую с обнаруженной у *C. p. pipiens* f. *molestus* (Huang et al., 2008).

Доказательство происхождения автогенных подвальных популяций в США от соседних местных природных популяций открытых водоемов было получено и другими исследователями. Исследуя популяции формы *molestus* из Чикаго и Нью-Йорка с помощью панели микросателлитов Kothera и соавторы (2010) определили, что уровни генетического разнообразия, измеренные как ожидаемая гетерозиготность и аллельное насыщение, были заметно ниже в обеих популяциях формы *molestus*, по сравнению с соседними популяциями *C. p. pipiens* f. *pipiens* из открытых водоемов. Также было обнаружено, что существует высокая степень сходства между географически-удаленными популяциями открытых водоемов, тогда как частоты аллелей между двумя популяциями f. *molestus* были совершенно различны, а некоторые аллели, присутствующие в одной подземной популяции, отсутствовали в другой. Парные значения FST между популяциями показали, что популяции *C. p. pipiens* f. *molestus* сильно дивергировали друг от друга, а также от связанных с ними наземных популяций. Кластерный анализ выявил три наиболее вероятные группы: с четырьмя популяциями *C. p. pipiens* f. *pipiens* в одном кластере и каждая из популяций f. *molestus* в собственном кластере. Было обнаружено низкое количество гибридов, 8%, между формами. Авторы пришли к выводу, что их данные подтверждают гипотезу о том, что популяции f. *molestus* в Чикаго и Нью-Йорке возникли из местных наземных популяций *C. p. pipiens* f. *pipiens* (Kothera et al., 2010). По данным Kothera и соавторов (2010) в Соединенных Штатах было найдено относительно небольшое

число популяций *C. p. pipiens f. molestus*: Boston, MA (Spielman, 1957); New York City, NY (Kent et al., 2007; Huang et al., 2008); San Mateo County, CA (McAbee et al., 2008); Philadelphia, PA (Kilpatrick et al., 2007); и Chicago, IL, (Wray, 1946; Mutebi, Savage, 2009) по сравнению с Россией, где в каждом крупном городе были зарегистрированы популяции этих комаров (Виноградова, 1997).

Кроме популяций американского континента с помощью панели микросателлитов были исследованы популяции Португалии. В Португалии комары, соответствующие *C. p. pipiens f. molestus* и *C. p. pipiens f. pipiens* по биологическим признакам, сосуществуют в открытых наземных биотопах. Подвальные популяции *C. p. pipiens* найдены не были. Автогенность и стеногамность оценивалась в потомстве первого поколения от 145 отдельных самок *C. p. pipiens* обеих форм. Байесовский кластерный анализ (Bayesian clustering analysis) на основе генотипов 13 микросателлитов выявил два различных генетических кластера, коррелирующих с альтернативными физиологическими чертами, которые определяют формы *pipiens* и *molestus*. Анализ примеси (Admixture analysis) оценил частоту гибридов в 8-10%. Большая доля примеси наблюдалась у особей *f. pipiens* предполагая, что больше генов *f. molestus* переносятся в форму *pipiens*, чем наоборот (Gomes et al., 2009). На основе разделения образцов в соответствии с предковыми кластерами, показанными анализом Structure, между формами *molestus* и *pipiens* был получен коэффициент дифференциации  $F_{st} = 0,127$ . Эта оценка несколько ниже, но все еще сравнима с приведенными в предыдущих исследованиях значениями различий между популяциями подземных *molestus* и наземных *pipiens* (обычно между 0,130 и 0,190) с использованием аналогичных данных микросателлитного анализа (Huang et al., 2008, 2009).

### Микросателлитный маркер CQ11

На основе полиморфизма ДНК во фланкирующей области микросателлитного локуса CQ11, был разработан быстрый анализ для идентификации *C. p. pipiens* форм *pipiens* и *molestus* (Bahnck, Fonseca, 2006). По результатам предыдущих работ авторов из этой же группы (Smith, Fonseca, 2004; Smith et al., 2005) микросателлит CQ11 отображает самые большие различия между *molestus* и *pipiens* с оценкой  $F_{st}$  приблизительно в 2 раза больше, чем для других локусов. Маркер CQ11 вариабелен на популяционном уровне, тем не менее, авторы утверждают, что предложенный метод не зависит от изменчивости длины микросателлитов, а использует несколько крупных (до 18 п.н.) вставок и делеций во фланкирующей области микросателлитных повторов, которые являются

специфическими либо для формы *pipiens*, либо для формы *molestus*. Общепринятое наблюдение, что меньшие микросателлиты испытывают более низкие скорости мутаций, объясняет почему у формы *molestus* локус CQ11 не изменяется и имеет фиксированный размер, поскольку проскальзывание репликации - механизм, считающийся генератором большинства микросателлитных мутаций, больше не может функционировать, когда достигнут минимальный порог числа повторов (Bahnck, Fonseca, 2006).

Метод заключается в ПРЦ с прямым праймером CQ11F2, общим для особей обеих форм *C. p. pipiens*, и праймерами *pipCQ11R* и *molCQ11R*, специфичными для идентификации *pipiens* и *molestus*, соответственно. Размер ПЦР-продукта, характерный для формы *pipiens*, составляет примерно 200 п.н., для формы *molestus* - 250 п.н. Авторы протестировали данным "быстрым" методом хорошо изученные по биологическим признакам популяции двух форм *C. p. pipiens* в северной Европе, где, как считается, они не гибридизуются. Только характерные фрагменты "*pipiens*" были получены у образцов, которые соответствовали поведенческим и физиологическим характеристикам *C. p. pipiens* формы *pipiens* и обратное было верным для характерных фрагментов "*molestus*". Кроме того, когда авторы тестировали метод в нескольких популяциях Америки, они получили хорошую согласованность между полным анализом 8-12 микросателлитов и "быстрым" тестом CQ11 (Bahnck, Fonseca, 2006).

Методом CQ11 были протестированы популяции *C. p. pipiens* в Северной Америке (Bahnck, Fonseca, 2006; Kent et al., 2007; Kothera et al., 2010), Европе (Bahnck, Fonseca, 2006; Gomes et al., 2009; Reusken et al., 2010; Danabalan et al., 2012) и северной Африке (Amraoui et al., 2012). С помощью данного метода *C. p. pipiens* обеих форм, *pipiens* и *molestus*, были найдены в городских, пригородных и сельских поселениях в трех районах в Марокко летом 2010 г. В целом, 52,3% протестированных имаго были гомозиготными по фрагменту 200 п.н., который характерен для формы *pipiens*, 22% были гомозиготными по фрагменту 250 п.н. определяющему форму *molestus*, а остальные (25,7%) соответствовали гибридам. Т.о. было показано, что в Марокко обе формы совместно сосуществуют в наземных и подземных местах размножения (Amraoui et al., 2012).

В Амстердаме, в августе 2009 г., в тоннеле метро на трех станциях были найдены баки с загрязненной органикой водой, в которых размножались комары *C. p. pipiens*. Вылетая, имаго нападали на людей на станциях метро и данные популяции были обнаружены именно после многочисленных жалоб пассажиров. Антропофильные, подвальные, т.е. способные спариваться в небольших пространствах и откладывать кладки яиц в загрязненную органикой воду, комары соответствовали типичным *C. p. pipiens* формы *molestus*. Методом CQ11 было обнаружено, что исследуемые популяции состоят из



*C. p. pipiens* формы *molestus* (18 особей), формы *pipiens* (2 особей) и их гибридов (9 особей) (Reusken et al., 2010). Авторы констатировали, что это первый случай обнаружения *C. p. pipiens* формы *pipiens* в подвальных местообитаниях в Северной Европе.

В Португальских популяциях формы *molestus*, где до изучения генетического состава популяций были исследованы физиологические признаки особей и определена способность к автогенному овогенезу, 14% автогенных особей *C. p. pipiens f. molestus* были определены методом CQ11 как "*pipiens*", которые по определению не должны проявлять свойство автогенности (Gomes et al., 2009). Результаты, полученные в исследованиях в Португалии и Амстердаме, в которых физиологические признаки особей не совпадали с аллелями CQ11 могут быть как следствием гибридизации, так и доказательством полиморфности и неспецифичности данного локуса.

Трудности с CQ11 возникали практически у всех исследователей, которые сравнивали результаты, полученные методом CQ11 с данными физиологического анализа представителей комплекса или с результатами других методов анализа ДНК, и потому интерпретация полученных результатов у многих авторов вызывает сомнения. Некоторые образцы, определенные по локусу CQ11 как форма *molestus* или гибрид между *pipiens* и *molestus*, по локусу SH60 соответствовали форме *pipiens* (Kent et al., 2007). Из сравнения с характеристиками родительских популяций, полученными с помощью анализа полной панели микросателлитов, было обнаружено, что метод CQ11 лишь частично эффективен в качестве диагностического маркера. Gomes и соавторы (2009) констатировали хорошее соответствие между альтернативными гомозиготными генотипами и каждой из форм, но в определении гибридных особей метод CQ11 работал менее эффективно. В условиях продолжающейся гибридизации, рекомбинация и независимая сортировка нарушает связь между альтернативными диагностическими генотипами и их соответствующим предковым генетическим фоном (Gomes et al., 2009).

В сравнении с пропорцией гибридов, обнаруженных при анализе панели из 12 микросателлитов, метод CQ11 переоценивает количество гибридов и также некорректно классифицирует значительное количество особей формы *pipiens*, как относящихся к форме *molestus* (Kothera et al., 2010). Так, например, в двух наземных популяциях неавтогенного *pipiens* в Чикаго с помощью панели микросателлитов было обнаружено 6,4% и 4,1% гибридных особей и ни одного *molestus*. Методом CQ11 в этих же популяциях было обнаружено 21,3 % и 24,5 % гибридов и 21,3 % и 14,3 % *molestus* (Kothera et al., 2010). В свете полученных результатов, авторы не рекомендуют

использовать метод CQ11 для обнаружения гибридов между *pipiens* и *molestus* или особой формы *molestus* в наземных популяциях (Kothera et al., 2010).

При исследовании популяций Калифорнии, США, было обнаружено, что согласно методу ACE2 большинство особей популяции Лос-Анджелеса соответствовали *C. p. quinquefasciatus*, но некоторые из этих же комаров были определены как *C. p. pipiens* f. *pipiens* методом CQ11 (Cornel et al., 2012). Это вызывает, по мнению авторов, озабоченность по поводу надежности и воспроизводимости данных методов в местах с неизвестной популяционной структурой.

Как сообщалось самими разработчиками метода CQ11 (Bahnck, Fonseca, 2006), предложенный ими диагностический тест может быть ненадежным, если интерпретации делаются на индивидуальном уровне. Но даже в южной Калифорнии, где предполагается существование только *C. p. quinquefasciatus*, методом CQ11 были определены *C. p. pipiens* f. *pipiens* и гибриды f. *pipiens* x f. *molestus*, что показывает, что метод может давать некорректные результаты не только на индивидуальном уровне идентификации, но и на уровне популяции. Вторая проблема, с которой столкнулись Cornel и соавторы, это большое количество так называемых "ноль-аллелей" - отсутствие результатов ПЦР, что не позволило охарактеризовать одну из исследуемых популяций (Cornel et al., 2012).

Есть несколько возможных причин, почему метод CQ11 дает некорректные результаты. Во-первых, CQ11 является единственным анализируемым локусом и, таким образом, его наследование может быть точным только в первом поколении гибридов. В природе, если гибридизация существует, скорее всего, встречаются другие классы гибридов, которые могут изменять частоту наблюдаемых генотипов. Кроме того, полный анализ микросателлитов, который генерирует мультилокусные генотипы, использует больше информации, чем анализ отдельного гена, и, следовательно, изображает более полную картину популяции. Наконец, поскольку маркер CQ11 сам микросателлитный локус, то возможно, что некоторые особи формы *pipiens* имеют аллель того же размера, который Bahnck и Fonseca (2006) приписывали форме *molestus*, даже если этот аллель мономорфен в комарах *C. p. pipiens* формы *molestus* (Kothera et al., 2010). Также и аллель, приписанный форме *pipiens* может присутствовать и в ДНК некоторых комаров формы *molestus*, что объясняет наличие фрагментов, характерных для особей формы *pipiens* и гибридов в ДНК комаров недолго существующей подземной популяции *C. p. pipiens* в Амстердаме (Reusken et al., 2010). Huang и соавторы (2011) высказали обобщенное мнение, что CQ11 слишком полиморфный для использования в качестве диагностического маркера (Huang et al., 2011).

## Гены митохондриальной ДНК

Митохондриальная ДНК часто используется для филогенетических исследований насекомых и, в частности, комаров (например, Morlais, Severson, 2002; Rasgon et al., 2006; Kumar et al., 2007; Paudan, Ribolla, 2008; Cywinska et al., 2006). Как маркер молекулярно-генетических исследований мтДНК имеет множество преимуществ. МтДНК многокопийна, не рекомбинирует, не содержит повторяющихся нуклеотидных последовательностей, интронов, мобильных элементов. МтДНК наследуется преимущественно по материнской линии, поскольку яйцеклетка содержит на несколько порядков больше копий митохондриальной ДНК, чем сперматозоид. Кроме того, обычно происходит деградация митохондрий сперматозоида после оплодотворения (Ченцов, 1995). Для некоторых видов насекомых, однако, была показана передача митохондриальной ДНК по мужской линии, например, у *Drosophila* (Kondo et al., 1992), медоносных пчел (Meusel, Moritz, 1993), цикад (Fontaine et al., 2007) и комаров *Aedes aegypti* (Paudan, Ribolla, 2008).

В большинстве случаев изменчивость нуклеотидных последовательностей генов мтДНК, кодирующих синтез белков, определяется единичными заменами оснований, три четверти из которых являются синонимичными. Нуклеотидные замены в мтДНК происходят с примерно одинаковой скоростью в эволюции видов, что позволяет рассчитывать время их дивергенции и проводить филогенетический анализ. Митохондриальная ДНК *C. pipiens* (был определен полный геном *C. p. quinquefasciatus* линии Pel) имеет классические характеристики, аналогичные найденным у мтДНК других проанализированных видов комаров (Atyame et al., 2011b). МтДНК *C. pipiens* содержит плотно упакованные гены с высоким содержанием А+Т (78,2%). Обнаружены 22 гена, кодирующих тРНК, 2 гена, кодирующих рибосомные РНК, 13 генов, кодирующих субъединицы ферментов, участвующих в окислительном фосфорилировании, и, наконец, А+Т-богатые некодирующие области. Гены расположены вдоль митохондриальной хромосомы аналогично тому, как они расположены и у других видов комаров (Beard et al. 1993; Atyame et al., 2011b). Ген цитохромоксидазы субъединицы I (*COI*) самый большой и самый консервативный из трех митохондриальных генов, кодирующих субъединицы цитохромоксидазы (Beard et al., 1993). Для насекомых обычно характерно присутствие в клетках одной особи одного митохондриального гаплотипа, но иногда встречается и гетероплазмия (Paudan, Ribolla, 2008).

В 1997 году было предпринято первое изучение полиморфизма мтДНК у *C. p. pipiens*, *C. p. quinquefasciatus* и *C. torrentium* (Guillemaud et al., 1997) для установления

связи мтДНК и симбиотической бактерии *Wolbachia* и природы цитоплазматической несовместимости у комаров комплекса. Авторы изучили полиморфизм А+Т-богатой контрольной области, которая обычно считается самым быстро эволюционирующим маркером мтДНК и сравнили частоту мутаций в этом районе и гене второй субъединицы цитохромоксидазы (*COII*), который, как следовало ожидать, эволюционировал более медленно. Это позволило оценить выбор А+Т-богатого района мтДНК в качестве маркера для последующих исследований.

Последовательности А+Т-богатой контрольной области мтДНК (742 пар оснований) были изучены у комаров из 10 лабораторных линий: BARRIOL и SPHAE, ведущих происхождение из двух подвальных популяций и ESPRO и PGI из наземных популяций *C. p. pipiens*, KILLCARE - *C. p. pipiens* из Австралии, четырех популяций *C. p. quinquefasciatus*: MART (Martinique), SELAX (California), THAI (Bangkok, Thailand) и BRESIL (Бразилия) из различных географических регионов, одной линии *C. p. pipiens* - TC, обработанной тетрациклином для элиминации бактерии и *C. torrentium* (Швеция) (Guillemaud et al., 1997). Таким образом, в анализ были включены основные представители комплекса *Culex pipiens*. Прямым секвенированием были обнаружены делеции одного из шести повторов ТА между позициями 294 и 305 в MART, делеции одного из девятнадцати Т между позициями 365 и 383 в Killcare и PGI и вставки одного из 10 Т между позициями 512 и 521 в BRESIL. Наконец, С в положении 125 замещен на А в BRESIL и PGI.

А+Т-богатый регион часто демонстрирует значительную вариабельность в длине у насекомых, как это наблюдается у *Drosophila melanogaster* (Lewis et al., 1994), жуков долгоносиков *Pissodes* (Boyce et al., 1989), сверчков *Gryllus* (Rand, Harrison, 1989), у цикад (Martin, Simon, 1990), а также обнаруживает полиморфизм последовательностей у *Anopheles gambiae* (Caccone et al., 1996) и бабочек *Jalmenus* (Taylor et al., 1993). У *C. pipiens*, среди изученных линий, изменчивость последовательностей оказалась более чем в восемь раз ниже, чем наблюдается у видов *Jalmenus* (Lepidoptera), которые известны наименьшим по размеру А+Т-богатым регионом, 350 п.н. (Guillemaud et al., 1997).

Между *C. p. pipiens* и *C. torrentium* в А+Т богатом контрольном регионе мтДНК были обнаружены три инсерции-делеции и 43 нуклеотидные замены, а по *COII* гену полиморфизм составил 14 вариабельных сайтов, что соответствовало 2,1% (Guillemaud et al., 1997). Сравнение гена *COII* у *C. pipiens* и *C. torrentium* выявило дивергенцию нуклеотидных последовательностей в три раза меньше, чем в А+Т-богатой контрольной области. В отличие от комплекса *Anopheles gambiae* (Caccone et al., 1996), где было обнаружено, что А+Т-богатый район развивался медленнее, чем ген *COII*, контрольный

регион и ДНК гена *COII* в третьей позиции кодонов у *Culex* эволюционируют примерно с одинаковой скоростью (Guillemaud et al., 1997). В отличие от других видов насекомых, между подвидами *C. p. pipiens* и *C. p. quinquefasciatus* был обнаружен низкий уровень изменчивости. Авторы впервые предположили, что снижение изменчивости митохондриальной ДНК у *C. pipiens* может быть связано с совместным наследованием симбиотической бактерии и митохондрий ("sweep by hitchhiking"), как показали до этого Turelli и Hoffmann (1995) у *Drosophila simulans* (Guillemaud et al., 1997).

Связь полиморфизма *Wolbachia* и мтДНК была исследована в популяции *C. p. pipiens* Южной Африки, единственной известной на сегодняшний день незараженной природной популяции, в сравнении с инфицированными *Wolbachia* популяциями *C. p. pipiens* Северной Америки. Было обнаружено, что у зараженных *Wolbachia* *C. p. pipiens* и *C. p. quinquefasciatus* значительно снижен полиморфизм гена NADH дегидрогеназы субъединицы 4 (*ND4*) мтДНК, при сравнении с незараженной популяцией *C. p. pipiens* из Южной Африки. По гену *ND4* инфицированные *C. p. pipiens* и *C. p. quinquefasciatus* не отличались между собой (Rasgon et. al., 2006).

В общей сложности, были определены 12 митохондриальных гаплотипов (A-L) по участку гена *ND4*. В инфицированных популяциях 99% особей имели гаплотип К. В неинфицированной популяции *C. p. pipiens* присутствовали 11 гаплотипов, в том числе К. Разнообразие ядерных генов было одинаково между инфицированными и неинфицированными популяциями. Анализ ядерной ДНК позволил предположить, что наличие гаплотипа К в незараженных *C. p. pipiens*, вероятно, объясняется общим предковым полиморфизмом, а не гибридной интрогрессией. Эти данные подтверждают предположение, что распространение *Wolbachia* привело к резкому сокращению митохондриальной изменчивости в географически широко распространенных популяциях комплекса *Culex pipiens*. В отличие от этого неинфицированная популяция, вероятно, криптический вид, где интрогрессия *Wolbachia* была предотвращена путем репродуктивной изоляции, и тем самым сохранен предковый уровень митохондриального разнообразия (Rasgon et. al., 2006).

Масштабное изучение мтДНК в комплексе *Culex pipiens* было предпринято в 2011 году, когда были секвенированы полные митохондриальные геномы (14 856 п.н, без А+Т богатых районов) *C. pipiens* из четырех линий: Ко (*C. p. pipiens*, Крит, Греция), Тн (*C. p. pipiens*, Тунис), SL (*C. p. quinquefasciatus*, Калифорния, США), Is (*C. p. pipiens*, Турция) и сравнивались с полным геномом линии Pel (*C. p. quinquefasciatus*, Шри Ланка) (Atyame et al., 2011b). В целом, пять последовательностей мтДНК отображали очень низкую

изменчивость, и были найдены только 36 переменных нуклеотидных сайтов (около 0,2%). Две последовательности, линии Ko и Tn, были абсолютно идентичными. Среди 13 генов, кодирующих белки, у пяти генов (*atp8*, *atp6*, *ND3*, *ND4L* и *ND6*) отсутствовал полиморфизм, тогда как *ND2*, *ND5* и *cytb*, по результатам сравнения исследованных комаров оказались наиболее полиморфны (Atyame et al., 2011б). Именно эти гены были исследованы у 19 особей из 19 линий *C. p. pipiens* и *C. p. quinquefasciatus*. В сумме, последовательности *ND2* (613 п.н.), *ND5* (1132 п.н.) и *cytb* (852 п.н.) генов составили 2549 п.н. (16.4% от полного митохондриального генома). У комаров подвида *C. p. pipiens* из 10 линий было обнаружено от 1 до 9 переменных сайтов мтДНК и уровень сходства исследованных последовательностей составил 99.6 – 99.9%. Всего, среди 19 линий обоих подвидов, *C. p. pipiens* и *C.p. quinquefasciatus*, было найдено 14 митохондриальных гаплотипа, которые различались в 22 переменных сайтах. Филогенетический анализ обнаружил два отдельных кластера, в первый вошли гаплотипы 1-5, а во второй 6-14. Распределение митохондриальных гаплотипов генов *ND2*, *ND5* и *cytb* на группы и кластеры не совпадает с таксономической принадлежностью комаров, скорее коррелирует с группами симбиотической бактерии *Wolbachia*, инфицирующей комаров из изученных линий (Dumas et al., 2013).

## 1.2 Божьи коровки рода *Adalia*

У видов божьих коровок р. *Adalia* (Coleoptera, Coccinellidae) наблюдается ярко выраженное внутривидовое разнообразие и географическая изменчивость в пределах видов по таким общепринятым морфологическим признакам, как окраска и рисунок пронотума (переднеспинки) и элитр (надкрылий). Формы внутри видов р. *Adalia* отличаются по окраске ног и низа тела жуков (у южных подвидов - красновато-желтые ноги и края брюшных стернитов, у северных - чисто черные), а также имеются небольшие, трудно уловимые различия по величине и форме тела (Лусис, 1973). Известно существование на протяжении продолжительного времени гетероморфных популяций адалий, состоящих из нескольких достаточно резко различающихся друг от друга типов. Интерес к божьим коровкам р. *Adalia* в области изучения закономерностей видообразования и эволюции из-за ярко выраженного у них разнообразия популяций и географической изменчивости не иссякает с начала XX века (Schröder, 1901-1902; Meissner, 1907-1910, 1911; Johnson, 1910; Palmer, 1911, 1914, 1917; цитировано по Лусис, 1973) и особенно усилился с середины двадцатых годов, когда Ф.Г. Добржанский впервые

опубликовал анализ географической изменчивости двух видов — *A. bipunctata* и *A. decempunctata* (Добжанский, 1924).

Самки *A. bipunctata* спариваются многократно во время репродуктивного периода (около 20 раз). Оплодотворение происходит за счет спермы последнего самца, однако встречаются и смешанные по происхождению потомства (De Jong et al., 1993). За весь репродуктивный период самка откладывает от 100 до 1,5 тысяч яиц, число яиц в кладке от 5 до 40. При оптимальной температуре, 20-25 С требуется 3-4 дня на развитие яиц от откладки до вылупления личинок, 3-4 недели занимает личиночная стадия и 1 неделю занимает развитие на стадии куколки. Если развитие яиц останавливается на ранних этапах эмбриогенеза, яйца желтеют, но сохраняют прежнюю форму. Неоплодотворенные яйца становятся сморщенными. Требуется еще около двух недель для созревания ооцитов у самки, так как из куколки выходят неполовозрелые жуки. Таким образом, в год появляется в среднем 1,5 – 2 поколения божьих коровок (Hodek, 1973).

### 1.2.1 Таксономия божьих коровок рода *Adalia*

#### *Adalia bipunctata*

Двухточечная коровка *Adalia bipunctata* распространена в палеоарктической области, где считается в основном синантропным видом. Ареалом распространения являются Европа, Сибирь и Средняя Азия. В краевых областях ареала, особенно на юге и юго-востоке, типичная форма замещается формами, отличающимися от типичной по морфологии.

Лусис провел критический анализ характерных отличительных морфологических признаков разных видов и морф коровок р. *Adalia* и пересмотрел классификацию адалий. 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 (рис. 1). Другие формы *A. bipunctata* характеризуются наличием многих пятен на надкрыльях, образующих своеобразные узоры (рис. 2). У *A. b. fasciatopunctata* искривленные полосы в верхней части и два ряда пятен в средней и нижней части надкрылий, пятна второго и третьего ряда могут быть слитными и образовывать поперечные полосы, возможны и некоторые

другие вариации слияния и разделения пятен. Красный фон элитры у форм *fasciatopunctata* несколько отличается от фона *bipunctata* своим малиновым оттенком. У среднеазиатских *A. b. turanica* характерным отличительным признаком является красновато-желтая окраска ног, с которой коррелирует более светлая пигментация всей нижней стороны тела, в особенности брюшных стернитов, для них характерны доминантные черные рисунки с одним или многими красными пятнами на каждой элитре. У *A. b. revelierei* переднеспинка бледно-желтая с М-образным черным рисунком посередине и двумя черными точками, расположенными по бокам фигуры М, или же черная со светлым бордюром по краям, ноги и низ брюшка черные. Для *A. b. revelierei* характерна светло-розовая окраска фона элитры и пять-семь точек на надкрыльях (рис. 2).

На основании морфологических признаков и того, что каждая специфическая популяция занимает определенный характерный эколого-географический ареал и имеет, очевидно, свою историю развития, многие исследователи выделяли формы с различной морфологией в самостоятельные систематические единицы - виды или подвиды: *A. bipunctata* Linneaus, 1758 (Евразия), *A. revelierei* Mulsant, 1866 (малая и Передняя Азия, Закавказье), *A. turanica* Lusic, 1947 (Средняя Азия), *A. fasciatopunctata* Mader, 1931 (Монголия, Тува, Забайкалье и прилегающая часть Сибири). Я.Я. Лусис (1973) на основе анализа многочисленных скрещиваний особей различного географического происхождения доказал, что ранее выделявшиеся в самостоятельные виды *A. revelierei* и *A. turanica* дают плодовитые гибриды с *A. bipunctata* и рассматривал данные формы как подвиды *A. bipunctata*.





**Рисунок 1.** Типичные формы *Adalia bipunctata*: красная и черная форма (меланист).



*Adalia bipunctata fasciatopunctata*



*Adalia bipunctata revelierei*

**Рисунок 2.** Морфологически отличающиеся формы вида *Adalia bipunctata*.

### Другие виды р. *Adalia*

В Палеарктической области некоторые систематики насчитывают десять видов р. *Adalia*. Наиболее близки к *A. bipunctata* три вида рода *Adalia*: *A. decempunctata* Linneaus, 1758, *A. tetraspilota* Норе и *A. frigida* Schneider, 1792. Виды *A. decempunctata* и *A. tetraspilota* (рис. 3) не дают гибридов с формами *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. В частности, в Ташкенте (Узбекистан) Я.Я.Лусис указывает, что эти виды репродуктивно изолированы: "*A. decempunctata* (L.) и *A. tetraspilota* (Норе) являются настоящими хорошими видами, отделенными друг от друга, а также от *A. bipunctata* (L.), биологическими изолирующими механизмами, что позволяют им там, где они живут совместно, существовать без обмена генами, сохранять свои генофонды" (Лусис, 1973). Лусис отмечает, что им было получено потомство от скрещиваний особей *A. tetraspilota* с *A. b. turanica*, обитающих в общих биотопах в южной части Средней Азии, и от самок *A. b. bipunctata* с самцами *A. tetraspilota*, но только от отдельных индивидуальных пар и в небольшом количестве; при реципрокных скрещиваниях гибридов не удавалось получить. Некоторые гибридные самки первого поколения, при возвратных скрещиваниях с самцами *A. tetraspilota* дали единичных F<sub>2</sub> - гибридов, но дальнейшего потомства от них получить не удавалось. Такие же результаты были получены при скрещивании самок *A. decempunctata* с самцами *A. tetraspilota* (Лусис, 1973).

Циркумполярный вид *A. frigida* обитает в приполярных районах на севере Евразии, от Скандинавии до Якутии. *A. frigida* представляет также громадную аллопатрическую систему популяций и по морфологии очень близок к формам комплекса *A. bipunctata* (Лусис, 1976). Типичный для вида *A. frigida* рисунок отличается от рисунка *A. b. fasciatopunctata* отсутствием на элитрах пятен переднего ряда, наличием на переднеспинке черной фигуры в виде буквы М и двумя черными точками по бокам этой фигуры (рис. 4). Рисунок на переднеспинке, однако, варьирует в сторону потемнения - ветви фигуры М расширяются, происходит слияние боковых точек с центральной



*Adalia tetraspilota* (две формы слева трудно отличимы от *A. bipunctata*)



*Adalia decempunctata*

**Рисунок 3.** *Adalia tetraspilota* и *Adalia decempunctata*.

фигурой, и в крайних случаях переднеспинка становится черной, с узкой белой каймой по наружным краям и спереди и парой светлых двориков посередине у основания; вариации в сторону посветления более редки и сводятся к исчезновению боковых пятен и некоторому уточнению столбцов фигуры М. На элитрах, судя по сборам из Евразии, чаще всего исчезает латеральное пятно среднего ряда, в более редких случаях - наружное пятно или оба пятна заднего ряда. В виде исключения попадаются особи с небольшим плечевым пятном переднего ряда. Слияние пятен в поперечные перевязи - явление довольно обычное и в особенности часто оно наблюдается в сборах из Азиатской части ареала вида, в то время, как в Европейской полосе преобладают более светлые формы со свободными пятнами и при более частом исчезновении некоторых из них (Лусис, 1973). *A. frigida* распространена в зоне тундр и лесотундр, занимает обширные пространства на севере Магаданской области и на Чукотке (Кузнецов, 2006). Таксономическое положение *A. frigida* до сих пор не ясно. Разные авторы рассматривают *A. frigida* как подвид или форму *A. bipunctata* (Кузнецов, 2006; Корсун, 1997) или как отдельный вид *A. frigida* (Лусис, 1976; Томилова, Плешанов, 1977; Bielawski, 1984). Лусис установил, что при скрещивании камчатской *A. frigida* с типичной формой *A. bipunctata* из рижской популяции гибриды первого поколения фертильны и по рисунку элитр и переднеспинки относятся к типу *bipunctata*. Но, в дальнейшем, как при скрещивании гибридов между собой, так и при возвратных скрещиваниях с представителями различных географических популяций *A. bipunctata*, "при всех спариваниях лишь ничтожный процент яиц дал вылупление и до взрослого состояния удалось вырастить лишь единичных особей. Эти данные, несомненно, указывают на наличие репродуктивной изоляции. В природных условиях, очевидно, эти виды не смешиваются; таким образом, несмотря на аллопатричность, *A. frigida* должно рассматриваться в качестве самостоятельного вида, а не подвида *A. bipunctata*. Интересно отметить, что первое поколение от скрещивания *A. frigida* x *A. bipunctata* получается сравнительно легко и, по-видимому, является даже гетерозиготным, нарушение процессов размножения дает место лишь во втором поколении, в то время как при межвидовых скрещиваниях *A. bipunctata*, *A. decempunctata* и *A. tetraspilota* уже в первом поколении проявляются эти нарушения" (Лусис, 1976).

Смешанные популяции и копулирующие особи *A. frigida* с типичными *A. bipunctata* наблюдались в Забайкалье, где были обнаружены также и существенные экологические и

*Adalia frigida*

**Рисунок 4.** Фото *Adalia frigida*.

поведенческие различия между ними. В работе Бутько Е.В. были выявлены различные предпочтения мест зимовок и питания особей двух видов. Автор предполагает существование частичной пространственной (биотопической), временной и поведенческой изоляции особей *A. frigida* и *A. bipunctata* в пределах забайкальских популяций (Бутько, 2005).

Интерес к божьим коровкам, как к объектам эколого-генетических исследований, сохраняется и в настоящее время. Виды божьих коровок р. *Adalia* имеют широкие ареалы распространения, что позволяет изучать географические тенденции изменения генофонда и выделить факторы, влияющие на генетическую структуру популяций. Исследования форм-меланистов добавляют примеры того, как некоторые организмы, вероятно, будут реагировать на изменение климата посредством прямых генетических ответов внутри популяций; такие примеры необходимо понимать в деталях, чтобы иметь возможность правильно оценить вероятный вклад адаптации к местным условиям и генетических ответов живых организмов на будущее изменение климата (Brakefield, de Jong, 2011). На жуках этого рода легко проводить экспериментальные исследования.

Основными таксономическими признаками, по которым идентифицируют виды р. *Adalia*, являются окраска и рисунок различных частей тела (голова, переднеспинка, элитр, нижней стороны тела, ног). Окраска и рисунок являются важными систематическими признаками и в других родах семейства Coccinellidae. Но именно эти признаки являются высоко изменчивыми, индивидуально и географически, особенно у видов р. *Adalia*, все виды адалий являются полиморфными по окраске. Как отмечал Лусис: "Систематиками описано у видов *Adalia*, с соблюдением всех правил таксономической номенклатуры, большое количество aberrаций, т.е. индивидуальных отклонений от типичного рисунка (f. *nominata*), среди которых мы можем встретить указанные формы полиморфизма и многочисленные мелкие вариации их. В каталоге жесткокрылых Юнка-Шенклинга Коршефский перечисляет для *Adalia bipunctata* 101 aberrацию (не считая многих названий, переведенных в разряд синонимов), для *A. decempunctata* - 119, *Ad. conglomerata* - 33, *Ad. frigida* - 23, *Ad. fasciatopunctata* - 14, *Ad. revelierei* - 9, *Ad. tetraspilota* - 4, *A. koltzei* - 1. Малое число aberrаций у внеевропейских видов скорее объясняется недостаточностью материалов, имевшихся в распоряжении систематиков, нежели малой изменчивостью их" (Лусис, 1973).

Ареалы распространения одних видов р. *Adalia* накладываются на ареалы других, особенно это распространено на границах ареалов. Так, ареал распространения *A.*

*bipunctata* на севере перекрывается с ареалом циркумполярного вида *A. frigida*. На востоке *A. bipunctata* сосуществует с *A. b. fasciatopunctata* и, частично, с *A. frigida*. На юге, в Средней Азии, ареал *A. b. fasciatopunctata* пересекается с северной границей ареала индийско-гималайского вида *A. tetraspilota*. Области распространения *A. decempunctata* и *A. bipunctata* в Европе совпадают. Нередко существуют гетероморфные популяции, т.е. популяции, состоящие из нескольких достаточно резко различающихся друг от друга основных типов или форм, в различных, но более или менее постоянных соотношениях. Каждая из этих основных форм, в свою очередь, может варьировать в определенных направлениях и границах. Полиморфные формы одних видов часто ошибочно идентифицируют и относят к другим видам. Исследование генетической структуры популяций адалий современными методами молекулярно-генетического анализа представляется в этой связи важной задачей.

### 1.2.2 Генетика *Adalia bipunctata*

В кариотипе *A. bipunctata* 10 пар хромосом ( $2n=20$ ), девять пар аутосом и пара половых хромосом Ху. Самцы гетерозиготны по половым хромосомам, так же как и у других 101 вида божьих коровок, изученных кариотипически (Rozec, Holesova, 2002).

На протяжении 1929-1940 гг. Н.В. Тимофеев-Рессовский исследовал действие естественного отбора в природных условиях на примере изучения сезонной динамики полиморфизма в немецких популяциях *A. bipunctata* (Timofeeff-Ressovsky, 1940; Тимофеев-Рессовский, Свирижев, 1966). В этих работах было обнаружено, что черные особи получают репродуктивное преимущество в весенние и летние месяцы, тогда как красные формы получают преимущества в зимний период. Однако, эти результаты не были подтверждены в других популяциях. В популяциях *A. bipunctata* был экспериментально показан половой отбор: преимущественный выбор черных партнеров для спаривания (O'Donald, Majerus, 1984). Этот механизм может обеспечить поддержание полиморфизма по окраске. Значительное увеличение доли темных жуков в популяциях больших городов к середине 20-го века, по сравнению с 1908-1910 гг., связывают с "индустриальным меланизмом": предполагалось, что особи черной окраски (меланисты) имеют больше шансов выжить и дать потомство в городе. После 90-х годов прошлого столетия на примере Петербургской популяции наблюдается падение частоты черных

особей и изменение аллельного состава внутри группы черных коровок. Обсуждались две причины изменения частоты меланистов: во-первых, это может быть связано с общим уменьшением загрязнения или со снижением концентрации отдельных компонентов, например сажи; во-вторых, могла быть генетическая причина - если аллели черной окраски обеспечивали большую устойчивость к стрессовым факторам среды, возможно, за счет некоторых компонентов приспособленности, затем происходит замещение на другие аллели, обеспечивающие более специфическое приспособление, не сопровождающееся потерей жизнеспособности (Захаров, 1995).

Наиболее значительный вклад в изучение генетики адалий внес Я.Я. Лусис (Лус), который с 1925 по 1979 г. изучал географически-удаленные популяции по всей территории Советского Союза. Им были проведены "опыты по скрещиванию в лабораторных условиях различных форм из различных популяций ряда видов *Adalia* (истинных или описанных в качестве таковых), во время которых было выращено свыше 50000 взрослых жуков от большого количества индивидуальных пар, в сочетании с личными наблюдениями и сборами жуков, куколок и личинок в природных популяциях, а также при ознакомлении со сборами других лиц и музейных материалов" (Лусис, 1973).

Именно Лусу (Лусису) удалось выяснить, что многочисленные вариации окраски элитр и переднеспинки *A. bipunctata* обусловлены наличием большой серии множественных аллелей одного локуса, обозначенного *S*, причем более темные формы последовательно доминантны по отношению к более светлым (Лус, 1928, 1932). Лус обнаружил 9 аллелей гена *S* и установил ряд их доминирования. В большинстве случаев в скрещиваниях наблюдалось полное доминирование. В ряде опытов при скрещивании особей, имеющих в генотипе аллели, стоящие в ряду доминирования рядом, выявлено неполное доминирование и появление жуков с промежуточной окраской элитр. Выявлен и летальный в гомозиготном состоянии аллель -  $S^{\circ}$ , *ocellata*. Жуки типичной формы *A. bipunctata* с двумя черными пятнами на красных надкрыльях имеют аллель *S turica*, расположенный в ряду доминирования в середине.

У среднеазиатских адалий брюшко и ноги коричневые, а не черные, как у европейских *A. bipunctata*. По данным Луса (1928) проявление этих признаков контролируется геном, не связанным с геном *S*. Аллель *B* определяет черный пигмент, а аллель *b* - бурый. Рисунок переднеспинки наследуется сцепленно с окраской надкрылий, поэтому предполагается плейотропное действие гена *S*.



Изучение закономерностей наследования рисунка на надкрыльях и биологического значения этого полиморфизма были продолжены в работах Majerus (1994), который при изучении популяций Великобритании описал 120 различающихся форм *A. bipunctata*. После проведенных скрещиваний был сделан вывод, что все четыре черных фенотипа (меланисты) - *sublunata*, *lunigera*, *quadrimaculata* и *sexpustulata*, контролируются одним аллелем главного локуса, а проявление признака зависит от модификаторов. Фенотип *anulata* (отличается от *typica* большим развитием меланистического пигмента) соответствует гетерозиготе с *typica*. В английской популяции были обнаружены темные фенотипы, подобные *quadrimaculata* и *sexpustulata*, но не с красными, а с желтыми и оранжевыми пятнами. Их назвали *Cambridge melanic*. Такие фенотипы были обнаружены в инбредных линиях и в скрещиваниях с *typica* такие аллели проявляли себя как рецессивные. Сделан вывод, что рекомбинация внутри сложного локуса приводит к появлению редких вариантов окраски (Majerus, 1994).

Эти данные противоречили гипотезе Луса о доминировании в ряду аллелей гена *S*. И.А. Захаров продолжил изучение генетических детерминант рисунков надкрылий у российских адалий, доказал правильность выводов Луса для изученных популяций. При проведении скрещиваний также был выделен новый фенотип, *tigrina*, и определено место аллеля, определяющего такую окраску, в ряду доминирования (Захаров, 1996). Изучение наследования рисунков надкрылий у *A. bipunctata* показало, что фенотипический полиморфизм имеет двоякую генетическую основу. Во-первых, это множественность аллелей в локусе *S*, определяющем основные типы рисунка на надкрыльях и переднеспинке. Во-вторых, это существование аллелей с варьирующей экспрессивностью, дающих при одном и том же генотипе по гену *S* очень широкий спектр форм. Фенотипическая вариабельность оказывается не свойством признака, не свойством популяционного генофонда или генотипа в целом, а свойством конкретного аллеля. Поэтому, исследования ДНК представляются очень актуальными.

### 1.2.3 Изменчивость ДНК *Adalia*

В проведенных на этом объекте исследованиях обычно учитывался полиморфизм по одному гену *S*, определяющему окраску и характер рисунка на надкрыльях (Захаров, 1996). Изменчивость по молекулярным маркерам у жуков рода *Adalia* и в комплексе *A. bipunctata* почти не изучалась, она был описана только в нескольких работах (Schulenburg

et al., 2001, 2002; Паленко и др., 2004; Jiggins, Tinsley, 2005). Schulenburg, Hurst, Zakharov и соавторы (2002) описали полиморфизм в популяциях *A. bipunctata* по двум генам митохондриальной ДНК – гену субъединицы I цитохромоксидазы (*COI*) и НАДН дегидрогеназы 5 (*ND5*). Авторы проанализировали последовательности мтДНК генов цитохромоксидазы субъединицы I и II и почти полной последовательности нуклеотидов гена *ND5* у двух особей *A. bipunctata* и сравнили их между собой и с мтДНК *A. decempunctata*. Были выделены две наиболее вариабельные области генома, 610 п.н. в гене *COI* и 563 п.н. в гене *ND5*, подходящие для популяционных исследований. Анализ данных участков генома у 52 особей *A. bipunctata* с известным статусом инфицированности симбиотическими бактериями и различного географического происхождения показал, что распределение митохондриальных гаплотипов не связано с географией. Были изучены особи из английской, немецких, датской и российских популяций из Москвы (22 особи) и Санкт-Петербурга (4 особи), Томска (1) и Тывы (1 особь). Было описано 10 мт-гаплотипов по гену *COI* и 10 мт-гаплотипов по гену *ND5*, у некоторых особей корреляция между двумя генами отсутствовала. 29 из 52 исследованных адалий были инфицированы симбиотическими бактериями 3 видов -*Spiroplasma*, *Rickettsia*, *Wolbachia*. Зараженность бактерией *Rickettsia* оказалась характерна для особей с двумя мт-гаплотипами Н9 и Н10, связь других симбионтов с определенными мт-гаплотипами не была обнаружена (Schulenburg et al., 2002). Связь мт-гаплотипов Н9 и Н10, а также и Н7 с *Rickettsia* у английских и шведских *A. bipunctata* была обнаружена и в работе Джиггинс и Тинслея (2005), в этой же работе было рассчитано примерное время дивергенции гаплотипов Н9 и Н10 от гаплотипа Н7 (Jiggins, Tinsley, 2005).

Изменчивость митохондриальной (3' конца гена *COI*) и ядерной (область ITS1, 5,8S, ITS2 кластера генов рРНК) ДНК у *A. bipunctata* в сравнении с ДНК божьих коровок из других родов (*Coccinella*, *Harmonia*, *Hippodamia*, *Semiadalia*, *Propylea*, *Thea*, *Exochomus* и *Chilocorus*) была исследована в работе Паленко и соавторов (2004а). Было обнаружено, что степень дивергенции 3' последовательности гена *COI* у божьих коровок восьми родов колеблется от 11,8 до 28,6%. Меньшие генетические дистанции были зафиксированы между мицетофагами и афидофагами, по сравнению с кокцидофагами. Сходные по окраске и обитающие в сходных экологических условиях жуки родов *Hippodamia* и *Semiadalia* оказались сближены и в филогенетическом отношении. Вид *A. bipunctata* представляет наиболее позднюю ветвь в эволюции трибы Coccinellini. Область кластера генов рРНК у жуков 5 родов варьировала по размеру, у *A. bipunctata* оказалась наибольшей (Паленко и др., 2004а). Внутри рода *Adalia*, по 3' последовательности гена

*COI* были обнаружены различия между видами *A. bipunctata* и *A. decempunctata*, и отсутствие различий между *A. bipunctata* и *A. b. fasciatopunctata* (Паленко и др., 2004б).

Из ядерных локусов у *A. bipunctata* и *A. decempunctata* были определены последовательности ДНК области ITS1 рРНК (Schulenburg et al., 2001) и участка гена глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (Г-6-ФДГ) (Jiggins, Tinsley, 2005). Изменчивость по данным двум областям генома внутри вида *A. bipunctata* оказалась ниже, чем изменчивость митохондриальной ДНК.

### 1.3 Симбиотические бактерии

Симбиотические бактерии чрезвычайно широко распространены у насекомых и других членистоногих. Не менее 65 % видов артропод заражено внутриклеточными симбиотическими бактериями (Hilgenboecker et al., 2008). В последнее десятилетие наблюдался бум исследований по изучению биологии симбионтов и их взаимоотношений с хозяевами (Ferrari, Vavre, 2011). Среди всех известных симбионтов *Wolbachia* остается самой распространенной, бактерии трех других родов - *Spiroplasma*, *Cardinium* и *Arsenophonus*, также широко распространены среди артропод, *Rickettsia* относятся к редким симбионтам (Duron, Hurst, 2013).

Симбионты по-разному влияют на фенотипы хозяев: они могут обеспечить фитнес-преимущества хозяина - например, предоставление им необходимых питательных веществ (Douglas, 1998) и защиту от естественных врагов (Brownlie, Johnson, 2009), или манипулировать размножением хозяина (Engelstaedter, Hurst, 2009). Бактериальные симбионты прямо или косвенно влияют на взаимодействие хозяина с другими особями внутри популяции и на отношения представителей разных популяций между собой. К факторам, которые формируют симбиотические сообщества относят взаимодействия между генотипом хозяина, генотипом симбионта и средой, взаимодействия между симбионтами, а также и горизонтальную передачу симбионтов (Ferrari, Vavre, 2011).

Симбионты являются важными факторами эволюционных изменений у насекомых. Симбиотические бактерии передаются как правило по материнской линии, вместе с цитоплазмой яйцеклетки и могут вызывать различные эффекты (цитоплазматическую несовместимость, феминизацию, гибель самцов и пр.), изменяющие характер размножения хозяина. Искажения в соотношении полов или цитоплазматическая

несовместимость являются механизмами, с помощью которых бактерии - паразиты репродуктивной системы членистоногих, распространяются в популяциях. В ряде случаев симбионты являются причиной сокращения потока генов между популяциями в пределах некоторых видов за счет цитоплазматической несовместимости, что приводит к репродуктивной изоляции и возникновению новых таксонов (Ferrari, Vavre, 2011). Симбиотические бактерии участвуют в сокращении глобального генетического разнообразия за счет экспансии в популяциях связанных с ними генотипов (Jiggins, 2003).

Недавние исследования доказали, что симбиотические микроорганизмы не просто репродуктивные паразиты. Наиболее изученная из всех симбиотических бактерий, *Wolbachia*, у членистоногих стала условной мутуалисткой, придающей преимущества хозяину при определенных условиях окружающей среды. Например, *Wolbachia* увеличивает плодовитость *Drosophila melanogaster*, выращенных на средах с дефицитом или, наоборот, с избытком железа и, таким образом, придает прямое приспособительное преимущество в периоды пищевого стресса (Brownlie et al., 2009). Наиболее существенное положительное значение симбиоза - *Wolbachia* может защитить своих хозяев от нападения естественных врагов. Инфекция *Wolbachia* мешает репликации и распространению широкого спектра патогенных микроорганизмов и паразитов (в том числе РНК-содержащих вирусов, бактерий, простейших и нематод), и защищает своего хозяина от индуцированной паразитами смертности (Brownlie, Johnson, 2009). Эти свойства привели к тому, что *Wolbachia* рассматривается в качестве агента, способного ограничить передачу патогенов человека и животных членистоногими (Hoffmann et al., 2011). При лечении филяриозов у людей и собак, например, эффективен курс антибиотиков, при котором мишенью воздействия является биологический симбионт филярий – бактерия *Wolbachia*, участвующая в процессе эмбриогенеза гельминтов. После уничтожения бактерии гибнут и филярии (Taylor et al., 2013). Разнообразные симбионты тлей, в том числе и члены родов *Rickettsia* и *Spiroplasma*, обеспечивают их защиту от паразитической осы и поражения грибками (Oliver et al., 2010; Lukasik et al., 2012). *Spiroplasma* определяет устойчивость к паразитам у *Drosophila* (Jaenike et al., 2010).

Наследуемые симбионты способствуют адаптации хозяина. Пожалуй, самым примечательным наблюдением недавнего времени является скорость адаптаций, ассоциированных с симбионтом. В течение 30 лет один из штаммов *Spiroplasma* распространился во множестве североамериканских популяций *Drosophila neotestacea*, за счет того, что он защищает от паразитической нематоды (Jaenike et al., 2010). У белокрылки штамм *Rickettsia*, который повышает количество потомства и его способность

к выживанию, размножился от менее 1% инфицированных особей до 97% всего за 6 лет (Himler et al., 2011). Стремительное распространение полезных, определяемых симбионтом признаков может быть обычным явлением у насекомых. И хотя правилом является вертикальная передача симбиотических бактерий по материнской линии, передача между разными видами-хозяев также имеет место. Например, в роду *Spiroplasma* бактерии, родственные *S. ixodetis*, вызывают гибель самцов у отдаленно родственных хозяев (бабочек и божьих коровок), что предполагает горизонтальный перенос бактерии между видами в течение эволюционного времени (Hurst, Jiggins, 2000). Горизонтальный перенос *Wolbachia* обнаружен у многих членистоногих, главным образом через наблюдаемые несоответствия между филогенией симбионтов и их хозяев (Werren et al., 1995; Werren et al., 1997; O'Neil et al., 1997; Baldo et al., 2008; Raychoudhury et al., 2009). Необходимым условием для горизонтального переноса, по-видимому, является тесный контакт между донором и реципиентом паразита, так как *Wolbachia* является облигатным внутриклеточным симбионтом. Но также было показано, что некоторые лабораторные штаммы *Wolbachia* могут выжить вне клеток хозяина в течение некоторого времени (Werren et al., 2008). Векторами для передачи симбионтов между различными хозяевами могут служить паразиты, такие как паразитические осы, поскольку доказаны случаи заражения паразитов насекомых, симбионтами от их хозяев и наоборот (Schilthuizen, Stouthamer, 1997; Vavre et al., 1999; Heath et al., 1999; Huigens et al., 2000). Обмен бактериями через одни и те же источники питания был предложен в качестве другого возможного пути инфицирования: между членистоногими, питающимися на листьях тыквы (Sintupachee et al., 2006), двукрылыми мицетофагами (Stahlhult et al., 2010); насекомыми рисовых полей (Kittayapong et al., 2003) и паразитическими осами (Huigens et al., 2000). Другими возможными путями для горизонтального переноса симбионтов являются обмен гемолимфой между зараженными и незараженными особями, что было показано у изопод *Armadillium vulgare* (Rigaud et al., 1995), социальный паразитизм (сосуществование нескольких видов в одной колонии), как у муравьев-пожарников *Solenopsis* spp (Dedene et al., 2005), и взаимодействия хищник-жертва (Cordaux et al., 2001). У комаров *Anopheles gambiae* и *An. stephensi* обнаружена "венерическая" передача бактерии *Asaia* при половых контактах (Kittayapong et al., 2002; Damiani et al., 2010; Cook, McGraw, 2010).

Часто происходит перенос генетической информации симбионтов в ядерный геном хозяина, хотя функциональное значение передаваемого материала пока еще не ясно (Hotopp, 2011). Симбионты могут также обмениваться генетической информацией с

другими симбионтами: бактерии "обычно неразборчивы в отношении ДНК" (Duron, Hurst, 2013) и различные симбионты, проживая в пределах одной клетки-хозяина, обеспечивают возможность переноса генов друг другу. Есть свидетельства того, что *Wolbachia* обмениваются фагами, когда два штамма совместно заражают одного хозяина (Kent et al., 2011). В этом контексте горизонтальный перенос симбионтов между разными видами может служить мощным механизмом эволюции (Duron, Hurst, 2013). Следовательно, широкое распространение симбионтов среди членистоногих, осуществляется в результате сложных взаимодействий между вертикальным и горизонтальным способами передачи, меняющимся в зависимости от способности бактерии изменить воспроизводство хозяина.

### 1.3.1 *Wolbachia* у *Culex pipiens*

*Wolbachia* была впервые открыта в 1924 г. в клетках *C. pipiens* (Hertig, Wolbach, 1924). Формальное описание было опубликовано в 1936 г. Hertig, который назвал новый род в честь своего коллеги: "Неизменное присутствие риккетсии в гонадах комаров *Culex pipiens* подтверждается. Эта риккетсия находится в цитоплазме каждой зародышевой клетки у обоих полов на всех стадиях развития от личинки до взрослого насекомого. Никакие другие виды комаров, как известно, подобно не инфицированы... Для риккетсии из *Culex pipiens* предлагается название *Wolbachia pipientis* (gen. et sp.n.)" (Hertig, 1936). *W. pipientis* относится к альфа-протеобактериям и супергруппе В рода *Wolbachia*.

Более 90% особей *C. p. pipiens* обеих форм, *C. p. pallens* и *C. p. quinquefasciatus* в естественных популяциях заражены *W. pipientis* (wPip) (Rasgon, Scott, 2003). До настоящего времени были обнаружены только две неинфицированные популяции *C. p. pipiens* в Родезии, Зимбабве (Irving-Bell, 1974) и в Южной Африке вблизи Йоханнесбурга (Cornel et al., 2003), особи последней оказались репродуктивно изолированы от симпатрической популяции инфицированных *C. p. quinquefasciatus*. Такая высокая распространенность хорошо объясняется способностью самцов, инфицированных wPip вызвать цитоплазматическую несовместимость (ЦН) с неинфицированными самками, передачей инфекции практически только по материнской линии и отсутствием негативного воздействия бактерии на плодовитость зараженных самок (Rasgon, Scott, 2003; Duron et al., 2006a). Среди всех насекомых, ЦН была установлена впервые именно у *C. pipiens*, когда при скрещивании линий различного географического происхождения

наблюдалась дегенерация эмбрионов (Marshall, 1938; Laven, 1951). Позднее, было показано, что именно *Wolbachia* является цитоплазматическим фактором, ответственным за эти несовместимости (Yen, Barr, 1971). ЦН выражается в том, что сперма инфицированных самцов несовместима с яйцеклетками неинфицированных самок. В результате неинфицированные самки не могут оставить потомства, а инфицированные самки получают репродуктивное преимущество (Yen, Barr, 1971; Rasgon, Scott, 2003; Duron et al., 2006a). Помимо этого простого случая, ЦН также наблюдалась в ряде случаев между самцами и самками, несущими несовместимые штаммы *wPip* (Guillemaud et al., 1997; Duron et al., 2006a; Duron et al., 2007a; Atyame et al., 2011a; Duron et al., 2012).

Уже достаточно давно признано, что у комаров комплекса *Culex pipiens* наблюдается самое большое разнообразие проявлений ЦН, поэтому *C. pipiens* и *Wolbachia* являются одной из основных моделей для изучения динамики ЦН. Эксперименты по скрещиванию, проведенные за последние 80 лет, показывают, что линии *C. pipiens* демонстрируют высокий уровень одно- и двунаправленных ЦН (например, Marshall, 1938; Laven 1951; O'Neill and Paterson, 1992; Guillemaud et al., 1997; Duron et al., 2012; Atyame et al., 2014). Но лучше всего многообразие типов скрещивания между линиями *C. pipiens* проиллюстрировал Laven (1967), который описал 17 различных типов скрещиваний в популяциях со всего мира. Даже у комаров из очень ограниченных зон обитания наблюдался высокий полиморфизм типов несовместимости: Barr (1980) выделил три цитотипа в природных популяциях Южной Калифорнии и было найдено, по крайней мере, шесть цитотипов среди восьми линий на юге Франции (Magnin et al., 1987). Для объяснения этой необычной ситуации Barr (1982) выдвинул гипотезу быстрой дивергенции *Wolbachia*, а позже, Clancy и Hoffmann (1996) предположили множественные инфекции в качестве возможного объяснения некоторых из типов цитоплазматической несовместимости у *Drosophila simulans* (Guillemaud et al., 1997). Последующее развитие исследований симбиоза *C. pipiens* и *Wolbachia* подтвердили оба эти предположения.

Механизмы индуцированной *Wolbachia* ЦН в настоящее время активно выясняются. Сейчас общепризнано, что в ЦН вовлечены два процесса: модификация (modification, mod) спермы самцов, что нарушает процесс кариогамии, и "спасение" (rescue, resc), предоставляемое *Wolbachia*, находящейся в яйце самки, с помощью которого восстанавливается кариогамия нормальных мужских и женских пронуклеусов в совместимых скрещиваниях, т.н. Mod-Resc механизм (Werren, 1997; Walker et al., 2009). Есть несколько факторов, которые, как считается, влияют на проявление ЦН у насекомых:

плотность *Wolbachia* (Bordenstein et al., 2006), тип штамма *Wolbachia* (Sakamoto et al., 2005), и хозяйский генотип (McGraw et al., 2001; Sasaki et al., 2005).

У нескольких видов хозяев, таких как *D. simulans*, спаривания со старыми самцами вызывают слабое проявление ЦН (Turelli, Hoffmann, 1995), эффект, связанный с низкой плотностью *Wolbachia*, наблюдаемой в гонадах старых самцов (Clark et al., 2002; Veneti et al., 2003). Но при взаимодействии *wPip* и *C. pipiens* это явление не наблюдается: ЦН проявляется с той же интенсивностью в течение всей жизни самца, будь то самец из лабораторной линии или из природных популяций (Rasgon, Scott, 2003; Duron et al., 2007a).

При изучении двусторонней ЦН между линиями Pel и Bei *C. p. quinquefasciatus* было показано, что на ЦН влияет генотип хозяина при интрогрессии ядерного генома Pel в цитоплазму Bei (Sinkins et al., 2005). Однако, влияние генетического фона хозяина на одностороннюю несовместимость между *C. p. quinquefasciatus* линии Col и *C. p. pipiens* f. *molestus* линии Mol найдено не было (Walker et al., 2009).

Таким образом, было доказано, что плотность *Wolbachia* не влияет на проявление ЦН у *C. pipiens*, а хозяйский генотип влияет не всегда. Вероятнее всего, проявление ЦН у *C. pipiens* зависит от свойств самой бактерии. В последних исследованиях было показано, что один из генов *Wolbachia* - транскрипционный регулятор, названный *wtrM*, регулирует экспрессию гомолога гена *Grauzone* дрозофилы, который кодирует белок, «цинковый палец» и действует как регулятор женского мейоза, мутации в котором могут привести к бесплодию. Эти данные показывают, что регуляция экспрессии генов хозяина, опосредованная *Wolbachia*, является составной частью механизма цитоплазматической несовместимости у *Culex* (Pinto et al., 2013).

При изучении природных популяций *C. pipiens* было обнаружено, что географически близкие популяции на юге Франции отличались значительным разнообразием штаммов *Wolbachia* (по мультилокусному анализу количество штаммов составило 37), которое стабильно сохранялось более 15 лет (Duron et al., 2011). Авторы также наблюдали очень низкую частоту бесплодных кладок внутри каждого места сбора. Между тем, после исследования потенциальных предпочтений спаривания в лабораторных условиях, никаких доказательств существования ассортативных спариваний не было обнаружено. Это говорит о том, что в природных популяциях на юге Франции существует большой набор совместимых *wPip* штаммов, которые всегда локально доминируют в популяции комаров *C. pipiens* (Duron et al., 2011).



В экспериментах с четырьмя несовместимыми изосамочными лабораторными линиями была доказана возможность быстрой эволюции Mod-Resc системы у комаров *C. pipiens*. Было изучено проявление ЦН больше, чем в 50 поколениях от скрещивания четырех линий *C. pipiens*, проявляющих как дву- и одностороннюю несовместимость, так и полную совместимость. В двух линиях комаров ЦН эволюционировала от полной до частичной несовместимости (т.е. через четыре года экспериментов была получена смесь совместимых и несовместимых кладок). Эксперименты по скрещиванию показали, что два различных типа ЦН появились у самок двух из 4 тестируемых линий. В данных линиях выделились сублинии: самки одних из этих сублиний проявляли полную несовместимость, как и исходная линия, тогда как самки других сублиний начали проявлять частичную совместимость. У остальных изменений в проявлении ЦН не зафиксировано. Были исключены случайная контаминация, вторичное заражение другим штаммом *wPip* и инфекция другим симбионтом, также как и влияние ядерного генома хозяина. На основании серии экспериментов по скрещиванию особей из разных линий и сублиний авторы констатируют, что появление новых типов ЦН зависит только от свойств *Wolbachia* и могут быть объяснены прибавлением новых Resc функций, тогда как Mod функции не изменяются (Duron et al., 2012). Эволюция типов ЦН в *C. pipiens* таким образом, представляется авторам как постепенный процесс, в котором один или несколько факторов Resc сосуществуют в одном хозяине, в дополнение к предковым, участвующим в само-совместимости. ЦН у *C. pipiens* выглядит как очень динамичный процесс, предковая и мутантная *Wolbachia* проявляют различные Resc функции и могут совместно заразить хозяина, открывая возможность для последующего развития функций Mod. Это дает первую подсказку к пониманию того, как *Wolbachia* проявляет такое многообразие ЦН в популяциях *C. pipiens* (Duron et al., 2012).

Для понимания природы взаимодействия бактерии и хозяина очень важно определить различия между штаммами *wPip*, вызывающими ЦН в линиях *C. pipiens*. Для характеристики восьми супергрупп (A-I), в настоящее время признанных в составе рода *Wolbachia*, традиционно используется система мультилокусного тестирования (MLST) пяти генов: *gatB*, *coxA*, *hcpA*, *ftsZ*, и *fbpA* (Baldo et al., 2006). Исследования с помощью метода MLST и гена *wsp* белка оболочки *Wolbachia* (Braig et al., 1998), разработанных для дифференцирования *Wolbachia*, не позволяют выявить существенных различий между *wPip* штаммами, показывая, что они представляют молодую и строго монофилетическую кладу в супергруппе B рода *Wolbachia*, которая тесно связана (идентичность >99.9%) со штаммом *wBoll*, инфицирующим бабочку *Hypolimnas bolina* (Atyame et al., 2011b).

В 2009 году были опубликованы результаты секвенирования полного генома *wPip* из *C. p. quinquefasciatus* линии Pel (Klasson et al., 2009) с целью найти молекулярные основы внутриклеточных взаимодействий бактерии и хозяина. Геном *wPip* (B-супергруппа) состоит из 1,48 миллиона пар оснований и 1386 кодирующих последовательностей (CDSs). По сравнению с определенными ранее полными геномами *wMel* из *Drosophila melanogaster* (A-супергруппа *Wolbachia*) и *wBm* из нематод *Brugia malayi* (D-супергруппа *Wolbachia*), у *wPip* существуют гораздо более обширные профаговые области (WO) и районы генов, кодирующих белки с анкириновыми повторами (АНК) и оба компонента, скорее всего, имеют существенное значение в биологии *wPip*. В геноме бактерии присутствуют пять WO-B-подобных профаговых районов, содержащих некоторые гены, которые идентичны или очень схожи между собой во множественных копиях профага, в то время как другие гены уникальны и, вполне вероятно, что обширные рекомбинации, дубликации и вставки произошли между копиями. Гораздо большее число генов - 60, кодирующих белки с анкириновыми повторами было обнаружено у *wPip*, по сравнению с 23 в геноме *wMel*, многие из которых находятся в пределах или вблизи профаговых областей. Геном *wPip* выявил значительную эволюционную гибкость *Wolbachia* и обнаружил четкие доказательства быстрого развития генов, кодирующих белки с анкириновыми повторами (АНК), и профаговых областей (Klasson et al., 2009).

Полиморфизм этих участков ДНК активно изучался и у других насекомых. Известно, что последовательности профага WO широко распространены в геномах 35 разнообразных видов членистоногих, зараженных *Wolbachia*, и передаются высокими темпами между дивергирующими линиями (Bordenstein, Wernegreen, 2004; Gavotte et al., 2004). Это привело к предположению, что бактериофаги могут в значительной степени управлять переносами генов и эволюционными изменениями в геномах *Wolbachia* и что белки фага могут быть напрямую связаны с ЦН (Duron et al., 2006b).

Использование элементов профага WO (Sanogo, Dobson, 2004) и транспозона Tr1 (Duron et al., 2005) выявило высокий уровень генетического разнообразия бактериофагов у *C. pipiens* всему миру. Однако, несмотря на впечатляющее разнообразие мобильных генетических элементов между штаммами *wPip*, четкой связи с географическим распределением каждого штамма *wPip* среди популяции *C. pipiens* по всему миру или со статусом подвидов *C. pipiens*, за исключением Великобритании, обнаружено не было. Наибольшее разнообразие наблюдалось в основном в европейских популяциях, где были обнаружены четыре варианта бактериофагов (Duron et al., 2005). Не проявилась связь

изменчивости бактериофагов и с цитоплазматической несовместимостью (Duron et al., 2006б).

Sinkins и соавторы (2005) исследовали полиморфизм штаммов *Wolbachia*, инфицирующих две линии *C. p. quinquefasciatus*, обозначенные как Bei (Китай) и Pel (Шри Ланка), и вызывающих полную ЦН между ними. На основании изучения нуклеотидных и аминокислотных последовательностей генов *pk1* и *pk2*, связанных с профаговым регионом и кодирующих белки с анкириновыми повторами, были выделены два варианта *wPip* (Sinkins et al., 2005). Тем не менее, ни *orf7*, ни *pk*, ни *Tr1* маркеры не были достаточно чувствительны, чтобы объяснить обнаруженные Laven в 1967 году 17 цитотипов в скрещиваниях *C. pipiens* (Duron et al., 2006а).

АНК повторы представляют собой последовательности с повторами мотивов из 33 углеводных остатков, лишённые ферментативной активности, которые способствуют специфическим взаимодействиям между белками. АНК повторы выявлены в токсинах и многочисленных белках, вовлечённых в клеточную сигнализацию, целостность цитоскелета, внутриклеточный транспорт, транскрипцию генов и регулирование клеточного цикла (Duron et al., 2007б). Из-за их способности содействовать белок-белковым взаимодействиям, АНК белки могут играть ключевые роли в установлении отношений *Wolbachia*-хозяин. Сравнение АНК вариантов генов *Wolbachia*, инфицирующих род *Drosophila*, показало значительные различия между вызывающими ЦН и неиндуцирующими ЦН вариантами, что позволило выделить 10 генов-кандидатов, связанных с репродуктивным паразитизмом в штаммах *wMel* (т.е. штаммах *Wolbachia*, инфицирующей *Drosophila melanogaster*). У *C. pipiens* только пять из 58 генов АНК были полиморфными в геномах несовместимых штаммов *wPip*, и ни один не коррелирует с картиной ЦН, полученной у 15 линий комаров, представляющих 14 вариантов *Wolbachia* (Duron et al., 2007б). Последующее изучение полиморфизма генов *ank2* и *pk1*, кодирующих белки с анкириновыми мотивами, в качестве быстро эволюционирующих маркеров в природных популяциях *C. pipiens* показало наличие более 100 генетически различных штаммов *wPip* (Duron et al., 2007б). Генетическое разнообразие профаговых областей *wPip* требовало комплексного изучения полиморфизма *Wolbachia* на основании многих или всех известных маркеров.

Мультилокусное типирование с использованием общепринятых 5 генов MLST анализа (Baldo et al. 2006) и дополнительных семи полиморфных маркеров: гена белка репарации *MutL* (одна копия в *wPip* (PEL) геноме); 3 АНК генов, *ank2* (в одной копии),

*pk1* (3 идентичных копии), и *pk2* (2 идентичных копии); и 3 генов фага, гена метилазы GP12 (4 идентичных копии), гена белка GP15 (также известный как *VrlC*, одна копия), и регулирующего гена белка *RepA* (в одной копии), позволило выявить 14 различных гаплотипов *wPip*, принадлежащих пяти различным субкладам и обозначенных авторами как *wPip-I* - *wPip-V* группы (Atyame et al., 2011б). Внутри этих пяти групп среди штаммов *wPip* обнаружены рекомбинации отдельных участков, отражающих мозаичную природу *wPip* геномов. Доказательства рекомбинации были найдены почти во всех исследованных локусах *wPip*: генах WO-фага, а также и в несвязанных с фагом локусах. Это показывает, по мнению авторов, что высокий уровень потока генов возникает между геномами *wPip* в *C. pipiens*. Таким образом, штаммы *wPip* не образуют множество клонов, в которых эволюция идет независимо, но, скорее, представляют большую популяцию бактерий, обменивающихся генетической информацией через латеральные переносы. Хотя никаких проявлений множественной инфекции не было обнаружено с помощью использованных маркеров, авторы предполагают, что множественные заражения имеют место, по крайней мере, в течение периода, достаточного для осуществления рекомбинации между штаммами. Кроме латеральных переносов, рекомбинировать могут бактерии, имеющиеся в цитоплазме обоих родителей. Присутствие в клетке отцовской мтДНК отмечалось у *Drosophila simulans* (Satta, Chigusa, 1991) и *Aedes aegypti* (Paudan, Ribolla, 2008). Однако, несмотря на обнаруженную обширную рекомбинацию, филогения *wPip* совпадала с филогенией митохондриальной ДНК (изучались гены цитохрома В и NADH дегидрогеназы субъединиц 2 и 5), вероятно, вклад рекомбинантных регионов в филогению много меньше, чем разнообразия нерекombинирующих фрагментов ДНК (Atyame et al., 2011б).

По оценкам, сделанным на основании полиморфизма митохондриальных, кодирующих белки генов, было высчитано, что распространение групп *Wolbachia* произошло в течение последних 21000 лет (Atyame et al., 2011б). Вероятное время начального заражения *C. pipiens* оценивается как 0-47000 лет назад (Rasgon et al., 2006). Эта датировка находится в пределах диапазона значений, классически оцениваемого для других видов хозяев *Wolbachia*, примерно, < 100 000 лет (Jiggins, 2003), и эволюционный путь *wPip* в *C. pipiens* может быть похож на другие в ассоциациях *Wolbachia* /членистоногие (Atyame et al., 2011б).

### 1.3.2 Симбионты *Adalia*

У жуков *Adalia bipunctata* (Coleoptera: Coccinellidae) были обнаружены четыре различных внутриклеточных, наследуемых по материнской линии бактерии, которые модифицируют процессы репродукции: одна из рода *Rickettsia* ( $\alpha$ -Proteobacteria), одна из рода *Spiroplasma* (Mollicutes) и два различных штамма *Wolbachia* ( $\alpha$ -Proteobacteria) (Schulenburg et al., 2002). У родственного вида, *A. decempunctata*, известны случаи заражения только *Rickettsia* (Zakharov, Shaikevich, 2001; Schulenburg et al., 2001). У божьих коровок нарушение репродукции выражается в сдвиге в соотношении полов в популяциях в сторону самок. На отсутствие потомства мужского пола у некоторых самок в популяциях *A. bipunctata* впервые обратил внимание Я.Я. Лусис. Он показал, что признак бессамцовости наследуется по материнской линии и детерминруется цитоплазматическим элементом (Лус, 1947). В 1992 г. была установлена бактериальная природа такого андрокцидного агента и возможность элиминации бактерий тетрациклином (Hurst et al., 1993). С помощью анализа ДНК бактерий, выделенных из особей английской популяции адалий, было доказано, что данные бактерии близки к видам *Rickettsia conorii*, *R. canada* и *R. typhi* (Werren et al., 1994). Выявлена зараженность *A. bipunctata turanica* из киргизской популяции бактерией рода *Rickettsia* (Захаров и др., 1998). Затем была обнаружена зараженность российских популяций *A. bipunctata* в Москве бактерией рода *Spiroplasma* группы IV, бактерии этой группы близки к *Spiroplasma ixodetis*, обнаруженной у клещей *Ixodes pacificus*, и не родственны спироплазме, инфицирующей *Drosophila* (Захаров, Шайкевич, Горячева, 1998; Hurst et al., 1999). Позже нами были выявлены инфицированные *Spiroplasma* особи и в других популяциях *A. bipunctata*: в Санкт-Петербурге и Кызыле (Захаров, Горячева, Шайкевич и др., 2000а), в Стокгольме (Zakharov, Shaikevich, 2001). В московской популяции *A. bipunctata* мы обнаружили бактерию *Wolbachia* (Захаров, Горячева, Шайкевич и др., 2000б). Все три вида симбиотических бактерий у божьих коровок рода *Adalia* одинаково влияют на репродукцию хозяина - вызывают эффект ранней мужской смертности или бессамцовость, называемую также андрокцид или male-killing.

В отличие от других эффектов, оказываемых симбионтами на репродукцию хозяев-членистоногих, бессамцовость вызывают не один вид бактерий, а несколько: *Rickettsia*, *Flavobacteria*, *Spiroplasma*, *Wolbachia* и  $\gamma$ -Proteobacteria. Разнообразие агентов, связанных с ранней мужской смертностью ставит стратегию бессамцовости отдельно от других манипуляций репродукцией хозяина, большинство из которых вызываются бактериями

рода *Wolbachia*. Явление бессамцовости было обнаружено у насекомых из таких отрядов как жесткокрылые, чешуекрылые, двукрылые и перепончатокрылые. Божьи коровки или кокцинеллиды особенно подвержены заражению симбиотическими бактериями, 13 из 30 изученных европейских видов божьих коровок заражены male-killing симбионтами (Elnagdy et al., 2013).

Способ, которым кокцинеллиды заражаются андроцидными бактериями, не известен. Предполагается, что заражение жуков рода *Adalia* может происходить в результате горизонтального переноса симбионтов от эктопаразитов, таких как клещ *Coccipolipus hippodamia*, передающийся от одной особи к другой во время копуляции (Hurst et al., 1995). Божьи коровки - афидофаги (питаются тлей). Было обнаружено заражение тли бактерией *Rickettsia* (Oliver et al., 2010), *Wolbachia* (Augustinos et al., 2011) и *Spiroplasma* (Lukasik et al., 2012). Бактерии могут заражать божьих коровок при питании.

Есть филогенетические свидетельства того, что горизонтальный перенос андроцидных бактерий имеет место, хотя, вероятно, очень редко (Hurst et al., 1997). Это означает, что существует возможность инфицирования особей одного вида двумя или более различными типами male-killing бактерий. 6 из 11 исследованных видов божьих коровок оказались инфицированы двумя различными симбионтами и, во всех случаях, разные бактерии были обнаружены в одной популяции. Двойные инфекции делились на две категории: у четырех видов две различные бактерии никогда не инфицировали одну и ту же особь; однако, у божьих коровок *Rhyzobius (Rhizobius) litura* и *Coccidula rufa* были найдены особи зараженные как одним, так и двумя симбионтами разных родов - *Wolbachia* и *Rickettsia* - одновременно (Weinert et al., 2007). Для совместного существования, внутриклеточная среда, в которой бактерии живут и вертикально передаются в определенных видах-хозяевах должна быть подходящей для обоих симбионтов. С другой стороны, бактерии используют стратегию эгоистического манипулирования. Это предполагает, что только один male-killer должен выжить в конкретной популяции хозяина. Однако, у бабочек *Acraea encedon*, два штамма андроцидных *Wolbachia* были зарегистрированы в популяциях Танзании (Jiggins et al., 2001). В московской популяции *A. bipunctata* были обнаружены *Rickettsia*, *Spiroplasma* и два различных штамма *Wolbachia* (Majerus et al., 2000). Два различных штамма *Wolbachia*, сосуществующие в одной популяции и вызывающие смерть мужских эмбрионов на ранней стадии были обнаружены у божьих коровок *Coccinella undecimpunctata* из Египта и Иордании. Один из штаммов оказался родственным *Wolbachia* из *Adalia bipunctata*,

другой - *Wolbachia* из *Acraea encedon* (Elnagdy et al., 2013), свидетельствуя о существовании горизонтального переноса бактерий в природе.

В эволюционном плане, положительный эффект бессамцовости может проявиться по ряду причин: снижение конкуренции внутри популяции, снижение инбридинга или прямые выгоды от каннибализма яиц (Hurst et al., 1997). Три особенности божьих коровок делают их склонными к вторжению со стороны бактерий. Во-первых, они откладывают яйца в кладках, предрасполагающих к тесным взаимодействиям между родственными личинками. Во-вторых, божьи коровки являются каннибалами, новорожденные личинки регулярно употребляют в пищу любые невылупившиеся яйца в своей кладке, независимо от того, являются ли они живыми или нет. Потенциальная возможность родственного каннибализма вызвала отбор на быстрое развитие и вылупление эмбрионов. Новорожденные личинки не обладают достаточными ресурсами и происходит высокая смертность от голода, если они не в состоянии сразу найти свою первую добычу - тлю. В то же время, популяции тли неустойчивы, подвержены как быстрому росту, так и быстрому спаду, и личинки божьих коровок часто сталкиваются с местной нехваткой ресурсов. В кладках яиц, отложенных самками, инфицированными андроцидными бактериями, яйца самцов не в состоянии вылупиться и становятся доступными для съедения инфицированным сестрам, которые тем самым получают значительные дополнительные ресурсы, прежде чем они разойдутся в поисках тли (Elnagdy et al., 2013).

Основные механизмы, которые приводят к специфической летальности мужских эмбрионов остаются до конца неизвестными. В исследованиях эмбрионов линий *Drosophila willistoni*, инфицированных *Spiroplasma poulsonii*, было показано, что смерть может наступить на двух стадиях формирования эмбрионов: нарушения митотических делений до образования зародышевых листков и после гаструляции, когда эмбрион чернеет вследствие распада внутренних структур и кариопикноза (Counce, Poulson, 1962). В то же время, генетические данные свидетельствуют о том, что *Spiroplasma* может затрагивать некоторые компоненты путей определения пола самцов (Fialho, Stevens, 2000). Другой андроцидный агент,  $\gamma$ -протеобактерия *Arsenophonus nasoniae*, вызывающая бессамцовость у ос *Nasonia vitripennis* связывается с наследуемыми по материнской линии центросомами (Fegree et al., 2008). В эмбрионах самцов *Drosophila bifasciata*, полученных от скрещивания зараженных бактерией *Wolbachia* самок с неинфицированными самцами, проявляется дефектное ремоделирование хроматина, неправильная сегрегация хроматид, а также формирование аномального митотического веретена и постепенная потеря их центросом. Эти дефекты возникают в разное время в начале развития мужских эмбрионов,

ведут к смерти во время ранних циклов деления ядра или к крупным дефектным зонам клеточной бластодермы, создавая аномальные эмбрионы, которые умирают до вылупления (Riparbelli et al., 2012). Андроцидный штамм *Spiroplasma* серьезно нарушает развитие нервной ткани в мужских эмбрионах, но не в женских, у *D. melanogaster*. Нейробласты или нейронные клетки-предшественники образуются правильно и их дочерние клетки дифференцируются в нейроны брюшной нервной цепочки. Однако нейроны не могут упаковаться вместе должным образом и производят аномальные аксоны. Клетки других тканей, например мезодермы, и сегментация тела были в норме на начальных этапах развития, хотя весь мужской эмбрион становился дефектным на более поздних этапах. Наконец, было обнаружено, что *Spiroplasma* полностью отсутствует в нервной ткани, а локализуется в кишечнике и эпителии непосредственно вокруг нервной ткани, доказывая, что бактерия выделяет токсин, который влияет на развитие нейронов, через границы нервной ткани. Эти данные показывают уникальную способность *Spiroplasma* преимущественно влиять на развитие конкретной эмбриональной ткани, чтобы вызвать андроцид (Martin et al., 2013). Полученные результаты свидетельствуют, что андроцидные бактерии создали различные способы взаимодействия с их хозяевами-насекомыми, проявляющиеся в разнообразных процессах, ведущих к смерти мужских эмбрионов.



## Глава 2. 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. В. Федоровой), Карелии (С. Карповой), Екатеринбурга (Н. Николаевой), Свердловской обл. (Ю. Л. Вигоровым и Л. С. Некрасовой), Томска (А. Сибатаевым), Абхазии (О. Безжоновой), Казахстана (О. Лопатиным), лабораторной линии МГУ (С. Б. Ивницким), Италии (Е. Б. Виноградовой и А. Talbalaghi), Португалии (Р. Almeida), Туниса (А. Bouattour), Франции (О. Duron), Греции (Е. Б. Виноградовой) и Марокко (А.- В. Failloux).

Куколки и имаго божьих коровок р. *Adalia* из природных популяций Кеми, Архангельска, Санкт-Петербурга, Улан-Уде, Ташкента, Киргизии и Швеции были собраны и охарактеризованы И. А. Захаровым-Гезехусом, Читы (О. В. Корсуном) и Якутска (П. Ноговицыным).

**Выделение ДНК** из отдельных насекомых проводилось фенол-хлороформным методом и с помощью коммерческих наборов DNAprep (Изоген, Москва). При работе со спиртовым материалом спирт предварительно выпаривали в течение 30-40 минут при 65°C. В реакции амплификации использовали по 0,1 мкг выделенной ДНК.

**Полимеразную цепную реакцию (ПЦР)** проводили с использованием термоциклера GeneAmp<sup>R</sup> PCR System 2700 (“Applied Biosystems”, USA), применяя наборы для амплификации GenePak<sup>TM</sup> PCR Core (Изоген, Россия) и Encyclo PCR kit (Евроген, Россия), следуя инструкции производителей. Концентрация праймеров в реакции составляла 5 пкмоль/мкл.

**Праймеры**, использованные в работе:

1) UEA9 5'-GТAААССТААСАТТТТТТСТСААСА-3' (Juan et al., 1996) и UEA10 5'-ТССААТГСАСТААТСТГССАТАТТА-3' (Lunt et al., 1996), комплементарные ДНК 3' конца гена цитохром-оксидазы I. Условия ПЦР: первичная денатурация – 5 мин при 94°C; 35 циклов: денатурация при 94°C – 30 сек, отжиг при 55°C – 30 сек, синтез при 72°C – 45 сек; завершающий синтез при 72°C – 10 мин. Размер фрагментов 311 п.н.

2) TY-J-1460 5'-TACAATTTATCGCCTAAACTTCAGCC-3' (Simon et al., 1994), комплементарный к ДНК tRNA-Тур, расположенной левее гена *COI* относительно точки начала репликации ДНК, использовался для определения точки начала репликации гена *COI Culex*.

3) LCO 5'-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3' и HCO 5'-TAAACTTCAGGGTGACSSAAAAAATCA-3', предложенные для штрихкодирования (BARCODE) животных (Folmer et al., 1994), использовали для амплификации видов *Adalia*. Условия ПЦР: 35 циклов при следующих условиях: 1 мин при 95°C, 1 мин при 40°C, и 1.5 мин при 72°C; финальный синтез 7 мин при 72°C. Размер фрагментов 710 п.н.

4) C1-j-1951 5'-TTCATCAATTTTAGGAGCTG-3' и C1-N-2618-5'-TGCTATAATAGCAAATACAG-3' (Schulenburg et al., 2002), были использованы для амплификации наиболее изменчивого района гена *COI Adalia*. Условия ПЦР: первичная денатурация – 5 мин при 94°C; 35 циклов: денатурация при 94°C – 30 сек, отжиг при 55°C – 40 сек, синтез при 72°C – 40 сек; завершающий синтез при 72°C – 10 мин. Размер амплифицированных продуктов 700 п.н.

5) *CulexCOIF* 5'-TTGAGCTGGAATAGTTGGAACTT-3' и *CulexCOIR* 5'-CCTCCAATTGGATCAAAGAATGA-3', специфичные для амплификации ДНК *Culex pipiens* подобраны на основе сравнения последовательностей полного генома *C. p. quinquefasciatus* и генов *COI Drosophila* из GenBank (Shaikovich, 2007).

Для секвенирования полного гена *COI* праймеры подбирались по уже известным нуклеотидным последовательностям комаров рода *Culex*, полученным нами в предыдущих работах (Шайкевич и др., 2005; Shaikovich, 2007) так, чтобы вновь секвенированные последовательности перекрывались не меньше, чем на 100 нуклеотидов:

6) *CulexCOIR1*: COIR1 5'-TCTACTGAAGCTCCAGCATG-3',

7) *CulexCOIF2*: 5'-GTAGTAATTACTGCAGTTTTA-3',

8) *CulexCOIR2*: 5'-CAAATAATGAAATTGTTCTACC-3'.

Размеры амплифицированных продуктов составляют примерно 650 п.н. Условия ПЦР: первичная денатурация – 5 мин при 94°C; 35 циклов: денатурация при 94°C – 30 сек, отжиг при 55°C – 40 сек, синтез при 72°C – 40 сек; завершающий синтез при 72°C – 10 мин.

9) wsp81F 5'-TGGTCCAATAAGTGATGAAGAAAC-3' и wsp691R 5'-AAAAATTAACGCTACTCCA-3' (Braig et al., 1998), комплементарные гену белка оболочки *wsp* использовали для обнаружения бактерий рода *Wolbachia* в тотальной ДНК насекомых. Условия реакции: первичная денатурация – 5 мин при 94°C; 35 циклов: денатурация при 94°C – 30 сек, отжиг при 55°C – 30 сек, синтез при 72°C – 45 сек; завершающий синтез при 72°C – 10 мин. Размер фрагмента 623 п.н.

10) MGSO-5'-TGCACCATCTGTCACTCTGTТААССТС-3' и FP-5'-GCTCAACCCСТААССGCC-3' (van Kuppeveld et al., 1992), специфичные к гену малой субъединицы 16S РНК бактерий класса Mollicutes, для определения зараженности жуков симбиотической бактерией *Spiroplasma*. Условия проведения ПЦР первичная денатурация – 5 мин при 94°C; 35 циклов: денатурация при 95°C – 35 сек, отжиг при 55°C – 1 мин, синтез при 72°C – 1 мин; завершающий синтез при 72°C – 10 мин. Размер специфичного для ДНК *Spiroplasma* ПЦР-продукта составлял 429 п.н.

11) Rr17.61p 5'-GCTCTTGCAACTTCTATGTT-3' и Rr17.492n 5'-CATTGTTTCGTCAGGTTGGCG-3' (Williams et al., 1992), специфичные для генов 17kDa антигена *Rickettsia*. Условия реакции 30 циклов: 40 сек -95°C, 1 мин - 57°C, 1 мин - 72°C; завершающий синтез 10 мин при 72°C. Размер ПЦР-продукта 434 п.н.

12) 5,8S рДНК 5'-TGTGAACTGCAGGACACATG-3' и 28S рДНК 5'-ATGCTTAAATTTAGGGGGTA-3' (Porter, Collins, 1991), комплементарные генам рРНК, использовали для амплификации второго внутреннего транскрибируемого спейсера кластера генов рРНК (ITS2). Условия реакции: после первичной денатурации 5 мин при 95°C 35 циклов: 15 сек -95°C, 15 сек - 57°C, 30 сек - 72°C; завершающий синтез 10 мин при 72°C. Размер ПЦР-продукта 410 п.н. у *C. torrentium*, 460 п.н. у *C. pipiens*, 900 п.н. у *Adalia* ssp.

13) B1246s 5'-TGGAGCCTCCTCTTCACGG-3', ACEpip 5'-GGAACAACGACGTATGТАCT-3', ACEquin 5'-CCTTCTTGAATGGCTGTGGCA-3' (Smith, Fonseca, 2004), для амплификации второго интрона гена ацетолхолинэстеразы 2 у *Culex*. Условия реакции: после первичной денатурации 5 мин при 95°C 35 циклов: 30 сек - 95°C, 30 сек - 55°C, 1 мин - 72°C; завершающий синтез 5 мин при 72°C. Размер ПЦР-продукта 610 п.н. у *C. p. pipiens*, 274 п.н. у *C. p. quinquefasciatus*.

14) CQ11F2 5'-GATCCTAGCAAGCGAGAAC-3', pipCQ11R 5'-CATGTTGAGCTTCGGTGAA-3' и molCQ11R 5'-CCCTCCAGTAAGGTATCAAC-3' для

амплификации фланкирующей области микросателлита CQ11 (Bahnck, Fonseca, 2006). Условия реакции: после первичной денатурации 5 мин при 95°C 40 циклов: 30 сек -94°C, 30 сек - 54°C, 40 сек - 72°C; завершающий синтез 5 мин при 72°C. Размер ПЦР-продукта 200 п.н. у *C. p. pipiens f. pipiens*, 250 п.н. у *C. p. pipiens f. molestus* и *C. p. quinquefasciatus*.

15) *Culex28S* (tgaacgcctctaaggtcgtatc) и *Culex18S* (gatgtgtagccatttctcat), специфичные для 3'-конца 28S и 5'-конца 18S генов рРНК, соответственно, для определения нуклеотидных последовательностей межгенных спейсеров кластера генов рРНК (IGS). Последовательности этих праймеров конструировали на основе сравнения известных эволюционно консервативных последовательностей генов рРНК ряда насекомых: *Aedes aegypti* (U65375); *Aedes albopictus* (L22060); *Anopheles albimanus* (L78065); *Drosophila willistoni* (XR\_049571), *Aedes vexans* (AM071382), *Ochlerotatus caspius* (EU700339), *Aedes vittatus* (AM071384) (Шайкевич и др., 2013). Условия ПЦР: первичная денатурация 94°C – 5 мин, затем 35 циклов, включающих этапы 94°C – 30 с, 50°C – 1 мин, 72°C – 1 мин 30с; завершающий синтез при 72°C – 7 мин. Продукты амплификации, содержащие участки IGS исследуемых видов комаров, размером ~2500 п.н. клонировали при помощи наборов реактивов pGEM-T Easy Vector Systems (“Promega”, США).

Ампликоны выявляли путем электрофореза в 1% агарозном геле (Sigma, США).

**Для рестрикционного анализа** использовали 5-10 мкл амплификата, который обрабатывали рестриктазами по стандартной прилагаемой к ферменту методике в течение 1,5-2 часов. Результаты визуализировали с помощью электрофореза в 2% агарозном геле. Для рестрикционного анализа гена *COI Culex* использовали рестриктазы *SspI* (Fermentas) *HaeIII* (Promega), *AluI* (Promega) и *BclI* (Promega) по прилагаемым методикам. Реакции рестрикции проводили в 30 µl смеси, состоящей из 5 µl *COI* ПЦР продукта, 0,5 µl (5 ед) фермента, 3 µl буфера, 0,3 µl BSA и 21,2 µl ddH<sub>2</sub>O. Для *SspI*, *HaeIII* и *AluI* рестрикционные смеси инкубировали в течение 1-2 часов при 37°C. Для *BclI* в течение 1-2 часов при 50°C. Результаты визуализировали с помощью электрофореза в 2% агарозном геле.

**Для клонирования фрагментов ДНК**, анализируемые продукты амплификации фракционировали в 0,8%-ном геле, приготовленном на основе легкоплавкой агарозы (“Sigma”, США) и окрашивали бромистым этидием. ПЦР-продукт нужного размера вырезали из геля и очищали посредством набора реактивов QIAquick Gel Extraction (“Qiagen”, США). Клонирование проводили с помощью наборов реактивов pGEM-T Easy Vector Systems (“Promega”, США).

**Для секвенирования** использовали прибор ABI PRISM 310 и набор реактивов BigDye Termination kit (“Applied Biosystems”, США), согласно инструкции производителя. Секвенирование проводили с обоих праймеров на приборе ABI PRISM 310 с использованием реагентов фирмы "Applera", США, по инструкции производителя.

Последовательности нуклеотидов протяженных клонированных фрагментов IGS (~2500 п.н.) определяли методом пошагового секвенирования. Для этого на каждом этапе подбирались праймеры, комплементарные к концевой области вновь полученной последовательности (Шайкевич и др., 2013). Для построения протяженных контигов использовали программу ChromasPro (<http://chromaspro.findmysoft.com>).

Последовательности, полученные в результате секвенирования продуктов амплификации гена *COI Culex*, были зарегистрированы в GenBank под номерами: AJ557889-AJ557892, AJ633083-AJ633091, AY303550. AM403476, AM403477, AM403492, FM177756-FM177758, FN395171-FN395206, KM233145-KM233150. Последовательности гена *COI Adalia* были зарегистрированы в GenBank под номерами: JQ757048- JQ757053, HM150667-HM150700. Последовательности ITS2 *C. torrentium* – AJ85083, *C. pipiens* - AJ850084, *Adalia* ssp- JX459794–JX459830. Последовательности IGS комаров рода *Culex* - JX500430-JX500439.

**Поиск сходства** между анализируемой последовательностью и последовательностями, представленными в базе данных GenBank, проводили посредством программы BLASTN (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>).

**Выравнивание** нуклеотидных последовательностей проводили с использованием программ MAFFT V.6 (<http://mafft.cbrc.jp/alignment/server/>) и Clustal (<http://www.clustal.org/clustal2/>).

**Филогенетический анализ** и анализ эволюционной изменчивости проводили с использованием программы MEGA версии 4 и 5 (Tamura et al., 2007, 2011). В таблицах представлены значения уровней эволюционной дивергенции между анализируемыми последовательностями по среднему числу нуклеотидных замен между двумя сравниваемыми последовательностями в пересчете на один сайт, используя модель Maximum Composite Likelihood. Все три позиции кодонов были вовлечены в анализ. Все неопределенные нуклеотиды, а также позиции, содержащие делеции были удалены из анализа (Complete deletion option). Значения эволюционных расстояний между последовательностями гена *COI* рассчитывали используя методы р-расстояний; метод

Jukes-Cantor, использующийся для оценки эволюции белковых молекул; метод Tamura-Nei, использующийся для оценки числа нуклеотидных замен в контрольном районе мтДНК; метод Kimura 2-parameter, использующийся как простой метод оценки скорости замен нуклеотидов и метод Tajima-Nei для оценки эволюционных различий между нуклеотидными последовательностями (Tamura et al. 2007, 2011). Значения дивергенции последовательностей гена *COI*, вычисленные с помощью различных методов, оказались практически одинаковы. В таблицах приводятся данные, полученные с использованием метода р-расстояний. Этот метод соответствует использованному Ю. Картавцевым критерию для оценки внутри- и межвидовой дивергенции митохондриальных генов у животных (Kartavtsev, 2011).

**Филогенетические деревья** построены на основе сравнения исследованных в данной работе последовательностей ДНК с использованием метода Neighbor-Joining для представления эволюционной истории изученных видов. Проценты повторений, при которых связанные таксоны кластеризуются вместе (bootstrap test 1000) показаны рядом с ветвями. Сходная топология деревьев, поддерживаемая высокими значениями бутстрепа, наблюдается при использовании алгоритмов UPGMA и Maximum Likelihood. Сети митохондриальных гаплотипов построены с использованием программы TCS 1.21 (Clement et al., 2000).

**Анализ полиморфизма ДНК** проводился с использованием программы DNA Sequence Polymorphism (DnaSP) software (Librado, Rozas, 2009). Корреляцию между гаплотипами гена *COI* и таксонами комаров тестировали с применением хи-квадрат теста в GraphPad InStat ([www.graphpad.com](http://www.graphpad.com)), между штаммами *Wolbachia* и таксонами комаров - точным тестом Фишера (Fisher exact test).

**Для поиска эволюционно консервативных мотивов** и вырожденных протяженных повторяющихся последовательностей использовали программу MEME (<http://meme.sdsc.edu/meme/cgi-bin/meme.cgi>).

**Микросателлитные повторы** выявляли посредством программы Microsatellite repeats finder ([http://www.biophp.org/minitools/microsatellite\\_repeats\\_finder/demo.php](http://www.biophp.org/minitools/microsatellite_repeats_finder/demo.php)).

**Для поиска вырожденных последовательностей мобильных элементов** в пределах исследуемых последовательностей ДНК использовали программу Censor (<http://www.girinst.org/censor/index.php>).

## Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ

### 3.1 Комары комплекса *Culex pipiens*

#### 3.1.1 Морфо-биологические особенности комаров комплекса *Culex pipiens* из изученных популяций

На территории России широко распространен вид *C. pipiens*, представленный подвальной автогенной (*molestus*) и населяющей открытые водоемы (*pipiens*) формами, и близкий к ним *C. torrentium*. Были исследованы основные физиологические, морфометрические и молекулярные особенности локальных популяций. Предварительная идентификация изучаемых популяций *C. pipiens* основывалась на экологической (тип биотопа), физиологической (проявление автогенности) и морфометрической (величина сифонального индекса личинок) характеристиках.

У комаров из девяти локальных популяций из подвальных биотопов Европейской части России, которые были изучены молекулярно-генетическими методами, обнаружена способность к автогенному овогенезу. Доля автогенных самок варьировала значительно, она была высокой у комаров из С.-Петербурга и Н. Новгорода (89-100%) и снижалась до 49% у комаров из Краснодара (табл. 3).

Средний сифональный индекс личинок позволяет различать формы *pipiens* и *molestus* на популяционном уровне. При исследовании данного признака у 6 локальных популяций из Петрозаводска, С.-Петербурга, Н. Новгорода и Краснодара отмечен большой размах изменчивости индекса - от 3.39 до 4.41. В пределах отдельных сборов распределение индивидуального индекса было нормальным или приближалось к нормальному, при этом размах его изменчивости был везде велик. Следует отметить и большую амплитуду изменчивости индивидуального сифонального индекса личинок, максимальное значение которого иногда находится в области величин, характерных для формы *pipiens*, т.е. более 4.8 (табл. 3). Известно, что температурные условия развития личинок являются одним из внешних факторов, способных модифицировать величину сифонального индекса. Величина сифонального индекса личинок из-за вариабельности признака не может служить достоверным диагностическим маркером для индивидуальных особей комаров. Различия в физиологии (основными из которых являются автогенность и способность формировать зимнюю диапаузу), в

противоположность морфологическим признакам, характерны для *C. pipiens f. pipiens* и *C. pipiens f. molestus*.

**Таблица 3.** Морфометрическая и физиологическая характеристики городского комара

| №  | Пункт сбора                       | Коор-ты<br>с.ш. | Автогенность |     | Сифон.<br>индекс |
|----|-----------------------------------|-----------------|--------------|-----|------------------|
|    |                                   |                 | число        | %   |                  |
| 1  | Петрозаводск 2 (ул.Сортавальская) | 62° 34°         | 20           | н/п | 3,87±0,06        |
| 2  | С.Петербург 1 (ул. Очаковская)    | 60° 30°         | 54           | 89  | 4,24±0,05        |
| 3  | С.Петербург 2 (ул.Разночинная)    | 60° 30°         | 43           | 100 | 4,03±0,03        |
| 4  | Москва                            | 56° 38°         | 12           | 75  | н/п              |
| 5  | Н.Новгород                        | 56° 44°         | 20           | 100 | 4,12±0,03        |
| 6  | Волгоград                         | 49° 44°         | 20           | 100 | н/п              |
| 7  | Волжский                          | 49° 45°         | 17           | 100 | н/п              |
| 8  | Краснодар 1                       | 45° 39°         | 30           | 90  | 4,41±0,04        |
| 9  | Краснодар 2                       | 45° 39°         | 55           | 49  | 3,39±0,03        |
| 10 | Баку                              | 40° 50°         | 50           | 89  | н/п              |

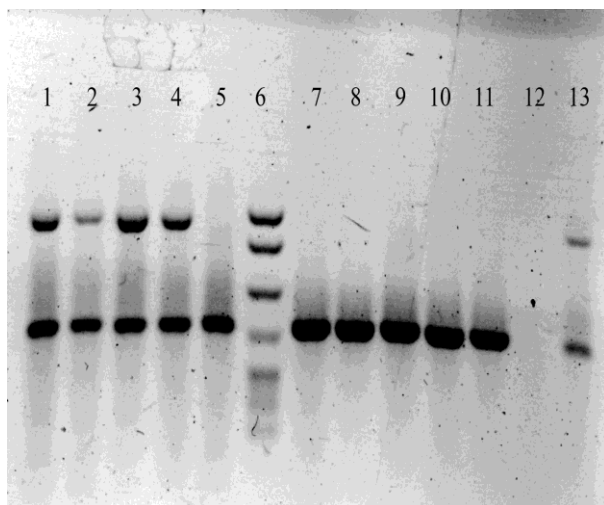
н/п - не проверялись

### 3.1.2 Инфицированность природных популяций *Culex pipiens* симбиотической бактерией *Wolbachia*

Молекулярно-генетическими методами мы изучили присутствие симбиотической бактерии *Wolbachia* у комаров комплекса *C. pipiens* из 15 природных популяций из России. Для обнаружения *Wolbachia* в тотальной ДНК использовали праймеры, специфичные к гену *wsp* *Wolbachia* (Braig et al., 1998). Ген *wsp* кодирует наиболее обильно экспрессирующийся белок оболочки бактерии *Wolbachia*. После ПЦР с праймерами, специфичными к гену *wsp* *Wolbachia*, мы получили продукты амплификации около 600 п.н.. Качество выделенной ДНК контролировалось с помощью праймеров, специфичных к



гену *COI* мтДНК: для всех исследованных образцов ДНК мы получили характерные продукты реакции, размером примерно 311 п.н. (рис. 5).



**Рисунок 5.** 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* (603 п.н.), 5 – подвальный комар без *Wolbachia*, 6 – маркер молекулярного веса pBR322/MspI, 7-11 – ДНК комаров из пригородных биотопов из-под г.Санкт-Петербурга: *Wolbachia* нет, 12 – отрицательный контроль, 13 – положительный контроль – ДНК *Adalia bipunctata* T171 с *Wolbachia*.

Исследованные сборы комаров *C. pipiens* оказались в той или иной степени зараженными бактерией *Wolbachia*: доля зараженных особей в подвальных популяциях варьировала от 60 до 100%, но в большинстве случаев была достаточно высокой, 71-100% (табл. 4). Комары, собранные в открытых наземных биотопах в большинстве случаев не были инфицированы этой бактерией: 84 из 93. Зараженными, (7 из 20), были особи только популяции из пос. Чашниково, Московской обл. Мы исследовали генетическую структуру зараженных и незараженных *Wolbachia* представителей комплекса, с целью выявления диагностических маркеров.

**Таблица 4.** Места сбора, инфицированность *Wolbachia* исследованных популяций комаров

| Город/область                            | Место сбора       | Характер биотопа | Число особей |             |
|--|-------------------|------------------|--------------|-------------|
|  |                   |                  | заражены     | не заражены |
| Петербург                                |                   | подвал           | 19           | 1           |
| Москва                                   |                   | подвал           | 18           | 2           |
| Нижний Новгород                          |                   | подвал           | 20           | 0           |
| Екатеринбург                             |                   | подвал           | 14           | 0           |
| Томск                                    |                   | подвал           | 10           | 2           |
| Петрозаводск                             |                   | подвал           | 6            | 4           |
| Волгоград                                |                   | подвал           | 20           | 0           |
| Волжский                                 |                   | подвал           | 20           | 0           |
| Ленинградская область                    | поселок "69 км"   | открытый водоём  | 0            | 20          |
| Московская область Солнечногорский район | поселок Чашниково | открытый водоём  | 7            | 13          |
| Московская область Дмитровский район     | поселок Икша      | открытый водоём  | 0            | 12          |
| Нижегородская область                    | деревня Дивеево   | открытый водоём  | 0            | 18          |
| Екатеринбург                             | Черта города      | открытый водоём  | 0            | 1           |
| Томская область                          | поселок Белоусово | открытый водоём  | 0            | 10          |
| Республика Карелия                       | деревня Маш-озеро | открытый водоём  | 0            | 10          |
| Всего                                    |                   |                  | 134          | 84          |

### 3.1.3 Вариабельность 3' участка гена *COI* мтДНК у комаров комплекса *Culex pipiens*

Генетическими методами было исследовано 208 особей из 15 подвальных и наземных популяций комаров комплекса *Culex pipiens*, собранных в различных регионах европейской части России и Сибири. Определены нуклеотидные последовательности 3' участка гена *COI* комаров комплекса *Culex pipiens* из 7 подвальных популяций, зараженных *Wolbachia* (Петербурга, Москвы, Волгограда, Волжского, Томска, Екатеринбурга, Петрозаводска), 4 популяций из открытых водоемов, не зараженных *Wolbachia* (Ленинградской и Томской областей, Карелии и Екатеринбурга), а также особей, зараженных и не зараженных *Wolbachia* из подмосковного поселка Чашниково. Сравнительный анализ последовательностей 3' конца гена *COI* показал, что комары из зараженных, подвальных и незараженных, наземных популяций отличаются, как правило, 6 заменами среди 246 нуклеотидов. При этом нуклеотидные последовательности соответствующих типов популяций комаров идентичны между собой, несмотря на значительную удаленность мест сбора друг от друга. Из шести замен отмечены пять транзиций (тимин-цитозин) и одна трансверсия (аденин-тимин). Все эти замены за счет вырожденности генетического кода не изменяют аминокислотных последовательностей и не влияют на функции гена *COI*. Тип мтДНК, обнаруженный нами при анализе участка гена *COI* у подвальных комаров (форма *molestus*), был обозначен как М, тогда как тип мтДНК комаров из открытых водоемов был обозначен как Р (рис. 6).

Среди изученных образцов ДНК популяции комаров из поселка “69 км” Ленинградской области было обнаружено два исключения: три точечные замены нуклеотидов по отношению к последовательности мт-гаплотипа Р, этот вариант мтДНК был назван Р1. В большинстве изученных популяций выявлялся либо митохондриальный гаплотип (мт-гаплотип) М, либо мт-гаплотипы Р/Р1. Однако среди личинок комаров комплекса *Culex pipiens*, собранных в открытых водоемах поселка Чашниково в Подмоскowie, были обнаружены особи как с мт-гаплотипом М, так и с мт-гаплотипом Р, что было подтверждено секвенированием. Поэтому данную популяцию можно было рассматривать как смешанную. На территории России встречаются подвид *C. p. pipiens*, представленный автогенной (*molestus*) и неавтогенной (*pipiens*) формами, и *Culex torrentium*. Комары автогенной формы *molestus* на территории России могут круглогодично размножаться в подвальных биотопах, тогда как комары неавтогенной

формы *pipiens* обитают симпатрично с *C. torrentium*. Поскольку во многих частях ареала *C. torrentium* и *C. p. pipiens* заселяют одни и те же наземные водоемы в виде «чистых» или смешанных популяций и морфологически различаются с трудом (Гуцевич и др., 1970; Dahl, 1988), мы предприняли комплексное изучение их морфологических, биологических и генетических характеристик.

|                |  |       |
|----------------|--|-------|
| Мт-гаплотип М  | GCA GGA ATA <b>CCA</b> CGA CGA <b>TAT</b> TCT GAT TTT CCA GAT AGT <b>TAC</b> TTA GCA TGA | [ 51] |
| Мт-гаплотип Р  | ... .. <b>..T</b> ... .. <b>..C</b> ... .. <b>..T</b> ... ..                             | [ 51] |
| Мт-гаплотип Р1 | ... .. <b>..T</b> ... .. <b>..C</b> ... .. <b>..T</b> ... ..                             | [ 51] |
| /SspI          |  |       |
| Мт-гаплотип М  | <b>AAT ATT</b> GTT TCA TCA <b>TTA</b> GGT AGA ACA ATT TCA TTA TTT GGA ATT GTA TTC        | [102] |
| Мт-гаплотип Р  | ... <b>..C</b> ... .. <b>..C</b> ..  | [102] |
| Мт-гаплотип Р1 | ... .. <b>..C</b> ..   | [102] |
| Мт-гаплотип М  | TTT TTA TTT ATT ATT TGA GAA <b>AGT</b> ATA ATT TCT CAA CGA ACA CCT TCA TTC               | [153] |
| Мт-гаплотип Р  | ... ..   | [153] |
| Мт-гаплотип Р1 | ... .. <b>..C</b> ..   | [153] |
| Мт-гаплотип М  | CCT ATA CAA TTA TCA TCA TCA ATT GAA TGA <b>TAT</b> CAT ACT CTT CCA CCT GCA               | [204] |
| Мт-гаплотип Р  | ... ..   | [204] |
| Мт-гаплотип Р1 | ... .. <b>..C</b> ..   | [204] |
| Мт-гаплотип М  | GAA CAT ACA TAT GCA GAA CTT CCA <b>TTA</b> TTA TCA TCT AAT TTC                           | [246] |
| Мт-гаплотип Р  | ... .. <b>..C</b> ..   | [246] |
| Мт-гаплотип Р1 | ... .. <b>..C</b> ..   | [246] |

**Рисунок 6.** Варианты нуклеотидных последовательностей участка гена цитохромоксидазы I комаров комплекса *Culex pipiens* из разных популяций России. Полиморфные сайты выделены жирным шрифтом, сайт рестрикции для *SspI* подчеркнут.

### 3.1.4 Различия между *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 (табл. 5), а по строению гениталий самцы хорошо различаются (Федорова, Шайкевич, 2007).

В подвальной популяции *C. p. pipiens* из Москвы все самки были стеногамными и 70% автогенными (табл. 5). Во всех остальных популяциях самки оказались неавтогенными и эвригамными.

Сравнительный анализ последовательностей 3' конца гена *COI* показал, что тип мтДНК, обозначенный нами ранее как М, характерен для зараженных *Wolbachia* комаров *C. p. pipiens*, а тип мтДНК, обнаруженный у неинфицированных эндосимбионтом особей и обозначенный нами как Р, - для *C. torrentium*. Последовательности ДНК изученного участка различаются, как правило, 6 заменами среди 246 нуклеотидов у двух видов (AY303550, AJ633083-AJ6330891, AJ557889-AJ557892). По исследованному нами участку гена *COI* различия между природными популяциями *C. p. pipiens* и *C. torrentium* составили 2.4%-2.8%.

Разница в нуклеотидном составе изученного участка гена *COI* мтДНК у двух групп популяций позволила подобрать рестриктазу, которая имела бы сайт рестрикции на последовательности только одного типа гена *COI*. Ферменту *SspI* требуется последовательность узнавания ААТ'АТТ, которая присутствует на участке гена *COI* у *C. p. pipiens* и отсутствует у комаров *C. torrentium* (рис. 6). Рестриктаза *SspI* разрезает ДНК *C. p. pipiens* на два фрагмента, 221 и 90 п.н., тогда как у *C. torrentium* фрагмент гена *COI* не изменяется и составляет 311 п.н.

Полученные результаты показали, что ДНК изученного участка гена *COI* автогенных *C. p. pipiens*, собранных в подвале дома на Ломоносовском проспекте в Москве, и самцов

**Таблица 5.** Морфобиологические характеристики самок комаров *Culex pipiens* и *Culex torrentium* в Москве и ее окрестностях

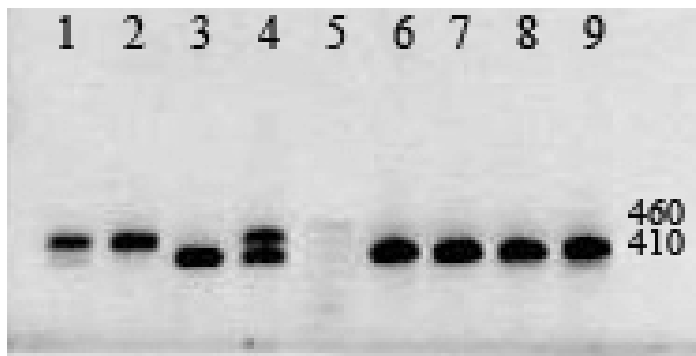
| Место сбора       | Вид      | Кол-во ♀♀ | Отношение R2 к R <sub>2+3</sub> |     |         | Кол-во ♀♀ с R2/R <sub>2+3</sub> < 4 (%) | Биологические характеристики самок |                      |                       |
|-------------------|----------|-----------|---------------------------------|-----|---------|---|------------------------------------|----------------------|-----------------------|
|                   |          |           | min                             | max | среднее |   | Кол-во                             | Кол-во ♀♀ автогенных | Кол-во ♀♀ стеногамных |
| Битца             | C.tor.   | 30        | 3,3                             | 5,2 | 4,2     | 36,7                                    | 34                                 | 0                    | 0                     |
| ЗБС               | C.tor.   | 12        | 2,8                             | 5,6 | 4,01    | 50,00                                   | 12                                 | 0                    | 0                     |
| Икша tor          | C.tor.   | 24        | 2,1                             | 3,9 | 2,87    | 100,00                                  | 28                                 | 0                    | 0                     |
| Икша pip          | C.pip.   | 23        | 3,9                             | 7,3 | 5,5     | 9,1                                     | 0                                  |                      |                       |
| Лужки             | C.pip.   | 16        | 4,0                             | 8,8 | 6,2     | 0                                       | 20                                 | 0                    | 0                     |
| Ломоносовский пр. | C.pip.   | 50        | 3,1                             | 6,7 | 4,2     | 44                                      | 12                                 | 9                    | 12                    |
| Останкино         | Оба вида | 21        | 3,1                             | 6,5 | 4,1     | 66,7                                    | 20                                 | 0                    | 0                     |
| Чашниково         | Оба вида | 30        | 2,6                             | 7,6 | 4,4     | 48                                      | 71                                 | 0                    | 0                     |

C.tor. - *Culex torrentium*; C.pip. - *Culex p. pipiens*

*C. p. pipiens* из неавтогенных популяций Икша, Лужки и Чашниково идентичны. Самцы *C. torrentium* из популяций Битцы, Икши и Чашниково также не отличаются между собой по нуклеотидному составу *COI*. Таким образом, этот участок мтДНК можно использовать как ДНК-маркер при разделении *C. torrentium* и *C. p. pipiens* методом ПЦР-ПДРФ, который является более удобным и быстрым способом идентификации видов, чем секвенирование ДНК.

В отличие от митохондриальной ДНК, транскрибируемые спейсеры кластера генов рибосомной РНК (рРНК) высоковариабельны. Используя праймеры, комплементарные к районам 5,8S и 28S рДНК (Proft et al., 1999), мы получили характерные ПЦР продукты для всех изученных особей из каждой популяции (рис. 7). Некоторые последовательности были секвенированы (AJ85083, AJ850084). При сравнении ПЦР продуктов области второго внутреннего транскрибируемого спейсера (ITS2) обнаружено, что ITS2 *C.*

*torrentium* меньше ITS2 *C. p. pipiens* на 52 п.н. (рис. 7). Эта разница возникает за счет множественных делеций, разбросанных по всему участку и составляет 14%.



**Рисунок 7.** 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.).

Нуклеотидный состав ITS2 комаров *C. p. pipiens* из поселков Чашниково, Икши и из подвала жилого дома на Ломоносовском проспекте г. Москвы был практически одинаков. ДНК ITS2 *C. torrentium* из поселков Чашниково и Икша различались двумя динуклеотидными повторами в 3' конце спейсера. Праймеры были подобраны таким образом, что последовательности ITS2 фланкированы районом 5,8S рДНК из 88 п.н. и участком 28S рДНК из 45 п.н. Точный размер ITS2 комаров *C. torrentium* из п. Икша равен 274 п.н., из п. Чашниково – 275 п.н., что соответствует размерам ITS2 *C. torrentium* из Швеции и Англии (Miller et al., 1996). Размер ITS2 комаров *C. p. pipiens* из п. Икша и Чашниково равен 329 п.н., из подвала дома на Ломоносовском проспекте – 333 п.н., что также соответствует размерам ITS2 изученных ранее американских и шведских *C. p. pipiens* (Miller et al., 1996). Полученные данные свидетельствуют о возможности использования ITS2 для идентификации комаров *C. torrentium* и *C. p. pipiens* из природных популяций. ДНК автогенной и неавтогенной форм *C. p. pipiens* по данным, изученным нами маркерами, не различается. Использование ITS2 в качестве дифференцирующего маркера позволяет выявлять гибриды от скрещивания комаров *C. torrentium* и *C. p. pipiens* (рис. 7). В лабораторных скрещиваниях были получены жизнеспособные гибриды между комарами этих близкородственных видов.

Можно также предположить, что бактерия сыграла ключевую роль в расхождении видов *C. pipiens* и *C. torrentium*. Действительно, в лабораторных скрещиваниях жизнеспособные гибриды между комарами этих близкородственных видов образуются

только в случае, когда инфицированные самки *C. pipiens* скрещивались с незараженными самцами *C. torrentium*. По результатам скрещиваний между *C. pipiens* f. *molestus* из Петербурга и *C. torrentium* из пригорода, "пл. 69 км" было показано, что самки формы *molestus*, оплодотворенные самцами *C. torrentium* (7 самок из 9), дали жизнеспособное потомство. В реципрокных скрещиваниях отсутствовало жизнеспособное потомство, демонстрируя цитоплазматическую несовместимость между партнерами (личное сообщение Е. Б. Виноградовой). В природе гибриды обнаружены не были, не смотря на то, что оба вида нередко обитают совместно. Хотя в лабораторных условиях скрещивание двух видов комаров, *C. pipiens* и *C. torrentium*, возможно, в естественных условиях они ведут себя как генетически изолированные. Отсутствие инфицированных особей *C. torrentium* даже в смешанных популяциях свидетельствует о том, что горизонтальный перенос вольбахии между *C. pipiens* и *C. torrentium* невозможен или происходит редко.

Таким образом, впервые были выявлены различия в инфицированности симбиотической бактерией *Wolbachia* и различия в структуре ДНК гена *COI* мтДНК у комаров *C. torrentium* и *C. p. pipiens* из природных популяций, соответствующие уровню межвидовых различий. Доказано, что идентификация самцов по строению гениталий позволяет различать представителей двух видов, тогда как идентификация самок по отношению жилок крыла  $R_2/R_{2+3}$  затруднительна из-за вариабельности признака. С использованием ПЦР-ПДРФ 3' конца гена *COI* рестриктазой *SspI*, зараженности *Wolbachia* и ITS2 были проверены всего 321 особь *C. torrentium* и 460 особей *C. p. pipiens* (327-подвальных и 133 из открытых водоемов) (табл. 6). Изучение локальных популяций комаров комплекса *Culex pipiens* с помощью молекулярных маркеров позволило выявить встречаемость *C. torrentium* в Ленинградской области (пос. 69 км) и окрестностях С.-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. Особый интерес представляет первое обнаружение на территории России смешанных популяций *C. torrentium* и неавтогенного *C. p. pipiens*. Они найдены в Москве (Останкино) и Подмосковье (пос. Чашниково, дер. Стариково) и Свердловской обл. (дер. Талица). Ранее совместное обитание этих видов, установленное на основании строения гипопигия самцов, регистрировалось в Ботаническом саду в Упсале (Швеция) и в южной Англии (Dahl, 1988).



**Таблица 6.** Зараженность *Wolbachia*, размер области ITS2 и митохондриальный гаплотип по 3' участку гена *COI* в географических популяциях комплекса *Culex pipiens*.

| №  | Город/область                    | Место сбора      | Кол-во особей | % <i>Wolbachia</i> | Размер ITS2 | Митотип по COI | Таксономич. статус* |
|----|----------------------------------|------------------|---------------|--------------------|-------------|----------------|---------------------|
| 1  | Санкт-Петербург I                | подвал           | 50            | 98                 | 460         | M              | <i>f. molestus</i>  |
| 2  | Санкт-Петербург II               | подвал           | 50            | 90                 | 460         | M              | <i>f. molestus</i>  |
| 3  | Нижний Новгород                  | подвал           | 40            | 100                | 460         | M              | <i>f. molestus</i>  |
| 4  | Екатеринбург                     | подвал           | 24            | 71                 | 460         | M              | <i>f. molestus</i>  |
| 5  | Томск                            | подвал           | 21            | 91                 | 460         | M              | <i>f. molestus</i>  |
| 6  | Петрозаводск I                   | подвал           | 33            | 60                 | 460         | M              | <i>f. molestus</i>  |
| 7  | Петрозаводск II                  | подвал           | 20            | 90                 | 460         | M              | <i>f. molestus</i>  |
| 8  | Волгоград                        | подвал           | 20            | 100                | 460         | M              | <i>f. molestus</i>  |
| 9  | Волжский                         | подвал           | 17            | 88                 | 460         | M              | <i>f. molestus</i>  |
| 10 | Краснодар I                      | подвал           | 20            | 70                 | 460         | M              | <i>f. molestus</i>  |
| 11 | Краснодар II                     | открытый водоем  | 20            | 98                 | 460         | M              | <i>f. molestus</i>  |
| 12 | Ленинградская обл.               | открытый водоем  | 50            | 0                  | 410         | P, P1          | <i>torrentium</i>   |
| 13 | Нижегородская обл., дер. Дивеево | открытый водоем  | 18            | 0                  | 410         | P              | <i>torrentium</i>   |
| 14 | Томская обл., дер. Белоусово     | открытый водоем  | 34            | 0                  | 410         | P              | <i>torrentium</i>   |
| 15 | Карелия, д. Машозеро             | открытый водоем  | 35            | 0                  | 410         | P              | <i>torrentium</i>   |
| 16 | Карелия, п. Нильма               | открытый водоем  | 8             | 0                  | 410         | P              | <i>torrentium</i>   |
| 17 | Свердловская обл., дер. Талица   | открытый водоем  | 12            | 100                | 460         | M              | <i>f. pipiens</i>   |
|    |                                  |                  | 24            | 0                  | 410         | P              | <i>torrentium</i>   |
| 18 | Ивановская обл., г. Кохма        | открытый водоем  | 20            | 0                  | 410         | P              | <i>torrentium</i>   |
| 19 | Нижегородская обл., г. Выкса     | открытый водоем  | 24            | 0                  | 410         | P              | <i>torrentium</i>   |
| 20 | Ярославская обл.                 | открытый водоем  | 24            | 0                  | 410         | P              | <i>torrentium</i>   |
| 21 | Волгоградская обл., пос. Сарепта | открытый водоем  | 20            | 100                | 460         | M              | <i>f. pipiens</i>   |
| 22 | Москва                           | подвал           | 53            | 96                 | 460         | M              | <i>f. molestus</i>  |
| 23 | Москва, Битца                    | открытый водоем  | 16            | 0                  | 410         | P              | <i>torrentium</i>   |
| 24 | Москва, Останкино                | открытый водоем  | 15            | 0                  | 410         | P              | <i>torrentium</i>   |
|    |                                  |                  | 3             | 100                | 460         | M              | <i>f. pipiens</i>   |
| 25 | Мос. обл., дер. Лужки            | открытый водоем  | 20            | 90                 | 460         | M              | <i>f. pipiens</i>   |
| 26 | Московская обл., дер. Чашниково  | открытый водоем  | 18            | 100                | 460         | M              | <i>f. pipiens</i>   |
|    |                                  |                  | 32            | 0                  | 410         | P              | <i>torrentium</i>   |
| 27 | Мос. обл., пос. Икша             | открытый водоем  | 22            | 0                  | 410         | P              | <i>torrentium</i>   |
| 28 | Мос. обл., пос. Икша             | подвал, зимующие | 20            | 100                | 460         | M              | <i>f. pipiens</i>   |
| 29 | Мос. обл., дер. Стариково        | открытый водоем  | 20            | 100                | 460         | M              | <i>f. pipiens</i>   |
|    |                                  |                  | 24            | 0                  | 410         | P              | <i>torrentium</i>   |

\*Разделение на формы *molestus* и *pipiens* у *C. p. pipiens* основывалось на проявлении автогенности и типе биотопа.

|                                    |     |
|------------------------------------|-----|
| Всего проверено                    | 827 |
| <i>C. p. pipiens f. molestus</i> * | 368 |
| <i>C. p. pipiens f. pipiens</i> *  | 113 |
| <i>C. torrentium</i>               | 346 |

### 3.1.5 ПЦР-ПДФ 5' конца гена *COI*

По последовательностям ДНК области ITS2 рРНК и 3'конца гена *COI* мтДНК две формы *C. p. pipiens*, f. *pipiens* и f. *molestus* не различались. Мы исследовали область 5' конца гена *COI* мтДНК (603 п.н.) с целью поиска дифференцирующих различий между ними (рис. 8). В анализ были включены также представители других членов комплекса - *C. p. quinquefasciatus* и *C. p. pallens*, *C. torrentium*, а также *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 включить комаров этого вида в разработку быстрых способов идентификации полевых сборов. Сравнительный анализ последовательностей 5' конца гена *COI* видов (AM403476, AM403477, AM403492, FM177756, FM177757, FM177758) показал, что автогенные комары *C. p. pipiens* f. *molestus* отличаются одной заменой от неавтогенных *C. p. pipiens*. *C. p. quinquefasciatus* также отличается одной заменой от других комаров комплекса *C. pipiens*. *C. p. pallens* на этом участке гена *COI* не отличается от формы *pipiens*. *C. torrentium* отличается 15 (2,5%) нуклеотидными заменами от *C. p. pipiens*. Отличие *C. modestus* составляет 5,14% и соответствует представлению о межвидовой дифференциации. Разница в нуклеотидном составе изученного нами участка гена *COI* мтДНК позволила подобрать рестриктазы, которые имели бы сайт рестрикции на последовательности ДНК только одной формы комаров.

Сайтом узнавания фермента *HaeIII* является последовательность GG'CC, которая имеется на участке гена *COI* у комаров *C. p. pipiens* f. *pipiens*, *C. p. quinquefasciatus*, *C. p. pallens* и отсутствует у комаров *C. p. pipiens* f. *molestus* и *C. modestus*. После рестрикции амплификатов ДНК гена *COI* *C. p. pipiens* f. *pipiens*, *C. p. quinquefasciatus*, *C. p. pallens* получались два фрагмента, размером 206 и 397 п.н. Фрагмент гена *COI* *C. p. pipiens* f. *molestus* и *C. modestus* оставался неизменным – 603 п.н. (рис. 9). *HaeIII* – удобный маркер для дифференциации *C. p. pipiens* f. *pipiens* и *C. p. pipiens* f. *molestus*, так как существует только один сайт на данном участке и образующиеся фрагменты значительно различаются по размеру и хорошо визуализируются с помощью электрофореза. С использованием рестриктазы *HaeIII* был проведен скрининг образцов ДНК особей из подвальных и наземных популяций *C. p. pipiens* и доказано, что мутация, различающая две формы, в популяциях закреплена и рестрикция *HaeIII* является надежным способом

```

#pipiens      TGA GCT GGA ATA GTT GGA ACT TCT TTA AGT TTA CTA ATT CGA GCA GAA TTA AGT CAA CCA GGT GTA TTT ATT GGA AAT GAT CAA ATT TAT AAT GTT ATT GTA ACT GCT CAT GCT
#molestus    ... ..
#pallens     ... ..
#quinquefasciatus ... ..
#torrentium  ... ..
#modestus    ... .. TAG TGG .AC GTC .T. AAG TT. ACT TAT TCG A.C CG. ATT AAG TCA ACC GGG A.. C.T .A. TGG AA. TGA TCA A.T T.A ..A TG. TA. TG. AAC TGC A.A TGC TT.

#pipiens      TTT ATT ATA ATT TTT TTT ATA GTA ATA CCA ATC ATA ATT GGA GGA TTT GGA AAT TGA TTA GTT CCT TTA ATG TTA GGA GCT CCA GAT ATG GCC TTT CCT CGA ATA AAT AAT ATA
#molestus    ... ..
#pallens     ... ..
#quinquefasciatus ... ..
#torrentium  ... ..
#modestus    .A. TA. .AT T.. ..A. .GT AAT .CC AAT TAT .AT TGG A.G ATT .GG AA. TTG ATT AGT TCC TT. AAT GCT AGG A.C C.C AG. T.. GGC .TT .CC T.G AAT .A. T.A T.. .AG

#pipiens      AGT TTT TGA ATA CTA CCT CCT TCA TTG ACA CTA CTA CTT TCA AGT AGT TTA GTA GAA AAT GGA GCT GGG ACT GGA TGA ACA GTG TAT CCC CCT CTT TCA TCT GGA ACA GCT CAT
#molestus    ... ..
#pallens     ... ..
#quinquefasciatus ... ..
#torrentium  ... ..
#modestus    TT. .G AAT .CT ACC T.C TTC ATT GAC ..T TCT ACT T.C AAG TAG TA. AGT AG. A.. TGG A.C TGG .AC TGG ATG AAC .GT T.A .CC ... T.. T.C ATC .GG AAC CGC T.A TGC

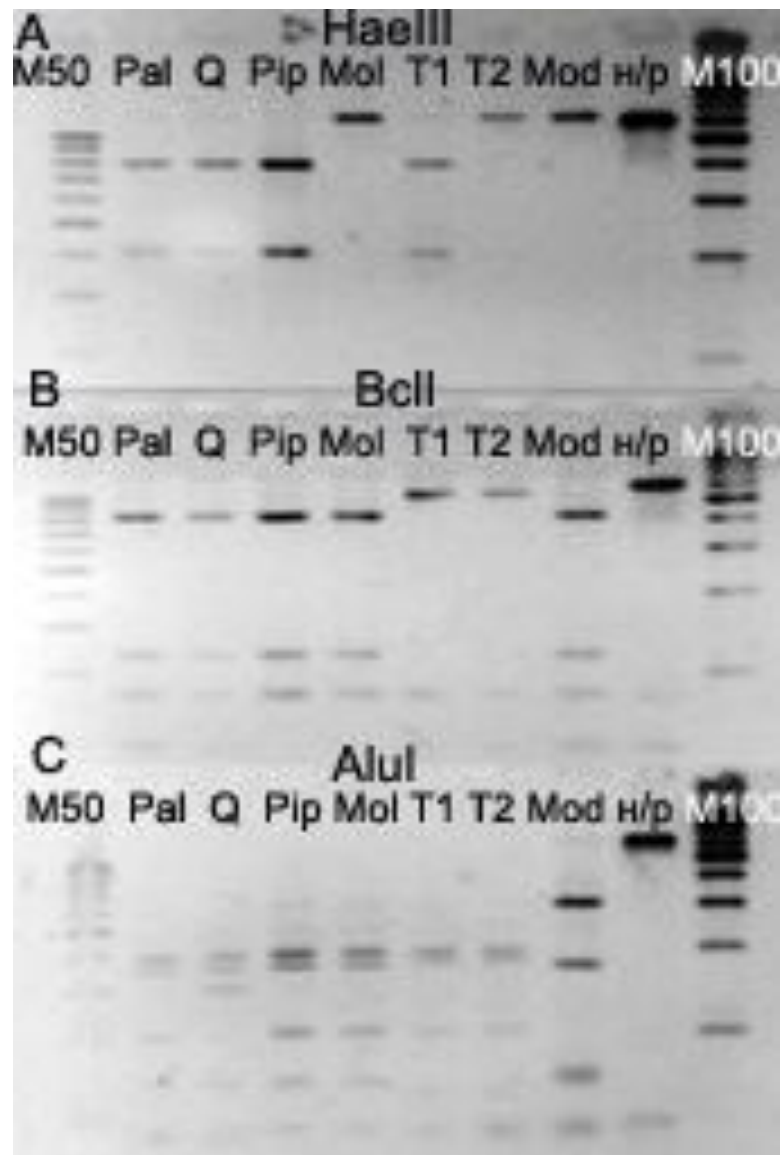
#pipiens      GCT GGA GCT TCA GTA GAC TTA GCT ATT TTT TCT TTA CAT TTA GCA GGA ATT TCA TCA ATT TTA GGT GCA GTA AAT TTT ATT ACA ACA GTA ATT AAT ATA CGA TCT TCA GGA ATT
#molestus    ... ..
#pallens     ... ..
#quinquefasciatus ... ..
#torrentium  ... ..
#modestus    TGG A.C ATC AGT TG. TTT AGC TA. T.. .C AT. AC. TT. AGC AGG AAT T.C ATC AAT T.. AGG A.C AGT AA. TT. .A. TAC .AC .GT AAT TAA T.. .CG ATC .TC AGG AAT TAC

#pipiens      ACT CTT GAT CGA ATA CCT TTA TTT GTT TGA TCA GTA GTA ATT ACT GCA GTT TTA TTA CTT CTT TCT TTA CCT GTT TTA GCT GGT GCT ATT ACT ATG TTA TTA ACA GAT CGA AAT
#molestus    ... ..
#pallens     ... ..
#quinquefasciatus ... ..
#torrentium  ... ..
#modestus    C.. TGA CCG AAT .CC AT. A.T .G. T.G ATC AGT AGT AAT TAC TGC TGT T.. A.T ACT TC. T.C .T. ACC AG. A.. AGC TGG A.C AA. TAC TA. ..T A.T AAC TG. TCG AA. TT.

#pipiens      TTA AAT ACT TCA TTC TTT GAT CCA ATT GGA GG
#molestus    ... ..
#pallens     ... ..
#quinquefasciatus ... ..
#torrentium  ... ..
#modestus    AA. T.C TTC ATC .CG ACC C.A TGG .GG A.G A.

```

**Рисунок 8.** Сравнение нуклеотидных последовательностей 5' участка гена *COI* комаров рода *Culex*. Точки означают гомологию с последовательностью *C. pipiens f. pipiens*. Праймеры *CulexCOIF* и *CulexCOIR* подчеркнуты. Диагностические сайты рестрикции для *HaeIII* (GG/CC), *BclI* (T/GATCA) и *AluI* (AG/CT) подчеркнуты.



**Рисунок 9.** 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*, Т1 и Т2 – *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.).

идентификации автогенных и неавтогенных комаров *C. p. pipiens*.

Для *C. torrentium* характерны оба варианта результатов рестрикции *HaeIII* (60% - AGCC, 30% -GGCT), т.е. у этого вида наблюдается внутривидовая изменчивость гена *COI* и в последовательности узнавания рестриктазы возможно присутствие как аденина, так и гуанина в 195 позиции (рис. 8). Полиморфизм ДНК позволил подобрать рестриктазу для дифференциации *C. torrentium*. Эндонуклеазе *BclI* требуется последовательность узнавания T<sup>3</sup>GATCA. На ДНК *C. p. pipiens, molestus, pallens, quinquefasciatus* и *C. modestus* есть два сайта для *BclI*. На ДНК *C. torrentium* - один. После рестрикции *BclI* ПЦР-продуктов, полученных при амплификации с праймерами COIF и COIR, ДНК комаров комплекса *C. pipiens* и *C. modestus* разрезалась на три фрагмента размером 406, 118 и 79 п.н. ДНК *C. torrentium* режется только на два фрагмента – 524 и 79 п.н. (рис. 9).

Для рестриктазы *AluI* требуется последовательность AG<sup>3</sup>CT. В ДНК гена *COI* *C. p. pipiens, molestus, pallens* и *C. torrentium* имеются по 6 сайтов для *AluI*. У *C. p. quinquefasciatus* в позиции 292 аденин меняется на гуанин (рис. 8) и рестриктаза в этом сайте не работает. Поэтому у *C. p. quinquefasciatus* на данном участке *COI* есть только 5 сайтов рестрикции для *AluI*. 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. 9). Фрагмент размером 144 п.н. после рестрикции *AluI* является диагностическим для *C. p. quinquefasciatus*.

У *C. modestus* существуют 4 сайта для *AluI*. После рестрикции образуются фрагменты размером 286, 171, 72, 69 и 5 п.н. что значительно отличается от профилей рестрикции комаров комплекса *C. pipiens* (рис. 9).

Метод был проверен при изучении популяций *C. p. pipiens* в Волгограде, где случаи заболеваний ЛЗН среди людей были зарегистрированы в 1999-2003 и 2005-2007гг. Были исследованы 545 комаров из 5 подвальных и 10 наземных биотопов. В качестве биологического признака для дифференциации форм использовали способность к автогенности. Было доказано, что все самки с мт-гаплотипом "*pipiens*" (206 и 397 п.н. после обработки *HaeIII*) неавтогенны. Мт-гаплотип "*molestus*" (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. В потомстве 6 из них были получены неавтогенные дочери (7,8 % от

общего числа потомков) и все имели мт-гаплотип "*molestus*" (603 п.н) . Присутствие неавтогенных особей в потомстве автогенных самок - явление, отмеченное ранее в лабораторных культурах, созданных на основе автогенных 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: от 10-90% в Египте (Gad et al., 1995) до 4-55% в Израиле (Nudelman et al., 1988).

Разработанный нами метод ПЦР-ПДРФ на основе анализа нуклеотидного состава 5' конца гена *COI* мтДНК позволил обнаружить различия и предложить быстрый способ диагностики комаров *C. p. pipiens* (f. *pipiens* и f. *molestus*), *C. p. quinquefasciatus*, *C. p. pallens*, *C. torrentium* комплекса *C. pipiens*, а также и *C. modestus*. С использованием ПЦР-ПДРФ был проведен скрининг образцов ДНК особей из 28 природных популяций (11 подвальных популяций и 19 популяций открытых наземных водоемов) и 3 лабораторных линий (табл. 7). Всего было протестировано 529 образцов ДНК комаров из разных популяций. Однородные популяции f. *molestus* были обнаружены в подвальных биотопах 7 городов, однородные популяции f. *pipiens* – в 15 наземных водоемах из окрестностей Москвы, Краснодара, Астрахани, городах Сев. Кавказа, Абхазии и Грузии (табл. 7). Обнаружены 4 смешанных популяции *pipiens* и *molestus* в открытых биотопах из окрестностей Краснодара, Батуми и Евлаха, Азербайджан. Не только *molestus*, но и *pipiens* были обнаружены в подвале Владикавказа - это единственный, обнаруженный нами случай, когда взрослые особи формы *pipiens* находились в подвале дома вместе с комарами формы *molestus*, скорее всего, самки формы *pipiens* использовали подвал как место отдыха, не найдя подходящего на поверхности. 4 смешанные популяции *C. torrentium* и неавтогенного *C. p. pipiens* были найдены в окрестностях Москвы и Н.Новгорода. Смешанные популяции *C. p. pipiens* f. *molestus* и *C. torrentium* не обнаружены.

### 3.1.6 Изменчивость гена *COI* мтДНК в связи с зараженностью

Мы изучили структуру полного гена *COI* мтДНК, определяя первичную структуру ДНК у комаров комплекса *Culex pipiens*, собранных в 16 географически удаленных местообитаниях: четыре популяции *C. p. pipiens* формы *pipiens* (далее f. *pipiens*) - две подмосковные популяции и две популяции из Волгограда; шесть популяций *C. p. pipiens*

**Таблица 7.** Результаты анализа популяций комплекса *Culex pipiens* методом ПЦР-ПДРФ 5' участка гена *COI*.

| №  | Место сбора                        | Тип биотопа | Кол-во особей | Размер фрагментов (п.н.) |         |         | Вид, форма          |
|----|------------------------------------|-------------|---------------|--------------------------|---------|---------|---------------------|
|    |                                    |             |               | VclI                     | 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.,<br>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,<br>п.Лужки           | открытый    | 10            | 406,118,79               | 206,397 | 99 и 45 | <i>f.pipiens</i>    |
| 6  | Московск.обл,<br>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,<br>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,<br>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,<br>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,<br>коллектор            | открытый    | 31            | 406,118,79               | 603     | 99 и 45 | <i>f.molestus</i>   |
| 17 | Краснодар,<br>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<br>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            | 406,118,79               | 206,397 | 99 и 45 | <i>f.pipiens</i>    |
| 22 | Кабардино-<br>Балкария, Нальчик    | открытый    | 8             | 406,118,79               | 206,397 | 99 и 45 | <i>f.pipiens</i>    |
| 23 | Северная Осетия,<br>с.Кизляр       | открытый    | 8             | 406,118,79               | 206,397 | 99 и 45 | <i>f.pipiens</i>    |
| 24 | Ставропольский<br>рай, гГеоргиевск | 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>  |

**Таблица 7** (продолжение). Результаты анализа популяций комплекса *Culex pipiens* методом ПЦР-ПДРФ 5' участка гена *COI*.

| №  | Место сбора   | Тип биотопа | Кол-во особей | Размер фрагментов (п.н.) |         |         | Вид, форма              |
|----|---------------|-------------|---------------|--------------------------|---------|---------|-------------------------|
|    |               |             |               | VcII                     | HaеIII  | AluI*   |                         |
|    | 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  | 23            | 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>          |

\* указаны только дифференцирующие фрагменты

|                               |     |
|-------------------------------|-----|
| Всего                         | 529 |
| <i>C. p. pipiens</i>          | 390 |
| <i>C. torrentium</i>          | 76  |
| <i>C. p. quinquefasciatus</i> | 43  |
| <i>C. p. pallens</i>          | 20  |

| Биотопическое распределение | <i>f. molestus</i> | <i>f. pipiens</i> | <i>C. torrentium</i> |
|-----------------------------|--------------------|-------------------|----------------------|
| подвалы                     | 100                | 5                 | 0                    |
| открытые                    | 71                 | 214               | 76                   |



формы *molestus* (далее f. *molestus*) – Петрозаводска, Санкт-Петербурга, Москвы, Нижнего Новгорода и две из Волгограда; две лабораторные линии *C. p. quinquefasciatus* из популяций Индии; одна линия *C. p. pallens* из Японии; три популяции *C. torrentium* (из Ленинградской, Московской и Саратовской областей).

Ген *COI* фланкирован tRNA-Tyrosine с 5' конца и tRNA-Leucine с 3' конца. Поскольку амплификация и последующее секвенирование ДНК проводилось с использованием праймера TY-J-1460 (Simon et al., 1994), комплементарного ДНК tRNA-Тур, расположенной левее гена *COI* относительно точки начала репликации ДНК, мы смогли определить иницирующий кодон TCG для гена *COI*. Использование для амплификации и секвенирования праймера UEA10 (Lunt et al., 1996), комплементарного tRNA-Leu и расположенной правее гена *COI*, позволило определить терминирующий кодон TAA. Нами была впервые определена структура полного гена *COI* комаров комплекса *C. pipiens*. Ранее было известно, что иницирующий кодон TCG гена *COI* обнаружен для многих насекомых отряда Diptera, например *Anopheles gambiae*, *An. quadrimaculatus* и *Aedes aegypti*, но для этих видов терминирующим кодоном является одиночный нуклеотид Т (Lunt et al., 1996; Bernasconi et al., 2000; Morlais, Severson, 2002). Нами было показано что, согласно генетическому коду митохондриальной ДНК беспозвоночных, терминирующим кодоном гена *COI* для всех изученных представителей комплекса *C. pipiens* является триплет TAA. Размер гена *COI* у исследуемых комаров равен 1542 п.н., что составляет 514 аминокислот. В ДНК этого гена пары А+Т составляют 70,2%. Аденин и Тимин располагаются преимущественно в третьих положениях кодонов, что является характерным для многих родов Diptera (Cywinska et al., 2006). Мутации равномерно распределены по всей последовательности, что не позволяет выделить более вариабельные участки гена. Нуклеотидные последовательности гена *COI* *C. pipiens* зарегистрированы в GeneBank под номерами FN395171-FN395206.

При сравнении всех изученных видов и подвидов, вариабельными оказались 64 нуклеотидных сайта (4 %), из которых информативными на основе принципа парсимонии были 54 (3,5 %) среди 36 изученных последовательностей ДНК гена *COI* представителей комплекса *C. pipiens* (рис. 10). Средние значения процентов нуклеотидных различий между представителями комплекса представлены в таблице 8.

Среди подвидов *C. pipiens* в гене *COI* обнаружено 7 вариабельных сайтов. Все обнаруженные замены нуклеотидов оказались транзициями А↔G, находятся в третьих

|                      | 122        | 2333344555 | 5666666677 | 7788899999 | 0000001111 | 1111111111 | 1111111111 | 1111  |  |
|----------------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|-------|--|
|                      | 1156677015 | 7135607457 | 8001157844 | 4824527899 | 0245591277 | 8122379013 | 5692       | 2291  |  |
|                      | 2810369232 | 0597354057 | 2368915714 | 7386542139 | 2070686249 | 5289350545 | 0042       | 6720  |  |
| ACTTGAGACG           | GTTAGTTTAT | TTTGTCTTAG | TAAGTATACA | TAAAATTAC  | TCATAAAATC | TTTT       | MVII       |       |  |
| pipMosLuzki-7        | G.....     | .....      | ...A.....  | .....      | .....      | .....      | .....      | ..... |  |
| pipMosLuzki-16       | G.....     | .....      | ...A.....  | .....      | .....      | .....      | .....      | ..... |  |
| pipMosLuzki-19       | .....      | .....      | .....      | .....      | .....      | .....      | .....      | ..... |  |
| pipMosIksha-3        | .....      | .....      | .....      | ..G.....   | .....      | .....      | .....      | ..... |  |
| pipMosIksha-4        | .....      | .....      | .....      | ..G.....   | .....      | .....      | .....      | ..... |  |
| pipMosIksha-6        | .....      | .....      | .....      | .....      | .....      | .....      | .....      | ..... |  |
| pipMosIksha-7        | .....      | .....      | .....      | .....      | .....      | .....      | .....      | ..... |  |
| pipMosIksha-8        | .....      | .....      | .....      | ..G.....   | .....      | .....      | .....      | ..... |  |
| pipVolgSarpinsky     | .....      | .....      | .....      | .....      | .....      | .....      | .....      | ..... |  |
| pipVolgLiteishik     | .....      | .....      | .....      | ..G.....   | .....      | .....      | .....      | ..... |  |
| molVolgRokosovskogo  | .....      | A.....     | .....      | .....      | ..G.....   | .....      | .....      | ..... |  |
| molSPeterburg-36     | .....      | A.....     | .....      | .....      | ..G.....   | .....      | .....      | ..... |  |
| molSPeterburg-10     | .....      | A.....     | .....      | .....      | ..G.....   | .....      | .....      | ..... |  |
| molMoscow            | .....      | A.....     | .....      | .....      | ..G.....   | .....      | .....      | ..... |  |
| molNNovgorod         | .....      | A.....     | .....      | .....      | ..G.....   | .....      | .....      | ..... |  |
| molVolgAldanskaya-1  | .....      | A.....     | .....      | .....      | ..G.....   | .....      | .....      | ..... |  |
| molVolgAldanskaya-2  | .....      | A.....     | .....      | .....      | ..G.....   | .....      | .....      | ..... |  |
| molVolgAldanskaya-3  | .....      | A.....     | .....      | .....      | ..G.....   | .....      | .....      | ..... |  |
| molVolgAldanskaya-4  | .....      | A.....     | .....      | .....      | ..G.....   | .....      | .....      | ..... |  |
| molPetrozavodsk      | .....      | A.....     | .....      | .....      | ..G.....   | .....      | .....      | ..... |  |
| quinPondicherry-12   | .....      | ..G.....   | .....      | .....      | ..G.....   | .....      | .....      | ..... |  |
| quinPondicherry-20   | .....      | ..G.....   | .....      | .....      | ..G.....   | .....      | .....      | ..... |  |
| quinHydarabad-12     | .....      | ..G.....   | .....      | .....      | ..G.....   | .....      | .....      | ..... |  |
| quinHydarabad-23     | .....      | ..G.....   | .....      | .....      | ..G.....   | .....      | .....      | ..... |  |
| pallens-2            | .....      | .....      | .....      | .....      | .....      | .....      | .....      | ..... |  |
| pallens-4            | .....      | .....      | .....      | .....      | .....      | .....      | .....      | ..... |  |
| torLen69km-1         | .TCCACATT. | ACA.ACACTC | CGAACTCCT. | CT.AA.CGTT | CG.TG.CCG. | CTGCGTTTCT | CCCC       | LIVA  |  |
| torLen69km-10        | .TCCA.ATT. | AC..A.A.TC | CGAACTCCT. | CT.AA.C.TT | C..T.CCCGT | .TGC.TTTCT | CC.C       | .IVA  |  |
| torLen69km-29        | .TCCA.ATT. | AC..A.A.TC | CGAACT.CT. | CT.AA.C.TT | C..T.CCCG. | CTG..TTTCT | CC.C       | .IVV  |  |
| torMosChashnikovo-14 | .TCCA.ATT. | AC..A.A.TC | CGAACT.CTA | CT.AA.C.TT | C..T.CCCG. | C.G..TTTCT | CCCC       | .IVV  |  |
| torMosChashnikovo-13 | .TCCA.ATT. | AC..A.A.TC | CGAACT.CTA | CT.AA.C.TT | C..T.CCCG. | CTG..TTTCT | CC.C       | .IVV  |  |
| torMosChashnikovo-27 | .TCCA.ATTA | .C..A.A.TC | CGAACT.CTA | CT.AA.C.TT | C..T.CCCG. | CTG..TTTCT | CC.C       | .IVV  |  |
| torMosChashnikovo-28 | .TCCA.ATT. | AC..A.A.TC | CGAACT.CTA | CT.AA.C.TT | C..T.CCCG. | C.G..TTTCT | CC.C       | .IVV  |  |
| torSaratov-4         | .TCCA.ATT. | AC..A.ACTC | CGAACT.CTA | CT.AA.C.TT | C..T.CCCG. | CTG..TTTCT | CC.C       | .IVV  |  |
| torSaratov-5         | GTCCA.ATT. | AC..A.A.TC | CGAACT.CTA | CT.AA.C.TT | C..T.CCCG. | CTG..TTTCT | CC.C       | .IVV  |  |
| torSaratov-7         | .TCCA.ATT. | .C..A.A.TC | CGAACT.CTA | CT.AA.C.TT | C..T.CCCG. | CTG..TTTCT | CC.C       | .IVV  |  |

**Рисунок 10.** Сравнение переменных нуклеотидных и аминокислотных последовательностей гена *COI* *Cx. pipiens* f. *pipiens* (pip), *Cx. pipiens* f. *molestus* (mol), *Cx. quinquefasciatus* (quin), *Cx. p. pallens* (pallens), *Cx. torrentium* (tor). Номера переменных сайтов указаны сверху. Указаны названия популяций по месту сбора и номер образца из данной популяции.

положениях кодонов и не меняют аминокислотную последовательность. У комаров *f. pipiens* обнаружены три вариабельных сайта, характеризующие три гаплотипа, которые мы обозначили буквами А, В и С. Эти гаплотипы не специфичны для популяции (рис. 10). Гаплотип А обнаружен у комаров из двух подмосковных популяций «Лужки» (Luzki-7) и «Икша» (Iksha-6, Iksha-7), волгоградской популяции «Сарпинский» (Sarpinsky-17) и двух изученных комаров *C. p. pallens*. У других комаров популяции «Лужки» (Luzki-16, Luzki-19) найден гаплотип В, который отличается от комаров с гаплотипом А двумя транзициями. К комарам, у которых обнаружен гаплотип С, относятся комары из подмосковной «Икши» (Iksha-3, Iksha-4, Iksha-8) и волгоградской популяции «Литейщик» (Liteishik-13). Все изученные комары *f. molestus* идентичны между собой и образуют один кластер гаплотипов D. Комары *f. molestus*, включенные в настоящее исследование, были отобраны из географически удаленных популяций: Петрозаводска, Санкт-Петербурга, Москвы, Нижнего Новгорода и Волгограда. Все комары *f. molestus* отличаются от комаров *f. pipiens* двумя фиксированными заменами нуклеотидов в позициях 270 (G→A) и 1047 (A→G). Комары *C. p. quinquefasciatus* из двух лабораторных линий Hyderabad и Pondisherry (Индия) идентичны между собой, отличаются от других подвидов двумя транзициями (A→G) в позициях 357 и 999 и образуют кластер гаплотипов E. Обнаруженные нами замены нуклеотидов строго подвидоспецифичны. Таким образом нет корреляции между гаплотипом и географическими координатами местообитания, а есть корреляция гаплотипов и подвидовой принадлежности комаров комплекса.

**Таблица 8.** Проценты нуклеотидных различий в гене *COI* между видами и подвидами комплекса *C. pipiens*

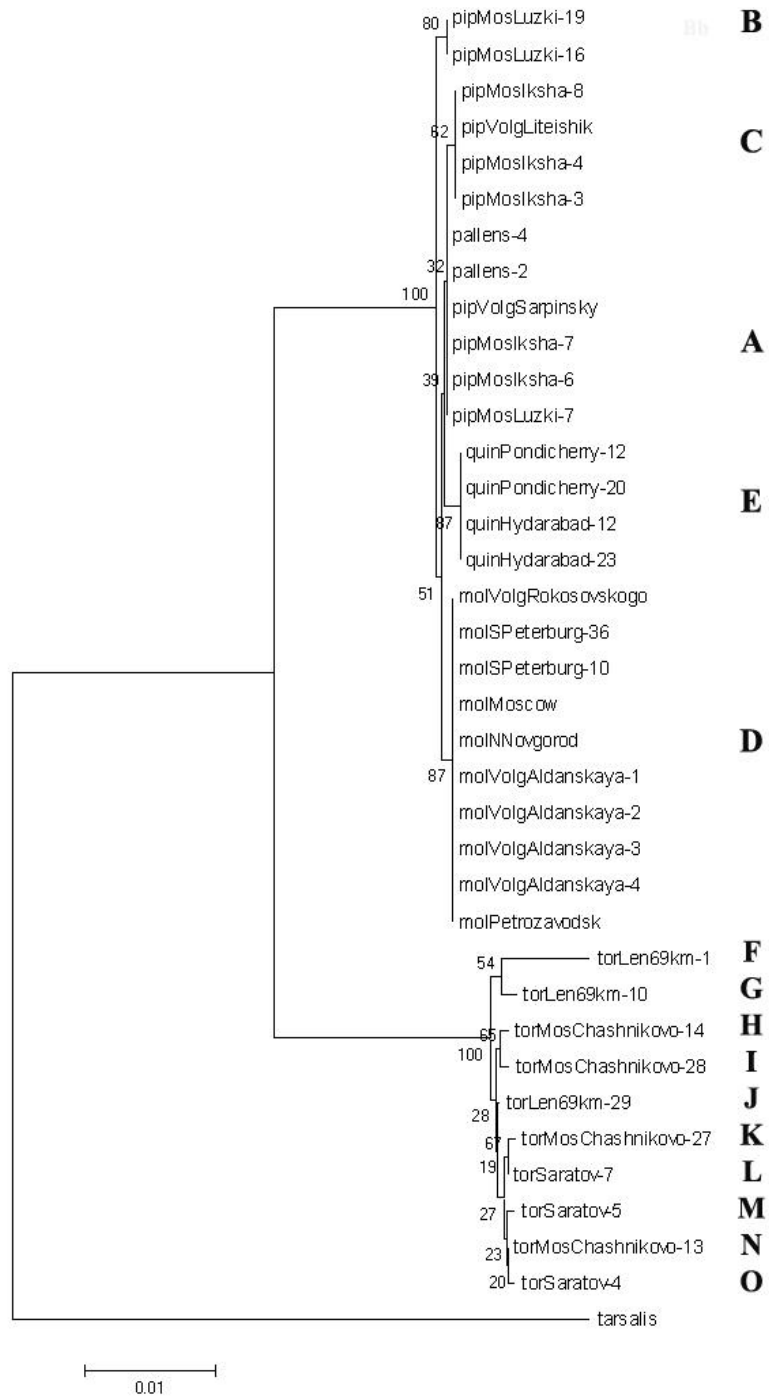
| Подвид (экотип)                 | 1     | 2    | 3    | 4    |
|---------------------------------|-------|------|------|------|
| 1 <i>C. pipiens f. pipiens</i>  |       |      |      |      |
| 2 <i>C. pipiens f. molestus</i> | 0,15% |      |      |      |
| 3 <i>C. p. quinquefasciatus</i> | 0,1%  | 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% |

У комаров *C. torrentium*, незараженных *Wolbachia*, обнаружен значительный полиморфизм гена *COI*. Для каждого из 10 изученных комаров из трех популяций Ленинградской области (69км-1, 69км-10, 69км-29), Московской обл. (Chashnikovo-13, Chashnikovo-14, Chashnikovo-27, Chashnikovo-28) и Саратовской обл. (Saratov-4, Saratov-5, Saratov-7) характерны индивидуальные гаплотипы F-O (рис. 11). ДНК гена *COI* каждого

исследованного комара *C. torrentium* отличается от одной до тринадцати нуклеотидных замен от *COI* других особей как внутри популяции, так и между популяциями (рис. 10). Из 21 переменного сайта 19 нуклеотидных замен находятся в третьих положениях кодонов, по одной замене в первом и во втором положениях. Только одна транзиция G→A в позиции 744 характерна для всех трех изученных комаров популяции 69км Ленинградской области и по этому сайту отличает их от комаров из Подмосковья и Саратова. При трансляции в аминокислотную последовательность у *C. torrentium* относительно комаров подвида *C. pipiens* обнаружены аминокислотные замены в четырех сайтах. Две замены Валин-Изолейцин (Val↔Ile, Ile↔Val) отличают всех комаров этого вида. Обнаружена также дополнительная аминокислотная замена Валина на Аланин (Val↔Ala) у двух комаров *C. torrentium* Ленинградской области. Еще одна замена Метионина на Лейцин (Met↔Leu) обнаружена у комара 69км-1 (рис. 10).

Исследуя полиморфизм гена *COI* мтДНК у представителей 16 популяций комаров комплекса мы определили всего 15 гаплотипов (А-О), из них 10 в популяциях незараженного *Wolbachia C. torrentium*. Мономорфными оказались гаплотипы у *C. p. quinquefasciatus* (Е) и *C. pipiens f. molestus* (D). У комаров *f. pipiens* обнаружено три гаплотипа (А, В, С), причем эти гаплотипы не специфичны для популяции (рис. 11). *C. p. pallens* идентичен основному гаплотипу *f. pipiens* (А). Все изученные комары *f. molestus* идентичны между собой. Отмеченная выше мономорфность изученных образцов *C. p. quinquefasciatus*, также как *C. p. pallens*, может объясняться тем, что мы изучали лабораторные культуры этих видов и проанализировали малое число особей. Изменчивость в популяциях *C. p. pipiens f. pipiens* (наличие трех гаплотипов) могла возникнуть после заражения предковых особей этого вида *Wolbachia*. Единообразие гена *COI* у *f. molestus* говорит в пользу того, что форма *C. p. pipiens*, часто обитающая на территории России в подвалах, возникла относительно недавно и ее популяции, обитающие на обширной территории, имеют общее происхождение.

Напротив, для каждого из десяти изученных неинфицированных *Wolbachia* комаров *C. torrentium* из трех различных популяций обнаружены собственные гаплотипы (F-О). Дендрограмма, показывающая отношения гаплотипов комаров комплекса *C. pipiens*, построенная методом NJ, демонстрирует подразделение выборки на два крупных кластера (рис. 11). Первый образован зараженными эндосимбиотической бактерией *Wolbachia* подвидами *C. pipiens*, второй - неинфицированными *Wolbachia C. torrentium*.



**Рисунок 11.** 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 Culex tarsalis* (AF425847) использована в качестве внешней группы.

При этом полиморфизм гена *COI* *C. torrentium* выражается не только в нуклеотидных различиях, но и в замене некоторых аминокислот. У особей этого вида обнаружены два случая гетероплазмии.

### Гетероплазмия у *C. torrentium*

При изучении видового состава популяций комплекса *C. pipiens* Ленинградской области у комаров *C. torrentium*, собранных на станции Скачки, были обнаружены два случая гетероплазмии. Для видовой идентификации комаров *C. pipiens* f. *pipiens*, f. *molestus* и *C. torrentium* использовали метод ПЦР-ПДРФ основанный на полиморфизме 5' конца гена *COI*. При тестировании популяций *C. torrentium* методом ПЦР-ПДРФ у двух комаров Skachki14 и Skachki15 из Ленинградской области (ст. Скачки) были обнаружены больше чем одна последовательность мтДНК: вместо ожидаемых двух фрагментов рестрикции после обработки амплификатов ДНК 5' конца гена *COI* этих комаров рестриктазой *HaeIII* мы обнаружили три фрагмента. После клонирования ПЦР-продукта были выделены клоны, содержащие и не содержащие сайт узнавания *HaeIII*. Были определены нуклеотидные последовательности 5' конца гена *COI* двух клонов для комаров Skachki14 и Skachki15. Мы обнаружили 11 переменных сайтов и 4 типа последовательностей мтДНК гена *COI*. Для каждого из двух исследованных комаров обнаружены два типа последовательностей. У этих комаров обнаружено 9 транзиций: четыре G↔A и три T↔C в третьем положении кодонов, одна G↔A в первом положении, одна T↔C во втором. Две трансверсии A↔T и T↔G в первых положениях кодонов. Все замены в третьих положениях кодонов не меняют аминокислотную последовательность. Транзиция G↔A в первом положении кодона приводит к смене Val на Ala, а трансверсия T↔G меняет Gly на Cys у Skachki14-5. Транзиция T↔C во втором положении кодона приводит к замене Thr на Ala и трансверсия A↔T меняет Phe на Ile у Skachki15-10 (табл. 9).

При сравнении последовательностей ДНК 5' конца гена *COI* комаров популяции «Скачки», у которых обнаружена гетероплазмия со всеми, изученными в данной работе *C. torrentium*, мы обнаружили 20 переменных сайтов и 11 типов последовательностей мтДНК гена *COI*. Различия по нуклеотидному составу данного участка гена *COI* у комаров из популяций «Чашниково», «69 км» и «Саратов» составляют от 0 до 0,6 %. Четыре нуклеотидные замены отличают комаров из популяции «Скачки» от *C. torrentium* из других популяций. ДНК комаров Skachki14 и Skachki15 отличаются от ДНК других *C. torrentium* большим количеством как нуклеотидных (0,3-1,2 %), так и аминокислотных

Таблица 9. Вариабельные сайты 5' конца гена *COI C. torrentium*

| Полиморфные сайты    | нуклеотидные (номер сайта, согласно рис. 6) |    |    |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | аминокислотные |    |    |     |
|----------------------|---|----|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|----------------|----|----|-----|
|                      | образец                                     | 12 | 76 | 242 | 252 | 270 | 315 | 322 | 327 | 339 | 405 | 540 | 649 | 657 | 675 | 678            | 26 | 81 | 108 |
| torMosChashnikovo-13 | A   | A  | T  | G   | A   | C   | A   | A   | T   | T   | T   | T   | T   | T   | A   | M              | V  | T  | F   |
| torMosChashnikovo-14 | .   | .  | .  | .   | .   | .   | .   | .   | .   | .   | .   | .   | .   | .   | .   | .              | .  | .  | .   |
| torMosChashnikovo-27 | .   | .  | .  | A   | G   | .   | .   | .   | .   | .   | .   | .   | .   | .   | .   | .              | .  | .  | .   |
| torMosChashnikovo-28 | .   | .  | .  | .   | .   | .   | .   | .   | .   | .   | .   | .   | .   | .   | .   | .              | .  | .  | .   |
| torLen69km-1         | .   | C  | .  | .   | .   | .   | .   | .   | A   | C   | C   | .   | .   | C   | .   | L              | .  | .  | .   |
| torLen69km-10        | .   | .  | .  | .   | .   | .   | .   | .   | .   | .   | .   | .   | .   | C   | .   | .              | .  | .  | .   |
| torLen69km-29        | .   | .  | .  | .   | .   | .   | .   | .   | .   | .   | .   | .   | .   | .   | .   | .              | .  | .  | .   |
| torSaratov-4         | .   | .  | .  | .   | .   | .   | .   | .   | .   | .   | C   | .   | .   | .   | .   | .              | .  | .  | .   |
| torSaratov-5         | G   | .  | .  | .   | .   | .   | .   | .   | .   | .   | .   | .   | .   | .   | .   | .              | .  | .  | .   |
| torSaratov-7         | .   | .  | .  | G   | .   | .   | .   | .   | .   | .   | .   | .   | .   | .   | .   | .              | .  | .  | .   |
| torSkachki14-1       | .   | .  | .  | .   | .   | .   | G   | .   | .   | .   | .   | .   | .   | .   | .   | .              | .  | .  | A   |
| torSkachki14-2       | .   | .  | .  | A   | G   | .   | .   | .   | .   | .   | .   | .   | .   | .   | .   | .              | .  | .  | .   |
| torSkachki15-1       | .   | .  | .  | .   | .   | T   | .   | G   | .   | .   | .   | .   | .   | C   | .   | .              | .  | .  | .   |
| torSkachki15-2       | .   | .  | C  | .   | G   | .   | .   | .   | .   | .   | .   | A   | C   | .   | G   | .              | A  | .  | I   |

У образцов Skachki14 и Skachki15 обнаружены по 2 варианта мтДНК.

(1,7 %) замен. При сравнении белковых последовательностей 5' участка гена *COI* всех изученных в данной работе комаров *C. torrentium* выделяется основной гаплотип. Отличаются от него один из комаров популяции 69км Ленинградской области и последовательности двух комаров, у которых обнаружено явление гетероплазмии из популяции Скачки, также Ленинградской области (табл. 9).

Наличие двух различных последовательностей ДНК митохондриальных генов у одного индивида может быть объяснено тремя причинами: амплификацией ядерных псевдогенов, мутациями мтДНК в клетке или присутствием отцовской мтДНК. Косвенным признаком псевдогенов является наличие стоп-кодонов при трансляции в аминокислотную последовательность и повышенная частота несинонимичных мутаций. У обнаруженных нами вариантов гена *COI* *C. torrentium* стоп-кодоны не обнаружены. Присутствие в клетке отцовской мтДНК отмечалось у *Drosophila simulans* и *Aedes aegypti* (Paudan, Ribolla, 2008). Множественные различия мтДНК у двух особей *C. torrentium*, у которых обнаружена гетероплазмия (соответственно по 4 и 8 нуклеотидам) свидетельствуют в пользу двуродительской передачи мтДНК в этих случаях.

Итак, наши данные показывают значительное снижение гаплотипического разнообразия мтДНК в зараженных *Wolbachia* популяциях *C. pipiens* по сравнению с незараженным *C. torrentium*. Если предположить, что снижение разнообразия в зараженных популяциях произошло вследствие того, что популяция прошла через «бутылочное горлышко» до распространения на обширной территории, то можно ожидать уменьшение разнообразия и в ядерной ДНК, также как и в мтДНК.

### 3.1.7 Разнообразие рДНК

Кластеры генов рибосомной РНК (рРНК), пригодны для поиска молекулярно-генетических различий, поскольку в их составе имеются как консервативные участки (гены 28S, 5,8S и 18S рРНК), так и переменные участки (внутренние транскрибируемые (ITS) и межгенные спейсеры кластеров генов рРНК (IGS)).



### 3.1.7.1 Анализ эволюционной изменчивости ITS2 комаров *C. pipiens*

Мы изучили полиморфизм области второго внутреннего транскрибируемого спейсера (ITS2) кластера генов рРНК у комаров комплекса *C. pipiens* из географически удаленных популяций Европейской части России. Используя праймеры, комплементарные к районам 5,8S и 28S рДНК (Porter, Collins, 1996), мы получили характерные ПЦР продукты размером 460-466 п.н. для 20 особей из каждой популяции. Четырнадцать последовательностей были секвенированы (некоторые из них зарегистрированы в GenBank под номерами AJ850083-AJ850086). У *C. pipiens* ДНК первой половины ITS2 менее вариабельна, чем второй. При сравнении изученных ITS2 последовательностей *C. p. pipiens* формы *molestus* в районе 245 нуклеотида обнаружены различия в числе тринуклеотидного повтора ACG (рис. 12). Кроме того, в районе с 312 по 330 нуклеотид наблюдается вариация числа тринуклеотидного повтора CGT, чередующегося с динуклеотидом CA. CGT также повторяется два раза в районе 349 нуклеотида и один раз в районе 366 нуклеотида у всех изученных последовательностей. При сравнении нуклеотидного состава ITS2 у подвальных комаров изученных популяций мы наблюдаем большое сходство (99%) ITS2 у особей из разных, удаленных на далекое расстояние, популяций: Москвы и Томска, Петрозаводска и Томска, Томска и Н. Новгорода, Петербурга и Москвы. При этом два комара из одной популяции могут отличаться по составу ДНК ITS2 на 3% как в Н. Новгороде, так и в Томске. Видимо, мутационные процессы в ITS2 у комаров *C. pipiens* происходят независимо от места обитания. По-видимому, это может свидетельствовать о повышенной рекомбинационной активности этой области ITS2 у *C. pipiens*. В остальных случаях наблюдаются делеции-инсерции единичных нуклеотидов. Размер и нуклеотидный состав ITS2 варьирует у представителей одной географической популяции, что делает невозможным использование ITS2 для диагностики комаров *C. p. pipiens* (f. *pipiens* и f. *molestus*). У комаров четырех популяций *C. torrentium* обнаружены комбинации динуклеотидных повторов в 3'-конце ITS2. В остальном, последовательности ITS2 *C. torrentium* идентичны между собой (рис. 12).



### 3.1.7.2 Анализ изменчивости IGS комаров рода *Culex*

#### Сравнение структурной организации участка IGS трех видов комаров рода *Culex* – *C. torrentium*, *C. modestus* и *C. pipiens*

Известно, что нуклеотидные последовательности межгенного спейсера кластера генов рибосомной РНК (IGS) относятся к числу наиболее вариабельных участков генома – даже между близкородственными видами наблюдается высокий уровень генетического полиморфизма. Были определены нуклеотидные последовательности IGS *C. modestus* (открытый водоем г. Волгоград); *C. torrentium* (открытые водоемы Подмосковья: №1 – пос. Икша и №2 – пос. Чашниково); *C. pipiens pallens* (Япония, лабораторная культура); *C. p. pipiens f. molestus* (подвальные помещения: №1 – Москва, Ломоносовский пр. и №2 – Волгоград, ул. Рокоссовского); *C. p. pipiens f. pipiens* (открытые водоемы: №1 – Подмосковье, пос. Икша и №2 – Волгоград, пос. Сарепта). Для определения нуклеотидных последовательностей IGS амплифицировали тотальную ДНК исследуемых комаров, используя разработанные нами праймеры *Culex28S* и *Culex18S*, специфичные для 3'-конца 28S и 5'-конца 18S генов рРНК соответственно. Последовательности этих праймеров конструировали на основе сравнения эволюционно консервативных последовательностей генов рРНК ряда насекомых: *Aedes aegypti* (U65375), *Aedes albopictus* (L22060), *Aedes vexans* (AM071382), *Aedes vittatus* (AM071384), *Anopheles albimanus* (L78065), *Drosophila willistoni* (XR\_049571), *Ochlerotatus caspius* (EU700339). Продукты амплификации, содержащие участки IGS исследуемых видов комаров, размером ~2500 п.н. клонировали. Последовательности нуклеотидов протяженных клонированных фрагментов определяли методом пошагового секвенирования. Для построения протяженных контигов использовали программу ChromasPro (<http://chromaspro.findmysoft.com>). Последовательности, полученные в результате секвенирования продуктов амплификации, зарегистрированы в базе данных GenBank (JX500430 - JX500439).

Границы межгенного спейсера исследуемых видов комаров определяли путем сравнения соответствующих протяженных последовательностей ДНК, включающих в себя фрагменты генов 18S и 28S рРНК, с последовательностями базы данных GenBank в программе BLAST. Границы наиболее протяженных консервативных последовательностей при 100%-ном сходстве с последовательностями генов рРНК базы данных принимали за фланги межгенного спейсера.

Длины межгенных спейсеров исследованных комаров различаются как между различными видами и подвидами, так и между комарами одного вида, одного подвида и даже форм, обитающих в различных популяциях. Так, длины межгенных спейсеров комаров *C. torrentium* составляют 1761 п.н. (№1) и 1770 п.н. (№2); *C. p. pipiens* f. *pipiens* – 1689 п.н. (№1) и 1731 п.н. (№2); *C. p. pipiens* f. *molestus* – 1741 п.н. (№1) и 1777 п.н. (№2); *C. p. p.* – 1720 п.н.; и *C. modestus* – 1649 п.н. Отметим, что межгенные спейсеры кластера генов рРНК видов *C. torrentium*, *C. modestus* и подвида *C. p. pallens* описаны нами впервые. Межгенные спейсеры кластера генов рРНК комаров подвида *C. p. pipiens* (формы *pipiens* и *molestus*) ранее описаны при анализе комаров, обитающих в популяциях США (Huang et al., 2011). Для всех описанных форм комаров из популяций США также характерна вариабельность длины межгенного спейсера кластера генов рРНК.

Известно, что межгенные спейсеры кластера генов рРНК эукариот являются одними из наиболее вариабельных участков генома. Вариация длины IGS близкородственных видов и особей одного вида, обитающих в различных популяциях, может быть обусловлена как различиями в числе субповторов, которые представляют собой энхансерные последовательности, регулирующие активность промотора РНК полимеразы I, так и различиями в длине микросателлитных последовательностей, характерных для этого участка генома.

Для поисков субповторов в последовательности межгенных спейсеров кластера генов рРНК использовали программу MEME. Нам не удалось выявить каких-либо повторяющихся последовательностей (в том числе -- вырожденных), которые имели бы длину более 20 п.н. По-видимому, отсутствие протяженных субповторов в пределах межгенных спейсеров кластера генов рРНК комаров рода *Culex* является их характерной особенностью, так как во всех других, описанных к настоящему времени видах комаров (рода *Anopheles* и *Aedes*), обнаружены субповторы протяженностью 60, 200 и более пар нуклеотидов (Mukha et al., 2011; Wu et al., 1998; Whang et al., 2002; Ambrose, Crease, 2010).

Визуальный анализ последовательностей, а также множественных выравниваний этого участка генома показывает, что эти последовательности содержат протяженные микросателлитные повторы, причем длины повторов могут значительно отличаться даже у представителей одного подвида и формы, обитающих в различных популяциях. На рисунке 13 представлен фрагмент выравнивания участка IGS комаров рода *Culex*, а

```

C.p._GU911328 agag-----gagaggacaaagagagag-----agagta-----atg-tat-----agg
C.p._GU911327 agag-----gagaggacaaagagagag-----agagta-----atg-tat-----agg
C.p._GU911330 agag-----gagaggacaaagagagag-----agagta-----atg-tat-----agg
C.p._GU911329 agag-----gagaggacaaagagagag-----agagta-----atg-tat-----agg
C.m._GU911316 agag-----gagaggacaaagagagagag-----agagta-----atg-tat-----agg
C.m._GU911315 agag-----gagaggacaaagagagagag-----agagta-----atg-tat-----agg
C.m._GU911314 agag-----gagaggacaaagagagagag-----agagta-----atg-tat-----agg
C.m._GU911308 agag-----gagaggacaaagagagagag-----agagta-----atg-tat-----agg
C.m._GU911309 agag-----gagaggacaaagagagagag-----agagta-----atg-tat-----agg
C.m._GU911305 agag-----gagaggacaaagagagagag-----agagta-----atg-tat-----agg
C.m._GU911318 ggag-----gagaggacaaagagagag-----agagta-----atg-tgtataagagg
C.m._GU911312 ggag-----gagaggacaaagagcgagag-----agagta-----atg-tgtataagagg
C.p._GU911332 ggga-----ggaggagaggacaaagagag-----agagta-----atg-tat-----agg
C.m._GU911319 ggag-----gagaggacaaagagcgagag-----agagtaaatgatgatg-tat-----agg
C.m._GU911317 ggag-----gagaggacaaagagcgagag-----agagtaaatgatgatg-tat-----agg
C.m._GU911310 ggag-----gagaggacaaagagcgagag-----agagtaaatgatgatg-tat-----agg
C.m._GU911313 agag-----gagaggacaaagagagagag-----agagta-----atg-tat-----agg
C.m._GU911311 ggag-----gagaggacaaagagagag-----agagta-----atg-tgtataagagg
C.p._GU911321 ggag-----gagaggacaaagagcgagag-----agagta---atgatg-tat-----agg
C.p._GU911333 ggag-----gagaggacaaagagcgagag-----agagta-----atg-tgtataagagg
C.p._GU911331 ggag-----gagaggacaaagagcgagag-----agagta---atgatg-tat-----agg
C.p._GU911326 ggag-----gagaggacaaagagagagagag-----agagta-----atg-tat-----agg
C.p._GU911325 ggag-----gagaggacaaagagagagagag-----agagta-----atg-tat-----agg
C.p._GU911324 ggaggaggagagaggacaaagagagagagag-----agagta-----atg-tgtataagagg
C.p._GU911320 ggaggaggagagaggacaaagagagagagag-----agagta-----atg-tgtataagagg
C.m._GU911307 ggag-----gagaggacaaagagag-----agagta-----atg-tgtataagagg
C.q._GU911306 ggag-----gagaggacaaagagagag-----agagta-----atg-tgtataagagg
C.m._#2 ggag-----gagaggacaaagagcgagag-----agagtaacagatgatg-tat-----agg
C.m._#1 ggag-----gagaggacaaagagcgagag-----agagtaacagatgatg-tat-----agg
C.p._#2 ggag-----gagaggacaaagagagag-----agagta-----atg-tgtacaagagg
C.p._#1 ggag-----gagaggacaaagagcgagag-----agagta---atgatg-tat-----agg
C.p._GU911323 ggag-----gagaggacaaagagagagag-----aga-----g
C.p._GU911322 ggag-----gagaggacaaagagagagag-----aga-----g
C.pal. ggag-----gagaggacaaagagagagta-----ttg-tat-----agg
C.t._#1 ggac-----acgacgacggaagagg-----agagag-----aggttcgatcgaggg
C.t._#2 ggac-----acgacgacggaagagg-----agagag-----aggttcgatcgaggg
C.mod. agag-----gagagagcgaaaagagagcgaaaagagag-----tgtaatacagag
.*. . . . . * * * * *

```

**Рисунок 13.** Фрагмент выравнивания нуклеотидных последовательностей межгенного спейсера кластера генов рРНК исследуемых видов комаров. Условные обозначения: C.p. – *C. p. pipiens* f. *pipiens*; C.m. – *C. p. pipiens* f. *molestus*; C.pal. – *C. p. pallens*; C.t. – *C. torrentium*; C.mod. – *C. modestus*. №1 и №2 – номера соответствующих популяций. В случае, когда последовательности взяты из Генбанка, представлены соответствующие каталожные номера.

также последовательностей, представленных в Генбанке. Как видно, основной вклад в вариабельность этого фрагмента IGS вносит полиморфизм в числе динуклеотидных повторов (ag). Для более детального анализа паттерна микросателлитных повторов IGS использовали программу Microsatellite repeats finder. В каждой последовательности ДНК обнаружены множественные микросателлитные повторы с повторяющейся единицей от 2 до 4 нуклеотидов, которая встречается не менее четырех раз подряд.

Как указано выше, при использовании программы MEME, выявляющей как совершенные, так и вырожденные повторяющиеся мотивы, нами не найдены протяженные (более 20 н.) повторы в последовательностях IGS комаров рода *Culex*. В то же время, посредством этой компьютерной программы нами обнаружены относительно протяженные эволюционно консервативные вырожденные мотивы, общие для всех трех исследованных видов комаров – *C. pipiens*, *C. torrentium* и *C. modestus*. «Усредненные» последовательности выявленных мотивов ДНК, имеющие значимое сходство с последовательностями IGS трех исследованных видов комаров и соответствующие выявленным мотивам LOGO, которые характеризуют вариабельность встречаемости нуклеотидов в пределах описанных мотивов, представлены на рисунке 14а. На рисунке 14б приведена схема локализации обнаруженных пяти мотивов в IGS трех исследованных видов комаров. Каждый из пяти консервативных мотивов сравнивали с последовательностями, представленными в базе данных GenBank, с использованием программы Blast. Показано, что первый мотив (Motif 1) (рис. 14а) эволюционно высококонсервативен не только в пределах комаров рода *Culex*; он в высокой степени сходен с последовательностью IGS комара *Aedes aegypti* (рис. 14в). Очевидно, что эти эволюционно консервативные мотивы играют определенную функциональную роль, общую для всех исследуемых видов комаров.

Известно, что основной промотор генов рРНК (core promoter) эукариот расположен в области примерно (+)10 п.н. и (-) 40 п.н. от сайта инициации транскрипции. Уникальной особенностью промотора генов рРНК (Pol I) является его видоспецифичность. В то же время, показано, что почти у всех исследованных организмов перед стартом транскрипции расположены “ТАТА-бокс”-подобные последовательности, а за стартом – G/C-богатые районы. У многих видов животных, в частности, комаров *A. aegypti* и *A. albopictus*, расположение промотора РНК-полимеразы I определено экспериментально (Baldrige, Fallon, 1992; Wu, Fallon, 1998).

A

Motif 1: Length 61 bp; E-value 4.1e-013.

TAACATGAACGTCATACGGCTACCCCGCTGCCAGTCGGCGATCGTAGCGAGTATTATGTGT



Motif 2: Length 99 bp; E-value 7.5e-013.

CCCGTCATAGCGGTACGGGTGTATGGTGGCCCGCTACGGGCACGGAAGAGGACCCGCAGAGCATGCCT;  
CCTTCGGGGGAAGCCATCTTTGCCGTTCC

Motif 3: Length 66 bp; E-value 1.3e-009.

TTTCTCGTACCTATAGGGAAGTCAAGTTTGGTGTATGGAGGTCGTCGATGGCGTATATGAAAATTC

Motif 4: Length 37 bp; E-value 9.6e-007.

ATGGGAATCTTTGACGATTGTATTGCGCGCATGATA



Motif 5: Length 34 bp; E-value 6.6e-004.

ATGCATGCACGTATCTACCACCGAGAGCGCGCAC



Б



B

Aedes GTACATGAATGTCATACGGCTACCCCGCTATGATGGAAGGATAGCGACAGTAGCAAGTATTATGACC  
 Motif 1 TAACATGAACGTCATACGGCTACCCCGCTGCCA-----GTCGGCGATCGTAGCGAGTATTATGTGT  
 :\*\*\*\*\* \*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\_\*\*\*\*\_ \* \*: \_\*\*\*\*\_\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*

**Рисунок 14.** Характеристика высококонсервативных мотивов в последовательностях межгенного спейсера кластера генов рРНК (IGS) трех видов комаров рода *Culex*: *C. pipiens*, *C. torrentium* и *C. modestus*. а – “Усредненные” последовательности пяти выявленных мотивов ДНК, имеющие максимальное сходство с последовательностями IGS трех исследованных видов комаров и соответствующие выявленным мотивам LOGO, которые отражают вариабельность встречаемости нуклеотидов в пределах описанных мотивов. E-value отражает степень достоверности выявленных мотивов. В последовательности мотива №3 подчеркнута последовательность, соответствующая промоторной области РНК-полимеразы I (см. рис. 15). б – Схема локализации выявленных пяти мотивов в пределах IGS трех исследованных видов комаров (мотивы №1 – №5 обозначены цифрами 1 - 5); P-value – степень достоверности взаимного расположения выявленных мотивов. в – Результат попарного сравнения «усредненной» последовательности, соответствующей первому мотиву (Motif 1), с фрагментом IGS *Aedes aegypti*.

На рисунке 15 представлено выравнивание последовательностей ДНК, соответствующих промотору РНК-полимеразы I этих двух видов комаров с последовательностями IGS комаров, исследованных в данной работе (*C. pipiens*, *C. torrentium*, *C. modestus*). Можно предположить, что участки IGS комаров рода *Culex*, проявляющие максимальное сходство с экспериментально определенными промоторными областями других видов комаров, также ответственны за инициацию транскрипции рРНК. Исходя из представленного сравнения (рис. 15), сайты инициации транскрипции генов рРНК у описанных нами видов комаров расположены в положениях 922 н. *C. modestus*, 1163 н. *C. torrentium* и 1159 н. (*C. pipiens pipiens* f. *pipiens* №1).

|                      |  |
|----------------------|--|
| <i>C. pipiens</i>    | CGATGGGCGTATATG-GAAATTCAATCACCGAA-CCGGGAA--C-GC-CA             |
| <i>C. torrentium</i> | CGATGGGCGTATATG-AAAATTCCATC-CCGGAGCCGGGAA--C-GT-CA             |
| <i>C. modestus</i>   | CG-TGAGCGTAT-TG-AAAATTCCACCACCGAA-CCGGGAA--C-GTTC-             |
| <i>A. aegypti</i>    | -GTTG-GCCCG---G-AAAACCCT-TCAG-GGA-----GGAAGGCAGTGTG            |
| <i>A. albopictus</i> | -GCTG-GCC-A---GTAAAACCCTAT-AG-GGA-----GGA-----                 |
|                      | * * * * *            *   * * *   *            * *        * * * |

**Рисунок 15.** Выравнивание предполагаемых промоторных областей РНК-полимеразы I исследованных комаров рода *Culex* (*C. pipiens*, *C. modestus* и *C. torrentium*) с промоторной областью генов рРНК комаров рода *Aedes* (*A. aegypti*, *A. albopictus*). Подчеркнут предполагаемый старт инициации транскрипции генов рРНК.

Сопоставляя места локализации промоторов РНК-полимеразы I на последовательностях IGS исследованных видов комаров и места локализации выявленных высококонсервативных мотивов (рис. 14б), можно заключить, что мотив №3 содержит часть последовательности, соответствующей промотору (на рис. 14а подчеркнута). Соответственно, мотивы №№ 1, 4 и 5 локализованы в районе внешнего транскрибируемого спейсера, а мотив №2 – в нетранскрибируемом спейсере. С нашей точки зрения, наиболее вероятно предположение, что эволюционно консервативные мотивы №№ 1, 2, 4 и 5 выполняют роль энхансеров промотора РНК-полимеразы I, которые у комаров рода *Culex* могут быть представлены в пределах IGS в единичных копиях, – в отличие от многих других видов эукариот, у которых энхансеры этого промотора представлены в виде множественных сходных по нуклеотидному составу повторов.



Известно, что последовательности IGS могут являться мишенями для интеграции мобильных элементов. В принципе, любой класс мобильных элементов, случайно распределяющихся по геному, может быть интегрирован в участок IGS; кроме того, известны сайт-специфические ретротранспозоны, сайты интеграции которых локализованы исключительно в IGS (DeMarco et al., 2005). Интегрированные в IGS мобильные элементы могут привносить в эту регуляторную область промотора РНК-полимеразы I собственные регуляторные элементы, обуславливая повышение уровня эволюционной изменчивости структурно-функциональной организации этого участка генома.

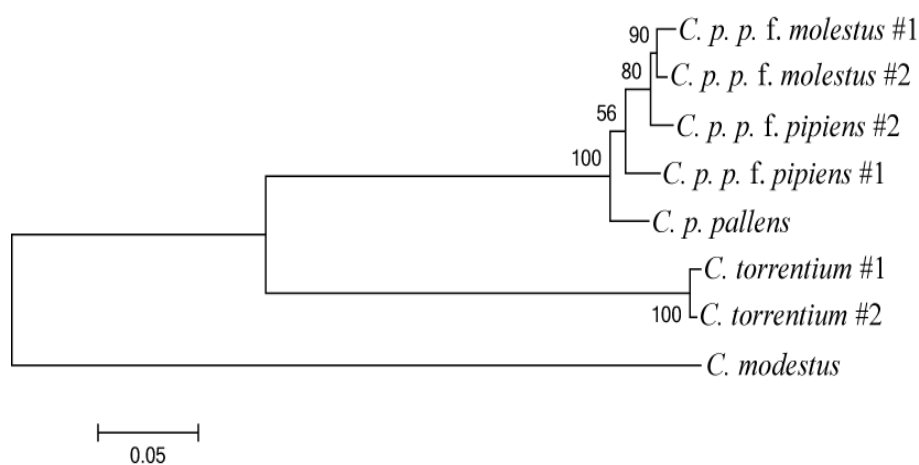
Используя программу Sensor, мы искали последовательности мобильных элементов в пределах участка IGS комаров рода *Culex*. Принцип действия программы заключается в сравнении тестируемой последовательности ДНК с обновляемой базой данных нативных и выродившихся повторяющихся последовательностей генома эукариот “Repbase” (поддерживается на базе Genetic Information Research Institute). Полноразмерных мобильных элементов какого-либо класса с характерной структурой или протяженными открытыми рамками считывания нами обнаружено не было. Однако, в пределах анализируемых последовательностей имеются протяженные выродившиеся последовательности, значимо сходные либо с ДНК-транспозонами, либо с ретротранспозонами, как содержащими, так и не содержащими длинные концевые повторы (рис. 16). Обнаружение “следов” мобильных элементов в функционально значимой области кластера генов рРНК может иметь значение для понимания эволюционной роли подвижных элементов генома и их взаимоотношений с геномом организма-хозяина.

#### **Анализ эволюционной изменчивости участка IGS комаров рода *Culex***

На рисунке 17 представлено филогенетическое дерево, построенное на основе сравнения последовательностей IGS исследованных в данной работе видов комаров. Такая топология дерева, поддерживаемая высокими значениями бутстрепа, наблюдается при использовании алгоритмов UPGMA и Maximum Likelihood. В таблице 10 представлены значения уровней дивергенции между анализируемыми последовательностями по среднему числу нуклеотидных замен между двумя сравниваемыми последовательностями в пересчете на один сайт. Из топологии ветвей филогенетического дерева и данных



таблицы видно, что наиболее эволюционно удаленным от других является *C. modestus*. Комары *C. torrentium*, обитающие в разных популяциях, также формируют на древе отдельную кладу. Результаты хорошо согласуются с данными таксономии, полученными на основе морфологических и физиологических исследований данной группы комаров. Уровень дивергенции между комарами *C. p. pipiens* формы *molestus*, обитающими в географически удаленных популяциях (подвальные помещения Москвы и Волгограда), незначителен (0.013), однако несколько выше, чем уровень дивергенции, выявляемый при сравнении последовательностей IGS *C. torrentium*, обитающих в разных популяциях Подмосковья (0.008).



**Рисунок 17.** Филогенетическое древо исследованных видов комаров, реконструированное на основе сравнения последовательностей межгенных спейсеров кластера генов рРНК методом максимального правдоподобия (ML). Значения достоверности ветвей дерева обозначены цифрами (выражено в процентах). Шкала соответствует среднему числу нуклеотидных замен в пересчете на один сайт сравниваемых последовательностей.

Неожиданно высоким, с нашей точки зрения, оказался уровень межпопуляционной изменчивости межгенного спейсера кластера генов рРНК *C. p. pipiens. f. pipiens*. Уровень эволюционной дивергенции между *C. p. pipiens. f. pipiens* из различных популяций равен 0.038, что соответствует уровню дивергенции между *C. p. pipiens. f. pipiens* из московской популяции и *C. pipiens pallens* (табл. 10). На филогенетическом древе комары из открытых водоемов Москвы и Волгограда не образуют общей клады, комары формы *pipiens* из популяции Волгограда (#2) группируются вместе с *C. p. pipiens. f. molestus* (рис. 17). Отсутствие выраженных и закрепленных за представителями популяций подвидов и форм *C. pipiens* различий в ядерной ДНК свидетельствует о недавнем времени дивергенции

**Таблица 10.** Уровень эволюционной дивергенции между последовательностями ITS2 и IGS кластера генов рРНК исследованных комаров *Culex*.

| <b>ITS2</b>         | <i>C.p.pipiens</i> | <i>C.p.molestus</i> | <i>C.torrentium</i> |
|---------------------|--------------------|---------------------|---------------------|
| внутри<br>между     | 0.001              | 0.006               | 0.008               |
| <i>C.p.pipiens</i>  |                    |                     |                     |
| <i>C.p.molestus</i> | 0.003              |                     |                     |
| <i>C.torrentium</i> | 0.147              | 0.147               |                     |

| <b>IGS</b>          | <i>C.p.pipiens</i> | <i>C.p.molestus</i> | <i>C.p.qinq.</i> | <i>C.p.pallens</i> | <i>C.torrentium</i> | <i>C.modestus</i> |
|---------------------|--------------------|---------------------|------------------|--------------------|---------------------|-------------------|
| внутри<br>между     | 0.038              | 0.013               | 0.027            | n/c                | 0.008               | n/c               |
| <i>C.p.pipiens</i>  |                    |                     |                  |                    |                     |                   |
| <i>C.p.molestus</i> | 0.028              |                     |                  |                    |                     |                   |
| <i>C.p.qinq.</i>    | 0.022              | 0.024               |                  |                    |                     |                   |
| <i>C.p.pallens</i>  | 0.040              | 0.045               | 0.037            |                    |                     |                   |
| <i>C.torrentium</i> | 0.365              | 0.366               | 0.374            | 0.373              |                     |                   |
| <i>C.modestus</i>   | 0.565              | 0.563               | 0.565            | 0.565              | 0.595               |                   |

Уровни дивергенции выражены в величинах, обозначающих среднее число нуклеотидных замен между двумя сравниваемыми последовательностями в пересчете на один сайт.

таксонов. О недавних или продолжающихся процессах обмена генетической информацией в популяциях *C. pipiens* свидетельствует и неожиданно высокий уровень различий IGS у комаров *C. p. pipiens* формы *pipiens* из подмосковной и волгоградской популяций. Комары из открытых водоемов Москвы и Волгограда не образуют общей клады, а комары формы *pipiens* из популяции Волгограда группируются вместе с *C. p. pipiens* формы *molestus*, подтверждая, что степень обособленности двух форм уменьшается с севера на юг. При этом, комары формы *molestus* из удаленных популяций Москвы и Волгограда группируются вместе, демонстрируя большее сходство друг с другом, чем с особями из соседней подмосковной популяции формы *pipiens*.

Скорость возникновения мутаций в мтДНК на порядок выше, чем в ядерной, вероятно из-за небольшого времени дивергенции подвидов и форм мутации в ДНК рибосомного кластера генов пока не являются дифференцирующими, а мутации в гене *COI* у *C. pipiens* успели образоваться и закрепиться за экотипами благодаря связи мтДНК с цитоплазматической бактерией *Wolbachia* и их совместному распространению среди популяций.

### 3.1.8 Разнообразие штаммов *Wolbachia* у *C. pipiens*

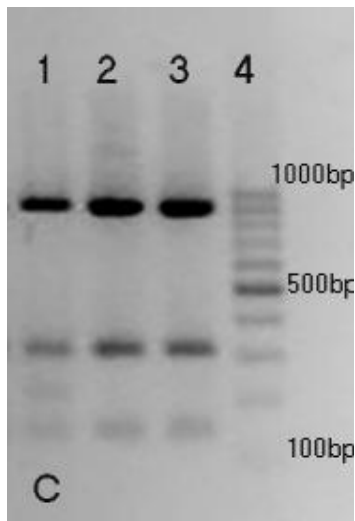
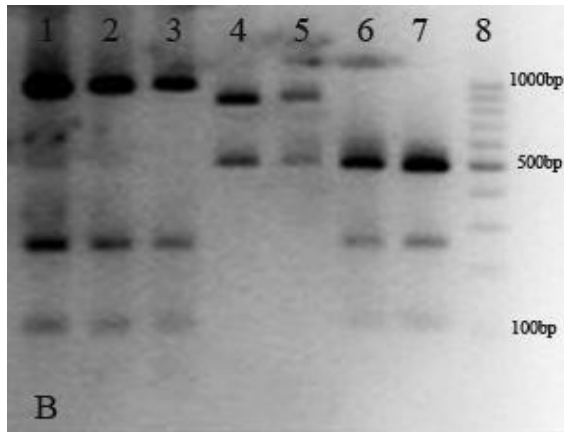
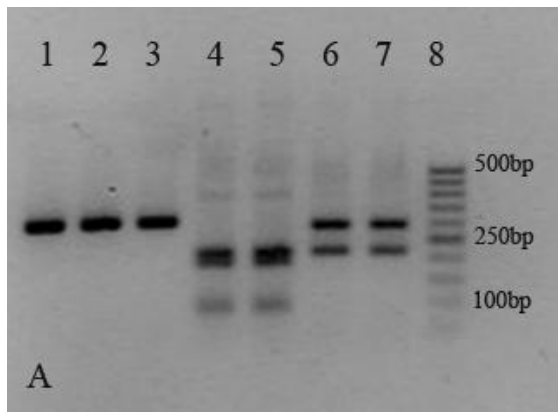
Цитоплазматическая симбиотическая бактерия *Wolbachia pipientis* и митохондрии наследуются совместно по материнской линии и проявляют так называемое неравновесие по сцеплению. Корреляция между типами митохондриальной ДНК и присутствием симбиотической бактерии *W. pipientis*, обнаружена у многих насекомых, например, у бабочек *Acraea encedon* (Jiggins et al., 2001) и *Coenonympha tullia* (Kodandaramaiah et al., 2013), у паразитических ос *Ceratosolen solmsi* (Xiao et al., 2012), у *Drosophila melanogaster* (Pinsky, 2013). Однако, в последнее время также доказаны передача бактерии по отцовской линии у *D. paulistorum* (Miller et al., 2012) и горизонтальный перенос *W. pipientis* у белокрылок *Vemisia tabaci* (Ahmed et al., 2013). Горизонтальная передача является одним из способов заражения насекомых-хозяев новыми штаммами или видами бактерий. Для ответа на вопросы, связан ли обнаруженный нами полиморфизм гена *COI* комаров комплекса *C. pipiens* с различными штаммами *W. pipientis* и существует ли не только коэволюция, но и горизонтальная передача симбионта мы исследовали связь изменчивости *W. pipientis* и гена *COI* мтДНК у *C. p. pipiens* форм *pipiens* и *molestus* из

географически удаленных популяций России и Казахстана и, для сравнения, у *C. p. quinquefasciatus* из Индии.

Для обнаружения *Wolbachia* в тотальной ДНК использовали праймеры, специфичные к гену *wsp* *W. pipientis*. Ген *wsp* кодирует наиболее обильно экспрессирующийся белок оболочки бактерии *Wolbachia*. Сравнивая последовательности ДНК участков генов *wsp* *W. pipientis* у образцов ДНК *C. p. pipiens* из Волгограда, Санкт-Петербурга и Москвы между собой, мы не обнаружили замен среди 404 нуклеотидов выровненных последовательностей ДНК. Бактерии *W. pipientis*, обнаруженные в этих популяциях комаров, по изученному участку гена *wsp* идентичны и проявляют 99% сходства с участком *wsp* гена белка оболочки бактерии рода *Wolbachia*, эндосимбионта *C. p. quinquefasciatus* и данный локус не позволяет обнаружить изменчивость ДНК бактерии. *W. pipientis* из всех изученных когда либо комаров *Culex* по гену *wsp* принадлежит к *Wolbachia* группы В.

Мультилокусное тестирование с использованием общепринятых 5 генов MLST анализа (Baldo et al. 2006) и дополнительных семи полиморфных маркеров: ген белка репарации *MutL*; 3 АНК генов, *ank2*, *pk1*, и *pk2*; и 3 генов фага, ген метилазы *GP12*, ген белка *GP15*, и регулирующий ген белка *RepA*, позволило выявить 14 различных гаплотипов *W. pipientis* (*wPip*), принадлежащих пяти различным субкладам и обозначенных авторами как *wPip-I* - *wPip-V* группы (Atyame et al., 2011б). Из всех маркеров, два - *ank2* и *pk1* оказались достаточны для типирования всех пяти групп *wPip* (Dumas et al., 2013).

Мы использовали этот метод для поиска различий между штаммами *wPip*, инфицирующими популяции *Culex pipiens* из России и в имеющихся у нас сборах из других стран (табл. 11). Штаммы *wPip* из изученных популяций были генотипированы и отнесены к одной из групп (*wPip-I* - *wPip-V*), используя серию специфических ПЦР-ПДРФ анализов, основанных на двух маркерах *Wolbachia*, *ank2* и *pk1* (рис. 18). Обработка рестриктазой *HinfI* продуктов ПЦР гена *ank2* позволяет разделить на пять аллелей (а-е): а (один ПДРФ фрагментов: 313 п.н.), б (217, 195, 98 п.н.), с (293, 217 п.н.), d (217, 195 п.н.) и е (415 п.н.). Обработка рестриктазой *TaqI* продуктов ПЦР гена *pk1* позволяет дифференциацию четырех специфических аллелей *wPip* (аллели а и е имеют одинаковый размер фрагмента): а / е (903, 430 п.н.), б (669, 665 п.н.), с (851, 498 п.н.) и d (497, 251, 107 п.н.). Аллели а и е гена *pk1* требуют дополнительной обработки продуктов ПЦР *pk1*



**Рисунок 18.** Примеры результатов ПЦР-ПДРФ анализа специфических *ank2* и *pk1* аллелей wPip.

(**A**) три аллеля: а (313bp), b (217, 195, 98bp) и с (293, 217bp) после рестрикции *Hinf*I ПЦР-продукта гена *ank2*; (**B**) три аллеля: а/е (903, 430bp), с (851, 498bp) и d (497, 251, 107bp) после обработки *Taq*I ПЦР-продукта гена *pk1*; (**C**) аллели а (903, 303, 141bp) после обработки *Pst*I ПЦР-продукта гена *pk1*.

**Таблица 11.** Типы штаммов *W. pipientis* и мт-гаплотип по гену *COI*.

| Место сбора           | Таксономич. статус      | N   | Аллель <i>wPip</i><br><i>pk1-TaqI</i> | Аллель <i>wPip</i><br><i>ank2-HinfI</i> | Тип <i>wPip</i> | Тип <i>COI</i> * |
|-----------------------|-------------------------|-----|---------------------------------------|---|-----------------|------------------|
| Чашниково, Моск. обл. | <i>f. pipiens</i>       | 16  | c                                     | b                                       | II              | A                |
| Рассудово, Моск. обл. | <i>f. pipiens</i>       | 10  | c                                     | b                                       | II              | A                |
| Краснодар             | <i>f. pipiens</i>       | 6   | c                                     | b                                       | II              | A                |
| Волгоград             | <i>f. pipiens</i>       | 12  | c                                     | b                                       | II              | A                |
|                       | <i>f. pipiens</i>       | 7   | b                                     | d                                       | III             | A                |
|                       | <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   | н/о                     | 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                |
| Ганновер, Германия    | <i>f. molestus</i>      | 1   | d                                     | c                                       | IV              | D                |
|                       | <i>f. pipiens</i>       | 1   | c                                     | b                                       | II              | A                |
| Португалия            | н/о                     | 10  | a                                     | a                                       | I               | E, E1            |
| Пондишерри, Индия     | <i>quinquefasciatus</i> | 23  | a                                     | a                                       | I               | E                |
| Гидарабад, Индия      | <i>quinquefasciatus</i> | 20  | a                                     | a                                       | I               | E                |
| Всего                 |                         | 220 |                                       |   |                 |                  |

\*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 и Е1.



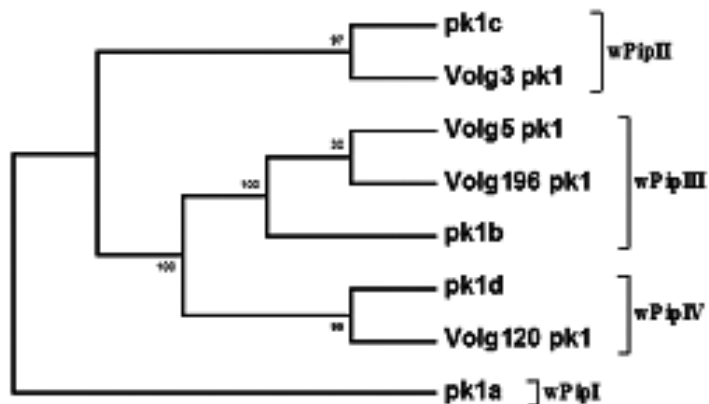
рестриктазой *Pst*I с разделением на два аллеля: а (903, 303, 141 п.н.) и е (903, 430 п.н.) (рис. 18). Аллели а *pk1* и а *ank2* соответствуют wPip-I, с *pk1* и b *ank2* - wPip-II, аллели b *pk1* и d *ank2* - wPip-III, аллели d *pk1* и с *ank2* - wPip-IV (Dumas et al., 2013). Были исследованы комары *C. pipiens* из 15 географически удаленных мест сбора. Результаты анализа представлены в таблице 11.

Пять, различающихся по нуклеотидным последовательностям гена *COI*, митохондриальных гаплотипов были обнаружены нами у представителей комплекса *Culex pipiens* (рис. 11). Позже, в португальской популяции *C. pipiens*, был обнаружен шестой, отличающийся одной мутацией от гаплотипа E и обозначенный нами E1.

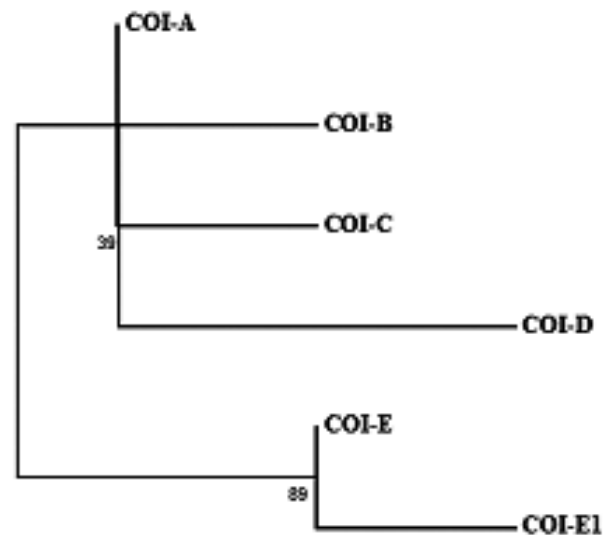
Тропические *C. p. quinquefasciatus* характеризуются *COI* типа E и wPipI. Особи *C. p. pipiens* формы *molestus* из Санкт-Петербурга, Москвы, Екатеринбурга, Томска, Волгограда, Алма-Аты, Берлина, Ганновера характеризуются мтДНК типа D и зараженностью wPip-IV (табл. 11).

Комары *C. p. pipiens* формы *pipiens* заражены бактериями групп wPip-II и wPip-III. У 8 особей, зараженных как wPip-II, так и wPip-III, были определены последовательности нуклеотидов гена *COI*. Все исследованные в данной работе последовательности соответствовали типу A. Гаплотипы B и C гена *COI* обнаружены не были. Вероятно, изменения мтДНК комаров формы *pipiens* и ДНК бактерии происходили независимо и уже после первоначального заражения и дивергенции подвидов *C. p. quinquefasciatus* и *C. p. pipiens*. Несмотря на дивергенцию ДНК, wPip-II и wPip-III являются близкими группами. В недавно опубликованной работе Atyame и соавторов по изучению ЦН у *C. pipiens* было обнаружено, что wPip-II и wPip-III при скрещиваниях комаров совместимы (60% случаев) или в некоторых случаях вызывают одностороннюю несовместимость (40%). Такое же соотношение совместимых и односторонне несовместимых скрещиваний было получено авторами среди линий, зараженных только wPip-III (Atyame et al., 2014).

В работе Dumas и соавторов (2013) выдвинуто предположение, что группа wPip-II может являться предковой по отношению к wPip-III и wPip-IV. Мы определили нуклеотидные последовательности аллелей b, c и d гена *pk1 Wolbachia* из исследованных нами комаров для построения филогенетической дендрограммы. Действительно, клады wPip-I и wPip-II дивергировали раньше, чем отделились группы wPip-III и wPip-IV от группы wPip-II (рис. 19).



A



B

**Рисунок 19.** Дендрограммы сходства нуклеотидных последовательностей А- гена *pk1* *W. pipiens*, 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; группы *W. pipiens*, I-IV, обозначены справа. На рисунке В представлены мт-гаплотипы по гену *COI*-А-Е, Е1, зарегистрированные в GenBank под номерами KM233145-KM233150.

Существующая связь мт-гаплотипов по гену *COI* и штаммов *Wolbachia* подтверждается подобием конфигурации ветвей на дендрограммах, построенных по сходству последовательностей гена *COI* комаров и гена *pk1* *wPip* (рис. 19). Строгая корреляция между типом *COI* и типом *W. pipiens* доказывает стабильную совместную передачу и распространение обоих цитоплазматических компонентов в исследованных популяциях комаров и свидетельствует об отсутствии или о редкости горизонтального переноса симбионтов в комплексе *Culex pipiens*.

Эти данные соответствуют выводам Dumas и соавторов, сделанным на основе анализа полиморфизма другого гена мтДНК, цитохрома В (*cyt B*) и *Wolbachia* на огромном материале (Dumas et al., 2013). Изучение полиморфизма *Wolbachia* на большом количестве образцов, собранных со всего света, выявило географическое распределение симбионтов в популяциях комплекса. В популяциях тропиков и субтропиков, населенных в основном *C. p. quinquefasciatus*, распространены *wPip-I*. В популяциях *C. p. pipiens* Европы и Северной Африки распространены *wPip-II*, *wPip-III* и *wPip-IV*. В популяциях Юго-восточной Азии, где распространены *C. p. pallens* и *C. p. quinquefasciatus* *wPip-V* и *wPip-I*. В популяциях *C. pipiens* Северной Америки *wPip-III*. Полиморфизм штаммов *wPip* коррелирует с соответствующими мт-гаплотипами по генам *cytb*, *ND2* и *ND5* (Dumas et al., 2013). Однако изменчивость гена *cytB* не позволила авторам выделить гаплотипы, характерные для членов комплекса *Culex pipiens*.

### 3.1.9 Гибридизация и митохондриальная интрогрессия в южных популяциях

При исследовании видового состава географически удаленных популяций из зарубежных стран: Казахстана, Германии, Италии, Португалии, юга Франции, Туниса, Греции, Израиля и Марокко в ряде случаев было обнаружено несоответствие мт-гаплотипов по гену *COI* и таксономической принадлежности образцов, определенной по биотопической принадлежности и, в случае Португалии, по физиологическому признаку автогенности и стеногамности (табл. 12).

Были определены 29 нуклеотидных последовательности полного гена *COI* из Казахстана (г.Алма-Аты), Германии (г.Берлина и г.Ганновера), Италии (севера, округ Пьемонт: г.Фругароло и г.Тортон; и центра старны, обл. Витербо), Израиля

**Таблица 12.** Распределение гаплотипов между таксонами *C. pipiens* на основе анализа полной последовательности гена *COI* (1548п.н.).

| Место сбора |                              | Таксономич. статус            | Частота мт-гаплотипа (количество особей) |         |         |       |         |         |
|-------------|------------------------------|-------------------------------|--|---------|---------|-------|---------|---------|
|             |                              |                               | A  | B       | C       | D     | E       | E1      |
| Россия      | Московская обл., Икша        | <i>C.p.pipiens f.pipiens</i>  | 0,4 (2)                                  | -       | 0,6 (3) | -     | -       | -       |
|             | Московская обл., Лужки       | <i>C.p.pipiens f.pipiens</i>  | 0,3 (1)                                  | 0,7 (2) | -       | -     | -       | -       |
|             | Волгоградская обл., Сарепта  | <i>C.p.pipiens f.pipiens</i>  | 1 (1)                                    | -       | -       | -     | -       | -       |
|             | Волгоградская обл., Литейщик | <i>C.p.pipiens f.pipiens</i>  | -  | -       | 1 (1)   | -     | -       | -       |
|             | Петрозаводск                 | <i>C.p.pipiens f.molestus</i> | -  | -       | -       | 1 (1) | -       | -       |
|             | Санкт-Петербург              | <i>C.p.pipiens f.molestus</i> | -  | -       | -       | 1 (2) | -       | -       |
|             | Москва                       | <i>C.p.pipiens f.molestus</i> | -  | -       | -       | 1 (1) | -       | -       |
|             | Нижний Новгород              | <i>C.p.pipiens f.molestus</i> | -  | -       | -       | 1 (2) | -       | -       |
|             | Волгоград                    | <i>C.p.pipiens f.molestus</i> | -  | -       | -       | 1 (5) | -       | -       |
| Германия    | Берлин                       | <i>C.p.pipiens f.pipiens</i>  | 0,5 (1)                                  | -       | 0,5 (1) | -     | -       | -       |
|             |                              | <i>C.p.pipiens f.molestus</i> | -  | -       | -       | 1(2)  | -       | -       |
|             | ГанOVER                      | <i>C.p.pipiens f.pipiens</i>  | 0,5 (1)                                  | -       | 0,5 (1) | -     | -       | -       |
|             |                              | <i>C.p.pipiens f.molestus</i> | -  | -       | -       | 1 (1) | -       | -       |
| Италия      | Область Пьемонт              | <i>C.p.pipiens hybrid*</i>    | -  | -       | -       | 1 (2) | -       | -       |
|             | Область Витербо              | <i>C.p.pipiens s.l.</i>       | -  | -       | -       | -     | 1 (1)   | -       |
| Португалия  | Область Компорта             | <i>C.p.pipiens f.pipiens</i>  | -  | -       | -       | -     | 1 (2)   | -       |
|             | Область Компорта             | <i>C.p.pipiens f.molestus</i> | -  | -       | -       | -     | 0,25(2) | 0,75(6) |
| Греция      | Остров Кипр                  | <i>C.p. pipiens hybrid*</i>   | -  | -       | -       | -     | 1 (1)   | -       |
| Израиль     | Хайфа                        | <i>C.p. pipiens s.l.</i>      | -  | -       | -       | -     | 1(2)    | -       |
| Тунис       | Нефза                        | <i>C.p. pipiens hybrid*</i>   | -  | -       | -       | 1 (5) | -       | -       |
|             | Табарка                      | <i>C.p. pipiens hybrid*</i>   | -  | -       | -       | 1(2)  | -       | -       |
| Индия       | Хидарабад                    | <i>C.p. quinquefasciatus</i>  | -  | -       | -       | -     | 1(2)    | -       |
|             | Пондишерри                   | <i>C.p. quinquefasciatus</i>  | -  | -       | -       | -     | 1(2)    | -       |

\*на основании результатов анализа CQ11

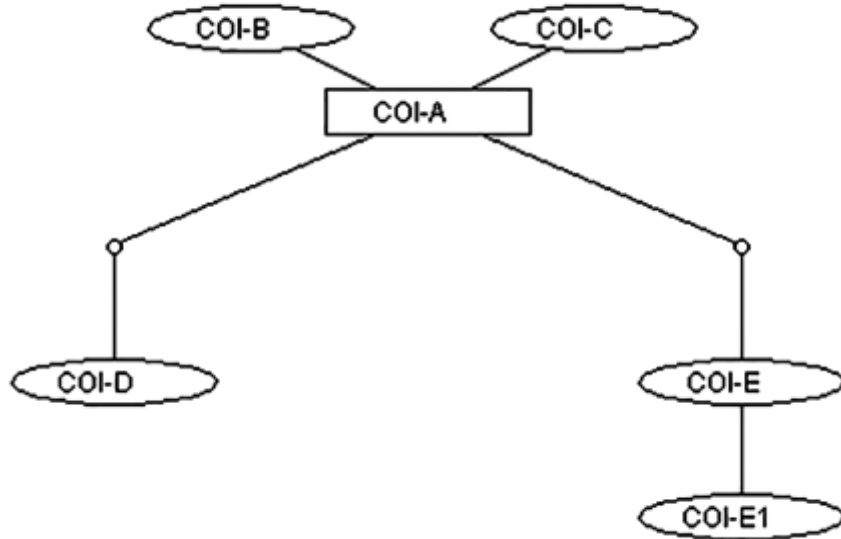
(г.Хайфа), Португалии (Компорта), Греции (о.Крит и о.Кос) и Туниса (г.Нефза и г.Табарка). Сравнение проводили с 26, полученными нами ранее для *C. p. pipiens* обеих форм из России (FN395171-FN395190), *C. p. quinquefasciatus* (FN395201- FN395204) и *C. p. pallens* (FN395205- FN395206). Полиморфизм ДНК среди 55 изученных нуклеотидных последовательностей гена *COI* мтДНК (1538 п.н.) комаров комплекса *Culex pipiens* из удаленных мест сбора позволил выделить 6 митохондриальных гаплотипов. Ранее мы обозначили их как А, В и С у *C. p. pipiens f. pipiens*, D у *C. p. pipiens f. molestus*, Е у *C. p. quinquefasciatus* (рис. 11). У особей из Португалии был обнаружен новый мт-гаплотип, отличающийся от типа Е одной нуклеотидной заменой А-С в сайте 830, обозначенный Е1 (рис. 20).

Среди *C. p. pipiens* формы *pipiens* мт-гаплотипы А и С обнаружены в образцах из России и Германии в одинаковых количествах 6 из 14 (43%) (табл. 12). Мт-гаплотип В встретился только в образцах из России 2 из 14 (14%). Мититип А характерен также особям из лабораторной линии *C. p. pallens*. Мт-гаплотип D отличается абсолютным мономорфизмом: относительно других мт-гаплотипов были обнаружены две фиксированные замены в позициях 119 и 896 последовательности гена *COI* у всех 23 исследованных особей из географически удаленных местах сбора от Туниса на юге, до Карелии на севере и Томска на востоке. Мт-гаплотип Е мы обнаружили у *C. quinquefasciatus* из двух лабораторных линий, ведущих свое происхождение из Индии и в сборах из Португалии, Греции, Израиля и Италии. У образцов из Португалии был обнаружен вариант Е1 (62%). Дальнейший анализ проводили с помощью метода ПЦР-ПДРФ. Поскольку рестриктазы *HaeIII* и *AluI* позволяют различать только мт-гаплотипы А, D и Е, то под А подразумеваются близкие мт-гаплотипы А, В и С, а Е означает Е и Е1. Близость данных гаплотипов друг к другу показана на медианной сети митохондриальных гаплотипов (рис. 20Б). Всего с помощью ПЦР-ПДРФ ДНК гена *COI* была проверена 639 особь из 35 географически удаленных мест сбора (табл. 13).

Тип А был обнаружен у особей из популяций открытых водоемов России, Германии и Франции. По литературным данным комары с таким мт-гаплотипом распространены в открытых биотопах Англии, Южной Германии, Америках. В северных европейских странах такой мт-гаплотип распространен среди неавтогенных, преимущественно орнитофильных и диапаузирующих комаров *C. p. pipiens f. pipiens*. Однако, автогенные комары с таким мт-гаплотипом были обнаружены нами в лабораторной линии, ведущей происхождение из подвальной популяции юга Франции, Монпелье (табл. 13). Тип D в России характерен для особей *C. p. pipiens f. molestus*,

|              | Positions  |            |          |          |          |          |          |
|--------------|------------|------------|----------|----------|----------|----------|----------|
|              | ↓          | ↓          | ↓        | ↓        | ↓        | ↓        | ↓        |
| [            | 1          | 2          | 4        | 6        | 8        | 8        | 8]       |
| [            | 1          | 0          | 6        | 7        | 3        | 4        | 9]       |
| [            | 9          | 6          | 7        | 7        | 0        | 8        | 6]       |
| #haplotypeA  | G          | A          | G        | A        | A        | A        | A        |
| #haplotypeB  | G          | A          | <u>A</u> | A        | A        | A        | A        |
| #haplotypeC  | G          | A          | G        | <u>G</u> | A        | A        | A        |
| #haplotypeD  | <u>A</u> * | A          | G        | A        | A        | A        | <u>G</u> |
| #haplotypeE  | G          | <u>G</u> * | G        | A        | A        | <u>G</u> | A        |
| #haplotypeE1 | G          | <u>G</u> * | G        | A        | <u>G</u> | <u>G</u> | A        |

A



Б

**Рисунок 20.** А: Сравнение переменных сайтов нуклеотидных последовательностей шести типов гена *COI* комаров *C. pipiens*. Номера сайтов указаны сверху, переменные сайты подчеркнуты, сайты, использованные в ПЦР-ПДРФ анализе отмечены звездочкой. Б: Медианная сеть гаплотипов мтДНК по гену *COI* комаров *C. pipiens*, построенная с использованием программы TSC v.1.21.

**Таблица 13.** Типы мтДНК и количество, исследованных комаров комплекса *Culex pipiens*, проверенных методом ПЦР-ПДФ анализа ДНК гена *COI*, места сбора, таксономический статус и кем были собраны.

| Тип <i>COI</i> | Кол.     | Место сбора                  | Тип биотопа | Географические координаты | Таксономич. статус     | Предоставлены     |
|----------------|----------|------------------------------|-------------|---------------------------|------------------------|-------------------|
| <b>A</b>       | 47       | Московская обл.              | с, о        | 56°09'С.Ш.37°31'В.Д.      | <i>f.pipiens</i>       | М.В.Федоровой     |
|                | 10       | Нижегородская обл.           | с, о        | 55°02'N 43°15'В.Д.        | <i>f.pipiens</i>       | Е.Б.Виноградовой  |
|                | 28       | Краснодар и обл.             | п, о        | 45°02'С.Ш.38°58'В.Д.      | <i>f.pipiens</i>       | Е.Б.Виноградовой  |
|                | 20       | Волгоград и обл.             | с, о        | 48°42' С.Ш.44°31'В.Д.     | <i>f.pipiens</i>       | М.В.Федоровой     |
|                | 28       | Северный Кавказ              | п, о        | 43°29' С.Ш.43°37'В.Д.     | <i>f.pipiens</i>       | Е.Б.Виноградовой  |
|                | 17       | Германия, Ганновер           | г, о        | 52°22'N 09°43'В.Д.        | <i>f.pipiens</i>       | М.В.Федоровой     |
|                | 9        | Германия, Берлин             | г, о        | 52°31'N 13°23'В.Д.        | <i>f.pipiens</i>       | М.В.Федоровой     |
|                | 39       | Франция, Prades-le-Lez       | о           | 43°42'N 03°52' В.Д.       | <i>f.pipiens</i>       | О. Duron          |
|                | 12       | Франция, St-Nazaire de Pezan | о           | 43°38'N 04°08' В.Д.       | <i>f.pipiens</i>       | О. Duron          |
|                | 11       | Франция, линия T7            | л.л.        | 43 36'N 03°52'В.Д.        | <i>f.molestus</i>      | О. Duron          |
|                | 2        | Марокко, Касабланка          | с, о        | 33°32'N 07°35'W           | <i>C. pipiens s.l.</i> | А.- В. Failloux   |
|                | 10       | Япония, Хиросима             | л.л.        | 34° 23'N 132° 27'В.Д.     | <i>C. p. pallens</i>   | Е.Б.Виноградовой  |
|                | <b>D</b> | 21                           | Москва      | г, з                      | 55°45'С.Ш. 37°37'В.Д.  | <i>f.molestus</i> |
| 22             |          | Санкт-Петербург              | г, з        | 59°57'С.Ш. 30°18'В.Д.     | <i>f.molestus</i>      | Е.Б.Виноградовой  |
| 10             |          | Н.Новгород                   | г, з        | 56°20'С.Ш. 44°00'В.Д.     | <i>f.molestus</i>      | Е.Б.Виноградовой  |
| 52             |          | Краснодар                    | г, о        | 45°02' С.Ш. 38°58'В.Д.    | <i>f.molestus</i>      | Е.Б.Виноградовой  |
| 10             |          | Гомск                        | г, з        | 56°30'С.Ш. 84°58'В.Д.     | <i>f.molestus</i>      | А. Сибатаевым     |
| 24             |          | Екатеринбург                 | г, з        | 56°53'С.Ш. 60°35'В.Д.     | <i>f.molestus</i>      | А. Карповой       |
| 10             |          | Петрозаводск                 | г, з        | 62°47' С.Ш. 34°20'В.Д.    | <i>f.molestus</i>      | Е.Б.Виноградовой  |
| 30             |          | Волгоград                    | г, з        | 48°42'С.Ш. 44°31'В.Д.     | <i>f.molestus</i>      | М.В.Федоровой     |
| 21             |          | Казахстан, Алма-Ата          | г, о        | 43°15' С.Ш. 76°57'В.Д.    | <i>f.molestus</i>      | О. Лопатиным      |
| 4              |          | Германия, Берлин             | г, з        | 52°31'С.Ш. 13°23'В.Д.     | <i>C. pipiens s.l.</i> | М.В.Федоровой     |
| 1              |          | Германия, Ганновер           | г, з        | 52°22'С.Ш. 9°43'В.Д.      | <i>C. pipiens s.l.</i> | М.В.Федоровой     |
| 48             |          | Италия, Пьемонт              | г, о        | 44°54' С.Ш. 8°37' В.Д.    | <i>C. pipiens s.l.</i> | А. Talbalaghi     |
| 16             |          | Гунис, Нефза                 | о           | 37°06'С.Ш. 9°11'В.Д.      | <i>C. pipiens s.l.</i> | А. Bouattour      |
| 11             |          | Гунис, Табарка               | о           | 36°57'С.Ш. 8°45'В.Д.      | <i>C. pipiens s.l.</i> | А. Bouattour      |
| 1              |          | Марокко, Касабланка          | с, о        | 33°32'С.Ш. 7°35'З.Д.      | <i>C. pipiens s.l.</i> | А.- В. Failloux   |

**Таблица 13** (продолжение). Типы мтДНК и количество, исследованных комаров комплекса *Culex pipiens*, проверенных методом ПЦР-ПДРФ анализа ДНК гена *COI*, места сбора, таксономический статус и кем были собраны.

| Тип <i>COI</i> | Кол. | Место сбора       | Тип биотопа | Географические координаты | Таксономич. статус      | Предоставлены    |
|----------------|------|-------------------|-------------|---------------------------|-------------------------|------------------|
| Е              | 20   | Индия, Хидарабад  | л.л.        | 17°8' С.Ш. 78° 31' В.Д.   | <i>quinquefasciatus</i> | Е.Б.Виноградовой |
|                | 23   | Индия, Пондишерри | л.л.        | 12°25' С.Ш. 80°41' В.Д.   | <i>quinquefasciatus</i> | Е.Б.Виноградовой |
|                | 10   | Португалия        | о           | 38°22' С.Ш. 8°46' З.Д.    | <i>f.pipiens</i>        | P. Almeida       |
|                | 10   | Португалия        | о           | 38°22' С.Ш. 8°46' З.Д.    | <i>f.molestus</i>       | P. Almeida       |
|                | 15   | Италия, Витербо   | г, о        | 42°23' С.Ш. 12°7' В.Д.    | <i>C. pipiens s.l.</i>  | Е.Б.Виноградовой |
|                | 7    | Израиль, Хайфа    | г, з        | 32° 49'С.Ш.34° 57'В.Д.    | <i>C. pipiens s.l.</i>  | М.В.Федоровой    |
|                | 13   | Марокко, Танжер   | г, о        | 35° 46' С.Ш.5°48' З.Д.    | <i>C. pipiens s.l.</i>  | А.- В. Failloux  |
|                | 3    | Греция, о. Кипр   | г, з        | 34°46'С.Ш. 32°25'В.Д.     | <i>C. pipiens s.l.</i>  | Е.Б.Виноградовой |
|                | 24   | Греция, о. Кос    | г, з        |                           | <i>C. pipiens s.l.</i>  | Е.Б.Виноградовой |
|                | 639  |                   |             |                           |                         |                  |

г-городской, с-сельский, п-подвальный, о-открытый, з-закрытый, л.л.-лабораторная линия



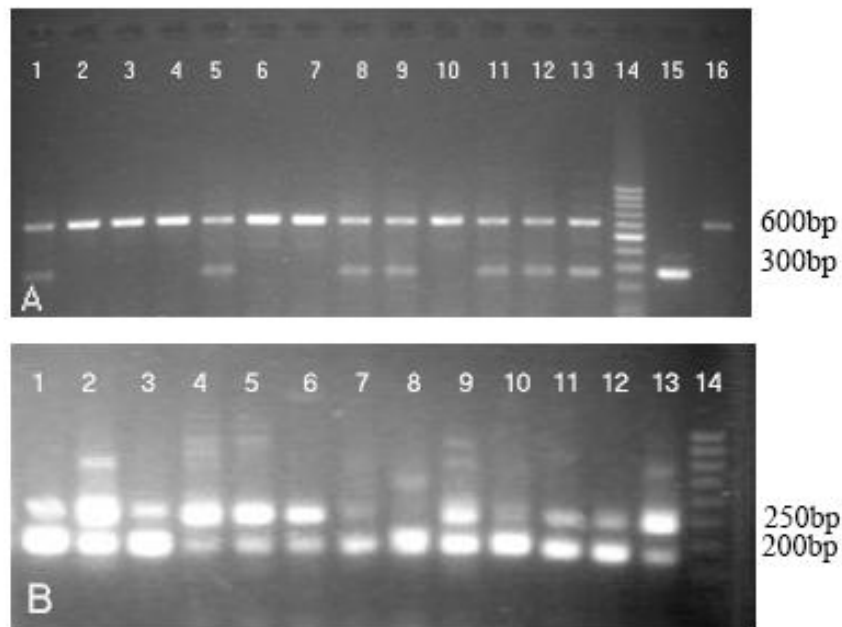
проявляющим свойства автогенности, стеногамности и антропофилии и приуроченным в основном к подвальным биотопам. То же характерно и в Германии, Франции и Сербии (Becker et al., 2012). В теплое время года таких особей можно обнаружить и в открытых биотопах вблизи подземных. Этот мт-гаплотип был обнаружен у особей из открытых биотопов в Алма-Ате, на Севере Италии, Марокко и в Тунисе (табл. 13). Тип Е мы обнаружили у *C. p. quinquefasciatus* из Индии и не обнаружили в странах умеренного климата между 40-45° и 62-68° с.ш. Самая северная точка регистрации этого типа - г. Витербо, Италия (табл. 13).

Распределение мт-гаплотипов демонстрирует выраженную географическую ориентацию (рис.21). Мт-гаплотипы Е и Е1 (обозначены синими квадратами), обнаруженные в популяциях Средиземноморья и в тропических странах, не встречаются в северных странах. Мт-гаплотипы А, В, С (зеленые квадраты) и D (розовые) встречаются в странах умеренного климата и на севере Африки, но (по литературным данным) не встречаются в зоне тропиков. Таким образом, север Африки выступает как зона перекрывания ареалов этих мт-гаплотипов. На большей части ареала распространения мт-гаплотип Е не перекрывается с мт-гаплотипами А - С и D.



**Рисунок 21.** Карта распределения *COI* гаплотипов *C. pipiens*. Митотипы А, В, С обозначены зелеными квадратами, D - розовыми и митотипы Е и Е1 обозначены синими квадратами, *C. torrentium* – желтыми квадратами.

Для того, чтобы выяснить, является ли Средиземноморье зоной гибридизации или зоной интрогрессии мтДНК мы проверили полиморфизм ядерной ДНК по таким маркерам, как второй интрон гена ACE2 (Banck, Fonseca, 2004) и микросателлитному маркеру CQ11 (Smith, Fonseca, 2006). Маркер ACE2 предложен для дифференциации *C. pipiens* (без разделения на формы) и *C. quinquefasciatus*. По маркеру ACE2 характерным для *C. pipiens* ПЦР-продуктом, размером 610 п.н обладали все исследованные комары, кроме особей, собранных на греческом острове Кос и в марокканском Танжере (табл. 14). У половины образцов этих сборов мы обнаружили амплификаты, специфичные как для *C. p. pipiens*, так и для *C. p. quinquefasciatus*, 274 п.н (рис. 22). Т.е., эти образцы соответствовали гибридам между *C. p. pipiens* и *C.p. quinquefasciatus*. Результаты, полученные с помощью анализа мтДНК и типа *Wolbachia*, свидетельствуют о происхождении данных популяций от одной или нескольких самок *C. p. quinquefasciatus*. Отсутствие варианта ACE, характерного только для *C. p. quinquefasciatus* (фрагменты, размером только 274 п. н.), является следствием малочисленности выборки или того, что эти самки скрещивались преимущественно с аборигенными самцами *C. p. pipiens*. *C. p. quinquefasciatus* мог быть завезен (и не один раз) на остров морским или воздушным путем, что подтверждается многочисленными находками его в транспортных средствах (Виноградова, 1997).



**Рисунок 22.** Примеры амплификации специфических аллелей ACE2 (А) и CQ11 (В) у комаров из Танжера, Марокко. 1-13 образцы, 14 - маркеры молекулярного веса, 15 – *C. quinquefasciatus*; 16 – *C. pipiens*

**Таблица 14.** Результаты анализа *COI* и *wPip* гаплотипов и локусов *ACE2* и *CQ11* у *C. pipiens* из некоторых областей Средиземноморья и северной Европы.

| Место сбора                     |     | 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              | -               | -      | -   |
| Волгоград                       | 12  | A(B,C)         | II              | 12             | -           | -      | 12              | -               | -      | -   |
| 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, Saint-Nazaire de Pesan | 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      | -   |
| 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               | -      | -   |
| Волгоград                       | 8   | D              | IV              | 8              | -           | -      | -               | 8               | -      | -   |
| 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               | 0              | 6           | -      | н/о             | н/о             | н/о    | н/о |
| Total                           | 274 |                |                 |                |             |        |                 |                 |        |     |

*pip* – *pipiens*; *mol* – *molestus*; *quin* – *quinguefasciatus*.

\* место сбора в подвале или в помещении

\*\* *ACE* маркер: *C. p. pipiens* (обе формы) - 610 п.н., *C. p. quinguefasciatus* - 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. quinguefasciatus* - 250 п.н., hybrid - 250 п.н. и 200 п.н., 0 - отсутствие ПЦР-продукта

н/о - не определяли из-за недостатка ДНК

Тест на основе полиморфизма фланкирующей области микросателлитного локуса CQ11 разработан для идентификации обеих форм *C. p. pipiens* (*pipiens* и *molestus*) и их гибридов. Для формы *pipiens* характерен ПЦР-продукт 200 п.н., для формы *molestus* - 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 локуса CQ11 у 253 особей практически во всех исследуемых популяциях были обнаружены гибриды, кроме подмосковной популяции Чашниково (табл. 14). Гибриды этим методом были обнаружены и ранее в популяциях Португалии (Gomes et al., 2009) и Марокко (Amraoui et al., 2012), откуда происходят особи, исследованные в данной работе. По результатам анализа локуса 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. 14). 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.

Анализ ядерного, ACE, и микросателлитного, CQ11, маркеров свидетельствует о том, что в странах Средиземноморья существует зона цитоплазматической интрогрессии между членами комплекса *C. pipiens*. Данные свидетельствуют о происходящих цитоплазматических обменах между таксонами *C. pipiens* в зоне Средиземноморья в то время как на большей части ареала виды различаются генетически, и при исследовании аллопатрических популяций взаимно монофилетичны (рис. 11). Несмотря на обнаруженное несоответствие результатов анализа митохондриальной и ядерной ДНК в южных популяциях, наблюдается статистически достоверное соответствие между мт-гаплотипами по гену *COI* и таксономической принадлежностью комаров комплекса (табл. 15). Между собой в северных регионах особи с мт-гаплотипами А - С и D разделены биотопически на популяции открытых и закрытых водоемов, соответственно. Отсутствие способности к формированию диапаузы у формы с мт-гаплотипом D в России и в сходных климатических зонах заставляет этих комаров заселять подземные биотопы.

**Таблица 15.** Распределение гаплотипов гена *COI* и групп *wPip* между таксонами комплекса *Culex pipiens*.

| Тип<br><i>COI</i> | Группа<br><i>wPip</i> | Таксоны <i>Culex pipiens</i> *        |  |                              |   |  | N<br>(544) |
|-------------------|-----------------------|---------------------------------------|--|------------------------------|---|--|------------|
|                   |                       | <i>C.p. pipiens</i> f. <i>pipiens</i> | <i>C.p. pipiens</i> f. <i>molestus</i> | <i>C.p. quinquefasciatus</i> | <i>C.p. pipiens</i> /<br><i>C.p.</i><br><i>quinquefasciatus</i><br>hybrid | <i>C.p.</i><br><i>pipiens/molestus</i><br>hybrid |            |
| A(B,C)            | II                    | 202 ( <b>91%</b> )                    | 11 (5%)                                | 0                            | 0   | 10(4%)   | 223        |
| D                 | IV                    | 20(9%)                                | 179 ( <b>81%</b> )                     | 0                            | 0   | 21(10%)  | 220        |
| E(E1)             | I                     | 9(9%)                                 | 14(14%)                                | 43 ( <b>43%</b> )            | 32 ( <b>32%</b> )   | 3(3%)  | 101        |

\* определение принадлежности к таксону проводилось методами *COI*, ACE и CQ11

Расчет процентов проводился среди особей из одной горизонтальной строки таблицы. Chi-square = 732.71, d.f. = 8,  $P < 0.0001$

В южных регионах комары этой формы могут выплываться и в открытых биотопах (Vinogradova et al., 2007). Изменчивость мт-гаплотипов А, В, С свидетельствует о древности этих последовательностей, по сравнению с мт-гаплотипом D. Мономорфизм мт-гаплотипа D у всех комаров, которые им обладают, поддерживает гипотезу о недавнем происхождении подвальных комаров на севере Африки и последующего распространения по Европе. Именно здесь на основании анализа CQ11 нам удалось обнаружить смешанные популяции комаров обеих форм *C. pipiens*. На территории северной Европы и России комары форм *pipiens* и *molestus* биотопически разделены и существуют генетически раздельно.

Таким образом, в регионе Средиземноморья мы обнаружили: 1) массовую гибридизацию между формами *pipiens* и *molestus*, 2) случаи межподвидовой гибридизации между *C. p. pipiens* и *C. p. quinquefasciatus*, 3) редкие популяции, возникшие в результате гибридизации, приведшей к интрогрессии мтДНК одного подвида в генофонд другого.

### 3.2 Божьи коровки рода *Adalia*

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, Shaikovich, 2001). 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 структуры ДНК у *A. bipunctata*. Мы предприняли масштабное исследование популяций комплекса *Adalia bipunctata* и других видов р. *Adalia* на территории России с учетом как зараженности жуков симбиотическими бактериями, так и разнообразия митохондриальной и ядерной ДНК.

### 3.2.1 Влияние зараженности бактерией *Spiroplasma* на изменчивость мтДНК

#### *A. bipunctata* из Петербурга

Среди популяций *A. bipunctata* петербургская выделяется очень высоким содержанием форм-меланистов (Лусис, 1961; Сергиевский, Захаров, 1983; Захаров, 2009). Эта популяция обитает в северной части ареала вида и имеет возраст всего лишь около 300 лет (считая с момента основания Санкт-Петербурга). Поскольку размножение адалий в городе происходит главным образом на растениях-интродуцентах численность жуков в Санкт-Петербурге намного превосходит их численность в естественных биотопах Ленинградской области. Все сказанное позволяло ожидать своеобразие генетической структуры этой популяции. Используемые в настоящей работе жуки *Adalia bipunctata* L. были собраны на стадии имаго в июне 2009 г. на кустах караганы, растущих на Университетской набережной, вдоль зданий Санкт-Петербургского Университета. Выборка была представлена перезимовавшими жуками, т.е. собравшимися в место сбора из разных колоний, где происходило их размножение.

Мы исследовали один из наиболее изменчивых районов митохондриального генома адалий – 709 п.н. в средней области гена *COI*. По составу мт-гаплотипов петербургская популяция *A. bipunctata* оказалась высоко полиморфной (рис. 23), в ней обнаружено 6 из 10 ранее описанных мт-гаплотипов (отсутствуют №5, 6, 7, 8). Номера мт-гаплотипов обозначены в соответствии с предложенными Schulenburg и соавторами (Schulenburg et al., 2002). Кроме того, нами найдены новые, которые были обозначены 11, 12, 13, 14, 15, 16 и 17 (рис. 23). Все новые мт-гаплотипы, кроме 13 и 15, отличаются от ранее обнаруженных одной нуклеотидной заменой. Мт-гаплотип Н13 отличается от третьего тремя нуклеотидными заменами. Мт-гаплотип Н15 отличается от Н4 двумя нуклеотидными заменами (рис. 23). Всего, таким образом, в проанализированной выборке из 34 особей (GenBank HM150667-HM150700) было обнаружено 13 мт-гаплотипов, из которых численно преобладает тип 1 (18 особей).

Среди изученных 84 жуков 21 оказался зараженным спироплазмой, 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, спироплазма является андроцидным агентом).

|                 | 11111111   | 1112223333 | 3333333333 | 4444444455 | 555555]    |         |    |
|-----------------|------------|------------|------------|------------|------------|---------|----|
| [               | 1122367788 | 9912455666 | 7791890012 | 3346677889 | 1233389901 | 234444] |    |
| [               | 3623340358 | 1467547069 | 2504081468 | 4891769587 | 2403616984 | 021477] |    |
| #SP8            | TGTCCATAAA | ATTTACTTAG | TACAGACATT | TCTTATACCA | GTA AATTAC | GATGG   | 1  |
| #SP9+           | .....      | .....      | .....C.    | .....      | .....      | .....   | 3  |
| #SP10+          | .....      | .....      | .....      | .....G.    | .....      | .....   | 2  |
| #SP11           | .....G.... | .....      | .....      | .....      | .....      | .....   | 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  |
| #SP19           | .....      | .....      | .G.....C.  | .....      | .....      | .....   | 12 |
| #SP20           | .....      | .....      | .....      | .....      | .....      | .....   | 1  |
| #SP21+          | .....      | .....      | .....      | .....      | .....      | .....   | 1  |
| #SP22+          | .....      | .....G..   | .....      | .....      | .....      | .....   | 11 |
| #SP23           | .....      | .....G..   | .....      | .....      | .....      | .....   | 11 |
| #SP25           | .....      | .....      | .....      | .....      | .....      | .....   | 1  |
| #SP26           | ....T....  | .....G..   | ....A..C.  | .....      | .....      | .....   | 13 |
| #SP27           | .....A...  | .....      | .....      | .....      | .....      | .....   | 14 |
| #SP28           | .....G.... | .....G..   | .....      | .....      | .....G...  | .....   | 15 |
| #SP29           | .....      | .....      | .....C.    | .....      | .....      | .....   | 3  |
| #SP30           | .....      | .....      | .....C.    | .....      | .....      | .....   | 3  |
| #SP32           | .....      | .....      | .....C.    | .....      | .....      | ....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  |
| #AJ313061type2  | .....      | .....      | .....      | .....G.    | .....      | .....   | 2  |
| #AJ313062type3  | .....      | .....      | .....C.    | .....      | .....      | .....   | 3  |
| #AJ313063type4  | .....G.... | .....      | .....      | .....      | .....      | .....   | 4  |
| #AJ313064type5  | .....G.... | .....      | .....      | .....      | .....      | .....   | 5  |
| #AJ313065type6  | .....      | .....      | .....C.    | .....      | .....A...T | .....   | 6  |
| #AJ313066type7  | .....      | .....      | ....A....  | .....      | .....      | .....   | 7  |
| #AJ313060type8  | .....T..   | .....      | .....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 23.** Сравнение переменных нуклеотидных сайтов средней области гена *COI* *Adalia bipunctata* из Санкт-Петербурга (SP) и ранее обнаруженных мт-гаплотипов (GenBank: AJ313060-AJ313070). Плюсом обозначены особи, зараженные *Spiroplasma*.



Как показывают данные, представленные на рисунке 23, среди зараженных особей преобладает мт-гаплотип 1 (18 жуков); встречаются также мт-гаплотипы 2, 3, 17, 11, которые отличаются от первого только одной заменой нуклеотидов. В то же время, среди незараженных спироплазмой обнаружено 10 мт-гаплотипов, 9 из которых отличаются от типа 1 по 1-4, 24 и 34 нуклеотидам.

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 популяции, она оказалась по мтДНК высоко полиморфной (13 мт-гаплотипов). Для сравнения можно привести данные из работы (Schulenburg et al., 2002) по популяциям Билефельд-Германия и Москва, соответственно: 7 мт-гаплотипов среди 16 особей и 8 среди 22. Подобных данных для других популяций в литературе нет. Оказалось, что среди зараженных *Spiroplasma* жуков резко снижен уровень разнообразия мтДНК – были определены средние нуклеотидные различия между жуками в двух выборках – зараженных и незараженных. Для первой эта величина оказалась равной 0,002, для второй 0,021 (табл. 16). Такой высокий уровень полиморфизма в незараженных *Spiroplasma* популяциях достигается главным образом за счет значительно отличающихся по составу ДНК мт-гаплотипов Н9 и Н10. Но, даже если убрать из выборки Н9 и Н10, то изменчивость в группе зараженных симбионтом ( $S^+ = 0,002$ ) в 2 раза меньше, чем в группе незараженных ( $S^- = 0,004$ ).

Разница в нуклеотидном составе изученного нами участка гена *COI* мтДНК позволила подобрать рестриктазу и разработать метод ПЦР-ПДРФ для анализа различий между гаплотипом Н1 (и сходными с ним) и резко отличающимися Н9 и Н10. Для рестрикционного анализа использовали ПЦР-продукты, полученные путем амплификации с праймерами С1-j-1951 и С1-N-2618 (Schulenburg et al., 2002), которые обрабатывали рестриктазой *MspI* (Fermentas) по прилагаемой методике. Сайты узнавания эндонуклеазы *MspI* (C'CGG) специфичны для трех мт-гаплотипов. Для гаплотипа Н10 были получены фрагменты рестрикции размером 123+134+452 п.н., для гаплотипа Н9: 134+575 п.н. Можно выявить также гаплотип Н12: размеры фрагментов рестрикции составляли 218+491 п.н. ДНК остальных гаплотипов не имеют сайта узнавания рестриктазы *MspI* в изученном участке гена и оставались размером 709 п.н.

**Таблица 16.** Попарные различия в пересчете на сайт между *COI* у особей *A.b. bipunctata*, зараженных и незараженных *Spiroplasma*.

| [     | 1 | 2     | 3     | 4     | 5     | 6     | 7     | 8     | 9     | 10    | 11    | 12    | 13    | 14    | 15    | 16    | 17    | 18    | 19 ]  |
|-------|---|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| [ 1 ] |   | 0.002 | 0.046 | 0.066 | 0.000 | 0.000 | 0.066 | 0.000 | 0.004 | 0.000 | 0.004 | 0.000 | 0.009 | 0.004 | 0.006 | 0.002 | 0.002 | 0.004 | 0.000 |
| [ 2 ] |   |       | 0.048 | 0.068 | 0.002 | 0.002 | 0.068 | 0.002 | 0.006 | 0.002 | 0.006 | 0.002 | 0.011 | 0.006 | 0.004 | 0.004 | 0.004 | 0.006 | 0.002 |
| [ 3 ] |   |       |       | 0.077 | 0.046 | 0.046 | 0.077 | 0.046 | 0.050 | 0.046 | 0.050 | 0.046 | 0.052 | 0.050 | 0.052 | 0.048 | 0.048 | 0.048 | 0.046 |
| [ 4 ] |   |       |       |       | 0.066 | 0.066 | 0.000 | 0.066 | 0.070 | 0.066 | 0.070 | 0.066 | 0.072 | 0.070 | 0.072 | 0.068 | 0.068 | 0.066 | 0.066 |
| [ 5 ] |   |       |       |       |       | 0.000 | 0.066 | 0.000 | 0.004 | 0.000 | 0.004 | 0.000 | 0.009 | 0.004 | 0.006 | 0.002 | 0.002 | 0.004 | 0.000 |
| [ 6 ] |   |       |       |       |       |       | 0.066 | 0.000 | 0.004 | 0.000 | 0.004 | 0.000 | 0.009 | 0.004 | 0.006 | 0.002 | 0.002 | 0.004 | 0.000 |
| [ 7 ] |   |       |       |       |       |       |       | 0.066 | 0.070 | 0.066 | 0.070 | 0.066 | 0.072 | 0.070 | 0.072 | 0.068 | 0.068 | 0.066 | 0.066 |
| [ 8 ] |   |       |       |       |       |       |       |       | 0.004 | 0.000 | 0.004 | 0.000 | 0.009 | 0.004 | 0.006 | 0.002 | 0.002 | 0.004 | 0.000 |
| [ 9 ] |   |       |       |       |       |       |       |       |       | 0.004 | 0.007 | 0.004 | 0.009 | 0.007 | 0.009 | 0.002 | 0.002 | 0.004 | 0.004 |
| [10]  |   |       |       |       |       |       |       |       |       |       | 0.004 | 0.000 | 0.009 | 0.004 | 0.006 | 0.002 | 0.002 | 0.004 | 0.000 |
| [11]  |   |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       | 0.004 | 0.006 | 0.004 | 0.006 | 0.006 | 0.006 | 0.007 | 0.004 |
| [12]  |   |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       | 0.009 | 0.004 | 0.006 | 0.002 | 0.002 | 0.004 | 0.000 |
| [13]  |   |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       | 0.009 | 0.011 | 0.007 | 0.007 | 0.009 | 0.009 |
| [14]  |   |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       | 0.009 | 0.006 | 0.006 | 0.007 | 0.004 |
| [15]  |   |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       | 0.007 | 0.007 | 0.009 | 0.006 |
| [16]  |   |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       | 0.000 | 0.002 | 0.002 |
| [17]  |   |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       | 0.002 | 0.002 |
| [18]  |   |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       | 0.004 |
| [19]  |   |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |

**Незараженные *Spiroplasma*, среднее значение 0,021**

| [     | 1     | 2     | 3     | 4     | 5     | 6     | 7     | 8     | 9     | 10    | 11    | 12    | 13    | 14    | 15    | 16 ] |
|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|------|
| [ 1 ] |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |      |
| [ 2 ] | 0.004 |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |      |
| [ 3 ] | 0.002 | 0.002 |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |      |
| [ 4 ] | 0.002 | 0.002 | 0.000 |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |      |
| [ 5 ] | 0.002 | 0.002 | 0.000 | 0.000 |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |      |
| [ 6 ] | 0.006 | 0.006 | 0.004 | 0.004 | 0.004 |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |      |
| [ 7 ] | 0.002 | 0.002 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.004 |       |       |       |       |       |       |       |       |       |      |
| [ 8 ] | 0.002 | 0.002 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.004 | 0.000 |       |       |       |       |       |       |       |       |      |
| [ 9 ] | 0.002 | 0.002 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.004 | 0.000 | 0.000 |       |       |       |       |       |       |       |      |
| [10]  | 0.002 | 0.002 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.004 | 0.000 | 0.000 | 0.000 |       |       |       |       |       |       |      |
| [11]  | 0.006 | 0.006 | 0.004 | 0.004 | 0.004 | 0.004 | 0.004 | 0.004 | 0.004 | 0.004 |       |       |       |       |       |      |
| [12]  | 0.002 | 0.002 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.004 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.004 |       |       |       |       |      |
| [13]  | 0.002 | 0.002 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.004 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.004 | 0.000 |       |       |       |      |
| [14]  | 0.002 | 0.002 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.004 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.004 | 0.000 | 0.000 |       |       |      |
| [15]  | 0.002 | 0.002 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.004 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.004 | 0.000 | 0.000 | 0.000 |       |      |
| [16]  | 0.004 | 0.004 | 0.002 | 0.002 | 0.002 | 0.002 | 0.002 | 0.002 | 0.002 | 0.002 | 0.002 | 0.002 | 0.002 | 0.002 | 0.002 |      |

**Зараженные *Spiroplasma*, среднее значение 0,002**

### 3.2.2 Связь разнообразия мтДНК и зараженности симбиотическими бактериями у жуков *A. bipunctata* из удаленных мест сбора

Для выяснения, существуют ли какие-либо закономерности в географическом распространении мт-гаплотипов адалии и симбиотических бактерий мы изучили изменчивость мтДНК в нескольких географически удаленных популяциях комплекса *A. bipunctata*. Среди собранных жуков были определены мт-гаплотипы (в популяциях Кемь и Улан-Уде гаплотипы Н9 и Н10 определяли методом ПЦР-ПДРФ, остальные - секвенированием ПЦР продуктов) и зараженность симбиотическими бактериями *Spiroplasma*, *Rickettsia*, *Wolbachia*. Последние в изученном материале не были обнаружены. Полученные результаты сведены в таблицу (табл. 17), где также, для сравнения, приведены данные по популяциям Москвы и Германии из работы Schulenburg и соавторов (Schulenburg et al., 2002).

В результате проведенного исследования было показано, что все изученные популяции проявляют полиморфизм по мтДНК. В Российских популяциях нами было обнаружено 13 мт-гаплотипов. В популяции Ташкента были обнаружены Н1 и ранее не встречавшийся мт-гаплотип 18 (JQ757048), близкий к мт-гаплотипу 1 (рис. 24). В популяции Еревана были обнаружены еще два гаплотипа Н19 и Н20. Всего нами у 126 особей вида *A. bipunctata* было обнаружено 17 различающихся гаплотипов. Большая часть, 52 особи *A. bipunctata* обладала гаплотипом Н1, 35 особей обладали гаплотипом Н10, 19 особей – гаплотипом Н7, 7 особей – гаплотипом Н9, 4 особи – гаплотипом Н3, по 2 особи - Н2 и Н11, также были обнаружены по одной особи с гаплотипами Н4, Н12, Н13, Н14, Н15, Н16, Н17, Н18, Н19 и Н20.

Во всех популяциях, кроме популяции Кемь, преобладающим является мт-гаплотип 1 (табл. 17). Наиболее сильно отличающийся от всех остальных мт-гаплотип Н10 встречается во всех популяциях, от Германии до Забайкалья, и отсутствует (или не был обнаружен из-за малой численности выборки) только в популяциях Ташкента и Еревана. При этом часть особей из популяции Забайкалья по морфологическим признакам должны быть отнесены к другому подвиду, *Adalia bipunctata fasciatopunctata* (Лус, 1973).

Исследованные нами популяции сильно различаются по зараженности бактериями – от примерно 50-процентной зараженности особей петербургской популяции бактерией *Spiroplasma* и 50-процентной зараженности особей популяции Кемь бактерией *Rickettsia*,

**Таблица 17.** 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        | 1      | 16                 |                   |   |
| 10             |                | 4      |                    | 1                 |   |
| всего          |                | 20     |                    | 1                 |   |
| Ташкент        | 1              | 14     |                    |                   |   |
|                | 18             | 1      |                    |                   |   |
| всего          |                | 15     |                    |                   |   |
| Ереван         | 1              | 9      |                    |                   |   |
|                | 3              | 1      |                    |                   |   |
|                | 4              | 1      |                    |                   |   |
|                | 9              | 2      |                    |                   |   |
|                | 19             | 1      |                    |                   |   |
|                | 20             | 1      |                    |                   |   |
| всего          |                | 15     |                    |                   |   |
| 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 поп-ях |                | 167    | 24                 | 23                |   |

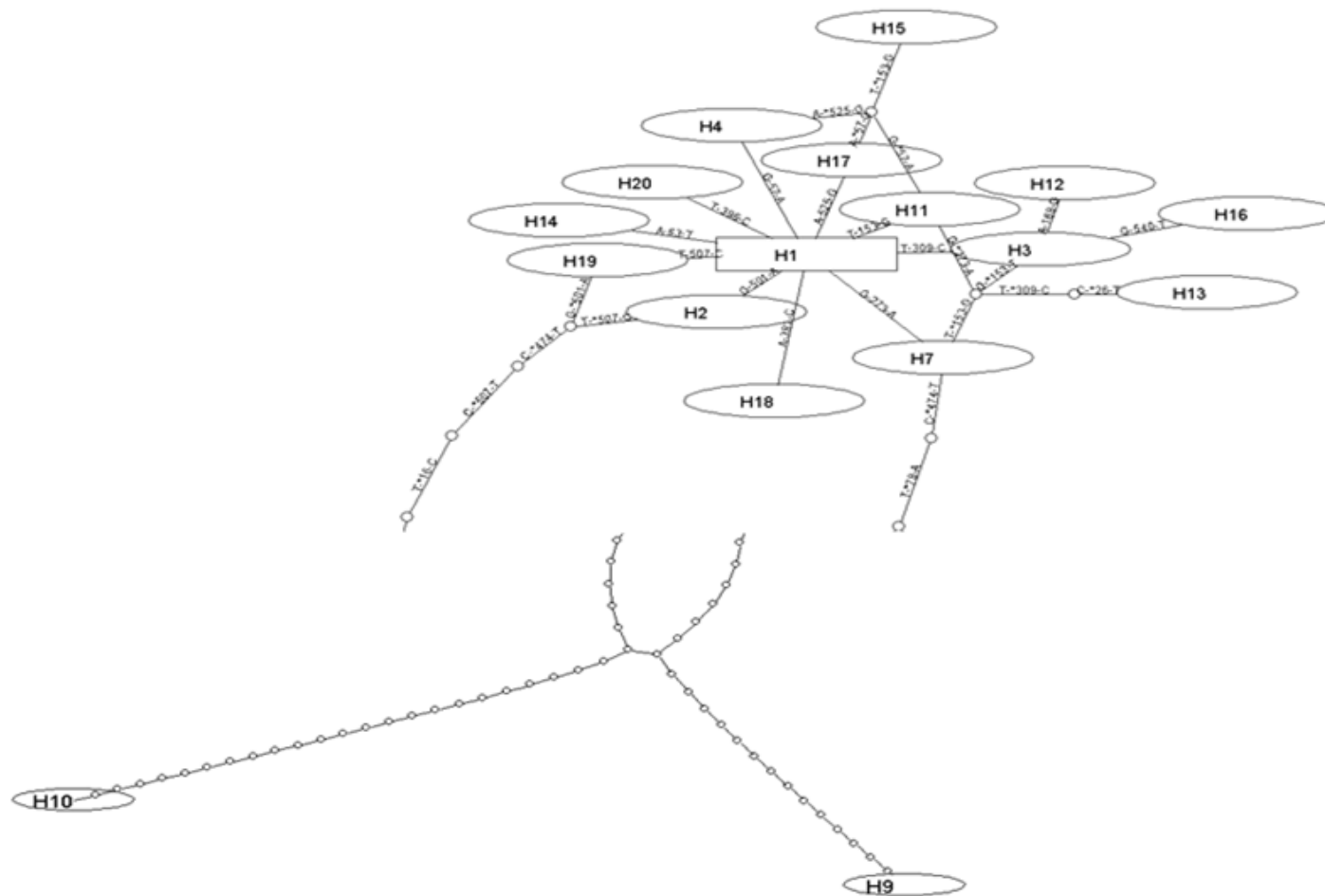
\* данные из Шуленбург и др., 2002; \*\* данные из Шуленбург и др., 2002: сборы: Билефельд (Северный Рейн-Вестфалия) 16 особей, Берлин 1 особь, Бэйреут (Бавария) 2 особи.

до полного отсутствия бактерий (или их большой редкости) в популяции Архангельска. При этом надо отметить, что все эти три популяции обитают в сходных климатических условиях. Отсутствие зараженности в южных популяциях, Ташкента и Еревана, может объясняться элиминацией бактерий при высоких температурах. Влияние температуры на выживание симбионта было исследовано на многих Coccinellidae (Elnagdy et al., 2013).

Изучение популяции из города Кемь, а также из Бурятии, подтвердило «сцепленность» мт-гаплотипа H10 с зараженностью риккетсией, отмеченную Schulenburg и соавторами (2002). Бактерии рода *Spiroplasma* инфицируют жуков мт-гаплотипов 1, 2, 3, 11, 17. Мт-гаплотипы 2, 3, 11, 17 отличаются от мт-гаплотипа 1 одной нуклеотидной заменой, т.е., вероятно, наиболее распространенный мт-гаплотип 1 по отношению к ним является предковым. Таким образом, можно предположить, что инфицированность бактерией *Spiroplasma* имела место до дифференциации мт-гаплотипов 1, 2, 3, 11, 17. Третья известная симбиотическая бактерия, *Wolbachia*, в проанализированных выборках жуков из изученных нами популяций встречена не была.

Наши результаты подтверждают заключение о связи инфицированности бактериями *Spiroplasma* и *Rickettsia* с определенными мт-гаплотипами хозяина, что является следствием отсутствия или редкости горизонтального переноса симбионтов и древности первого контакта бактерий, во всяком случае *Rickettsia*, с коровками вида *A. bipunctata*. При изучении популяций Стокгольма, Швеция, мы показали, что 23% коровок близкого симпатрического вида *Adalia decempunctata* также инфицированы риккетсиями (Zakharov, Shaikevich, 2001). Возможно, что инфекция имела место до расхождения этих двух видов. Сохранение бактерионосительства на протяжении миллионов лет свидетельствует о биологической полезности явления бессамцовости, которое вызывается у адалий всеми тремя видами симбиотических бактерий.

При изучении митохондриального полиморфизма в популяциях двуточечной божьей коровки *A. bipunctata* были обнаружены два мт-гаплотипа, H9 и H10, значительно отличающиеся от всех остальных (рис. 24). В работе Jiggins и Tinsley (2005) была сделана попытка оценить время дивергенции мт-гаплотипа H10 от H7, оно оказалось равным 2 -2.5 млн. лет. Соответственно, наблюдаемый митохондриальный полиморфизм был назван «древним». От какого таксона рода *Adalia* происходят мт-гаплотипы H9 и H10? В состав комплекса *A. bipunctata* включают четыре подвида: *A. b. bipunctata* L. (Европа и Азия), *A. b. fasciatopunctata* Fald. (Монголия, Тува, Забайкалье и прилегающая часть Сибири),



**Рисунок 24.** 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.

*A. b. turanica* Lus (Средняя Азия) и *A. b. revelierei* Muls. (малая и Передняя Азия, Закавказье). Между формами репродуктивной изоляции нет (Лусис, 1973, 1976), есть ли генетические основы разделения на подвиды - не ясно. Наиболее близки к *A. bipunctata* три вида рода *Adalia*: *A. decempunctata*, *A. tetraspilota*, *A. frigida* (Лусис, 1973). Насколько они генетически изолированы – не вполне ясно. Мы сравнили последовательности митохондриальной и ядерной ДНК, характерные для мт-гаплотипов Н9 и Н10, а также типичные для *A. bipunctata*, с гомологичными последовательностями ДНК других 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*. Были изучены нуклеотидные последовательности двух участков гена *COI* – 5' конца гена, т.н. участка штрихкодирования, который традиционно используют для сравнения видов, и середины гена *COI*, как наиболее варибельного района. Размер ПЦР продуктов составлял в обоих случаях примерно 700 п.н. Амплифицированные фрагменты секвенировали. Использованные нами пары праймеров (LCO и HCO) и (C1-j-1951 и C1-N-2618) были подобраны так, что амплифицированные последовательности перекрываются. Это позволило нам соединить полученные последовательности для дальнейшего анализа и размер изученного участка гена составил 970 п.н.

### 3.2.3 Изменчивость мтДНК в популяциях *A. bipunctata*

Были исследованы последовательности гена *COI* у особей *A. bipunctata* из популяций Санкт-Петербурга (7 особей), Архангельска (14) и Бурятии (10), Еревана (12) и Ташкента (10); *A. b. fasciatopunctata* из Бурятии (10), *A. b. revelierei* из Еревана (8) и *A. b. turanica* из Киргизии (1).

В популяции Бурятии 4 особи имели мт-гаплотип Н10, который был обнаружен у двух особей *A. b. fasciatopunctata* и двух особей *A. bipunctata*, у остальных исследованных 8 *A. bipunctata* и 8 *A. b. fasciatopunctata* обнаружен мт-гаплотип Н1 (табл. 18). Имеющаяся в нашем распоряжении *A. b. turanica* обладала мт-гаплотипом Н1. Среди ереванской популяции адалий были изучены последовательности гена *COI* у 8 жуков с фенотипом *A. b. revelierei* и 12 жуков с фенотипом *A. b. bipunctata* typica: идентичные мт-гаплотипы были обнаружены у особей обеих форм: у 20 жуков были обнаружены 5 уже известных мт-гаплотипа и два новых, которые отличаются от ранее обнаруженных одной нуклеотидной заменой. Мы обозначили их Н19 и Н20, продолжая имеющиеся

обозначения. У особей с фенотипом *A. b. revelierei* преобладающим мт-гаплотипом оказался Н1 (табл. 18), так же, как и у особей из других популяций комплекса *A. bipunctata*. У одной особи обнаружился мт-гаплотип Н3 и одна особь обладала новым мт-гаплотипом, который мы назвали Н20. Среди типичных *A. b. bipunctata* из Еревана 8 особей имели Н1, по одной особи - Н4 и Н19. Две особи *A. b. bipunctata* из Ереванской популяции обладали мт-гаплотипом Н9.

**Таблица 18.** Распределение митохондриальных гаплотипов по гену COI у особей четырех подвидов *A. bipunctata*.

| Популяция                     | Тип рисунка на надкрыльях     | мт-гаплотип | кол-во особей |
|-------------------------------|-------------------------------|-------------|---------------|
| Бурятия,<br>Иволгинский дацан | <i>A. b. bipunctata</i>       | Н1          | 8             |
|                               |                               | Н10         | 2             |
|                               | <i>A. b. fasciatopunctata</i> | Н1          | 8             |
|                               |                               | Н10         | 2             |
| Ереван                        | <i>A. b. bipunctata</i>       | Н1          | 8             |
|                               |                               | Н4          | 1             |
|                               |                               | Н9          | 2             |
|                               |                               | Н19         | 1             |
|                               | <i>A. b. revelierei</i>       | Н1          | 6             |
|                               |                               | Н3          | 1             |
|                               |                               | Н20         | 1             |
| Киргизия                      | <i>A. b. turanica</i>         | Н1          | 1             |

Примечание: *A. b. bipunctata* объединяет особи с надкрыльями двух типов: красными с двумя пятнами и черными.

Изменчивость ДНК гена *COI* внутри и между популяциями комплекса *A. bipunctata*, без учета типов Н9 и Н10, не превышает 0,009 за счет разнообразия ДНК в популяциях Санкт-Петербурга и Архангельска (табл. 19). Среднее число нуклеотидных замен на сайт у 29 особей разных морфологических форм комплекса *A. bipunctata* с мт-гаплотипами Н1, Н3, Н4, Н19 и Н20 составляет 0,001, различия Н9 и Н10 от других мт-гаплотипов достигают уровня межвидовых различий (табл. 20).



**Таблица 19.** Величины эволюционной дивергенции (число нуклеотидных различий на сайт) между гаплотипами H1-H20.

|            | H1           | H2           | H3           | H4           | H5           | H6           | H7           | H8           | <b>H9</b>    | <b>H10</b>   | H11   | H12   | H13   | H14   | H15   | H16   | H17   | H19   | H20   |
|------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| H1         |              |              |              |              |              |              |              |              |              |              |       |       |       |       |       |       |       |       |       |
| H2         | 0,002        |              |              |              |              |              |              |              |              |              |       |       |       |       |       |       |       |       |       |
| H3         | 0,002        | 0,004        |              |              |              |              |              |              |              |              |       |       |       |       |       |       |       |       |       |
| H4         | 0,002        | 0,004        | 0,004        |              |              |              |              |              |              |              |       |       |       |       |       |       |       |       |       |
| H5         | 0,002        | 0,004        | 0,004        | 0,004        |              |              |              |              |              |              |       |       |       |       |       |       |       |       |       |
| H6         | 0,004        | 0,006        | 0,002        | 0,006        | 0,006        |              |              |              |              |              |       |       |       |       |       |       |       |       |       |
| H7         | 0,002        | 0,004        | 0,004        | 0,004        | 0,004        | 0,006        |              |              |              |              |       |       |       |       |       |       |       |       |       |
| H8         | 0,006        | 0,008        | 0,004        | 0,008        | 0,008        | 0,006        | 0,008        |              |              |              |       |       |       |       |       |       |       |       |       |
| <b>H9</b>  | <b>0,045</b> | <b>0,047</b> | <b>0,047</b> | <b>0,047</b> | <b>0,047</b> | <b>0,049</b> | <b>0,043</b> | <b>0,047</b> |              |              |       |       |       |       |       |       |       |       |       |
| <b>H10</b> | <b>0,064</b> | <b>0,062</b> | <b>0,066</b> | <b>0,066</b> | <b>0,062</b> | <b>0,068</b> | <b>0,062</b> | <b>0,066</b> | <b>0,075</b> |              |       |       |       |       |       |       |       |       |       |
| H11        | 0,002        | 0,004        | 0,004        | 0,004        | 0,004        | 0,006        | 0,004        | 0,008        | <b>0,047</b> | <b>0,066</b> |       |       |       |       |       |       |       |       |       |
| H12        | 0,004        | 0,006        | 0,002        | 0,006        | 0,006        | 0,004        | 0,006        | 0,006        | <b>0,049</b> | <b>0,068</b> | 0,006 |       |       |       |       |       |       |       |       |
| H13        | 0,008        | 0,009        | 0,006        | 0,009        | 0,009        | 0,008        | 0,006        | 0,009        | <b>0,049</b> | <b>0,068</b> | 0,006 | 0,008 |       |       |       |       |       |       |       |
| H14        | 0,002        | 0,004        | 0,004        | 0,004        | 0,004        | 0,006        | 0,004        | 0,008        | <b>0,047</b> | <b>0,066</b> | 0,004 | 0,006 | 0,009 |       |       |       |       |       |       |
| H15        | 0,006        | 0,008        | 0,008        | 0,004        | 0,008        | 0,009        | 0,008        | 0,011        | <b>0,051</b> | <b>0,070</b> | 0,004 | 0,009 | 0,009 | 0,008 |       |       |       |       |       |
| H16        | 0,002        | 0,004        | 0,000        | 0,004        | 0,004        | 0,002        | 0,004        | 0,004        | <b>0,047</b> | <b>0,066</b> | 0,004 | 0,002 | 0,006 | 0,004 | 0,008 |       |       |       |       |
| H17        | 0,002        | 0,004        | 0,004        | 0,004        | 0,004        | 0,006        | 0,004        | 0,008        | <b>0,047</b> | <b>0,066</b> | 0,004 | 0,006 | 0,009 | 0,004 | 0,004 | 0,004 |       |       |       |
| H18        | 0,002        | 0,004        | 0,004        | 0,004        | 0,004        | 0,006        | 0,004        | 0,008        | <b>0,047</b> | <b>0,062</b> | 0,004 | 0,006 | 0,009 | 0,004 | 0,008 | 0,004 | 0,004 |       |       |
| H19        | 0,002        | 0,004        | 0,004        | 0,004        | 0,004        | 0,006        | 0,004        | 0,008        | <b>0,047</b> | <b>0,064</b> | 0,004 | 0,009 | 0,006 | 0,004 | 0,008 | 0,004 | 0,004 | 0,004 |       |
| H20        | 0,002        | 0,004        | 0,004        | 0,004        | 0,004        | 0,006        | 0,004        | 0,008        | <b>0,047</b> | <b>0,066</b> | 0,004 | 0,009 | 0,006 | 0,004 | 0,008 | 0,004 | 0,004 | 0,004 | 0,004 |

Различия H9 и H10 от других гаплотипов *A. bipunctata* выделены жирным шрифтом. Данные получены в результате попарного сравнения 20 последовательностей гена *COI*, размером 532 п.н. методом максимального правдоподобия в программе MEGA 5.

**Таблица 20.** Уровень эволюционной дивергенции между последовательностями *COI* гена исследованных подвидов и видов р. *Adalia*.

|                             | <i>A.bipunctata</i> * | <i>A.b.fasciatopunctata</i> * | <i>A.b.turanica</i> | <i>A.b.revelierei</i> | <i>A.frigida</i> | <i>A.tetraspilota</i> | <i>A.decempunctata</i> | H9**  |
|-----------------------------|-----------------------|-------------------------------|---------------------|-----------------------|------------------|-----------------------|------------------------|-------|
| <i>A.bipunctata</i> *       |                       |                               |                     |                       |                  |                       |                        |       |
| <i>A.b.fasciatopunctata</i> | 0.001                 |                               |                     |                       |                  |                       |                        |       |
| <i>A.b.turanica</i>         | 0.001                 | 0.001                         |                     |                       |                  |                       |                        |       |
| <i>A.b.revelierei</i> *     | 0,001                 | 0,001                         | 0,001               |                       |                  |                       |                        |       |
| <i>A.frigida</i>            | 0.043                 | 0.043                         | 0.043               | 0.043                 |                  |                       |                        |       |
| <i>A.tetraspilota</i>       | 0.062                 | 0.062                         | 0.062               | 0.062                 | 0.066            |                       |                        |       |
| <i>A.decempunctata</i>      | 0.120                 | 0.120                         | 0.120               | 0.120                 | 0.138            | 0.129                 |                        |       |
| H9**                        | 0.043                 | 0.043                         | 0.043               | 0.043                 | 0.023            | 0.067                 | 0.136                  |       |
| H10***                      | 0.067                 | 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* (включая все мт-гаплотипы, за исключением H9, H10)

\*\* *A. bipunctata* мт-гаплотип H9

\*\*\* *A. bipunctata* мт-гаплотип H10

### 3.2.4 Сравнение мтДНК разных видов рода *Adalia*

Структура и изменчивость ДНК гена *COI* были исследованы у трех близких к *A. bipunctata* видов. Были определены митохондриальные гаплотипы двух особей *A. decempunctata* и *A. tetraspilota*. В нашем распоряжении были одна особь *A. frigida* (№1) и ее потомки из Архангельска и одна из Якутии (№2). Мы сравнили все, обнаруженные нами гаплотипы (рис. 25). Среди 23 исследованных различающихся гаплотипов четырех видов был обнаружен 171 вариабельный нуклеотидный сайт, 144 из которых являются информативными по принципу парсимонии. Пять нуклеотидных замен, три из которых находятся в первом положении кодона, приводят к смене аминокислот (рис. 25). Большинство изученных последовательностей гена *COI* внутри вида различаются не более, чем на 0,4 % (табл. 19). Минимальная величина эволюционной дивергенции (число нуклеотидных различий в пересчете на сайт) - 4,3 % обнаружена между видами *A. bipunctata* и *A. frigida*. Наибольшие различия наблюдаются между *A. decempunctata* и остальными видами и составляют примерно 12,5 % (табл. 20).

Исключения составляют последовательности ДНК *A. bipunctata*, характерные для мт-гаплотипов Н9 и Н10. Гаплотип Н9 отличается от группы типичных гаплотипов *A. bipunctata* на 4,3 %, от *A. frigida* на 2,3 %, от *A. tetraspilota* на 6,7 %, а от *A. decempunctata* на 13,6%. Последовательности типа Н10 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 %. Анализ полиморфизма ДНК между Н10 и другими изученными видами по исследованному участку гена *COI* обнаружил, что 64 вариабельных сайта отличают Н10 от *A. frigida*, 66 – 68 от *A. bipunctata*, 64 от *A. tetraspilota* и 116 сайтов от *A. decempunctata*. Мт-гаплотип Н10 генетически одинаково далек от *A. bipunctata*, *A. frigida* и *A. tetraspilota*, большая генетическая дистанция отделяет его от *A. decempunctata*. Мт-гаплотип Н9 генетически близок к *A. frigida*, и ближе, чем Н10 к другим мт-гаплотипам *A. bipunctata*. Генетические дистанции Н9 с *A. tetraspilota* и *A. decempunctata* практически идентичны таковым для Н10 (табл. 20, рис. 26). Важно было показать, что особи с мт-гаплотипами Н9, Н10 и с другими мт-гаплотипами составляют единую популяцию. Для этого мы сопоставили последовательности ITS2 рРНК в выборках особей мт-гаплотипов Н9, Н10 и других мт-гаплотипов.

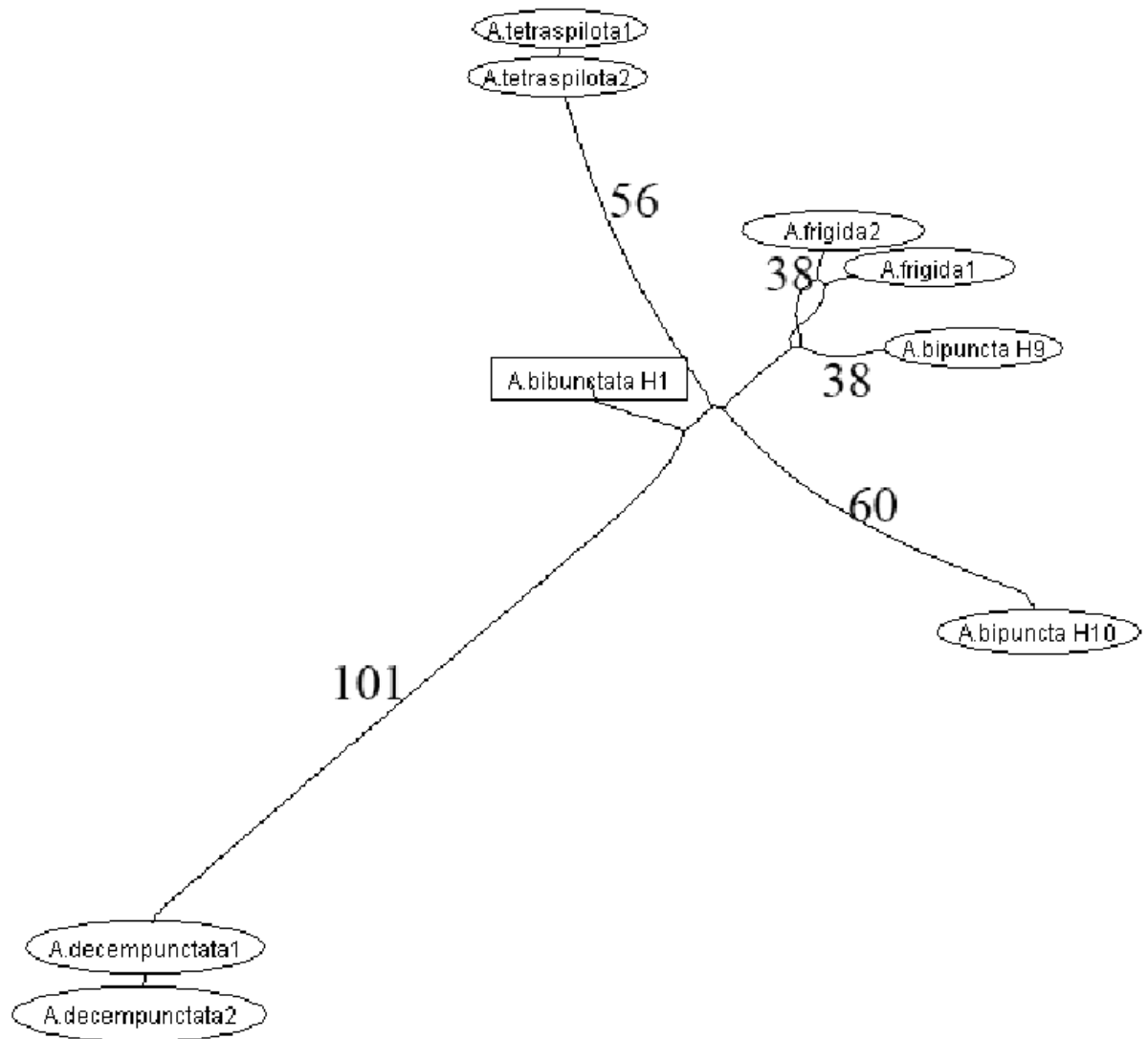
```

[
[
[
#A.bipunctataH1
#A.bipunctataH2
#A.bipunctataH3
#A.bipunctataH4
#A.bipunctataH7
#A.bipunctataH9
#A.bipunctataH10
#A.bipunctataH11
#A.bipunctataH12
#A.bipunctataH13
#A.bipunctataH14
#A.bipunctataH15
#A.bipunctataH16
#A.bipunctataH17
#A.bipunctataH18
#A.bipunctataH19
#A.bipunctataH20
#A.frigida1
#A.frigida2
#A.tetraspilota1
#A.tetraspilota2
#A.decempunctata1
#A.decempunctata2

[
[
[
#A.bipunctataH1
#A.bipunctataH2
#A.bipunctataH3
#A.bipunctataH4
#A.bipunctataH7
#A.bipunctataH9
#A.bipunctataH10
#A.bipunctataH11
#A.bipunctataH12
#A.bipunctataH13
#A.bipunctataH14
#A.bipunctataH15
#A.bipunctataH16
#A.bipunctataH17
#A.bipunctataH18
#A.bipunctataH19
#A.bipunctataH20
#A.frigida1
#A.frigida2
#A.tetraspilota1
#A.tetraspilota2
#A.decempunctata1
#A.decempunctata2

```

**Рисунок 25.** Сравнение вариабельных нуклеотидных сайтов средней области гена *COI Adalia ssp.* H1-H20 – полиморфные митохондриальные гаплотипы *Adalia bipunctata*.

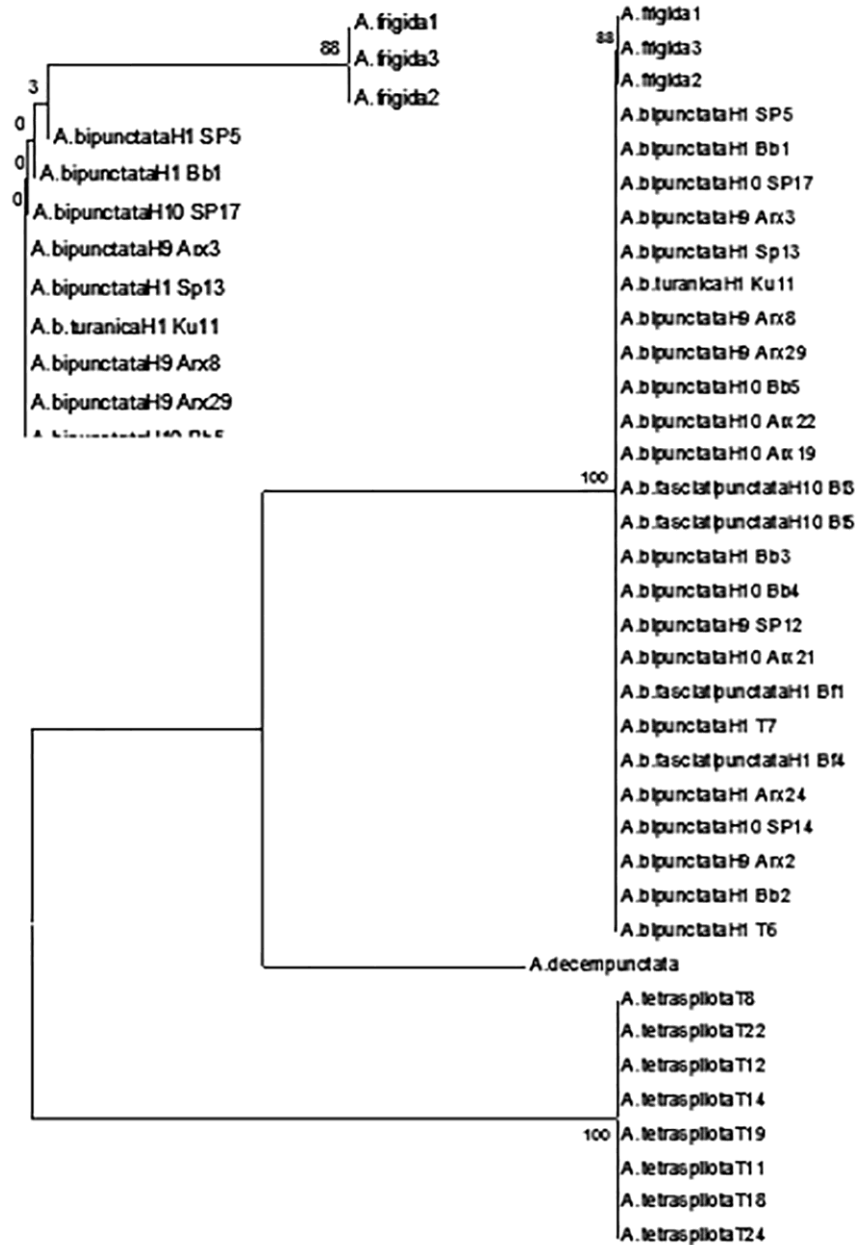


**Рисунок 26.** Медианная сеть митохондриальных гаплотипов божьих коровок рода *Adalia*. На линиях, соединяющих гаплотипы, указано количество, различающих их мутаций.

### 3.2.5 Разнообразие ядерной ДНК у жуков рода *Adalia*

Размер амплифицированного фрагмента области ITS2 составил 900 п.н. Были изучены 9 особей *A. bipunctata* и 2 особи *A. b. fasciatopunctata* с типичным гаплотипом H1, 5 особей с гаплотипом H9, 7 особей *A. bipunctata* и 2 особи *A. b. fasciatopunctata* с гаплотипом H10, 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 гаплотипа, обладали практически идентичными последовательностями ITS2. Средне число нуклеотидных замен на сайт у 25 особей *A.*

*bipunctata* составляет 0,001. Мономорфными оказались ITS2 и у других изученных видов (рис. 27). Величины эволюционной дивергенции между *A. bipunctata* и *A. frigida* составляют 1,8 %, между *A. bipunctata* и *A. decempunctata* – 41,2 %, между *A. bipunctata* и *A. tetraspilota* 57,8 %. *A. decempunctata* отличается на 41,6% от *A. frigida*; *A. tetraspilota* отличается от *A. frigida* на 58,5% и от *A. decempunctata* на 57,7%.



**Рисунок 27.** Филогенетическое древо исследованных видов *Adalia*, реконструированное на основе сравнения последовательностей ITS2 рНК 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. *fasciata* Bf – Бурятия f. *fasciata*, Ku – Киргизия, T – Ташкент

### 3.2.6 Древние митохондриальные гаплотипы в генофонде *A. bipunctata*

Jiggins и Tinsley (2005) определили, что время расхождения мт-гаплотипа H10 и остальных составляет 2,1 – 2,5 млн лет. Если принять частоту возникновения мутаций в мтДНК адалий как и у дрозофилы  $6,2 \times 10^{-8}$  (Haag-Liautard et al., 2008), то при 1 поколении в год время дивергенции составляет 1.130 млн лет. При числе поколений в год в среднем 1,5 время дивергенции - 750 тыс. лет. Расхождение гаплотипов H1 и H9 можно оценить как около 500 тыс. лет назад. Мы также попытались оценить уровень дивергенции мт-гаплотипов H1, H9 и H10, для чего сравнили стандартную последовательность начала гена *COI* длиной 571 нуклеотид, которая широко используется в так называемом штрихкодировании (barcoding) геномов. Различие между мт-гаплотипами H1 и H10 составляет 7,00 %, между H1 и H9 – 4,55 %. Таким образом, различия мт-гаплотипов H1 и H10 приближаются к уровню различий «хороших» видов. При сравнении бóльшей последовательности гена *COI* длиной 970 п.н. эволюционная дивергенция мт-гаплотипа H9 от группы других мт-гаплотипов *A. bipunctata* составляет 4,3 %, мт-гаплотипа H10 – 6,7 %, что подтверждает эти выводы.

О древности сосуществования в генофонде вида *A. bipunctata* мт-гаплотипов группы H1 и H10 говорит и тот факт, что одинаковый полиморфизм мтДНК обнаруживается как в европейских популяциях, так и в популяции из Бурятии (табл. 18). При этом популяция из Забайкалья относится к особому подвиду, описанному Я.Я.Лусисом – *A. bipunctata fasciatopunctata*. Таким образом, мт-гаплотипы H10 и остальные сосуществовали в предковой популяции *A. bipunctata* до того, как этот вид расселился по Евразии от Западной Европы до Забайкалья и до того, как дифференцировалась форма *A. bipunctata fasciatopunctata*, отличающаяся от европейской формы узором на надкрыльях. Приведенные факты свидетельствуют о древности митохондриального полиморфизма *A. bipunctata*, хотя и не позволяют точно определить его возраст. Гаплотипы H1 и H9 были обнаружены нами в Петербурге, Архангельске и в Ереване (табл. 17, 18). Обращает на себя внимание сходство последовательности мт-гаплотипа H9 с соответствующей последовательностью ДНК *A. frigida* (рис. 26). Вероятно, мт-гаплотип H9 происходит от вида, предкового по отношению к *A. frigida*. Известно, что ареал *A. frigida* занимает огромную территорию – от Скандинавии до Якутии. В нашем распоряжении было ограниченное количество образцов. Возможно, что в генофонде *A. frigida* до сих пор сохранился мт-гаплотип, близкий к H9. Желательно, поэтому, исследовать мтДНК из большего количества образцов *A. frigida* разного географического происхождения. Если

предполагать, что гаплотип Н9 перешел к *A. bipunctata* от *A. frigida*, то его обнаружение у *A. bipunctata* из Еревана можно объяснить только завозом божьих коровок с таким мт-гаплотипом из северных регионов, поскольку *A. frigida* относится к циркумполярным видам.

Мт-гаплотип Н10 показывает некоторое сходство с последовательностью *A. frigida*, но существенно отличается и от нее и от последовательностей других видов (рис. 26). Вероятно, в настоящее время в природе не сохранился тот вид, от которого *A. bipunctata* заимствовала при гибридизации мт-гаплотип Н10.

### 3.2.7 *A. bipunctata* и *A. frigida*

*A. frigida* обитает на севере Евразии, от Скандинавии до Якутии. По наблюдениям И. А. Захарова в Архангельске *A. bipunctata* и *A. frigida* обитают совместно. Для исследования в нашем распоряжении были одна особь *A. frigida* и ее потомки из Архангельска, 6 особей из Читы и 3 из Якутии (табл. 21). В сборе из Читы среди особей были типичные по рисунку *A. frigida*, т.е. с несколькими пятнами, расположенными в два ряда в задней части надкрылий и особи с промежуточным рисунком. Особи из Якутии фенотипически соответствовали *A. frigida*.

ДНК гена *COI* у особей *A. frigida* отличается от ДНК *A. bipunctata* на 4,3% (табл. 20). Такие последовательности были обнаружены нами у особей из Архангельска, одной из Читы и двух из Якутии. Остальные исследованные особи, несмотря на морфологическое сходство с *A. frigida* обладали мтДНК, соответствующей *A. bipunctata* (табл. 21).

Мы сравнили обнаруженные нами у *A. frigida* гаплотипы гена *COI*. Последовательности гена *COI* двух особей из Якутии и одной из Читы идентичны между собой (рис. 28). ДНК гена *COI* у жука из Архангельска отличается шестью заменами (0,7 %) от таковых у жуков из Якутии и Читы (рис. 28), что свидетельствует о возрасте расхождения данных популяций в 0-130 тысяч лет, если считать скорость возникновения мутаций в мтДНК равной  $6 \times 10^{-8}$ , принятую для *Drosophila* (Haag-Liautard et al., 2008) и среднее число генераций в год - 1,5. Выявленные замены нуклеотидов не приводят к смене аминокислотных последовательностей.



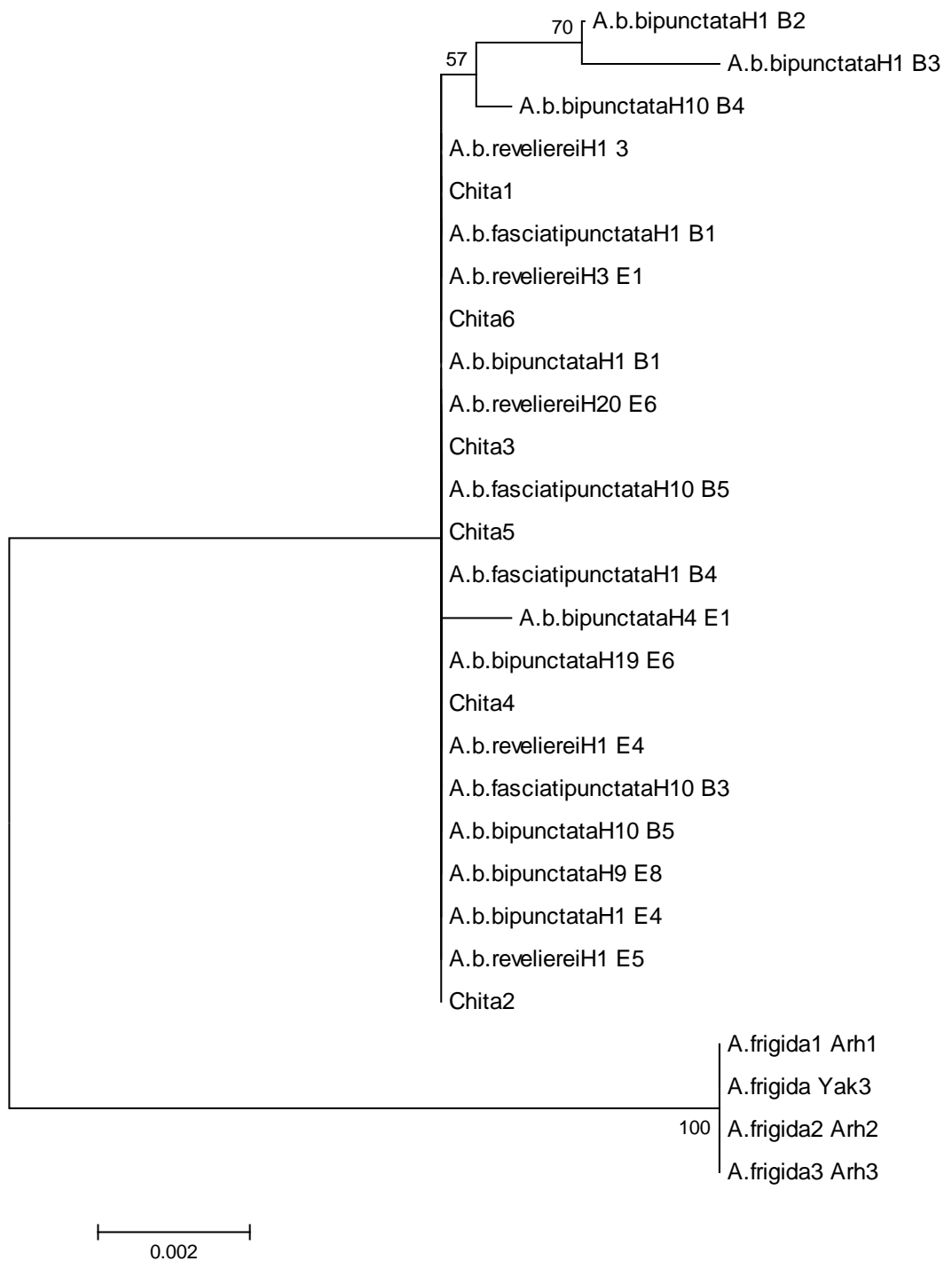
**Таблица 21.** Типы COI и ITS2 у божьих коровок из Архангельска, Читы и Якутска.

|             | № особи | COI                 | ITS2                |
|-------------|---------|---------------------|---------------------|
| Архангельск | 1       | <i>A.frigida</i>    | <i>A.frigida</i>    |
|             | 2 (F1)  | <i>A.frigida</i>    | <i>A.frigida</i>    |
|             | 3 (F1)  | <i>A.frigida</i>    | <i>A.frigida</i>    |
| Чита        | 1       | <i>A.frigida</i>    | <i>A.bipunctata</i> |
|             | 2       | <i>A.bipunctata</i> | <i>A.bipunctata</i> |
|             | 3       | <i>A.bipunctata</i> | <i>A.bipunctata</i> |
|             | 4       | <i>A.bipunctata</i> | <i>A.bipunctata</i> |
|             | 5       | <i>A.bipunctata</i> | <i>A.bipunctata</i> |
|             | 6       | <i>A.bipunctata</i> | <i>A.bipunctata</i> |
| Якутск      | 1       | <i>A.frigida</i>    | н/о                 |
|             | 2       | <i>A.bipunctata</i> | н/о                 |
|             | 3       | <i>A.frigida</i>    | <i>A.frigida</i>    |

[ 222244 ]  
 [ 377916 ]  
 [ 469118 ]  
 #frigidal\_Arkhangelsk TTCACC  
 #frigidal\_Chita ACTGCA  
 #frigidal\_Yakutia ACTGCA  
 #frigida3\_Yakutia ACTGTA

**Рисунок 28.** Варибельные сайты нуклеотидных последовательностей гена *COI A. frigida* из удаленных популяций.

ДНК области ITS2 у *A. frigida* из Архангельска и Якутии идентичны между собой и отличаются от ДНК *A. bipunctata*, величина дивергенции составляет 1,8 % (рис. 29). Для двух особей из Якутии нам не удалось получить качественных последовательностей ДНК области ITS2, выделение ДНК проводилось из коллекционного материала (сухих жуков). ITS2 всех исследованных особей из Читы, несмотря на фенотипическое сходство с *A. frigida*, соответствует ДНК *A. bipunctata* (табл. 21).



**Рисунок 29.** Дендрограмма сходства последовательностей нуклеотидов ITS2 *A. bipunctata* и *A. frigida*, построенная с использованием метода Neighbor-Joining (NJ). Цифрами указаны бутстреп-коэффициенты, рассчитанные для 1000 повторов. H1-H20 – обозначения митохондриальных гаплотипов. В – Бурятия; Е – Ереван; Yak – Якутия; Arh – Архангельск; цифрами обозначены номера особей из популяции. Chita – жуки из Читы, по фенотипу подобные *A. frigida*.

Анализ нуклеотидных последовательностей *COI* и *ITS2* у божьих коровок, морфологически схожих с *A. frigida* из Читы и Якутии, выявил случаи, когда особи с фенотипом одного вида имели ДНК другого вида. В Чите обнаружена особь с мтДНК *A. frigida* и *ITS2 A. bipunctata*. Наиболее вероятным объяснением может быть то, что это митохондриальная интрогрессия среди *A. bipunctata* и *A. frigida*, но тогда следует признать фертильность гибридов и возможность возвратных скрещиваний с родительскими видами в природе.

Различия в митохондриальной и ядерной ДНК подтвердили существование в роде *Adalia* двух, вероятно, скрещивающихся в зонах симпатрии, близких, но самостоятельных видов *Adalia bipunctata* Linnaeus, 1758 и *Adalia frigida* Schneider, 1792.

### 3.2.8 Таксономический статус географических форм *A. bipunctata*

Изученные в настоящей работе формы *A. bipunctata* со многими пятнами на красных или розовых надкрыльях, которые входят в состав полиморфных популяций подвидов *A. b. revelierei*, *A. b. turanica*, *A. b. fasciatopunctata*, являются результатом проявления аллелей гена *S*. Другие аллели этого гена определяют «европейские» варианты окраски и рисунка надкрылий – красную с двумя точками, либо черную с красными пятнами – типичные *A. b. bipunctata*. Обращает на себя внимание тот факт, что формы *A. bipunctata* со многими пятнами никогда не встречаются в Европе. Они характерны только для регионов с резко-континентальным климатом и со степной или полупустынной растительностью: Армении, Киргизии, Узбекистана, Монголии, Тувы, Бурятии, Забайкалья. Можно предположить, что либо соответствующие такому рисунку аллели сами имеют плейотропный физиологический эффект, либо они тесно сцеплены (образуют устойчивые гаплотипы) с генами, благоприятствующими выживанию в условиях резко континентального и засушливого климата. В более влажных регионах – Европе и Сибири, эти генотипические варианты оказываются неадаптивными и не поддерживаются в популяциях.

Выполненные нами исследования позволили впервые определить последовательности генов мтДНК и рРНК для *A. b. turanica* и *A. b. revelierei* и провести сравнение этих подвидов с *A. b. bipunctata* и *A. b. fasciatopunctata*.

Среди *A. b. bipunctata*, *A. b. fasciatopunctata*, *A. b. revelierei* и *A. b. turanica* были обнаружены 20 переменных мт-гаплотипов по гену *COI*, но ни один из них не был уникальным для какой-либо из форм. Различия 18 из обнаруженных 20 мт-гаплотипов между собой составляют от 1 до 4 нуклеотидов. Мт-гаплотип H1 является самым распространенным гаплотипом во всех выборках и на медианной сети видно, что он является корневым, предковым гаплотипом по отношению к остальным семнадцати (рис. 24). Два мт-гаплотипа, H9 и H10, значительно отличаются от остальных. Гаплотип H9, который встречается в популяциях *A. b. bipunctata* северных районов Западной Европы (Schulenburg et al., 2002; Jiggins, Tinsley, 2005), обнаружен нами в Санкт-Петербурге и Архангельске и у особей из Еревана. Мт-гаплотип H10 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, Бурятия. Единственная зараженная *Rickettsia* особь в популяции Улан-Уде, Бурятия относится к *A. b. fasciatopunctata* и имеет мт-гаплотип H10, и в этом также не отличается от *A. b. bipunctata*.

В отличие от мтДНК область ITS2 оказалась абсолютно консервативной. Все изученные особи *A. b. bipunctata*, вне зависимости от митохондриального гаплотипа, обладали практически идентичными последовательностями ITS2.

Таким образом, проведенный анализ структуры ДНК *A. b. fasciatopunctata*, *A. b. revelierei* и *A. b. turanica*, не обнаружил разницы в нуклеотидном составе ДНК изученных генов. На основании анализа ДНК нельзя считать морфологически различающиеся формы *A. b. bipunctata*, *A. b. fasciatopunctata*, *A. b. revelierei* и *A. b. turanica* отдельными самостоятельными видами. Можно утверждать, что *A. b. fasciatopunctata*, *A. b. revelierei* и *A. b. turanica*, иногда описываемые как отдельные виды, являются лишь географическими формами политипического вида *Adalia bipunctata*.

## Глава 4. ОБСУЖДЕНИЕ

### 4.1 Генетические различия между таксонами в родах *Culex* и *Adalia*

У близких видов и подвидов комаров *Culex* и божьих коровок *Adalia* морфологические признаки из-за их вариабельности далеко не всегда позволяют идентифицировать особь. В отличие от морфологических признаков, анализ ДНК позволяет определить таксономическую принадлежность насекомого, после чего становится возможным выявить структуру локальных популяций и генетические процессы, происходящие в популяциях изученных насекомых.

Обнаруженная степень эволюционной дивергенции (число нуклеотидных различий в пересчете на сайт, выраженное в процентах) в нуклеотидном составе ДНК 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%.

Степень дивергенции ДНК в гене *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 низкая (0,1 - 0,3 %), однако, были обнаружены фиксированные замены нуклеотидов у представителей таксонов из аллопатрических популяций. У *C. p. pipiens* формы *pipiens* обнаружены 3 митохондриальных гаплотипа, которые различаются 1 и 2 нуклеотидными заменами и были обозначены нами как А, В и С. У *C. p. pipiens* 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 E, отличающийся также двумя мутациями от гаплотипов *C. p. pipiens*. Выявленные различия сохраняются и в симпатрических популяциях умеренного климата, что предполагает существование изолирующих механизмов. Разработанный нами метод ПЦР-ПДРФ на основе анализа нуклеотидного состава 5' конца гена *COI* мтДНК позволил предложить быстрый способ диагностики комаров *C. p. pipiens* (f. *pipiens* и f. *molestus*), *C. p. quinquefasciatus*, *C. torrentium* и *C. modestus*.

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* составляет 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 %. Обнаруженные различия выражаются в нескольких протяженных делециях у *C. torrentium* и разница в размере ПЦР-продукта составляет 52 п.н., что позволяет легко выявлять особей этих видов и идентифицировать гибриды. Большие различия обнаружены между видами *C. pipiens* и *C. torrentium*, 37 %, в ДНК области IGS. 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 %. Межпопуляционные различия между *C. p. quinquefasciatus* и *C. p. pipiens* формы *pipiens* (2,2 %) или формы *molestus* (2,4 %) оказались сравнимы с различиями между комарами *C. p. quinquefasciatus* из двух популяций Индии (2,7 %) и с величинами дивергенции между подвидами *C. pipiens*. Наименьшее разнообразие IGS было обнаружено у комаров формы *molestus* (0,13 %); комары формы *molestus* из подвала Москвы группируются вместе с особями из удаленной популяции Волгограда, демонстрируя большее сходство комаров формы *molestus* друг с другом, чем с особями из соседней подмосковной популяции формы *pipiens*.

У божьих коровок рода *Adalia* по мтДНК наибольшая степень дивергенции наблюдается между *A. decempunctata* и остальными видами и составляет в среднем 12,5 %. 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 *A. frigida*. В то же время, внутри вида *A. bipunctata* изменчивость ДНК гена *COI* не превышала 0,9 % (табл. 19) и в среднем составила 0,4 %.

Нуклеотидные последовательности исследованного участка ядерной ДНК области ITS2 у всех особей *A. bipunctata*, вне зависимости от гаплотипа, оказались практически

идентичными. 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 рДНК.

Проведенный анализ ДНК *A. b. turanica*, *A. b. revelierei* и *A. b. fasciatopunctata*, 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. Среди отличающихся по морфологии *A. b. bipunctata*, *A. b. fasciatopunctata*, *A. b. revelierei* и *A. b. turanica* были обнаружены 20 варибельных мт-гаплотипов по гену *COI*, но ни один из них не был уникальным для какой-либо из форм. Мт-гаплотип H1 является самым распространенным гаплотипом во всех выборках и вероятно является корневым, предковым гаплотипом по отношению к остальным семнадцати. В отличие от мтДНК область ITS2 у *A. bipunctata* оказалась абсолютно консервативной, вне зависимости от митохондриального гаплотипа, все исследованные особи обладали практически идентичными последовательностями ITS2. На основании анализа ДНК можно утверждать, что *A. b. fasciatopunctata*, *A. b. revelierei* и *A. b. turanica*, иногда описываемые как отдельные виды, являются лишь географическими формами политипического вида *Adalia bipunctata*.

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.

Различия по мтДНК между морфологически различающимися видами, для которых известны репродуктивные барьеры и между внутривидовыми формами оказались сравнимы у насекомых двух родов, *Adalia* и *Culex* (табл. 22). Наши результаты коррелируют и с результатами Ю.Ф.Картавцева, который свел данные 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).

**Таблица 22.** 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> |
| ITS2           | н/о          | 41; 57 %      | 14,7%        | 1,8%          | 0,1- 0,6 %       | 0,1%                |
| <i>COI</i>     | 5,14%        | 12,5; 6,2%    | 3,5%         | 4,3%          | 0,1 - 0,3%       | 0,1-0,4%            |

По ядерной ДНК различия между близкими видами *C. pipiens* и *C. torrentium* (14,7%) оказались намного больше, чем различия между близкими *A. bipunctata* и *A. frigida* (1,8 %), различия по мтДНК сравнимы (табл. 22). 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. Зараженность *Wolbachia* также способствовала распространению связанных с ней митохондриальных гаплотипов в популяциях *C. pipiens*.

## 4.2 Влияние симбионтов на разнообразие мтДНК в популяциях *Culex* и *Adalia*

### 4.2.1 Корреляция мт-гаплотипов и типа бактерии

Симбиотическая бактерия *Wolbachia* была выявлена в *C. pipiens* и доказано, что с ней связаны по меньшей мере 17 вариантов цитоплазматической несовместимости при скрещивании комаров из разных популяций (Laven, 1967). В 30 природных популяциях в России комары вида *C. pipiens* оказались заражены *Wolbachia*, а вида *C. torrentium* - нет.



Отсутствие бактерии у комаров *C. torrentium* было обнаружено нами впервые. Инфицированность разных популяций *C. pipiens* варьировала, но всегда была высокой, 70-100%.

Метод идентификации различных групп *W. pipientis*, основанный на полиморфизме ДНК генов *pk1* и *ank2* *W. pipientis*, позволил нам обнаружить различия между штаммами бактерии в изученных популяциях и выявить связь между типом мтДНК и зараженностью определенным вариантом этой бактерии. Митохондриальные гаплотипы А, В и С распространяются 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 других вариантов распределения цитоплазматических компонентов у 380 особей из 32 мест сбора от Португалии до Томска и от Санкт-Петербурга до Индии не было обнаружено.

Существующая связь мт-гаплотипов хозяина по гену *COI* и штаммов *Wolbachia* с подвидовой принадлежностью комаров среди зараженных популяций *C. pipiens* может свидетельствовать о том, что расхождение таксонов проходило одновременно с дивергенцией штаммов бактерии и не поддерживает предположение о случайном заражении комаров комплекса разными штаммами. Это также позволяет предположить, что первоначальное заражение *C. pipiens* эндосимбиотической бактерией произошло раньше дивергенции подвидов. 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, встречающимся совместно с *wPip-IV*.

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 *wPip* групп и изоляции между популяциями за счет ЦН, обнаруженные нами различия в ДНК гена *COI* у членов комплекса *Culex pipiens* являются следствием экспансии в популяциях связанных с бактерией мт-гаплотипов.

У *A. bipunctata* наблюдается корреляция мт-гаплотипа H10 с зараженностью бактерией *Rickettsia*, по литературным данным известно заражение риккетсией божьих

коровок с гаплотипом Н9. Бактерии рода *Spiroplasma* инфицируют жуков с мт-гаплотипом Н1 и с гаплотипами Н2, Н3, Н11 и Н17, отличающимися от Н1 одной нуклеотидной заменой. Вероятно, наиболее распространенный мт-гаплотип Н1 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*.

#### 4.2.2 Степень изменчивости ДНК у зараженных и незараженных видов и популяций

У представителей комаров комплекса *Culex pipiens* мы определили всего 16 гаплотипов (А-О), из них 10 в популяциях незараженного симбионтами *C. torrentium*. Среди подвидов *C. pipiens* обнаружено 6 мт-гаплотипов, различия между ними составили от одного до трех нуклеотидных замен в последовательности гена *COI* размером 1542 п.н. Для *C. p. pipiens* 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. 23). Отсутствует изменчивость полных последовательностей гена *COI* у *C. p. pipiens* формы *molestus* из России, Германии, Италии, Марокко и Туниса, все 23 особи обладают идентичными последовательностями типа D (табл. 12). Все обнаруженные замены оказались транзициями А↔G, находятся в третьих положениях кодонов и не меняют аминокислотную последовательность. Известно, что максимальное мутационное давление в генах мтДНК человека испытывают гуаниновые основания и происходит смещение мутационных спектров в сторону транзиций G→A (Малярчук, 2005), вероятно, это характерно и для насекомых и поэтому количество транзиций А↔G много больше, чем других мутаций.

Напротив, для каждого из десяти изученных неинфицированных *Wolbachia* комаров *C. torrentium* из трех различных популяций обнаружены собственные гаплотипы (F-O). При этом полиморфизм гена *COI* мтДНК *C. torrentium* выражается не только в нуклеотидных различиях, но и в замене некоторых аминокислот. У особей этого вида

обнаружены два случая гетероплазмии. Уровень нуклеотидного разнообразия ( $P_i$ ) 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 5,5 раз больше, чем уровень разнообразия *C. p. pipiens* формы *pipiens*. Величина гаплотипического разнообразия ( $H_d$ ) у *C. torrentium* составляет 1, у *C. p. pipiens* формы *pipiens*  $H_d=0,71$ , у формы *molestus* разнообразия ДНК нет,  $P_i=0$  и  $H_d=0$ . При попарном сравнении нуклеотидных последовательностей гена *COI* методом Максимального правдоподобия, среднее значение нуклеотидных замен на сайт в выборке из 20 зараженных бактерией *C. p. pipiens* обеих форм составляет 0,001, в выборке из 10 незараженных *C. torrentium* – 0,004 (табл. 23).

**Таблица 23.** Генетические различия между членами комплекса *Culex pipiens*, данные получены по программе DNA Sequence Polymorphisms - Dna SP (Librado, Rozas, 2009) на основе анализа ДНК гена *COI*. Оценка генетической дифференциации ( $F_{st}$ ) рассчитана по Нею (Nei, 1973).

| Таксоны комплекса      | Значения генетических различий внутри таксона |    |      |         |      |       | Fst       |            |
|------------------------|---|----|------|---------|------|-------|-----------|------------|
|                        | h   | S  | Hd   | Pi      | K    | d     | f.pipiens | f.molestus |
| <i>C.p.p.f.pipiens</i> | 3   | 3  | 0,71 | 0,0008  | 0,89 | 0,001 |           |            |
| <i>C.p.p.f.molestu</i> | 1   | 0  | 0    | 0       | 0    |       | 0,78      |            |
| <i>C.torrentium</i>    | 10  | 21 | 1    | 0,00346 | 4,4  | 0,004 | 0,93      | 0,94       |

h – количество гаплотипов; S – число нуклеотидных замен (сайтов сегрегации);  $H_d$  – гаплотипическое разнообразие;  $P_i$  – нуклеотидное разнообразие; K – среднее количество различий; d – среднее значение нуклеотидных замен в пересчете на сайт.

Отсутствие уменьшения нуклеотидного разнообразия в ядерной ДНК 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. Тот же показатель изменчивости последовательностей IGS составляет в среднем у *C. p. pipiens* обеих форм 0,025, а у *C. torrentium* - 0,008. 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. Сходные результаты были получены в работе Rasgon и соавторов (2006), в которой не было обнаружено различий в изменчивости генов рРНК между инфицированными *Wolbachia C. p. pipiens* и *C. p. quinquefasciatus* и неинфицированной популяцией *C. p. pipiens* в Африке, тогда как различия по гену *ND4* мтДНК были значительны (Rasgon et al., 2006).

Эффект зараженности симбиотической бактерией на разнообразие мтДНК впервые показан и для жуков *A. bipunctata*. У зараженных *Spiroplasma* особей обнаружены 5 мт-гаплотипов, преобладает мт-гаплотип Н1. В то же время, среди жуков, для которых зараженность *Spiroplasma* не выявлена, определены 15 мт-гаплотипов. Среди зараженных *Spiroplasma* жуков в Санкт-Петербургской популяции уровень полиморфизма мтДНК снижен на порядок – среднее значение нуклеотидных различий у зараженных *Spiroplasma* жуков оказалось равным 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 Н9 и Н10. Но и без учета гаплотипов Н9 и Н10 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 24.** Сравнение разнообразия ДНК у зараженных и незараженных симбионтами особей

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

\*значение без отличающихся гаплотипов Н9 и Н10

Таким образом, у насекомых двух родов обнаружено снижение разнообразия мтДНК (частоты встречаемости переменных мт-гаплотипов) в выборках зараженных симбиотическими бактериями особей, разнообразие ядерной ДНК при этом не снижается (табл. 24). 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*.

### 4.3 Географические закономерности в распространении мт-гаплотипов *Culex* и *Adalia*

Разработанные нами молекулярные методы диагностики, безусловно, являются перспективными в изучении насекомых, идентификация которых в рамках традиционной таксономии вызывает определенные трудности. Они 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*.

Всего, по результатам проведенного анализа изменчивости ДНК гена *COI* у 1721 комара в 65 природных популяциях комплекса *Culex pipiens* из России и ближнего зарубежья, однородные популяции *f. 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 А (В и С) обнаружены в однородных популяциях *f. 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 А и D были найдены в южных популяциях в окрестностях Краснодара, в Волгограде и Владикавказе, в Батуми (Грузия) и в Евлахе (Азербайджан).

Распределение мт-гаплотипов *Culex pipiens* демонстрирует выраженную географическую ориентацию (рис. 21). Наблюдаемые варианты гена *COI* у особей из географически-удаленных мест обитания свидетельствуют о том, что это не случайные мутации, а появившиеся однажды мт-гаплотипы, распространившиеся по ареалу вида. 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. 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; Тайланд 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. Последние могут быть результатом ошибочного определения таксономического статуса или гибридами с мтДНК *C. p. quinquefasciatus*.

Таким образом, район Средиземноморья выступает как зона перекрывания 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, 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 и отсутствие строгой репродуктивной изоляции между подвидами позволяют им не только существовать, но 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 монофилетичность линии, объединяющей географически удаленные популяции подвальных комаров *C. p. pipiens* формы *molestus* на территории Европейской части России. Единообразие цитоплазматических компонентов у особей формы *molestus* в России и в Тунисе 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 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 цитоплазматических компонентов 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. 23) поддерживается такими факторами, как неспособность гибридов к диапаузированию, стено- и эвригамность и биотопическая изоляция. Репродуктивная изоляция между формами *pipiens* и *molestus* может быть связана также с цитоплазматической несовместимостью, которую вызывают генетически различные штаммы *W. pipientis*. В опытах по изучению цитоплазматической несовместимости в 91,4% двусторонне несовместимых скрещиваний участвовали комары, инфицированные wPip-IV (Ayame et al., 2014).

Среди *A. b. bipunctata*, *A. b. fasciatopunctata*, *A. b. revelierei* и *A. b. turanica* были обнаружены 20 вариабельных мт-гаплотипов по гену *COI* (рис. 24), но ни один из них не был уникальным для какой-либо из форм или для определенного географического региона. Два мт-гаплотипа, H9 и H10, значительно отличаются от остальных. Гаплотип H9, ранее наблюдаемый только в популяциях *A. bipunctata* из северных районов Европы, обнаружен нами у *A. b. bipunctata* в популяциях из Санкт-Петербурга и Архангельска, но также и из Еревана. Мт-гаплотип H10 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 вида *A. bipunctata* на две группы мт-гаплотипов – H10 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* (рис. 30). 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 адалий. Наиболее ярким примером является популяция Кемь, где с высокой частотой встречается *Rickettsia*, которая редко выявляется в других популяциях России.



**Рисунок 30.** Карта распространения исследованных видов рода *Adalia* и *COI* гаплотипов *A. bipunctata*. *A. decempunctata* обозначены зеленым ромбом, *A. tetraspilota* – желтым квадратом, *A. frigida* – красными треугольниками, Мт-гаплотипы *A. bipunctata* обозначены на легенде карты, под Н1 подразумеваются близкие гаплотипы Н1-Н20, за исключением Н9 и Н10.

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., 2011б), 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 митохондриальных вариантов.

*Adalia bipunctata* могут быть инфицированы четырьмя разными симбионтами. Мы не обнаружили заражение одной популяции *A. bipunctata* несколькими бактериями 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 Н9 и Н10 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 бактерии 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 генов-супрессоров хозяина, которые по-разному влияют на передачу различных андроцидных агентов и поддерживают полиморфизм по статусу инфицированности в популяции. Хотя прямых доказательств существования генов-супрессоров андроцида у *Adalia* нет, есть доказательства, что эффективность «male-киллеров» зависит от хозяйского генотипа (Randerson et al., 2000).

Механизм, посредством которого вирулентность бактерии влияет на вторичное соотношение полов в популяции был продемонстрирован в ассоциации между *Spiroplasma poulsonii* и *Drosophila melanogaster* (Veneti et al., 2005). Функциональный комплекс дозовой компенсации генов X-хромосомы у дрозофилы предполагается главным компонентом генетического контроля андроцида. Эндосимбионты не могли убивать самцов, лишенных любого из пяти белковых компонентов комплекса дозовой компенсации. Этот результат использован для получения более полного представления о механизме андроцида, который до сих пор остается до конца неизвестным (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 и, следовательно, возможно заражение особей другими бактериями. Случайное расселение зараженных и незараженных жуков привело к отсутствию географических закономерностей распределения митохондриальных гаплотипов, связанных с симбионтами, в популяциях адалий.

#### 4.4 Гибридизация и интрогрессия мтДНК в зонах симпатрии

В зоне Средиземноморья степень репродуктивной изоляции между таксонами комплекса *Culex pipiens* много меньше, чем в северных регионах Европы. Анализ структуры ДНК средиземноморских популяций выявил множественные случаи гибридизации особей, принадлежащих разным подвидам и формам. В зоне Средиземноморья обнаружены 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* и особи с ядерной ДНК *C. p. pipiens* и мтДНК *C. p. quinquefasciatus*, которую они получили в результате межподвидовой гибридизации. Несмотря на это, обнаружена статистически достоверная корреляция между типом *COI* и таксономической принадлежностью - Chi-square = 732.71, d.f. = 8, P<0.0001 (табл. 15).

В Португалии, Италии, Греции, Израиле и Марокко обнаружен мт-гаплотип E, характерный для *C. p. quinquefasciatus*. У образцов из Португалии - также его вариант E1. Все особи с гаплотипами E и E1 заражены wPip-I. На греческом острове Кос и среди комаров из Танжера, Марокко по результатам анализа ядерного маркера – участка интрона гена ацетилхолинэстеразы 2 (ACE2) найдены гибриды между *C. p. pipiens* и *C. p. quinquefasciatus*. Остальные особи с гаплотипами E и E1 относятся к подвиду *C. p. pipiens* согласно результатам анализа ядерного локуса ACE2 и, скорее всего, представляют собой примеры цитоплазматической интрогрессии (табл. 14).

Зона интрогрессии между *C. p. pipiens* и *C. p. quinquefasciatus* известна в США между 36° с.ш. и 39° с.ш. В этой зоне комары обоих подвидов, а также их гибриды симпатрично сосуществуют. Для гибридов в этой зоне США характерны промежуточные морфологические признаки, в частности, DV/D индекс самцов. Все популяции комплекса *Culex pipiens* в гибридной зоне находятся в равновесии Хайди-Вайнберга по полиморфным белковым маркерам (Urbanelli et al., 1997; Cornel et al., 2003). Гибридная зона в Северной Америке доказывает отсутствие барьеров для скрещивания особей *C. p. quinquefasciatus* и *C. p. pipiens* в природе, однако считается, что пустыня Сахара является естественным барьером для скрещиваний *C. p. quinquefasciatus* и *C. p. pipiens* в Палеарктике (Gomes et al., 2012). Известно, что транспортные перевозки могут способствовать распространению комаров на далекие расстояния. Случайный завоз *C. p. quinquefasciatus* и скрещивание с местными *C. p. pipiens* приводит к образованию гибридной популяции, как мы обнаружили на греческом острове Кос и в Танжере. Далее, гибридные особи скрещиваются с местными комарами и, как было доказано в лабораторных экспериментах, через шесть поколений (Sinkins et al., 2005) происходит полное замещение ядерного генома на ДНК *C. p. pipiens*. Такие особи обладают ядерной ДНК *C. p. pipiens* и митохондриальной ДНК *C. p. quinquefasciatus*.

Интрогрессия происходит там, где ареалы популяций *C. p. pipiens* и *C. p. quinquefasciatus* перекрываются, в Северной Америке и в Юго-восточной Азии, но сохранение родительских фенотипов вне зоны интрогрессии свидетельствует о

существовании независимых таксономических единиц, видов или подвидов. Есть сведения о существовании на протяжении долгого времени симпатрических популяций *C. p. pipiens* и *C. p. quinquefasciatus* в Юго-восточной Африке без смешивания (Cornell et al., 2003). Именно возможность гибридизации и существование барьеров для скрещивания между *C. p. pipiens* и *C. p. quinquefasciatus* в разных географических районах земного шара является причиной, почему некоторые авторы считают их видами, тогда как другие - только подвидами. В зоне Средиземноморья гибриды между *C. p. pipiens* и *C. p. quinquefasciatus* найдены нами впервые.

Возможно, мы обнаружили не только редкие случаи гибридизации, приведшие к цитоплазматической интрогрессии, и последующее распространение на север гибридных особей, но и распространение *C. p. quinquefasciatus* на север и сдвиг зоны гибридизации в Палеарктике, для доказательства этого требуются дополнительные исследования. 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*. Косвенным доказательством того, что комары *C. p. pipiens* с мт-гаплотипом Е отличаются по физиологии, может служить их отсутствие в умеренном климате. Возникает вопрос о существовании разных экотипов *C. p. pipiens*, помимо *pipiens* и *molestus*, которые могут представлять разную эпидемиологическую опасность.

У божьих коровок *A. bipunctata* можно предполагать интрогрессию мт-гаплотипов Н9 и Н10 и мы показали, что виды, от которых были заимствованы гаплотипы Н9 и Н10 в природе не сохранились. Мт-гаплотип Н10 генетически одинаково далек от *A. bipunctata*, *A. frigida* и *A. tetraspilota*, большая генетическая дистанция отделяет его и от *A. decempunctata*. Последовательности типа Н10 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 Н9 в два раза ближе к *A. frigida* (2,3 %), чем к *A. bipunctata* (4,3 %). Генетические дистанции Н9 с *A. tetraspilota* (7 %) и *A. decempunctata* (13,5 %) идентичны таковым для Н10. Сравнение ядерных последовательностей ITS2 генов рРНК в выборках особей с мт-гаплотипами Н9 и Н10 и с другими мт-гаплотипами не выявило различий между особями с Н9 и Н10 и *A. bipunctata* с другими мт-гаплотипами, все они составляют единую популяцию.

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 с мт-гаплотипами 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, как 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 риккетсией, 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 риккетсией, сохранились до сих пор в большинстве популяций *A. bipunctata* и уже не проявляют никакой географической ассоциации. Время дивергенции мт-гаплотипов Н1 и Н10 оценивается 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 имели ДНК другого вида. В Чите обнаружена особь с мтДНК *A. frigida* и *ITS2* *A. bipunctata*. Проведенный анализ ДНК *A. bipunctata* и *A. frigida* позволяет утверждать, что это близкие, но самостоятельные виды, скрещивающиеся в зонах симпатрии. Я. Я. Лусис отмечал репродуктивную изолированность жуков *A. bipunctata* и *A. frigida*, хотя и наблюдал появление гибридов первого поколения, а нарушение процессов размножения

проявлялись только со второго поколения (Лусис, 1976). По нашим данным следует признать фертильность гибридов и возможность возвратных скрещиваний с родительскими видами в природе.

Таким образом, 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.

Случаи интрогрессии мтДНК, выявленные в двух различных группах видов, показывают, что в практической работе по идентификации видовой принадлежности насекомых в зонах симпатрии нельзя ограничиваться митохондриальными маркерами, в частности, используемой в «штрихкодировании» последовательностью гена *COI*. Анализ этих маркеров следует дополнять анализом ядерных маркеров, для чего может быть рекомендована последовательность *ITS2* для *Adalia* и *ACE2* для *Culex*. 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 различных других видовых комплексов у 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, H9 и H10, 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 H1 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 H10. 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.

## БЛАГОДАРНОСТИ

Я приношу искреннюю благодарность моему научному руководителю – член-корр. РАН, профессору Илье Артемьевичу Захарову-Гезехусу за руководство и всемерную поддержку в работе. Я искренне признательна д.б.н. Елене Борисовне Виноградской 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 Программы фундаментальных исследований Президиума РАН «Динамика генофондов растений, животных и человека» и «Живая природа».



## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Алтухов Ю. П. Генетические процессы в популяциях. М.: Академкнига, 2003. 431с.
2. Бутько Е. В. Экология и внутривидовая изменчивость кокциnellид (Coleoptera, Coccinellidae) в Восточном Забайкалье. Автореф. дис. канд. биол. наук: 03.00.16. Улан-Удэ, 2005. 185 с.
3. Виноградова Е. Б. Комары комплекса *Culex pipiens* в России. СПб.: Труды Зоологического института РАН, 1997. 307 с.
4. Виноградова Е. Б. Городские комары, или "Дети подземелья" // Серия "Разнообразие животных". Вып. 2. М.- СПб.:Т-во научных изданий КМК, 2004. 96 с.
5. Виноградова Е. Б., Шайкевич Е. В. Дифференциация городского комара *Culex pipiens pipiens f. molestus* (Diptera, Culicidae) и *Culex torrentium* молекулярно-генетическими методами // Паразитология. 2005. Т. 39. С. 574-576.
6. Виноградская О. Н. К нахождению *Culex torrentium* Martini (*Culex exilis* Dyar) в Подмоскowie // Мед.паразитол. 1970. № 4. С. 502-504.
7. Ганушкина Л. А. Дремова В. П. Характеристика рода *Culex*, отдельных видов, эпидемиологическое значение // Пест-Менеджмент. 2006. № 4. С. 7-12.
8. Гуцевич А. В., Мончадский А. С., Штакельберг А. А. Фауна СССР. Насекомые двукрылые. Комары сем. Culicidae. JL, 1970. Т. 3. Вып. 4. 384 с.
9. Горностаева Р. М., Данилов А. В. Комары (сем. Culicidae) Москвы и Московской области. М.: КМК Scientific Press, 1999. 342 с.
10. Добржанский Ф. Г. О географической и индивидуальной изменчивости *Adalia bipunctata* L. и *Adalia decempunctata* L. (Coleoptera, Coccinellidae) // Русск. Энтом. Обозр. 1924. XVIII. С. 201-211.
11. Дубицкий А. М. Кровососущие комары Казахстана. Алма-Ата, 1970. 220 с.
12. Захаров И. А. Двучечная божья коровка (*Adalia bipunctata*) как генетический объект // Генетика. 1995. Т.31. № 2. С. 149-161.
13. Захаров И. А. Изучение наследования рисунка на надкрыльях у *Adalia bipunctata* // Генетика. 1996. Т. 32. № 4. С. 579-583.
14. Захаров И. А. Основы генетики. В кн.: Виноградовой Е.Б. Комары комплекса *Culex pipiens* в России. СПб., 1997. С.205-223.

15. Захаров И. А., Шайкевич Е. В., Горячева И. И. Бактерии рода *Spiroplasma* инфицируют двуточечную божью коровку (*Adalia bipunctata* L.) в России // ДАН. 1998. Т.362. № 4. С. 570-573.
16. Захаров И. А., Горячева И. И., Шайкевич Е. В., Доржу Ч. М. Распространение в популяциях *Adalia bipunctata* L. Евразии цитоплазматически наследуемой бактерии рода *Spiroplasma*, влияющей на соотношение полов // Генетика. 2000а. Т.36. № 2. с.191-194.
17. Захаров И. А., Горячева И. И., Шайкевич Е. В., Граф фон дер Шуленбург Х., Межерес М. Э. Н. *Wolbachia* - новая бактерия, вызывающая сдвиг в соотношении полов у двуточечной божьей коровки *Adalia bipunctata* L. // Генетика. 2000б. Т.36. № 4. с.482-486.
18. Захаров И. А. Динамика генофонда петербургской популяции *Adalia bipunctata* за 75 лет наблюдений // Экологическая генетика. 2009. Т.7 № 4. С. 57-59.
19. Красикова Кровососущие насекомые и клещи, борьба с ними // Природные ресурсы Томской области. 1966. С. 188-194
20. Кузнецов В. Н. Фауна и распределение кокцинеллид (Coleoptera: Coccinellidae) на Дальнем Востоке России // Труды Русского энтомологического общества. С.-Петербург, 2006. Т. 77. С. 192-199.
21. Кункова Е. В., Федорова В. Г. 2003. Дополнение к фауне комаров сем. Culicidae (Diptera) Новгородской области // Паразитология. Т.37, №2, 113-117
22. Кухарчук Л. П., Виноградская О. Н. Кровососущие комары (Diptera, Culicidae) Сибири. Новосибирск: Наука, 1980. 223 с.
23. Лопатин О. Е. Характеристика полиморфных ферментных систем комаров и их диагностическая ценность. В кн.: Виноградовой Е.Б. Комары комплекса *Culex pipiens* в России. СПб., 1997. С. 164-181.
24. Лопатин О. Е. Комары *Culex pipiens*: электрофоретическая изменчивость ферментов // Сибирский экологический журнал. 2000. № 4. С.461-475.
25. Лус Я. Я. О наследовании окраски и рисунка у божьих коровок *Adalia bipunctata* L. и *Adalia decempunctata* L. // Изв. Бюро ген. 1928. Т. 6. С. 89-163.
26. Лус Я. Я. Анализ явления доминирования при наследовании рисунка элитр и переднеспинки у *Adalia bipunctata* L. // Тр. Лабор. Генет. 1932. Т.9. С. 135-162.

27. Лус Я. Я. Некоторые закономерности размножения популяций *Adalia bipunctata* L. Бессамцовые линии в популяциях // Докл. АН СССР. 1947. Т. 57. № 8. С.951-954.
28. Лусис Я. Я. О биологическом значении полиморфизма окраски у двуточечной коровки - *Adalia bipunctata* L. // Latvijas entomologs. 1961. Т. 4. С. 1-21.
29. Лусис Я. Я. Таксономические отношения и географическое распространение форм жуков рода *Adalia* Mulsant // Проблемы генетики и эволюции. Рига, 1973. Вып. I. С. 5-128.
30. Лусис Я. Я. О систематическом положении *Adalia frigida* Schneider (Coleoptera, Coccinellidae) // Генетико-селекционные исследования в Латв. ССР, тез. докл. конф. Рига: Зинатие, 1976. С. 3-6.
31. Малярчук Б. А. Анализ распределения нуклеотидных замен в генах митохондриальной ДНК человека // Генетика. 2005. Т. 41. N. 1. С. 93-99.
32. Маркович Н. Я., Заречная С. Н. Материалы по распространению *Culex pipiens* на территории СССР // Медицинская паразитология и паразитарные болезни. 1992. Вып.1. С. 5-9.
33. Мончадский А. С. Личинки кровососущих комаров СССР и сопредельных стран (подсем. Culicinae). М.-Л.: Изд-во Академии наук СССР, 1951. 290 с.
34. Оленев Н. О. 1940. Комары Нижнего Поволжья и борьба с ними. Саратов: Облгиз, 1940. 87 с.
35. Паленко М. В., Шайкевич Е. В., Муха Д. В., Захаров И. А. Молекулярно-генетические подходы к филогении жуков семейства Божьи коровки (Coleoptera: Coccinellidae) // Энтомологическое обозрение. 2004а. Т.83. № 4. С. 876-879.
36. Паленко М. В., Муха Д. В., Захаров И. А. Изменчивость митохондриального гена цитохромоксидазы I внутри вида *Adalia bipunctata* и между видами жуков семейства божьи коровки (Coleoptera, Coccinellidae) // Генетика. 2004б. Т.40. №2. С.205-209.
37. Сергиевский С. О., Захаров И. А. Экологическая генетика популяций *Adalia bipunctata*: концепция "жесткого и гибкого" полиморфизма / Исследования по генетике. Л.: Изд-во Ленинградского университета, 1981. № 9. С.112-129.

38. Сичинава Ш. Г. Реципрокное скрещивание *Culex pipiens pipiens* с *Culex pipiens molestus*, копуляция и соотношение полов родительских и гибридных поколений. // Сообщ. АН ГрСССР. 1975. Т. 80. №3. С. 733-736.
39. Сулимова Г. Е., Удина И. Г., Зинченко В. В. Анализ полиморфизма ДНК с использованием метода полимеразной цепной реакции. М.: МАКС Пресс, 2006. 77 с.
40. Сюткина К. А., Котельникова К. М. О фауне кровососущих двурьлых в районе строительства железной дороги Ивдель-Обь (Северное Зауралье) // Зоол.ж. 1965. Т. 64. № 1. С. 60-66.
41. Тимофеев-Рессовский Н. В., Свирижев Ю. М. Об адапционном полиморфизме в популяциях *Adalia bipunctata* L.// Проблемы кибернетики. 1966. Вып.16. С. 137-146.
42. Томилова В. Н., Плешанов А. Кокциnellиды (Coleoptera, Coccinellidae) Прибайкалья// Фауна и экология насекомых Восточной Сибири и Дальнего Востока. Иркутск, 1977. С. 137- 153.
43. Федоров В. Г., Алифанов В. И., Пендикова Е. Г., Таранюк Г. С. Материалы к фауне кровососущих комаров города Омска. В кн.: Вопросы инфекционной патологии. Вып.2. Омск, 1970. С. 93-95.
44. Федорова М. В., Шайкевич Е. В. Морфологические и молекулярно-генетические различия имаго комаров *Culex torrentium* и *C. pipiens* (Diptera, Culicidae) Московского региона // Энтомологическое обозрение. 2007. Т. 86. № 1. С. 32-41.
45. Храброва Н. В., Сибатаев А. К., Стегний В. Н. RAPD – маркеры для идентификации представителей рода *Culex* – переносчиков вируса западнонильской лихорадки // Вестник Томского гос. ун– та. Приложение. 2004а. № 10. С. 128-130.
46. Храброва Н. В., Сибатаев А. К., Сегний В. Н. SCAR – маркер для идентификации *Culex pipiens pipiens* (Diptera: Culicidae) // Вестник Томского гос. Ун–та. 2004б. № 30. С. 146-149.
47. Храброва Н. В., Сибатаев А. К., Стегний В. Н. Генетическая идентификация комаров группы *Culex pipiens* (Diptera, Culicidae) методом RAPD-анализа // Докл. Академии наук. 2005. Т. 401. №. 3. С. 125-126.
48. Ченцов Ю. С. Общая цитология. М.: Изд-во МГУ, 1995. 353с.
49. Шайкевич Е. В., Виноградова Е. Б. Молекулярно-генетические методы идентификации городского комара *Culex pipiens pipiens* f. *molestus* (Diptera, Culicidae) // Паразитология. 2004. Т. 38. № 5. С. 406-412.

50. Шайкевич Е. В., Виноградова Е. Б., Платонов А. Е., Карань Л. С., Захаров И. А. Полиморфизм митохондриальной ДНК и зараженность цитоплазматической симбиотической бактерией *Wolbachia pipientis* комаров комплекса *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) из России // Генетика. 2005. Т. 41. № 3. С. 320-325.
51. Шайкевич Е. В. Идентификация комаров рода *Culex* (Diptera, Culicidae) методом рестрикционного анализа продуктов амплификации // Медицинская паразитология и паразитарные болезни. 2009. №3. С. 28-32.
52. Шарков А. А., Лобкова М. П., Усова З. В. Кровососущие комары и мошки Европейского Севера СССР. Петрозаводск, 1984. 152 с.
53. Agarwal M., Bensaadi N., Salvado J. C., Campbell K., Mouchès C. Characterization and genetic organization of full-length copies of a LINE retroposon family dispersed in the genome of *Culex pipiens* mosquitoes // Insect. Biochem. Mol. Biol. 1993. V. 23. P. 621–629.
54. Ahmed M. Z., De Barro P. J., Ren S.-X., Greeff J. M., Qiu B.-L. Evidence for horizontal transmission of secondary endosymbionts in the *Bemisia tabaci* cryptic species complex // PLoS ONE. 2013. V. 8(1): e53084. doi:10.1371/journal.pone.0053084.
55. Alves J., Gomes B., Rodrigues R., Silva J., Arez A. P., Pinto J., et al. Mosquito fauna on the Cape Verde Islands (West Africa): an update on species distribution and a new finding // J. Vector Ecol. 2010. V. 35. P. 307-312.
56. Ambrose C., Crease T. Evolution of repeated sequences in the ribosomal DNA intergenic spacer of 32 arthropod species // J. Mol. Evol. 2010. V. 70. P. 247-259.
57. Amraoui F., Tijane M., Sarih M., Failloux A.-B. Molecular evidence of *Culex pipiens* form *molestus* and hybrids *pipiens/molestus* in Morocco, North Africa // Parasit Vectors. 2012. V. 5. P. 83.
58. Andreadis T. G., Anderson J. F., Vossbrinck C. R., Main A. J. Epidemiology of West Nile virus in Connecticut: a five-year analysis of mosquito data 1999–2003 // Vector-Borne Zoonotic Dis. 2004. V. 4. P. 360-378.
59. Aslamkhan M., Laven H. Inheritance of autogeny in the *Culex pipiens* complex // Pakistan J. Zool. 1970. V. 2. P. 121-147.
60. Apperson C. S., Hassan H. K., Harrison B. A., Savage H. M., Aspen S. E., Farajollahi A., Crans W., Daniels T. J., Falco R. C., Benedict M., Anderson M., McMillen L., Unnasch T. R. Host feeding patterns of established and potential mosquito vectors of West Nile virus in the eastern United States // Vector-Borne Zoonotic Dis. 2004. V. 4. P. 71–82.

61. Aspen S., Savage H. M. Polymerase chain reaction assay identifies North American members of the *Culex pipiens* complex based on nucleotide sequence differences in the acetyl-cholinesterase gene *Ace.2* // J. Am. Mosq. Control. Assoc. 2003. V. 19. P. 323–328.
62. Atyame C. M., Duron O., Tortosa P., Pasteur N., Fort P., Weill M. Multiple *Wolbachia* determinants control the evolution of cytoplasmic incompatibilities in *Culex pipiens* mosquito populations // Mol. Ecol. 2011a. V. 20. № 2. P. 286-298.
63. Atyame C. M., Delsuc F., Pasteur N., Weill M., Duron O. Diversification of *Wolbachia* endosymbiont in the *Culex pipiens* mosquito // Mol. Biol. Evol. 2011b. V.28. № 10. P. 2761-2772.
64. Atyame C. M., Labbe' P., Dumas E., Milesi P., Charlat S., Fort P., Weill M. *Wolbachia* divergence and the evolution of cytoplasmic incompatibility in *Culex pipiens* // PLoS ONE. 2014. V. 9 (1): e87336. doi:10.1371/journal.pone.0087336.
65. Augustinos A. A., Santos-Garcia D., Dionyssopoulou E., Moreira M., Papapanagiotou A., Scarvelakis M., Doudoumis V., Ramos S., Aguiar A. F., Borges P. A. V., Khadem M., Latorre A., Tsiamis G., Bourtzis K. Detection and Characterization of *Wolbachia* Infections in Natural Populations of Aphids: Is the Hidden Diversity Fully Unraveled?// PLoS ONE 2011. V. 6 (12): e28695. doi:10.1371/journal.pone.0028695
66. Bahnck C., Fonseca D. M. Rapid assay to identify the two genetic forms of *Culex* (*Culex*) *pipiens* L. (Diptera: Culicidae) and hybrid populations // Am. J. Trop. Med. Hyg. 2006. V. 75. P. 251–255.
67. Baldo L., Dunning Hotopp J. C., Jolley K. A., Bordenstein S. R., Biber S. A., Choudhury R. R., Hayashi C., Maiden M. C., Tettelin H., Werren J. H. Multilocus sequence typing system for the endosymbiont *Wolbachia pipientis* // Appl Environ Microbiol. 2006. V. 72. P. 7098–7110.
68. Baldo L., Ayoub N. A., Hayashi C. Y., Russel J. A., Stahult J. K., Werren J. H. Insight into the routes of *Wolbachia* invasion: high levels of horizontal transfer in the spider genus *Agelenopsis* revealed by *Wolbachia* strain and mitochondrial DNA diversity // Mol. Eco. 2008. V. 17. № 2. P. 557-569.
69. Baldridge G. D., Fallon A. M. Primary structure of the ribosomal DNA intergenic spacer from the mosquito, *Aedes albopictus* // DNA Cell Biol. 1992. V. 11. P. 51–59.
70. Bataille A., Cunningham A. A., Cedeno V., Cruz M., Eastwood G., Fonseca D. M., Causton C. E., Azuero R., Loayza J., Martinez J. D., Goodman S. J. Evidence for regular ongoing introductions of mosquito disease vectors into the Galapagos Islands // Proc. Biol. Sci. 2009. V. 276. P. 3769–3775.

71. Barr A. R. The distribution of *Culex p. pipiens* and *C. p. quinquefasciatus* in North America // Am. J. Trop. Med. Hyg. 1957. V. 6. P. 153–165.
72. Barr A. R. Occurrence and distribution of the *Culex pipiens* complex // Bull. World Health Organ 1967. V. 37. P. 293-296.
73. Barr A. R. Cytoplasmic incompatibility in natural populations of a mosquito, *Culex pipiens* L. // Nature. 1980. V. 283. P. 71-72.
74. Barr A. R. The *Culex pipiens* complex. Cytogenetics and genetics of vectors // Proceedings Symposium, XVIth International Congress of Entomology, Amsterdam. 1981. P.123-136.
75. Barr A. R. The *Culex pipiens* complex. In WWM Steiner, WJ Tabachnick, KS Rai, S Narang (eds), *Recent developments in the genetics of insect disease vectors*. Champaign, Illinois, Stipes, 1982. P. 551-572.
76. Beard C. B., Mills Hamm D., Collins F. H. The mitochondrial genome of the mosquito *Anopheles gambiae*: DNA sequence, genome organization, and comparisons with mitochondrial sequences of other insects // Insect. Mol. Biol. 1993. V. 2. P. 103–124.
77. Becker N., Jost A., Storch V., Weitzel T. Exploiting the biology of urban mosquitoes for their control. In: Robinson WH, Rettich F, and Rambow GW, eds. Proc. 3rd Int. Conference on Urban Pests. Czech Univ. Agriculture, Prague, Czech Republic, 1999. P. 425–429.
78. Becker N., Petric D., Zgomba M., Boase C., Dahl C., Lane J., Kaiser A. Mosquitoes and their Control. NY.: Kluwer Academic/Plenum Publishers, 2003. 498 pp.
79. Becker N., Petric D., Zgomba M., Boase C., Madon M., Dahl C., Kaiser A. Mosquitoes and Their Control. 2nd ed. NY.: Springer: Heidelberg, Dordrecht, 2010. 577 pp.
80. Becker N., Jöst A., Weitzel T. The *Culex pipiens* Complex in Europe // Journal of the American Mosquito Control Association. 2012. V. 28. № 4s. P. 53-67.
81. Belkin J. N., Schick R. X., Heinemann S. J. Mosquito studies (Diptera, Culicidae) VI. Mosquitoes originally described from North America // Contrib. Am. Entomol. Inst. 1966. V. 1. № 6. P. 1–39.
82. Bielawski R. Coccinellidae (Coleoptera) of Mongolia // Ann. Zool. Warszawa. 1984.V.38. № 14. P. 281–460.
83. Black W. C., McLain D. K., Rai K. S. Patterns of variation in the rDNA cistron within and among world populations of a mosquito, *Aedes albopictus* (Skuse) // Genetics. 1989. V. 121. P. 539–550.

84. Bordenstein S. R., Wernegreen J. J. Bacteriophage flux in endosymbionts (*Wolbachia*): infection frequency, lateral transfer, and recombination rates // *Mol. Biol. Evol.* 2004. V. 21. P. 1981-1991.
85. Bordenstein S. R., Marshall M. L., Fry A. J., Kim U., Wernegreen J. J. The Tripartite Associations between Bacteriophage, *Wolbachia*, and Arthropods // *PLoS Pathog.* 2006. V. 2: e106. doi:10.1371/journal.ppat.0020043.
86. Bourguet D., Raymond M., Fournier D., Malcolm C. A., Toutant J. P., Arpagaus M. Existence of two acetylcholinesterases in the mosquito *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) // *J. Neurochem.* 1996. V. 67. P. 2115-2123.
87. Bourguet D., Fonseca D., Vourch G., Dubois M. P., Chandre F., Severini C., Raymond M. The acetylcholinesterase gene ace: a diagnostic marker for the *pipiens* and *quinquefasciatus* forms of the *Culex pipiens* complex // *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 1998. V. 14. P. 390-396.
88. Boyle L., O'Neill S. L., Robertson H. M., Karr T. L. Interspecific and intraspecific horizontal transfer of *Wolbachia* in *Drosophila* // *Science, Wash.*, 1993. V. 260. P. 1796-1799.
89. Braig H. R., Zhou W., Dobson S. L., O'Neil S. L. Cloning and characterization of a gene encoding the major surface protein of the bacterial endosymbiont *Wolbachia* // *J. Bacteriol.* 1998. V. 180. P. 2373-2378.
90. Brakefield P. M., de Jong P. W. A steep cline in ladybird melanism has decayed over 25 years: a genetic response to climate change? // *Heredity.* 2011. V. 107. P. 574-578.
91. Briton M. A. The molecular biology of West Nile Virus: a new invader of the western hemisphere // *Annu. Rev. Microbiol.* 2002. V. 56. P. 371-402.
92. Brownlie J. C., Johnson K. N. Symbiont-mediated protection in insect hosts // *Trends Microbiol.* 2009. V. 11. P. 348-354.
93. Brownlie J. C., Cass B. N., Riegler M., Witsenburg J. J., Iturbe-Ormaetxe I., McGraw E. A., O'Neill S. L. Evidence for metabolic provisioning by a common invertebrate endosymbiont, *Wolbachia pipientis*, during periods of nutritional stress // *PLoS Pathog.* 2009. V. 11:e1000368. doi: 10.1371/journal.ppat.1000368.
94. Bullini L., Coluzzi M. Ethological mechanisms of reproductive isolation in *Culex pipiens* and *Aedes mariaae* complexes (Diptera, Culicidae) // *Monit. Zool. Ital.* 1980. V. 14. P. 99-101.
95. Bushrod F. M. Field and laboratory studies on the vectors of *Bancroftian filariasis* with special reference to their control. Ph. D. Thesis, University of Liverpool, 1978.



96. Byrne K., Nichols R. A. *Culex pipiens* in London Underground tunnels: differentiation between surface and subterranean populations // *Heredity*. 1999. V. 82. P. 7-15.
97. Caccone A., Garcia B. A., Powell J. R. Evolution of the mitochondrial DNA control region in the *Anopheles gambiae* complex // *Insect Mol. Biol.* 1996. V. 5. P. 51-59.
98. Chapman H. F., Kay B. H., Ritchie S. A., van den Hurk A. F., Hughes J. M. Definition of Species in the *Culex sitiens* Subgroup (Diptera: Culicidae) from Papua New Guinea and Australia // *Journal of Medical Entomology*. 2000. V. 37. P. 736-742.
99. Chevillon C., Pasteur N., Marquine M., Heyse D., Raymond M. Population structure and dynamics of selected genes in the mosquito *Culex pipiens* // *Evolution*. 1995. V. 49. P. 997-1007.
100. Clancy D. J., Hoffmann A. A. Cytoplasmic incompatibility in *Drosophila simulans* : evolving complexity // *Trends Ecol. Evol.* 1996. V. 11. P. 145-146.
101. Clark M. E., Veneti Z., Bourtzis K., Karr T. L. The distribution and proliferation of the intracellular bacteria *Wolbachia* during spermatogenesis in *Drosophila* // *Mech. Dev.* 2002. V. 111. P. 3-15.
102. Clement M., Posada D., Crandall K. A. TCS: a computer program to estimate gene genealogies // *Molecular Ecology*. 2000. V. 9. № 10. P. 1657-1660.
103. Cordaux R., Michel-Salzat A., Bouchon D. *Wolbachia* infection in crustaceans: novel hosts and potential routes for horizontal transmission // *J. Evol. Biol.* 2001. V. 14. № 2. P. 237-43.
104. Cordaux R., Bouchon D., Greve P. The impact of endosymbionts on the evolution of host sex-determination mechanisms // *Trends Genet.* 2011. V. 27. P. 332-341.
105. Cornel A. J., McCabe R. D., Rasgon J., Stanich M. A., Scott T. W., Coetzee M. Differences in extent of genetic introgression between sympatric *Culex pipiens* and *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) in California and South Africa // *J. Med. Entomol.* 2003. V. 40. P. 36-51.
106. Cornel A., Lee Y., Fryxell R. T., Siefert S., Nieman C., Lanzaro G. *Culex pipiens* Senu Lato in California: A Complex Within a Complex? // *Journal of the American Mosquito Control Association*. 2012. V. 28. № 4s. P.113-121.
107. Cook P. E., McGraw E. A. *Wolbachia pipientis*: an expanding bag of tricks to explore for disease control // *Trends Parasitol.* 2010. V. 26. P. 373-375.
108. Counce S. J., Poulson D. F. Developmental effects of the sex-ratio agent in embryos in *Drosophila willistoni* // *J. Exp. Zool.* 1962. V. 151. P. 12-31.

109. Crabtree M. B., Savage H. M., Miller B. R. Development of a species-diagnostic polymerase chain reaction assay for the identification of *Culex* vectors of St. Louis encephalitis virus based on interspecies sequence variation in ribosomal DNA spacers // Am. J. Trop. Med. Hyg. 1995. V. 53. P. 105–109.
110. Cywinska A., Hunter F. F., Hebert P. D. N. Identifying Canadian mosquito species through DNA barcodes // Med. Vet. Entomol. 2006. V. 20. P. 413-424.
111. Dahl C. Taxonomic studies on *Culex pipiens* and *Cx. torrentium*. in: Service, M.W. (ed.), Biosystematics of Haematophagous Insects. Oxford: Clarendon Press, 1988. P. 149-175.
112. Damiani C., Ricci I., Crotti E., Rossi P., Rizzi A., Scuppa P., Capone A., Ulissi U., Epis S., Genchi M., Sagnon N., Faye I., Kang A., Chouaia B., Whitehorn C., Moussa G.W., Mandrioli M., Esposito F., Sacchi L., Bandi C., Daffonchio D., Favia G. Mosquito-bacteria symbiosis: the case of *Anopheles gambiae* and *Asaia* // Microb. Ecol, 2010. V. 60. P. 644–654.
113. Danabalan R. , Ponsonby D. J., Linton Y.-M. A Critical Assessment of Available Molecular Identification Tools for Determining the Status of *Culex pipiens* S.L. in the United Kingdom // J. American Mosquito Control Association. 2012. V. 28. № 4s. P. 68-74.
114. de Boissezon P. Remarques sur les conditions de la reproduction chez *Culex pipiens* L. pendant la hivemale // Bull. Soc. Path. exot. 1929. V. 22. P. 549-53. (резюме на английском).
115. Dedeine F., Ahrens M., Calcaterra L., Shoemaker D. D. Social parasitism in fire ants (*Solenopsis* spp.): a potential mechanism for interspecies transfer of *Wolbachia* // Mol. Eco. 2005. V. 14. № 5. P. 1543-1548.
116. De Jong P. W., Verhoog M. D., Brakefield P. M. Sperm competition and melanic polymorphism in the 2-spot ladybird, *Adalia bipunctata* (Coleoptera, Coccinellidae) // Heredity. 1993. V. 70. P. 172-178.
117. DeMarco R., Machado A. A., Bisson-Filho A. W., Verjovski-Almeida S. Identification of 18 new transcribed retrotransposons in *Schistosoma mansoni* // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2005. V. 333. P. 230–240.
118. De Merida A. M., De Mata M. P., Molina E., Porter C. H., Black W. C. Variation in ribosomal DNA intergenic spacers among populations of *Anopheles albimanus* in South and Central America // Am. J. Trop. Med. Hyg. 1995 . V. 5. P. 469–477.
119. Denhöfer L. Inherited preferential segregation in translocation heterozygotes of the mosquito *Culex pipiens* // Theoret appl. Genet. 1975. V. 45. P. 250–253.

120. Dohm D. J., Sardelis M. R., Turell M. J. Experimental vertical transmission of West Nile virus by *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) // J. Med. Entomol. 2002. V. 39. P. 640–644.
121. Douglas A. E. Nutritional interactions in insect–microbial symbioses: aphids and their symbiotic bacteria *Buchnera* // Annu. Rev. Entomol. 1998. V. 43. P. 17–37.
122. Dumas E., Atyame C. M., Milesi P., Fonseca D. M., Shaikevich E. V., Unal S., Makoundou P., Weill M., Duron O. Population structure of *Wolbachia* and cytoplasmic introgression in a complex of mosquito species // BMC Evol. Biol. 2013. V. 13(1): 181. doi:10.1186/1471-2148-13-181.
123. Duron O., Lagnel J., Raymond M., Bourtzis K., Fort P., Weill M. Transposable element polymorphism of *Wolbachia* in the mosquito *Culex pipiens*: evidence of genetic diversity, superinfection and recombination // Mol. Ecol. 2005. V. 14. № 5. P. 1561–73.
124. Duron O., Bernard C., Unal S., Berthomieu A., Berticat C., Weill M. Tracking factors modulating cytoplasmic incompatibilities in the mosquito *Culex pipiens* // Mol. Ecol. 2006a. V. 15. № 10. P. 3061-3071.
125. Duron O., Fort P., Weill M. Hypervariable prophage WO sequences describe an unexpected high number of *Wolbachia* variants in the mosquito *Culex pipiens* // Proc. Biol. Sci. 2006b. V. 273. P. 495-502.
126. Duron O., Fort P., Weill M. Influence of aging on cytoplasmic incompatibility, sperm modification and *Wolbachia* density in *Culex pipiens* mosquitoes // Heredity. 2007a. V. 98. № 6. P. 368-374.
127. Duron O., Boureux A., Echaubard P., Berthomieu A., Berticat C., Fort P., Weill M. Variability and expression of ankyrin domain genes in *Wolbachia* variants infecting the mosquito *Culex pipiens* // J. Bacteriol. 2007b. V. 189. № 12. P. 4442-4448.
128. Duron O., Raymond M., Weill M. Many compatible *Wolbachia* strains coexist within natural populations of *Culex pipiens* mosquito // Heredity. 2011. V. 106. № 6. P. 986-993.
129. Duron O., Bernard J., Atyame C. M., Dumas E., Weill M. Rapid evolution of *Wolbachia* incompatibility types // Proc. Biol. Sci. 2012. V. 279. P. 4473–4480.
130. Duron O., Hurst G. D. D. Arthropods and inherited bacteria: from counting the symbionts to understanding how symbionts count // BMC Biology. 2013. V. 11: doi:10.1186/1741-7007-11-45
131. Edillo F. E., Tripet F., McAbee R. D., Foppa I. M., Lanzaro G. C., Cornel A. J., Spielman A. A. A set of broadly applicable microsatellite markers for analyzing the structure of *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) populations // J. of Med. Entomol. 2007. V. 44. P. 145-149.

132. Elnagdy S., Messing S., Majerus M. E. N. Two Strains of Male-Killing *Wolbachia* in a Ladybird, *Coccinella undecimpunctata*, from a Hot Climate // PLoS ONE. 2013. V. 8(1): e54218. doi:10.1371/journal.pone.0054218.
133. Engelstaedter J., Hurst G. D. D. The ecology and evolution of microbes that manipulate host reproduction // Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst. 2009. V. 40. P. 127-149.
134. Farajollahi A., Crans W. J., Bryant P., Wolf B., Burkhalter K. L., Godsey M. S., Aspen S. E., Nasci R. S. Detection of West Nile viral RNA from an overwintering pool of *Culex pipens pipiens* (Diptera: Culicidae) in New Jersey, 2003 // J. Med. Entomol. 2005. V. 42. P. 490-494.
135. Farajollahi A., Fonseca D. M., Kramer L. D., Kilpatrick M. A. "Bird biting" mosquitoes and human disease: a review of the role of *Culex pipiens* complex mosquitoes in epidemiology // Infection, Genetics and Evolution. 2011. V. 11. P. 1577-1585.
136. Farid H. A., Gad A. M., Spielman A. Genetic similarity among Egyptian populations of *Culex pipiens* (Diptera, Culicidae) // J. Med. Entomol. 1991. V. 28. P. 198-204.
137. Favia G., della Torre A., Bagayoko M., Lanfrancotti A., Sagnon N., Toure Y. T., Coluzzi M. Molecular identification of sympatric chromosomal forms of *Anopheles gambiae* and further evidence of their reproductive isolation // Insect. Mol. Biol. 1997. V. 6. P. 377-383.
138. Ferrari J., Vavre F., Bacterial symbionts in insects or the story of communities affecting communities // Phil. Trans. R. Soc. B. 2011. V. 366. P. 1389-1400.
139. Ferree P. M., Avery A., Azpurua J., Wilkes T., Werren J. H. A bacterium targets maternally inherited centrosomes to kill males in *Nasonia* // Curr. Biol. 2008. V. 18. P. 1409-1414.
140. Fialho R. F., Stevens L. Male-killing *Wolbachia* in a flour beetle // Proc. R. Soc. Lond. B. 2000. V. 267. P. 1469-1473.
141. Folmer O., Black M., Hoeh W., Lutz R., Vrijenhoek R. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome C oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates // Mol. Mar. Biol. Biotechnol. 1994. V. 3. P. 294-299.
142. Fonseca D. M., Atkinson C. T., Fleischer R. C. Microsatellite primers for *Culex pipiens quinquefasciatus*, the vector of avian malaria in Hawaii // Mol. Ecol. 1998. V. 7. P. 1617-1619.
143. Fonseca D. M., LaPointe D. A., Fleischer R. C. Bottlenecks and multiple introductions: population genetics of the vector of avian malaria in Hawaii // Mol. Ecol. 2000. V. 9. P. 1803-1814.

144. Fonseca D. M., Keyghobadi N., Malcolm C. A., Mehmet C., Schaffner F., Mogi M., Fleischer R. C., Wilkerson R. C. Emerging vectors in the *Culex pipiens* complex // Science. 2004. V. 303. P. 1535-1538 .
145. Fonseca D. M., Smith J. L., Wilkerson R. C., Fleischer R. C. Pathways of expansion and multiple introductions illustrated by large genetic differentiation among worldwide populations of the southern house mosquito // Am. J. Trop. Med. Hyg. 2006. V. 74. P. 284-289.
146. Fonseca D. M., Smith J. L., Kim H. C., Mogi M. Population genetics of the mosquito *Culex pipiens pallens* reveals sex-linked asymmetric introgression by *Culex quinquefasciatus* // Infect. Genet. Evol. 2009. V. 9. P. 1197-1203.
147. Fontaine K. M., Cooley J. R., Simon C. Evidence for paternal leakage in hybrid periodical cicadas (Hemiptera: Magicicada spp.) // PLoS One. 2007. V. 9: e892.  
doi:10.1371/journal.pone.0000892
148. Francy D. B., Jaenson T. G., Lundström J. O., Schildt E.-B., Espmark A., Henriksson B., Niklasson B. Ecologic studies of mosquitoes and birds as hosts of Ockelbo virus in Sweden and isolation of Inkoo and Batai viruses from mosquitoes // Am. J. Trop. Med. Hyg. 1989. V. 41. P. 355-363.
149. Gad A. M., Abdel Kader M., Farid H. A., Hassan A. N. Absence of mating barriers between autogenous and anautogenous *Culex pipiens* L. in Egypt // J. Egypt. Soc. Parasitol. 1995. V. 25. P. 63-71.
150. Gavotte L., Vavre F., Henri H., Ravallec M., Stouthamer R., Bouletreau M. Diversity, distribution and specificity of WO phage infection in *Wolbachia* of four insect species // Insect Mol. Biol. 2004. V. 13. P. 147-153.
151. Gavotte L., Henri H., Stouthamer R., Charif D., Charlat S., Bouletreau M., Vavre F. A survey of the bacteriophage WO in the endosymbiotic bacteria *Wolbachia* // Mol. Biol. Evol. 2007. V. 24. P. 427-435.
152. Gilchrist B. M., Haldane J. B. S. Sex linkage and sex determination in a mosquito, *Culex molestus* // Hereditas. 1947. V. 33. P. 175-190.
153. Gomes B., Sousa C. A., Novo M. T., Freitas F. B., Alves R., Corte-Real A. R., Salgueiro P., Donnelly M. J., Almeida A. P. G., Pinto J. Asymmetric introgression between sympatric *molestus* and *pipiens* forms of *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) in Comporta region, Portugal // BMC Evol. Biol. 2009. V. 9: 262. doi:10.1186/1471-2148-9-262.
154. Gomes B., Alves J., Sousa C. A., Santa-Ana M., Vieira I., Silva T. L., Almeida A. P., Donnelly M. J., Pinto J. Hybridization and population structure of the *Culex pipiens*

- complex in the islands of Macaronesia // *Ecology and Evolution*. 2012. V. 2. № 8. P. 1889-1902.
155. Gordeev M., Goriacheva I., Shaikevich E., Ejov M. Variability of the internal transcribed spacer of the ribosomal DNA among five Palearctic species of anopheline mosquitoes // *European mosquito Bulletin*. 2004. V. 17. P. 14-19.
156. Guillemaud T., Pasteur N., Rousset F. Contrasting levels of variability between cytoplasmic genomes and incompatibility types in the mosquito *Culex pipiens* // *Proc. R. Soc. Lond. B*. 1997. V. 264. P. 245-251.
157. Haag-Liautard C., Crown N., Houle D., Lynch M., Charlesworth B., Keightley P. D. Direct estimation of the mitochondrial DNA mutation rate in *D. melanogaster* // *PLoS Biology*. 2008. V. 6. P. 1706-1714.
158. Hamer G. L., Kitron U. D., Brawn J. D., Loss S. R., Ruiz M. O., Goldberg T. L., Walker E. D. *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae): a bridge vector of West Nile virus to humans // *J. Med. Entomol.* 2008. V. 45. P. 125-128.
159. Hamon J., Burnett G. F., Adam J. P., Rickenbach A., Grjebine A. *Culex pipiens fatigans* Wiedemann, *Wuchereria bancrofti* Cobbold, et le développement économique de l'Afrique tropicale // *Bull. W H O*. 1967. №. 37. P. 217-237. (резюме на английском).
160. Harbach R. E., Harrison B. A., Gad A. M. *Culex (Culex) molestus* Forskel (Diptera, Culicidae) - neotype designation, description, variation, and taxonomic status // *Proc. Entomol. Soc. Wash.* 1984. V. 86. P. 521-542.
161. Harbach R. E., Dahl C., White G. B. *Culex (Culex) pipiens* Linnaeus (Diptera, Culicidae) - concepts, type designations, and description // *Proc. Entomol. Soc. Wash.* 1985. V. 87. P.1-24.
162. Harbach R. E. *Culex pipiens*: species versus species complex taxonomic history and perspective // *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 2012. Vol. 28. P. 10-23.
163. Hardy J. L., Reeves W. C. Experimental studies on infection in vectors. In: Reeves W. C., ed. *Epidemiology and control of mosquito-borne arboviruses in California, 1943-1987*. Sacramento, CA: California Mosquito Vector Control Association, 1990. P. 145-250.
164. Harshman L. G., Hoffmann A. A. Laboratory selection experiments using *Drosophila*: what do they really tell us? // *Trends Ecol. Evol.* 2000. V.15. P. 32-36.
165. Heath B. D., Butcher R. D. J., Whitfield W. G. F., Hubbard S. F. Horizontal transfer of *Wolbachia* between phylogenetically distant insect species by a naturally occurring mechanism // *Current Biology*. 1999. V. 9. P. 313-316.

166. Hesson J. C., Ostman O., Schäfer M., Lundström J. O. Geographic distribution and relative abundance of the sibling vector species *Culex torrentium* and *Culex pipiens* in Sweden // Vector Borne Zoonotic Dis. 2011. V.11. № 10. P. 1383-1389.
167. Hesson J. C., Rettich F., Merdić E., Vignjević G., Östman Ö., Schäfer M., Schaffner F., Foussadier R., Besnard G., Medlock J., Scholte E.-J., Lundström J. O. The arbovirus vector *Culex torrentium* is more prevalent than *Culex pipiens* in north and central Europe // Medical and Veterinary Entomology. 2013. V. 27: doi: 10.1111/mve.12024.
168. Hertig M., Wolbach S. B. Studies on Rickettsia-Like Micro-Organisms in Insects // Journal of Medical Research. 1924. V. 44. № 3. P.329–374.
169. Hertig M. The *Rickettsia*, *Wolbachia pipientis* (gen. et sp.n.) and Associated Inclusions of the Mosquito, *Culex pipiens* // Parasitology. 1936. V. 28. P. 453-486.
170. Hilgenboecker K., Hammerstein P., Schlattmann P., Telschow A., Werren J. H. How many species are infected with *Wolbachia*? A statistical analysis of current data // FEMS Microbiol. Lett. 2008. V. 281. P. 215-220.
171. Himler A. G., Adachi-Hagimori T., Bergen J. E., Kozuch A., Kelly S. E., Tabashnik B. E., Chiel E., Duckworth V. E., Dennehy T. J., Zchori-Fein E., Hunter M. S. Rapid spread of a bacterial symbiont in an invasive whitefly is driven by fitness benefits and female bias // Science. 2011. V. 11. P. 254-256.
172. Hodek I. Biology of Coccinellidae. Prague: Czechoslovak. Academy of Science, 1973. 260pp.
173. Hoffmann A. A., Montgomery B. L., Popovici J., Iturbe-Ormaetxe I., Johnson P. H., Muzzi F., Greenfield M., Durkan M., Leong Y. S., Dong Y., Cook H., Axford J., Callahan A. G., Kenny N., Omodei C., McGraw E. A., Ryan P. A., Ritchie S. A., Turelli M., O'Neill S. L. Successful establishment of *Wolbachia* in *Aedes* populations to suppress dengue transmission // Nature. 2011. V. 11. P. 454–457.
174. Hotopp J. D. Horizontal gene transfer between bacteria and animals // Trends in Genetics. 2011. Vol. 27. No. 4. P. 157-163.
175. Huang S., Molaei G., Andreadis T. G. Genetic insights into the population structure of *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) in the northeastern United States by using microsatellite analysis // Am. J. Trop. Med. Hyg. 2008 . V. 79. P. 518-527.
176. Huang S., Hamer G., Molaei G., Walker E., Goldberg T., Kitron U., Andreadis T. Genetic variation associated with mammalian feeding in *Culex pipiens* from a West Nile virus epidemic region in Chicago, Illinois // Vector Borne Zoonotic Dis. 2009. V. 9. P. 637-642.

177. Huang S., Molaei G., Andreadis T. G. Reexamination of *Culex pipiens* hybridization zone in the Eastern United States by ribosomal DNA-based single nucleotide polymorphism markers // *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2011. V. 85. P. 434-441.
178. Huff C. G. Ovulation requirements of *Culex pipiens* L. // *Biol. Bull. Woods Hole.* 1929. V. 56. P. 347-50.
179. Huigens M. E., Luck R. F., Klaassen R. H., Timmermans M.J., Stones-Havas, Stouhamer R. Infectious Parthenogenesis // *Nature.* 2000. V. 405. P. 178-179.
180. Humeres S. G., Almiron W. R., Sabattini M. S., Gardenal C. N. Estimation of genetic divergence and gene flow between *Culex pipiens* and *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) in Argentina // *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 1998. V. 93. P. 57-62.
181. Hurst G. D. D., Majerus M. E. N., Walker L. E. The importance of cytoplasmic male killing elements in natural populations of the two spot ladybird, *Adalia bipunctata*(Linnaeus) (Coleoptera: Coccinellidae) // *Biol. J. Linn. Soc.* 1993. V. 49. P. 195-202.
182. Hurst G. D. D., Sharpe R. G., Broomfield A. H., Walker L. E., Majerus T. M. O., Zakharov I. A., Majerus M. E. N. Sexually-transmitted disease in a promiscuous insect, *Adalia bipunctata* // *Ecol. Entomol.* 1995. V. 20. P. 230-236.
183. Hurst G. D. D., Hurst L. D., Majerus M. E. N. Cytoplasmic sex-ratio distorters. In *Influential Passengers* (eds. O'Neill S. L., Hoffmann A. A., Werren J. H.). Oxford: Oxford University Press, 1997. P. 125-154.
184. Hurst G. D. D., Jiggins F. M., Schulenburg J. H. G. von der, Bertrand D., West S. A., Goriacheva I. I., Zakharov I. A., Werren J. H., Stouthamer R., Majerus M. E. N. Male-killing *Wolbachia* in two species of insect // *Proc. R. Soc. Lond. (B).* 1999. V.266. P. 735-740.
185. Hurst G. D., Jiggins F. M. Male-killing bacteria in insects: mechanisms, incidence, and implications // *Emerg. Infect. Dis.* 2000. V. 6. P. 329-336.
186. Ilinsky Y. Coevolution of *Drosophila melanogaster* mtDNA and *Wolbachia* genotypes // *PLoS ONE.* 2013. V. 8(1): e54373. doi:10.1371/journal.pone.0054373.
187. Iltis W. G. Biosystematics of the *Culex pipiens* Complex in Northern California. Ph. D. Thesis. Davis, CA, University of California, 1966.
188. Irving-Bell R. J. Cytoplasmic incompatibility within and between *Culex molestus* and *Cx. quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) // *J. Med. Entomol.* 1983. V. 20. P. 44-48.
189. Ishii T. Integrated study on the *Culex pipiens* complex // *Akaieka Newsletter.* 1991. V. 14. P. 5-40.



190. Jaenike J., Unckless R., Cockburn S. N., Boelio L. M., Perlman S. J. Adaptation via symbiosis: recent spread of a *Drosophila* defensive symbiont // *Science*. 2010. V. 11. P. 212-215.
191. Jiggins F. M., Hurst G. D. D., Schulenburg J. H. G. vd, Majerus M. E. N. Two male-killing *Wolbachia* strains coexist within a population of the butterfly *Acraea encedon* // *Heredity*. 2001. V. 86. P. 161-166.
192. Jiggins F. M., Hurst G. D. D., Yang Z. Host-symbiont conflicts: positive selection on an outer membrane protein of parasitic but not mutualistic *Rickettsiaceae* // *Mol. biology and evolution*. 2002. V. 19. № 8. P. 1341-1349.
193. Jiggins F. M. Male-killing *Wolbachia* and mitochondrial DNA: selective sweeps, hybrid introgression and parasite population dynamics // *Genetics*. 2003. V. 164. № 1. P. 5-12.
194. Jiggins F. M., Tinsley M. C. An ancient mitochondrial polymorphism in *Adalia bipunctata* linked to a sex-ratio-distorting bacterium // *Genetics*. 2005. V. 171. P. 1115-1124.
195. Jöst H., Bialonski A., Storch V., Gunther S., Becker N., Schmidt-Chanasit J. Isolation and phylogenetic analysis of Sindbis viruses from mosquitoes in Germany // *Journal of Clinical Microbiology*. 2010. V. 48. P. 1900-1903.
196. Juan C., Omori P., Hewitt G. M. Phylogeny of the genus *Hegeter* (Tenebrionidae, Coleoptera) and its colonization of the Canary Islands deduced from Cytochrome Oxidase I mitochondrial DNA sequences // *Heredity*. 1996. Vol. 76. P. 392-403.
197. Kambhampati S., Black W. C. IV, Rai K. S. Random Amplified Polymorphic DNA of mosquito species and populations (Diptera: Culicidae): Techniques, Statistical Analysis, and applications // *J. Med. Entomol.* 1992. V. 29. P. 939-945.
198. Kartavtsev Y. P. Sequence divergence at mitochondrial genes in animals: applicability of DNA data in genetics of speciation and molecular phylogenetics // *Marine genomics*. 2011. V. 4. № 2. P. 71-81.
199. Kassim N. F. A., Webb C. E., Russell R. C. *Culex molestus* Forskal (Diptera: Culicidae) in Australia: colonisation, stenogamy, autogeny, oviposition and larval development // *Australian Journal of Entomology*. 2012. V. 51. P. 67-77.
200. Kent R. J., Harrington L. C., Norris D. E. Genetic differences between *Culex pipiens* f. *molestus* and *Culex pipiens pipiens* (Diptera: Culicidae) in New York // *J. Med. Entomol.* 2007. V. 44. P. 50-59.

201. Kent B. N., Salichos L., Gibbons J. G., Rokas A., Newton I. L., Clark M. E., Bordenstein S.R. Complete bacteriophage transfer in a bacterial endosymbiont (*Wolbachia*) determined by targeted genome capture // *Genome. Biol. Evol.* 2011. V. 3. P. 209-218.
202. Keyghobadi N., Matrone M. A., Ebel G. D., Kramer L. D., Fonseca D. M. Microsatellite loci from the northern house mosquito (*Culex pipiens*), a principal vector of West Nile virus in North America // *Mol. Ecol. Notes.* 2004. V. 4. P. 20-22.
203. Kilpatrick A. M., Kramer L. D., Campbell S., Alleyne E. O., Dobson A. P., Daszak P. West Nile virus risk assessment and the bridge vector paradigm // *Emerg. Infect. Dis.* 2005. V. 11. P. 425-429.
204. Kilpatrick A. M., Kramer L. D., Jones M. J., Marra P. P., Daszak P. West Nile virus epidemics in North America are driven by shifts in mosquito feeding behavior // *PLoS Biol.* 2006. V. 4. P. 606-610.
205. Kilpatrick A. M., Kramer L. D., Jones M. J., Marra P. P., Daszak P., Fonseca D. M. Genetic influences on mosquito feeding behavior and the emergence of zoonotic pathogens // *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2007. V. 77. P. 667–671.
206. Kittayapong P., Baisley K. J., Sharpe R. G., Baimai V., O'Neill S. L. Maternal transmission efficiency of *Wolbachia* superinfections in *Aedes albopictus* populations in Thailand // *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2002. V. 66. P. 103-107.
207. Kittayapong P., Jamnongluk W., Thipaksorn A., Milne J. R., Sindhusake C. *Wolbachia* infection complexity among insects in the tropical rice-field community // *Mol. Eco.* 2003. V. 12. № 4. P. 1049-1060.
208. Klasson L., Walker T., Sebahia M., Sanders M. J., Quail M. A., Lord A., Sanders S., Earl J., O'Neill S. L., Thomson N., Sinkins S. P., Parkhill J. Genome evolution of *Wolbachia* strain wPip from the *Culex pipiens* group // *Mol. Biol. Evol.* 2008. V. 25. P. 1877-1887.
209. Knight A. Review of the *Culex pipiens* Complex in the Mediterranean Subregion (Diptera, Culicidae) In: Mattingly, et al, *Trans. Roy. Entomol. Soc. London*, 1951. V.102. № 7. P. 354-364.
210. Knight K. L., Abdel Malek A. A. A morphological and biological study of *Culex pipiens* in the Cairo area of Egypt // *Bull. Soc. Fouad 1er Entom.* 1951. V. 35. P. 175-185.
211. Knight K. L., Stone A. A catalog of the mosquitoes of the world (Diptera: Culicidae). The Thomas Say Foundation, 1977. 611 pp.
212. Knight J. W., Nayar J. K. Identification of four common *Culex* (*Culex*) (Diptera: Culicidae) Species from Florida with isoenzyme analysis // *Florida Entomologist.* 2004.V. 87. P. 1–5.

213. Kodandaramaiah U., Simonsen T. J., Bromilow S., Wahlberg N., Sperling F. Deceptive single-locus taxonomy and phylogeography: *Wolbachia*-associated divergence in mitochondrial DNA is not reflected in morphology and nuclear markers in a butterfly species // Ecology and Evolution. 2013. V. 3(16). P. 5167-5176.
214. Kondo R., Matsuura E. T., Chigusa S. I. Further observation of paternal transmission of *Drosophila* mitochondrial DNA by PCR selective amplification method // Genet. Res. 1992. V. 59. № 2. P. 81–4.
215. Kothera L., Zimmerman E. M., Richards C. M., Savage H. M. Microsatellite characterization of subspecies and their hybrids in *Culex pipiens* complex (Diptera: Culicidae) mosquitoes along a north-south transect in the central United States // J. Med. Entomol. 2009. V. 46. P. 236-248.
216. Kothera L., Godsey M., Mutebi J., Savage H. M. A Comparison of Aboveground and Belowground Populations of *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) Mosquitoes in Chicago, Illinois, and New York City, New York, Using Microsatellites // J. Med. Entomol. 2010. V. 47. P. 805–813.
217. Kumar A., Rai K. S. Chromosomal localization and copy number of 18S+28S ribosomal-RNA genes in evolutionarily diverse mosquitos (Diptera, Culicidae) // Hereditas. 1990. V. 113. P. 277–289.
218. Kumar N. P., Rajavel A. R., Jambulingam P. DNA barcodes can distinguish species of Indian mosquitoes (Diptera: Culicidae) // J. Med. Entomol. 2007. V. 44. P. 1-7.
219. Laven H. Crossing experiments with *Culex* strains // Evolution. 1951. V. 5. P. 370-375.
220. Laven H. Speciation and evolution in *Culex pipiens*. In: Wright JW, Pal R, editors. Genetics of Insect Vectors of Disease. Amsterdam: Elsevier, 1967. P. 251–275.
221. Lewis D. L., Farr C. L., Farquhar A. L., Kaguni L. S. Sequence, organization and evolution of the A-T region of *Drosophila melanogaster* mitochondrial DNA // Mol. Biol. Evol. 1994. V. 11. P. 523-538.
222. Librado P., Rozas J. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data // Bioinformatics. 2009. V. 25. P. 1451–1452.
223. Lukacik G., Anand M., Shusas E. J., Howard J. J., Oliver J., Chen H., Backenson P. B., Kauffman E. B., Bernard K. A., Kramer L. D., White D. J. West Nile virus surveillance in mosquitoes in New York state, 2000–2004 // J. Am. Mosq. Control Assoc. 2006. V. 22. P. 264–271.

224. Lukasik P., Asch M., Guo H., Ferrari J., van der Putten W. Unrelated facultative endosymbionts protect aphids against a fungal pathogen // *Ecol. Lett.* 2012. V. 11. P. 214-218.
225. Lundström J. O. Vector competence of Western European mosquitoes for arboviruses: a review of field and experimental studies // *Bull. of the Society of Vector Ecology.* 1994. V. 19. P. 23-36.
226. Lunt D. H., Zhang D. X., Szymura J. M., Hewitt G. M. The insect cytochrome oxidase I gene: evolutionary profiles and conserved primers for phylogenetic studies // *Insect Molecular Biology.* 1996. V. 5. P. 153–165.
227. Madesis P., Ganopoulos I., Tsaftaris A. Microsatellites: evolution and contribution. *Methods in molecular biology.* New York : Humana Press : Springer, 2013. V. 1006. P. 1-13.
228. Magnin M., Pasteur N., Raymond M. Multiple incompatibilities within populations of *Culex pipiens* L. in southern France // *Genetica.* 1987. V. 74. P. 125–130.
229. Majerus M. E. N. *Ladybirds.* UK: Collins, London, 1994. 367 pp.
230. Majerus M. E. N., Schulenburg J. H. G.vd, Zakharov I. A. Multiple cause of male-killing in a single sample of the 2 spot ladybird, *Adalia bipunctata* (Coleoptera: Coccinellidae) from Moscow // *Heredity.* 2000. V. 84. P. 605–609.
231. Malcolm C. A., Bourguet D., Ascolillo A., Rooker S. J., Garvey C. F., Hall L. M., Pasteur N., Raymond M. A sex-linked Ace gene, not linked to insensitive acetylcholinesterase-mediated insecticide resistance in *Culex pipiens* // *Insect. Mol. Biol.* 1998. V. 7. P. 107-120.
232. Marshall J. F. *The British Mosquitoes.* London: Trustees of the British Museum, 1938. P. 253-254.
233. Martin A., Simon C. Differing levels of amongpopulation divergence in the mitochondrial DNA of periodical cicadas related to historical biogeography // *Evolution.* 1990. V. 44. P. 1066-1080.
234. Martin J., Chong T., Ferree P. M. Male Killing *Spiroplasma* Preferentially Disrupts Neural Development in the *Drosophila melanogaster* Embryo // *PLoS ONE.* 2013. V. 8(11): e79368. doi:10.1371/journal.pone.0079368.
235. Mattingly P. F. *Culex* (*Culex*) *torrentium* Martini, a mosquito new to Great Britain // *Nature, Lond.* 1951. V. 168. P. 172-173.
236. Mayr E., Ashlock P. D. *Principles of Systematic Zoology,* 2nd edn. NY.: McGraw-Hill, 1991. P. 39-54.

237. McAbee R. D., Kang K-D., Stanich M. A., Christiansen J. A., Wheelock C. E., Inman A. D., Hammock B. D., Cornel A. J. Pyrethroid tolerance in *Culex pipiens pipiens* var *molestus* from Marin County, California // Pest Management Science. 2004. V. 60. № 4. P. 359-368.
238. McAbee R. D., Green E. N., Holeman J, Christiansen J. A., Frye N., Dealey K., Mulligan F. S., Brault A. C., Cornel A. J. Identification of *Culex pipiens* complex mosquitoes in a hybrid zone of West Nile virus transmission in Fresno County, California // Am. J. Trop. Med. Hyg. 2008. V. 78. P. 303–310.
239. McGraw E. A., Merritt D. J., Droller J. N., O’Neill S. L. *Wolbachia* mediated sperm modification is dependent on the host genotype in *Drosophila* // Proc. Biol. Sci. 2001. V. 268. P. 2565–2570.
240. Meusel M. S., Moritz R. F. Transfer of paternal mitochondrial DNA during fertilization of honeybee (*Apis mellifera* L.) eggs // Curr. Genet. 1993. V. 24. № 6. P. 539–43.
241. Miles S. J. Assortative mating between *Culex fatigans* and *C. molestus* (Diptera: Culicidae) under simulated field conditions // J. Aust. Entomol. Soc. 1977. V. 16. P. 389–392.
242. Miller B. R., Crabtree M. B., Savage H. M. Phylogeny of fourteen *Culex* mosquito species, including the *Culex pipiens* complex, inferred from the internal transcribed spacers of ribosomal DNA // Insect Mol. Biol. 1996. V. 5. P. 93–107.
243. Miller W. J., Schneider D., Lind A., Daeble W., Ehrman L. The impact of *Wolbachia* on triggering sexual isolation and adaptive behavioral changes in insects // Abstract book of 7th International *Wolbachia* Conference. 2012. P. 50.
244. Mori A., Romero-Severson J., Severson Dw. Genetic basis for reproductive diapause is correlated with life history traits within the *Culex pipiens* complex // Insect molecular biology 2007. V. 16. № 5. P. 515-524.
245. Morlais I., Severson D.W. Complete mitochondrial DNA sequence and amino acid analysis of the cytochrome C oxidase subunit I (*COI*) from *Aedes aegypti* // DNA sequence. 2002. V. 13. P. 123-127.
246. Mouchès C., Pasteur N., Bergé J. B., Hyrien O., Raymond M., Robert De Saint Vincent B., De Silvestri M., Georghiou G. P. Amplification of an esterase gene is responsible for insecticide resistance in a California *Culex* mosquito // Science. 1986. V. 233. P. 778-780.
247. Mouchès C., Pamplin Y., Agarwaal M., Lemieux L., Herzog M., Abadon M., Beysat-Arnaouty V., Hyrien O., de Saint Vincent B. R., Georghiou G. P. Characterization of

- amplification core and esterase B1 gene responsible for insecticide resistance in *Culex* // Proc. Natl. Acad. Sci., USA. 1990. V. 87. P. 2574-2578.
248. Mukha D. V., Mysina V., Mavropulo V., Schal C. Structure and molecular evolution of the ribosomal DNA external transcribed spacer in the cockroach genus *Blattella* // Genome. 2011. V. 54. P. 222-234.
249. Mutebi J.-P., Savage H. M. Discovery of *Culex pipiens* form *molestus* (Diptera: Culicidae) in Chicago // J. Am. Mosq. Control Assoc. 2009. V. 25. P. 500-503.
250. Nasci R. S., Savage H. M., White D. J., Miller J. R., Cropp B. C., Godsey M. S., Kerst A. J., Bennett P., Gottfried K., Lanciotti R. S. West Nile virus in overwintering *Culex* mosquitoes, New York City, 2000 // Emerg. Infect. Dis. 2001. V. 7. № 4. P. 742-744.
251. Nei M. Analysis of gene diversity in subdivided populations // Proc. Natl. Acad. Sci., USA. 1973.V. 70. P. 3321-3323.
252. Nudelman S., Galun R., Kitron U., Spielman A. Physiological characteristics of *Culex pipiens* in the Middle East // Med. Vet. Entomol. 1988. V. 2. P. 161-169.
253. Oda T., Fujita K. A short review of the ecology of *Culex pipiens molestus* in Japan: oviposition activity in open water // Tropical Medicine. 1986. V. 28. P. 73-78.
254. O'Donald P., Majerus M. E. N. Polymorphism of melanic ladybirds maintained by frequency-dependent sexual selection // Biological Journal of the Linnean Society. 1984. V. 23. P. 101-111.
255. Oliver K. M., Degnan P. H., Burke G. R., Moran N. A. Facultative symbionts in aphids and the horizontal transfer of ecologically important traits // Annu Rev Entomol. 2010. V. 11. P. 247-266.
256. O'Neill S. L., Paterson H. E. Crossing type variability associated with cytoplasmic incompatibility in Australian populations of the mosquito *Culex quinquefasciatus* Say // Med. Vet. Entomol. 1992. V. 6. № 3. P. 209-216.
257. O'Neill S. L., Hoffman A. A., Werren J. H. Influential Passengers Inherited Microorganisms and Arthropod Reproduction. UK: Oxford, Oxford University Press, 1997. 232 pp.
258. Onyeka J. C. A. Studies on the Ecology and Biology of *Culex pipiens* L. and *Culex torrentium* Martini (Diptera: Culicidae) in Britain. Ph.D. Thesis, University of London, 1980. 329 pp.
259. Pasteur N., Rioux, J. A., Guilvard E., Pech-Perieres J. Nouvelle mention pour le 'Midi' méditerranéen, de populations naturelles anautogènes et sténogames de *Culex pipiens* L. //Annales Parasitologie. 1977. V. 52. P. 205-210. (резюме на английском).

260. Pasteur N., Sinègre G., Gabinaud A. *Est-2* and *Est-3* polymorphism in *Culex pipiens* L. from southern France in relation to organophosphate resistance // *Biochem. Genet.* 1981.V. 19. P. 499-508.
261. Paudan K. D., Ribolla P. E. Mitochondrial DNA Polymorphism and Heteroplasmy in Populations of *Aedes aegypti* in Brazil // *J. Med. Entomol.* 2008. V. 45. P. 59-67.
262. Pinto S. B., Stainton K., Harris S., Kambris Z., Sutton E. R., Bonsall M. B., Parkhill J., Sinkins S. P. Transcriptional Regulation of *Culex pipiens* Mosquitoes by *Wolbachia* Influences Cytoplasmic Incompatibility // *PLoS Pathog.* 2013. V. 9(10): e1003647. doi:10.1371/journal.ppat.1003647.
263. Porter C. H., Collins F. H. Species-diagnostic differences in a ribosomal DNA internal transcribed spacer from the sibling species *Anopheles freeborni* and *Anopheles hermsi* (Diptera: Culicidae) // *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1991. V. 45. P. 271-279.
264. Quiao C. L., Raymond M. A same esterase B1 haplotype is amplified in insecticide resistant mosquitoes of the *Culex pipiens* complex from the Americas and China // *Heredity.* 1995. V. 74. P. 339-45.
265. Rand D. M., Harrison R. G. Molecular population genetics of mtDNA size variation in crickets // *Genetics.* 1989. V. 121. P. 551-569.
266. Randerson J. P., Smith N. G. C., Hurst L. D. The evolutionary dynamics of male-killers and their hosts // *Heredity.* 2000. V. 84. P. 152-160.
267. Rasgon J. L., Scott T. W. *Wolbachia* and cytoplasmic incompatibility in the California *Culex pipiens* mosquito species complex: Parameter estimates and infection dynamics in natural populations // *Genetics.* 2003. V. 165. P. 2029-2038.
268. Rasgon J. L., Cornel A. J., Scott T. W. Evolutionary history of mosquito endosymbiont revealed through mitochondrial hitchhiking // *Proc. R. Soc. Lond. B.* 2006. V. 273. P. 1603-1611.
269. Raychoudhury R., Baldo L., Oliveira De C. S. G., Werren J. H. Modes of acquisition of *Wolbachia*: horizontal transfer, hybrid introgression, and codivergence in the *Nasonia* species complex // *Evolution.* 2009. V. 63. P. 165-183.
270. Raymond M., Callaghan A., Fort P., Pasteur N. Worldwide migration of amplified insecticide resistance genes in mosquitoes. *Nature* 1991. V. 350. P. 151-153.
271. Raymond M., Poulin E., Boiroux V., Dupont E., Pasteur N. Stability of insecticide resistance due to amplification of esterase genes in *Culex pipiens* // *Heredity.* 1993.V. 70. P. 301-307.

272. Reusken C. B. E. M., de Vries A., Buijs J, Braks M. A. H., den Hartog W., Scholte E. J. First evidence for presence of *Culex pipiens* biotype molestus in the Netherlands, and of hybrid biotype pipiens and molestus in northern Europe // J. Vector Ecol. 2010. V. 35. P. 210-212.
273. Ribeiro H., Ramos H. C. Identification keys of the mosquito (Diptera, Culicidae) of continental Portugal, Acores and Madeira // European Mosq. Bull. 1999. № 3. P. 1-11.
274. Rigaud T., Juchault P. Success and failure of horizontal transfers of feminizing *Wolbachia* endosymbionts in woodlice // Journal of Evolutionary Biology. 1995. V. 8. № 2. P. 249-255.
275. Riparbelli M. G, Giordano R., Ueyama M., Callaini G. *Wolbachia*-Mediated Male Killing Is Associated with Defective Chromatin Remodeling // PLoS ONE. 2012. V. 7(1): e30045. doi:10.1371/journal.pone.0030045.
276. Ross H. H. The colonization of temperate North America by mosquitoes and man // Mosq. News. 1964. V. 24. P. 103-118 .
277. Roubaud E. Cycle autogène d'attente et generations hivernales suractives inapparentes chez le moustique commun, *Culex pipiens* L. // C. R. Acad. Sci. Fr. 1929. V.188. P. 735-738. (резюме на английском).
278. Rozec M., Holecova M. Chromosome numbers, C-banding patterns and sperm of ladybird species from Cenral Europe (Coleoptera; Coccinelidae) // Folia Biologica (Krakow). 2002. V. 5. P. 17-21.
279. Rudolf M., Czajka C., Börstler J., Melaun C., Jöst H., Thien H.v., Badusche M., Becker N., Schmidt-Chanasit J., Krüger A., Tannich E., Becker S. First nationwide surveillance of *Culex pipiens* complex and *Culex torrentium* mosquitoes demonstrated the presence of *Culex pipiens* biotype *pipiens/molestus* hybrids in Germany // PLoS ONE. 2013.8(9): e71832.
280. Ruiz M. O., Chaves L. F., Hamer G. L., Sun T., Brown W. M., Walker E. D., Haramis L., Goldberg T. L., Kitron U. D. Local impact of temperature and precipitation on West Nile virus infection in *Culex* species mosquitoes in northeast Illinois, USA // Parasites and Vectors. 2010. V. 3 (19): doi:10.1186/1756-3305-3-19.
281. Rydzanicz K., Lonc E. Species composition and seasonal dynamics of mosquito larvae in the Wroclaw, Poland area // Journal of Vector Ecology. 2003. V. 28. P. 255-266.



282. Sanogo YO, Dobson SL (2004) Molecular discrimination of *Wolbachia* in the *Culex pipiens* complex: evidence for variable bacteriophage hyperparasitism // *Insect Mol. Biol.* V. 13. № 4. P. 365-369.
283. Sardelis M. R., Turell M. J., Dohm D. J., O'Guinn M. L. Vector competence of selected North American *Culex* and *Coquillettidia* mosquitoes for West Nile virus// *Emerg. Infect. Dis.* 2001. V. 7. P. 1018-1022.
284. Sakamoto H., Ishikawa Y., Sasaki T., Kikuyama S., Tatsuki S., Hoshizaki S. Transinfection reveals the crucial importance of *Wolbachia* genotypes in determining the type of reproductive alteration in the host // *Genet. Res.* 2005. V. 85. P. 205-210.
285. Saridaki A., Bourtzis K. *Wolbachia*: more than just a bug in insects genitals // *Curr. Opin. Microbiol.* 2010. V. 13. P. 67-72.
286. Sasa M., Shirasaka A., Kurihara T. Crossing experiments between fatigans, pallens and molestus colonies of the mosquito *Culex pipiens* s. l. From Japan and southern Asia, with special reference to hatchability of hybrid eggs // *Jpn. J. Exp. Med.* 1966. V. 36. P.187-210.
287. Sasaki T., Massaki N., Kubo T. *Wolbachia* variant that induces two distinct reproductive phenotypes in different hosts // *Heredity.* 2005. V. 95. P. 389-393.
288. Savage H.M., Anderson M., Gordon E., McMillen L., Colton L., Charnetzky D., Delorey M., Aspen S., Burkhalter K., Biggerstaff B.J., Godsey M. Oviposition activity patterns and West Nile virus infection rates for members of the *Culex pipiens* complex at different habitat types within the hybrid zone, Shelby County, TN, 2002 (Diptera: Culicidae). *J. Med. Entomol.* 2006. V. 43. P. 1227-1238.
289. Savage H. M., Aggarwal D., Apperson C. S., Katholi C.R., Gordon E., Hassan H. K., Anderson M., Charnetzky D., McMillen L., Unnasch E. A., Unnasch T.R. Host choice and West Nile virus infection rates in blood fed mosquitoes, including members of the *Culex pipiens* complex, from Memphis and Shelby County, Tennessee 2002–2003 // *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2007. V. 7. P. 365-386.
290. Satta Y., Chigusa S. I. Mitochondrial DNA in *Drosophila*: the genetics and evolution. Kimura, M. and N. Takahata, editors. *New aspects of the genetics of molecular evolution.* Japan: Tokyo, Japan Scientific Societies Press, 1991. P. 117-134.
291. Schäfer M. L., Lundström J. O., Pfeffer M., Lundkvist E., Ladin J. Biological diversity versus risk for mosquito nuisance and disease transmission in constructed wetlands in southern Sweden // *Medical and Veterinary Entomology.* 2004. V. 18. P. 256-267.
292. Schilthuizen M., Stouthamer R. Horizontal transmission of parthenogenesis inducing

- microbes in *Trichogramma* wasps // *Proc. Biol. Sci.* 1997. V. 264. P. 361-366.
293. Schulenburg J. H., Habig M., Sloggett J. J., Webberley K. M., Bertrand D., Hurst G. D., Majerus M. E. Incidence of Male-Killing *Rickettsia* spp. (α-Proteobacteria) in the ten-spot ladybird beetle *Adalia decempunctata* L. (Coleoptera: Coccinellidae) // *Appl. Environ. Microbiol.* 2001. V. 67. № 1. P. 270-277.
294. Schulenburg J. H., Hurst G. D., Tetzlaff D., Booth G. E., Zakharov I. A., Majerus M. E. History of infection with different male-killing bacteria in the two-spot ladybird beetle *Adalia bipunctata* revealed through mitochondrial DNA sequence analysis // *Genetics.* 2002. V. 160. P. 1075-1086.
295. Scott J. A., Brogdon W. G., Collins F. H. Identification of single specimens of the *Anopheles gambiae* complex by the polymerase chain reaction // *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1993. V. 49. P. 520-529.
296. Service M. W. The taxonomy and biology of two sympatric sibling species of *Culex*, *C. pipiens* and *C. torrentium* (Diptera, Culicidae) // *J. Zool. Land.* 1968. V. 156. P. 313-23.
297. Severini C., Silvestrini F., Manchini P. Sequence and secondary structure of the rDNA second internal transcribed spacer in the sibling species *Culex pipiens* L. and *Cx. quinquefasciatus* Say (Diptera, Culicidae) // *Insect Mol. Biol.* 1996. V. 5. P. 181-186.
298. Shaikevich E. V. PCR-RFLP of the *COI* gene reliably differentiates *C. pipiens*, *C. pipiens* f. *molestus* and *C. torrentium* of the Pipiens Complex // *European Mosquito Bulletin.* 2007. № 22. P. 25-30.
299. Shaikevich E. V., Fyodorova M.V., Karan L. S. Ecological study of *Culex pipiens* f. *pipiens* and *Cx. pipiens* f. *molestus* in Volgograd region, Russia, based on ovarian status and two molecular markers // *Abstract book of 5th European Mosquito Control Association Workshop.* Turin: Italy, 2009. P. 42-44.
300. Shaikevich E. V., Zakharov I. A. Polymorphism of mitochondrial *COI* and nuclear ribosomal ITS2 in *Culex pipiens* complex and in *Culex torrentium* (Diptera, Culicidae) // *Comparative Cytogenetics.* 2010. V. 4. № 2. p. 161-174.
301. Simon C., Frati F., Beckenbach A., Crespi B., Liu H., Flook P. Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers // *Annals of the Entomological Society of America.* 1994. V. 87. № 6. P. 651-701.
302. Sinkins S. P., Walker T., Lynd A. R., Steven A. R., Makepeace B. L., Godfray H. C. J., Parkhill J. *Wolbachia* variability and host effects on crossing type in *Culex* mosquitoes // *Nature.* 2005. V. 436. P. 257-260.

303. Sintupachee S., Milne J., Poonchaisri S., Baimai V., Kittayapong P. Closely Related *Wolbachia* Strains within the Pumpkin Arthropod Community and the Potential for Horizontal Transmission via the Plant // *Micro. Eco.* 2006. V. 51. P. 294-301.
304. Sirivanakarn S., White G. B. Neotype designation of *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae) // *Proc. Entomol. Soc. Wash.* 1978. V. 80. P. 360-372.
305. Small G. J., Karunaratne S. H. P. P., Chadee D. D., Hemingway J. Molecular and kinetic evidence for allelic variants of esterase Estb1 in the mosquito *Culex quinquefasciatus* // *Medical and Veterinary Entomology.* 1999. V. 13. P. 274-281.
306. Smith J. L., Fonseca D. M. Rapid assays for identification of members of the *Culex (Culex) pipiens* complex, their hybrids, and other sibling species (Diptera: Culicidae) // *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2004. V. 70. P. 339-345.
307. Smith J., Keyghobadi N., Matrone M. A., Escher R. L., Fonseca D. M. Cross-species comparison of microsatellite loci in the *Culex pipiens* complex and beyond // *Mol. Ecol. Notes.* 2005. V. 5. P. 697-700.
308. Spielman A. The inheritance of autogeny in the *Culex pipiens* complex of mosquitoes // *Am. Jour. Hyg.* 1957. V. 65. P. 404-425.
309. Spielman A. Studies on autogeny in *Culex pipiens* populations in nature. I. Reproductive isolation between autogenous and anautogenous populations // *Am. J. Hyg.* 1964. V. 80. P. 175-183.
310. Spielman A. Population structure in the *Culex pipiens* complex of mosquitoes // *Bull WHO.* 1967. V. 37. P. 271-276.
311. Spielman A. Bionomics of autogenous mosquitoes // *Annu. Rev. Entomol.* 1971. V.16. P. 231-248.
312. Spielman A., Wong, J. Studies on autogeny in natural populations of *Culex pipiens*. III. Midsummer preparation for hibernation in autogenous populations // *J. Med. Entomol.* 1973. V. 10. № 4. P. 319-324.
313. Spielman A. Structure and seasonality of nearctic *Culex pipiens* populations // *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2001. V. 951. P. 220-234.
314. Stahlhult J. K., Desjardins C. A., Clark M. I. E., Baldo L. A., Russell Jacob A., Werren J. H., Jaenike J. The mushroom habitat as an ecological arena for global exchange of *Wolbachia* // *Mol. Eco.* 2010. V. 19. № 9. P. 1940-1952.
315. Strickman D., Fonseca D.M. Autogeny in *Culex pipiens* Complex Mosquitoes from the San Francisco Bay Area // *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2012. V. 87. № 4. P. 719-726.
316. Stone A. Corrections in the taxonomy and nomenclature of mosquitoes (Diptera, Culicidae) // *Proc. Entomol. Soc. Wash.* 1957. V. 58. P. 333-344.

317. Subra R. Biology and control of *Culex pipiens quinquefasciatus* Say, 1823 (Diptera, Culicidae) with special reference to Africa // Int. J. Trop. Insect Sci. 1981. V. 1. P. 319-338.
318. Sundararaman S. Biometrical studies on integradation in the genitalia of certain populations of *Culex pipiens* and *Culex quinquefasciatus* in the United States // Am. J. Hyg. 1949. V. 50. P. 307-314.
319. Tamura K., Dudley J., Nei M., Kumar S. MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0 // Mol. Biol. Evol. 2007. V. 24. P. 1596-1599.
320. Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M., Kumar S. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods // Mol. Biol. Evol. 2011. V. 28. P. 2731-2739.
321. Tanaka K. Studies on the pupal mosquitoes of Japan (10) *Culex* (*Culex*) (Diptera, Culicidae) // Jpn. J. syst. Entomol. 2004. V. 10. № 1. P. 9-42.
322. Tatar M., Chien S. A., Priest N. K. Negligible senescence during reproductive dormancy in *Drosophila melanogaster* // Am. Nat. 2001. V. 158. P. 248 -258.
323. Taylor M. F. J., McKechnie S. W., Pierce N., Kreitman M. The lepidopteran mitochondrial control region: structure and evolution // Mol. Biol. Evol. 1993. V. 10. P. 1259-1272.
324. Taylor M. J., Voronin D., Johnston K. L., Ford L. *Wolbachia* filarial interactions // Cellular Microbiology. 2013. V. 15. P. 520-526.
325. Tiawsirisup S., Platt K.B., Evans R.B., Rowley W.A. A comparison of West Nile virus transmission by *Ochlerotatus trivittatus* (COQ.), *Culex pipiens* (L.), and *Aedes albopictus* (Skuse) // Vector-Borne Zoonotic Dis. 2005. V. 5. P. 40-47.
326. Timofeeff-Ressovsky N. W. Mutations and geographical variation. In The New Systematics, edited by Huxley J. UK: Oxford, Oxford University Press, 1940. P. 73-136.
327. Turell M. J., Sardelis M. R., O'Guinn M. L., Dohm D. J. Potential vectors of West Nile virus in North America. In: Mackenzie, J., Barrett, A., Deubel, V. (Eds.), Japanese Encephalitis and West Nile Viruses // Current Topics in Microbiology and Immunology. Berlin: Springer-Verlag, 2002. V. 267. P. 241-252.
328. Turell M. J., Dohm D. J., Sardelis M. R., O'Guinn M. L., Andreadis T. G., Blow J. A. An update on the potential of North American mosquitoes (Diptera: Culicidae) to transmit West Nile virus // J. Med. Entomol. 2005. V. 42. P. 57-62.
329. Turelli M., Hoffmann A. A., McKechnie S. W. Dynamics of cytoplasmic incompatibility and mtDNA variation in natural *Drosophila simulans* populations // Genetics. 1992. V. 132. P. 713-723.

330. Turelli M., Hoffmann A. A. Cytoplasmic incompatibility in *Drosophila simulans*: dynamics and parameter estimates from natural populations // *Genetics*. 1995. V. 140. P. 1319-1338.
331. Urbanelli S., Silvestrini F., Sabatinelli G., Raveloarifera F., Petrarca V., Bullini L. Characterization of the *Culex pipiens* complex (Diptera: Culicidae) in Madagascar // *J. Med. Entomol.* 1995. V. 32. № 6. P. 778-786.
332. Urbanelli S., Silvestrini F., Reisen W. K., De Vito E., Bullini L. Californian hybrid zone between *Culex pipiens pipiens* and *Cx. p. quinquefasciatus* revisited (Diptera: Culicidae) // *J. Med. Entomol.* 1997. V. 34. P. 116-127.
333. Urbanelli S., Sabatini A., Bullini L. Tassonomia morfologica e biochimica di *Culex pipiens* e *Culex torrentium* // *Parassitologia*. 1981. V. 23. P. 279-281. (резюме на английском).
334. Van Kuppeveld F. J. M., Van der Logt H. T. M., Angulo A. E, Van Zoest M. J., Quint W. G. V, Niesters H. G. M., Galama J. M. D., Melchers W J. G. Genus- and species-specific identification of mycoplasmas by 16S rRNA amplification // *Appl. Environ. Microbiol.* 1992. V. 58. P. 2606-2615.
335. Van Riper C., Van., Riper S. G., Goff M. L., Laird M. The epizootiology and ecological significance of malaria in Hawaiian (USA) land birds // *Ecol. Monogr.* 1986. V. 56. P. 327-344.
336. Vaughan A., Rodriguez M., Hemingway J. The independent gene amplification of indistinguishable esterase B electromorphs from the insecticide resistant mosquito *Culex quinquefasciatus* // *Biochemical Journal*. 1995. V. 305. P. 651-658.
337. Vaughan A., Hawkes N., Hemingway J. Co-Amplification explains linkage disequilibrium of two mosquito esterase genes in insecticide resistant *Culex quinquefasciatus* // *Biochemical Journal*. 1997. V. 325. P. 359-365.
338. Vavre F., Fleury F., Lepetit D., Fouillet P., Bouletreau M. Phylogenetic evidence for horizontal transmission of *Wolbachia* in host-parasitoid associations // *Mol. Biol. Evol.* 1999. V. 16. № 12. P. 1711-1723.
339. Veneti Z., Clark M. E., Zabalou S., Karr T. L., Savakis C., Bourtzis K. Cytoplasmic incompatibility and sperm cyst infection in different *Drosophila*–*Wolbachia* association // *Genetics*. 2003. V. 164. P. 545-552.
340. Veneti Z., Bentley J. K., Koana T., Braig H. R., Hurst G. D. A functional dosage compensation complex required for male killing in *Drosophila* // *Science*. 2005. V. 307. P. 1461-1463.

341. Villani F., Urbanelli S., Gad A., Nudelman S., Bullini L. Electrophoretic variation of *Culex pipiens* from Egypt and Israel // Biol. J. Linn. Soc. 1986. V. 29. P. 49–62.
342. Vinogradova E. B. *Culex pipiens pipiens* Mosquitoes: Taxonomy, Distribution, Ecology, Physiology, Genetics, Applied Importance and Control. Sofia: Pensoft Publishers, 2000. 250 pp.
343. Vinogradova E. B. Ecophysiological and morphological variations in mosquitoes of the *Culex pipiens* complex (Diptera: Culicidae) // Acta Soc. Zool. Bohem. 2003. V. 67. P. 41–50.
344. Vinogradova E. B., Shaikovich E. V., Ivanitsky A. V. The study on the distribution of the *Culex pipiens* complex mosquitoes in the European part of Russia by molecular methods of their identification // Comparative Cytogenetics. 2007. V. 1. № 2. P. 129-138.
345. Vinogradova E. B., Shaikovich E. V. 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 // European mosquito Bulletin. 2007. №. 22. P. 17-24.
346. Walker T., Song S., Sinkins S. P. *Wolbachia* in the *Culex pipiens* group mosquitoes: introgression and superinfection // Journal of Heredity. 2009. V. 100. P. 192–196.
347. Weinert L. A., Tinsley M. C., Temperley M., Jiggins F. M. Are we underestimating the diversity and incidence of insect bacterial symbionts? A case study in ladybird beetles // Biol. Lett. 2007. V. 3. P. 678-681.
348. Weitzel T., Collado A., Jöst A., Pietsch K., Storch V., Becker N. Genetic differentiation of populations within the *Culex pipiens* Complex (Diptera:Culicidae) and phylogeny of related species // J. Am. Mosq. Control. Assoc. 2009. V. 25. P. 6-17.
349. Weitzel T., Braun K., Collado A., Jöst A., Becker N. Distribution and frequency of *Culex pipiens* and *Culex torrentium* (Culicidae) in Europe and diagnostic allozyme markers // European Mosquito Bulletin. 2011. № 29. P. 22-37.
350. Werren J. H., Hurst G. D. D., Zhang W., Breeuwer J. A. J., Stouthamer R., Majerus M. E. *Rickettsial* Relative Associated with Male Killing in the Ladybird Beetle (*Adalia bipunctata*) // Journal of Bacteriology. 1994. V. 176. P. 388-394.
351. Werren J. H., Windsor D., Guo L. Distribution of *Wolbachia* among Neotropical arthropods // Proc. R. Soc. B. 1995. V. 262. P. 55-63.
352. Werren J. H. Biology of *Wolbachia* // Annu. Rev. Entomol. 1997. V. 42. № 1. P. 587–609.
353. Werren J. H., Baldo L., Clark M.E. *Wolbachia*: master manipulators of invertebrate biology // Nat. Rev. Microbiol. 2008. V. 6. P. 741- 51.

354. Whang I. J., Jung J., Park J. K., Min G. S., Kim W. Intragenomic length variation of the ribosomal DNA intergenic spacer in a malaria vector, *Anopheles sinensis* // Mol. Cells. 2002. V. 14. P. 158-162.
355. Williams S. G., Sacci J. B., Schriefer M. E., Andersen E. M., Fujioka K. K., Sorvillo F. J., Barr A. R., Azad A. F. Typhus and typhuslike rickettsiae associated with opossums and their fleas in Los Angeles County, California // J. Clin. Microbiol. 1992. V. 30. P. 1758-1762.
356. Wilton D. P., Smith G. C. Ovarian diapause in three geographic strains of *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) // J. Med. Entomol. 1985. V. 22. P. 524-528.
357. Wray F. C. Six generations of *Culex pipiens* without a bloodmeal // Mosq. News. 1946. V. 6. P. 71-72.
358. Wu C. C., Fallon A. M. Analysis of a ribosomal DNA intergenic spacer region from the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti* // Insect. Mol. Biol. 1998. V. 7. P. 19-29.
359. Xiao J.-H., Wang N.-X., Murphy R. W., Cook J., Jia L. Y., Huang D. W. *Wolbachia* infection and dramatic intraspecific mitochondrial DNA divergence in a fig wasp // Evolution. 2012. V. 66. P. 1907-1916.
360. Yen J. H., Barr A. R. New hypothesis of the cause of cytoplasmic incompatibility in *Culex pipiens* L. // Nature. 1971. V. 232. P. 657-658.
361. Zakharov I. A., Shaikevich E. V. The Stockholm populations of *Adalia bipunctata* (L) (Coleoptera: Coccinellidae) - a case of extreme female-biased population sex ratio // Hereditas. 2001. V. 134. № 3. P. 263-266.