

На правах рукописи

ГОРЯЧЕВА Ирина Игоревна

**ГЕНЕТИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ ПОПУЛЯЦИЙ НАСЕКОМЫХ В СВЯЗИ С
ИХ ИНВАЗИВНОСТЬЮ И БИОЛОГИЧЕСКИМИ ЭФФЕКТАМИ
БАКТЕРИАЛЬНЫХ СИМБИОНТОВ**

03.02.07 – генетика

АВТОРЕФЕРАТ

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

МОСКВА – 2016

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук.

Научный консультант: член–корреспондент Российской академии наук, доктор биологических наук, профессор И.А. Захаров-Гезехус

Официальные оппоненты: Мария Сергеевна Раутиан
доктор биологических наук, профессор, ведущий научный сотрудник биологического факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования "Санкт-Петербургский государственный университет"

Елена Алексеевна Ляпунова доктор биологических наук, профессор, главный научный сотрудник Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова Российской академии наук

Евгений Александрович Климов
доктор биологических наук, доцент, ведущий научный сотрудник кафедры генетики биологического факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова»

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова Российской академии наук

Защита состоится _____ на заседании диссертационного совета Д 002.214.01, созданного на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук, по адресу: 119991. Москва, ул. Губкина, д.3.

С диссертацией и авторефератом можно ознакомиться в библиотеке и на сайте Института www.vigg.ru, телефон: 8(499)135-1431.

Автореферат разослан « ___ » _____ 2017 года.

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат биологических наук

Синельщикова Т.А.

ВВЕДЕНИЕ

Общая характеристика работы

Актуальность проблемы. Насекомые (класс Insecta) традиционно находятся в фокусе пристального внимания специалистов-биологов, что обусловлено многочисленностью видов, их повсеместным распространением и значимостью насекомых для экосистем. С позиций фундаментальных исследований эта группа живых организмов привлекательна благодаря возможности создания с ее участием моделей, позволяющих на молекулярном уровне изучать макро- и микроэволюционные процессы и процессы жизнедеятельности, а также разрабатывать новые биотехнологии.

Насекомые оказывают значительное влияние на здоровье и хозяйственную деятельность человека. Они являются переносчиками заболеваний человека и животных, вредителями сельскохозяйственных культур и агентами биоконтроля и поэтому предстают в центре фундаментальных и научно-практических работ по генетике, эпидемиологии, экологии, ветеринарии и защите растений. Среди эпидемиологически опасных двукрылых особое место занимают переносчики малярии человека – комары рода *Anopheles*. Исследование этой группы, прежде всего распространенного на территории Российской Федерации палеарктического комплекса *An. maculipennis*, приобрело особую актуальность с середины 90-х годов XX-го столетия в связи со вспышкой эпидемии малярии в странах Европейского региона ВОЗ и описанием новых для комплекса *maculipennis* видов. Генетическая идентификация представителей комплекса, в который входят сибсовые и гомосеквентные виды, позволяет формировать целостную картину распространения переносчиков, проводить оценку рисков возникновения новых и сохранения уже известных очагов заболевания и эффективно контролировать численность переносчиков.

Вопросы контроля численности оказываются значимыми не только для переносчиков заболеваний человека и животных, но и для инвазивных видов, создающих угрозы биоразнообразию аборигенных экосистем. К числу таких видов относится жук-божья коровка *Harmonia axyridis* Pallas (1763) (Coleoptera: Coccinellidae). Как агент биологического контроля тлей и кокцид активный афидофаг *H. axyridis* с 1916 г. неоднократно интродуцировалась в Северную Америку, с 1982 г. – в Европу и с 1986 г. – в Южную Америку. Несмотря на периодически повторяющиеся в целях акклиматизации выпуски насекомых из различных популяций нативного ареала в регионы-реципиенты, вид на протяжении десятилетий не натурализовался в новых для него местообитаниях. В конце XX-го века неожиданно началась глобальная экспансия *H. axyridis*, захватившая к настоящему времени четыре континента и сопровождающаяся нарастанием численности популяций инвайдера, снижением общего уровня биоразнообразия и подавлением аборигенных видов афидофагов. Приобретение высокой инвазивности у *H. axyridis* могло быть связано с комплексом существующих в ее нативных популяциях преадаптаций, для выявления которых необходимо понимание микроэволюционных процессов, происходящих в границах исторического ареала и на его инвазивной части. Репродуктивные симбиотические бактерии могут рассматриваться в этой связи в контексте динамики генетической структуры популяций, прежде всего, как фактор, влияющий на подразделенность популяций и потенциально изменяющий половую структуру инфицированных популяций.

Репродуктивные симбиотические бактерии представляют группу облигатных симбионтов-прокариот. Развитие методов молекулярно-генетического анализа кардинально изменило представления об облигатных эндосимбионтах как малораспространенных живых организмах, хотя еще несколько десятилетий назад эндосимбиоз между насекомыми и бактериями считался относительно редким явлением. Скрининг популяций насекомых и выполненные на основании этого скрининга оценки позволили предположить, что более 70% видов насекомых заражено цитоплазматическими бактериями. Здесь следует уточнить, что в рамках настоящего исследования термин «симбиоз» понимается в широком смысле как

различные формы совместного существования разноимённых организмов, составляющих симбиотическую систему.

Wolbachia pipientis является наиболее распространённым эндосимбионтом насекомых. В последние два десятилетия на ней было сосредоточено внимание исследователей, поскольку этот вид альфа-протеобактерий детерминирует все четыре известных к настоящему моменту модификации репродукции хозяина: цитоплазматическую несовместимость, феминизацию, партеногенез и андроцид. Эти нарушения репродуктивного поведения рассматриваются как выгодные не только для бактерии, но и для хозяина, поскольку увеличивают доступность пищевых ресурсов для зараженных индивидуумов на критических стадиях онтогенеза и смещают соотношение полов в инфицированных популяциях в сторону самок, что обеспечивает быстрое нарастание численности особей инфицированной популяции. Однако виды, для которых описаны нарушения репродукции под влиянием *Wolbachia*, относительно немногочисленны, в большинстве же случаев бактерионосительство не имеет явных эффектов, или же эффекты остаются не известными. Отсутствие очевидного влияния бактерии на биологию и репродукцию насекомого-хозяина стало причиной того, что взаимоотношения партнеров в таких «бессимптомных» симбиотических системах еще совсем недавно оценивались как нейтральные. Однако последнее маловероятно. Длительное совместное существование, поддерживаемое коэволюцией геномов хозяина и бактерии, должно неизбежно сопровождаться возникновением специфических адаптаций партнеров. Удобным объектом для изучения таких адаптаций и исследования тонких механизмов взаимодействия насекомого и бактерии является система *Drosophila melanogaster-Wolbachia*, в которой не обнаруживается явных эффектов бактерионосительства, за исключением слабой цитоплазматической несовместимости в скрещиваниях некоторых лабораторных линий. Очевидное противоречие между перманентным инфекционным статусом природных популяций *D. melanogaster* и высокой – до 5% – частотой потери *Wolbachia* при ее вертикальной передаче позволяет высказать предположение о мутуалистических взаимоотношениях хозяина и эндосимбиотической бактерии, а также о существовании компенсаторных механизмов, обеспечивающих поддержание *Wolbachia*. Можно предполагать, что эти механизмы, обеспечивающие сохранение бактерии в популяциях *D. melanogaster*, затрагивают как репродуктивную, так и другие особенности биологии хозяина, включая возможность альтернативной передачи бактерии через гаметы самца и инфекционную передачу, а также влияние симбионта на компоненты приспособленности хозяина на различных стадиях онтогенеза и устойчивость к факторам внешней среды.

Принципиальным аспектом симбиотических отношений представляется сохранение целостности и функциональности генома *Wolbachia* в условиях облигатного внутриклеточного существования, ограничивающего рекомбинацию. Биоинформационный анализ позволил получить доказательства рекомбинационных событий (Werren, Bartos, 2001, Reuter, Keller, 2003, Verne *et al.*, 2007, Ros *et al.*, 2012, Yang *et al.*, 2013), однако экспериментальное подтверждение рекомбинации у *Wolbachia* отсутствовало. Исследование возможности рекомбинации осуществимо в условиях клеточной культуры, коинфицированной несколькими бактериальными линиями. Изучение особенностей сохранения стабильности генома *Wolbachia* важно для понимания механизмов сохранения его целостности и функциональности при инфицировании широкого круга насекомых-хозяев, а также для разработки экспериментальных подходов по конструированию штаммов *Wolbachia* с заданными характеристиками. Именно такие штаммы *Wolbachia* с уже известными характеристиками представляются наиболее перспективными для их использования в целях контроля численности эпидемиологически опасных и инвазивных видов насекомых.

Степень разработанности проблемы. Исследования представителей комплекса *An. maculipennis* были начаты в 30-х годах XX-го века. К концу столетия видовой состав комплекса в основном был изучен. Диагностика проводилась на основании методов морфологического (Гуцевич *и др.*, 1970) и цитогенетического анализа. Значительный вклад в разработку цитогенетических подходов был внесен В.Н. Стегнием с сотрудниками, которые, основываясь

на особенностях структуры политенных хромосом слюнных желез личинок четвертого возраста, описали новый вид комплекса – *An. beklemishevi* и восстановили валидность вида *An. martinius* (Стегний, Кабанова, 1976; Stegnij, Kabanova, 1978; Стегний *и др.*, 1978; Стегний, 1976, 1980, 1981; Stegnii, 1997). Генетическая идентификация *An. martinius* с использованием методов молекулярно-генетического анализа в тот момент по объективным причинам проведена не была. Достижением школы стало описание внутривидового полиморфизма структуры политенных хромосом *An. messeae* (Стегний, 1991, 1993), а также разработка принципов генетической идентификации представителей комплекса по архитектуре политенных хромосом трофоцитов взрослых самок (Стегний, 1979, 1987; Широкова *и др.*, 1999). Широкое использование методов молекулярно-генетического анализа привело к описанию в начале нынешнего столетия двух новых видов – *An. persiensis* (Sedaghat *et al.*, 2003) и *An. daciae* (Nicolescu *et al.*, 2004). Достоверность генетической идентификация последнего вызывала большие сомнения, поскольку этот вид был выделен из *An. messeae* на основании пяти нуклеотидных замен полиморфной многокопийной последовательности второго внутреннего транскрибируемого спейсера кластера рибосомных генов (ITS2). Отсутствие достоверных данных о валидности *An. daciae* и необходимость сопоставления данных морфологического и цитогенетического анализа с молекулярно-генетическими признаками *An. martinius* требовала специального изучения. Изменение ареалов видов комаров комплекса *An. maculipennis*, связанное, вероятнее всего, с глобальным потеплением, делает особенно актуальной разработку методов идентификации видов рода *Anopheles*.

Глобальная инвазия актуализировала исследования *H. axyridis*. Работы, выполненные в конце 90-х – начале 2000-х годов, в основном были посвящены вопросам биологии и экологии вида с позиций его особенностей, благоприятных для захвата новых территорий и быстрого распространения (Michaud, 2002; Félix, Soares, 2004; Labrie *et al.*, 2006; Hemptinne *et al.*, 2012; Majerus *et al.*, 2006; Michaud, 2003; Roy *et al.*, 2006; Berkvens *et al.*, 2008; 2010; Cottrell, Shapiro-Pan, 2008; Ware, Majerus, 2008; Nedvěd *et al.*, 2010). Приоритет в исследовании генетики *H. axyridis* принадлежит Ф.Г. Добржанскому, который в 20-30-е годы опубликовал серию блестящих работ по полиморфизму кокцинеллид (Dobzhansky, 1924, 1933, 1937). Более или менее систематические исследования генетики *H. axyridis* в связи с инвазией были начаты в середине первого десятилетия нашего века. Целью этих работ было изучение генетической структуры нативных и инвазивных популяций для определения популяции – источника инвазии, выяснение генетических преадаптаций к инвазии и исследование процессов, имевших место на первых этапах инвазии при формировании плацдармной популяции (Thomas *et al.*, 2010; Greenstone *et al.*, 2011; Lombaert *et al.*, 2010; Lombaert, 2011; Turgeon *et al.*, 2011). Некоторые из указанных вопросов решались и в рамках представленной работы. Специальной и оригинальной проблемой настоящего исследования стало изучение видового состава, распространения и изменчивости репродуктивных эндосимбиотических бактерий в границах нативного и инвазивного ареала *H. axyridis* для оценки возможностей их влияния на инвазивный потенциал вида-хозяина.

Начало изучения генетики симбиотических отношений у насекомых было положено в 1971 году с описанием цитоплазматической несовместимости, возникающей у комаров *Culex pipiens* под влиянием *W. pipientis* (Yen, Barr, 1971). Несколько позже и на других видах были описаны детерминируемые репродуктивными эндосимбионтами партеногенез (Stouthamer *et al.*, 1999), феминизация генетических самцов (Rousset *et al.*, 1992) и андроид (Jiggins *et al.*, 1998, 2000). Поскольку результатом любого из указанных изменений репродукции оказывалось негативное в определенном смысле влияние на хозяина, выражавшееся либо в уменьшении числа потомков инфицированных насекомых, либо в элиминации самцов, в зарубежной литературе эти явления получили название «репродуктивного паразитизма». Параллельно с описанием эффектов предпринимались усилия для выяснения механизмов реализации изменений репродуктивного поведения (Breeuwer, Werren, 1990; Reed, Werren, 1995; Lassy, Karr, 1996; Callaini *et al.*, 1997; Tram *et al.*, 2006; Landmann *et al.*, 2010 и др.). Развитие методов молекулярно-генетического анализа привело к пониманию не только масштабности заражения

энтомофауны репродуктивными эндосимбиотическими бактериями, но и к выявлению множества «бессимптомных» симбиозов. Следующим этапом развития знаний о генетике симбиотических отношений стало изучение симбиозов без видимых репродуктивных эффектов бактерионосительства. Это направление интенсивно развивается и в настоящее время, закономерным следствием и итогом чего становится изменение взгляда на симбиотические отношения между бактерией и насекомым, рассматривающиеся в настоящее время как важный фактор эволюции геномов насекомых. Это утверждение постепенно приобретает статус парадигмы.

Цели исследования

Целью настоящей работы является изучение биоразнообразия насекомых и его структуры в связи с процессами видообразования и эффектами бактериальных цитоплазматических симбионтов насекомых. Указанная цель исследования направлена на получение данных, которые могут быть положены в основу разработки подходов к контролю численности эпидемиологически опасных и инвазивных видов насекомых.

Задачи исследования

- I. Генетическая идентификация видов малярийных комаров представителей комплекса *Anopheles maculipennis* со спорным таксономическим статусом, обитающих на территории России и сопредельных государств:
 1. Изучение особенностей первичной структуры маркерных областей генома – второго внутреннего транскрибируемого спейсера кластера рибосомных генов (ITS2) и фрагмента гена цитохромоксидазы I (*cox1*).
 2. Комплексный анализ молекулярно-генетических особенностей, цитогенетических характеристик и морфологических признаков переносчиков малярии комплекса «*maculipennis*» для оценки генетической дифференциации и идентификации видов со спорным таксономическим статусом.
- II. Изучение внутривидовой дифференциации, генетического груза и разнообразия цитоплазматических симбионтов как генетической компоненты преадаптации к инвазиям у азиатской божьей коровки *H. axyridis*.
 3. Характеристика внутривидовой дифференциации *H. axyridis* по изменчивости митохондриального гена *cox1* и микросателлитных маркеров.
 4. Выявление генетического груза в границах нативного и инвазивного ареала *H. axyridis*.
 5. Определение видового состава и распространения внутриклеточных репродуктивных эндосимбионтов *H. axyridis* и оценка их вклада в формирование способности к инвазии.
- III. Исследование влияния симбиотической цитоплазматической бактерий *W. pipientis* на хозяина *D. melanogaster* и изучение генетических механизмов сохранения симбиотической системы:
 6. Оценка влияния симбиотической бактерии *Wolbachia* на компоненты приспособленности у *D. melanogaster*.
 7. Описание особенностей полового поведения мух *D. melanogaster* с различным инфекционным статусом.
 8. Изучение возможности двуродительского наследования *Wolbachia* у дрозофил.
 9. Получение пересеваемой клеточной культуры как упрощенной модельной системы для изучения генетических аспектов симбиотических отношений между *D. melanogaster*-*W. pipientis* и изучение возможности рекомбинации *Wolbachia* в пересеваемой клеточной культуре.

Научная новизна

Применение комплексного подхода, основанного на использовании методов морфологического, цитогенетического и молекулярно-генетического анализа позволило идентифицировать, описать и изучить распространение нового вида – *An. artemievi*. Молекулярно-генетические характеристики – полиморфизм структуры ITS2 и митохондриального гена *cox1* – не поддерживают разделение *An. daciae* и *An. messeae* на самостоятельные виды.

Показано, что инвазивные популяции *H. axyridis* Старого и Нового света имеют общее происхождение. В нативных и инвазивных популяциях *H. axyridis* выявлены различия по времени поколения, являющемся одной из компонент преадаптации к инвазии. Выявлена инфицированность *H. axyridis* репродуктивными симбиотическими бактериями. *Rickettsia* у *H. axyridis* обнаружена впервые, этот симбионт относится к группе *R. bellii*, тогда как *Rickettsia*-симбионты других видов кокцинеллид входят в группу *Rickettsia* AB. Впервые показано, что *H. axyridis* инфицирована неродственными линиями *Wolbachia*, представляющими супергруппы A, B, E и N. *Wolbachia* из супергрупп A, E и N у *H. axyridis* найдена впервые. *Spiroplasma* обнаружена только в нативных популяциях *H. axyridis*, что предполагает отрицательные ассоциативные связи этого репродуктивного цитоплазматического симбионта с формированием способности к инвазии у *H. axyridis*. Выявлены новые молекулярные формы *Spiroplasma*. Впервые выявлена множественная индивидуальная инфекция хозяина этой бактерией. *Rickettsia* и *Wolbachia*, встречающиеся в инвазивных популяциях хозяина с невысокой частотой, по всей видимости не являются лимитирующим фактором инвазивности *H. axyridis*.

Впервые показано, что продолжительность жизни, скорость реализации процессов старения и гибели различаются у самок *D. melanogaster* с различным инфекционным статусом. У инфицированных самок скорость отмирания ниже, чем у генотипически идентичных неинфицированных. Впервые получены данные о повышенной устойчивости инфицированных *Wolbachia* *D. melanogaster* к энтомопатогенным грибам в стрессовых условиях среды. Показано влияние инфекции *Wolbachia* на избирательность репродуктивного поведения дрозофилы. Впервые изучена возможность и особенности передачи бактерии через гаметы самца и ассортативность спариваний у мух с различным инфекционным статусом. Вертикальная передача *Wolbachia* через гаметы самцов и ассортативность спариваний являются элементами комплексной системы, поддерживающей стабильность инфекционного статуса популяции.

Получена и охарактеризована пересеваемая клеточная культура клеток *Drosophila melanogaster*, инфицированная *Wolbachia*. Впервые экспериментально показана возможность рекомбинации двух штаммов *Wolbachia* в клетках клеточной культуры при коинфекции.

Выдвинута гипотеза о том, что совокупность выявленных эффектов приспособленности может способствовать расширению экологической амплитуды вида, повышая стабильность его популяционной системы. Полученные в ходе настоящего исследования данные позволяют пересмотреть существующую концепцию о нейтральности отношений партнеров в симбиотической системе. Симбиотические организмы существенно влияют на хозяина, расширяя его адаптационные возможности за счет изменений, затрагивающих как репродуктивную стратегию, так и другие особенности биологии вида.

Теоретическая и практическая значимость

Результаты настоящего исследования могут быть использованы – для разработки методологии борьбы с инвазивными и эпидемиологически опасными видами насекомых.

– в научно-методической практике – лекциях для студентов и аспирантов МГОУ и других вузов по специальности «биология и экология».

Методы исследования

Работа выполнена с использованием методов генетического, морфологического, цитогенетического, молекулярно-генетического анализа, статистического и биоинформационного анализа.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Малярийный комар *Anopheles artemievi* Gordeev et al., распространенный в ряде регионов Средней Азии, является новым видом – представителем комплекса «maculipennis». *An. artemievi* характеризуется специфическими молекулярно-генетическими признаками и несвойственной другим видам комплекса совокупностью морфологических и цитогенетических особенностей.
2. *An. messeae sensu lato* характеризуется высоким полиморфизмом маркерных областей генома – второго внутреннего транскрибируемого спейсера кластера рибосомных генов ITS2 и митохондриального гена *cox1*. Изменчивость *An. daciae* по указанным маркерам находится в пределах внутривидовой изменчивости *An. messeae sensu lato*.
3. Инвазивный вид азиатской божьей коровки *Harmonia axyridis* в границах нативного ареала генетически дифференцирован на восточную и западную группы популяций. Основным источником инвазии являются популяции восточной группы. Инвазивные популяции, по всей видимости, имеют общее происхождение.
4. Факторами, обеспечившими успешное укоренение и глобальную инвазию *H. axyridis*, стали повышение жизнеспособности и восстановление генетической изменчивости в инвазивных популяциях на уровне, свойственном нативным популяциям.
5. *H. axyridis* инфицирована тремя видами репродуктивных цитоплазматических симбиотических бактерий – *Rickettsia*, *Wolbachia* и *Spiroplasma*. Эволюционная история *H. axyridis* характеризуется неоднократными событиями инфицирования репродуктивными цитоплазматическими бактериями *Rickettsia*, *Wolbachia* и *Spiroplasma*.
6. *Spiroplasma* является более функционально значимым симбионтом для *H. axyridis*, чем *Rickettsia* и *Wolbachia*. Отсутствие в инвазивных популяциях хозяина *Spiroplasma* позволяет предполагать наличие отрицательной связи этого эндосимбионта с формированием способности к инвазии у *H. axyridis*.
7. Отношения партнеров в симбиотической системе *D. melanogaster* и *W. pipientis* являются мутуалистическими. Наследуемая по материнской линии цитоплазматическая бактерия *Wolbachia* повышает приспособленность зараженного хозяина *D. melanogaster*.
8. Бактерия *Wolbachia* оказывает влияние на репродуктивное поведение хозяина – *D. melanogaster*. Сложная система ассортативных скрещиваний зависит от генотипа и инфекционного статуса линий *D. melanogaster*. Реализации специфического репродуктивного поведения хозяина обеспечивает частичную компенсацию спонтанной потери *Wolbachia* при материнском наследовании. Альтернативное наследования через гаметы самца также является элементом компенсаторной системы сохранения *Wolbachia* у *D. melanogaster*.
9. В условиях клеточной культуры происходит рекомбинация между линиями *Wolbachia*. Гомологичная рекомбинация может рассматриваться как наиболее вероятный молекулярный механизм рекомбинации *Wolbachia* у *D. melanogaster*.

Степень достоверности и апробация работы

Все представленные в работе результаты подтверждены в необходимых случаях статистически и являются достоверными.

Результаты работы были доложены или представлены на следующих семинарах, конференциях и конгрессах: Первом совещании по региональной инициативе, Ташкент, Узбекистан, 18-20 октября 2005 года, 48th Annual Drosophila Research Conference, Philadelphia, Pensilvania, March 7-11 2007; Международной конференции «Малярия: актуальные проблемы для стран Европейского региона Всемирной организации здравоохранения», Москва, Россия, 10-11 апреля 2008 года, 5th European Mosquito Control Association Workshop Turin, Italy 9th-13th March 2009; International Symposium Ecology of aphidophaga 12, Belgrade-Serbia, September 9-13, 2013, 3rd Meeting of IOBS-WPRS study group «Benefits and risks of exotic biological control agents» 13th-15th May 2015, Bornholm-Denmark, 6-th International workshop «Invertebrates in Zoo and Insectarium Collections» 10-15 октября 2016, Москва-Россия, на научных семинарах Института общей генетики им. Н. И. Вавилова РАН.

Публикации

Материалы диссертации опубликованы в 31 статье в международных и отечественных журналах, из них 30 в журналах списка ВАК, а также в 1 монографии.

Результаты работы внедрены в научно-педагогическую практику Московского областного государственного университета (Москва, ул. Радио, д. 10).

Личный вклад автора

Все результаты, представленные в работе, получены при непосредственном участии автора в период с 1998 по 2016 год. При постановке проблемы диссертационного исследования, формулировке проблем, целей и задач исследования участие автора было решающим. Автором спланировано и выполнено большинство (80%) экспериментов, проведена подготовка и анализ результатов и их подготовка к публикации.

Результаты

3.1 Генетическая идентификация видов малярийных комаров комплекса *An. maculipennis*

3.1.1 Идентификация нового вида малярийных комаров *Anopheles artemievi sp.n.* в комплексе *maculipennis*

3.1.1.1 Идентификация по морфологическим признакам

По морфологическим признакам имаго, личинок и яиц *An. artemievi* является видом-двойником *An. sacharovi* и *An. martinius*. *An. artemievi* имеет характерные для *An. sacharovi* и *An. martinius* окраску тела, среднеспинки и пятен на крыльях. У личинок *An. artemievi* не обнаружено морфологических различий, позволяющих отличать новый вид. Яйца *An. artemievi* однотипные – одноцветные, без полос и пятен, лишённые воздушных камер, с оторочкой (рисунок 3.1.1) и отличаются от яиц *An. maculipennis*.

3.1.1.2 Цитогенетическая идентификация

Вид *An. artemievi* является гомосеквентным с видом *Anopheles maculipennis*. Политенные хромосомы слюнных желез личинок отличается от хромосом *Anopheles martinius* по структуре аутосом 2R, 3L и половой хромосоме XL.

Обнаруженные противоречия между морфологическими и цитогенетическими особенностями изученных образцов привели к необходимости молекулярно-генетического анализа.

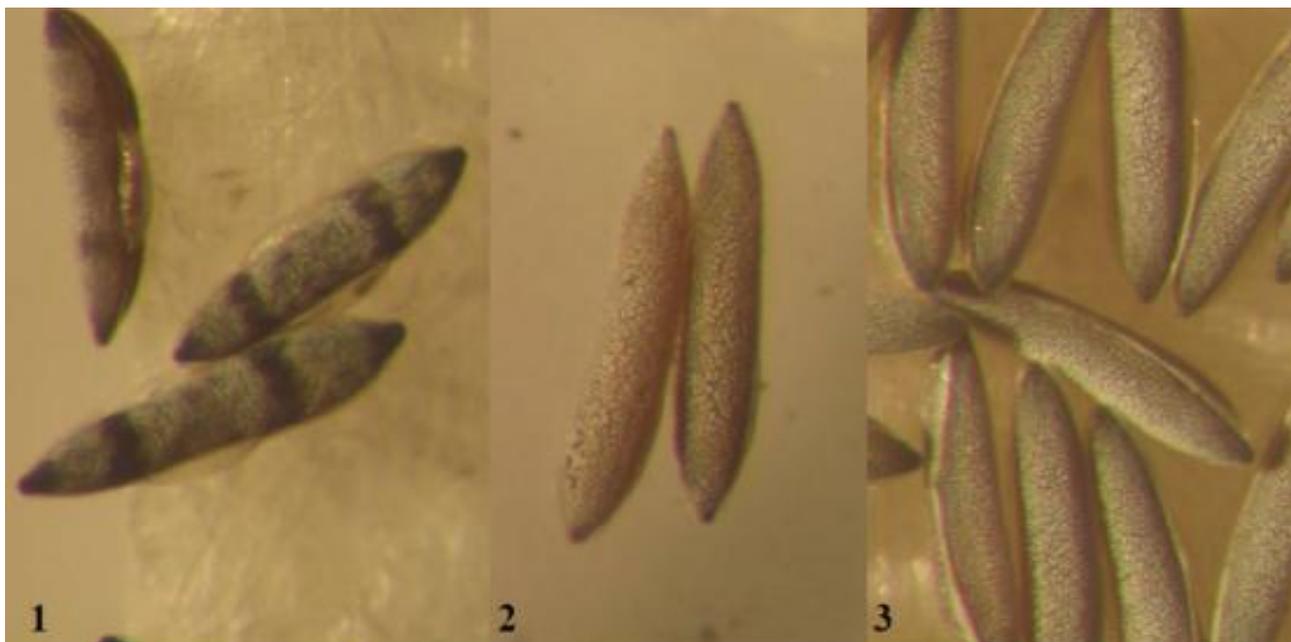


Рисунок 3.1.1 – Внешний вид яиц комаров комплекса *An. maculipennis*. 1 – *An. maculipennis*, 2 – *An. artemievi*, 3 – *An. sacharovi*

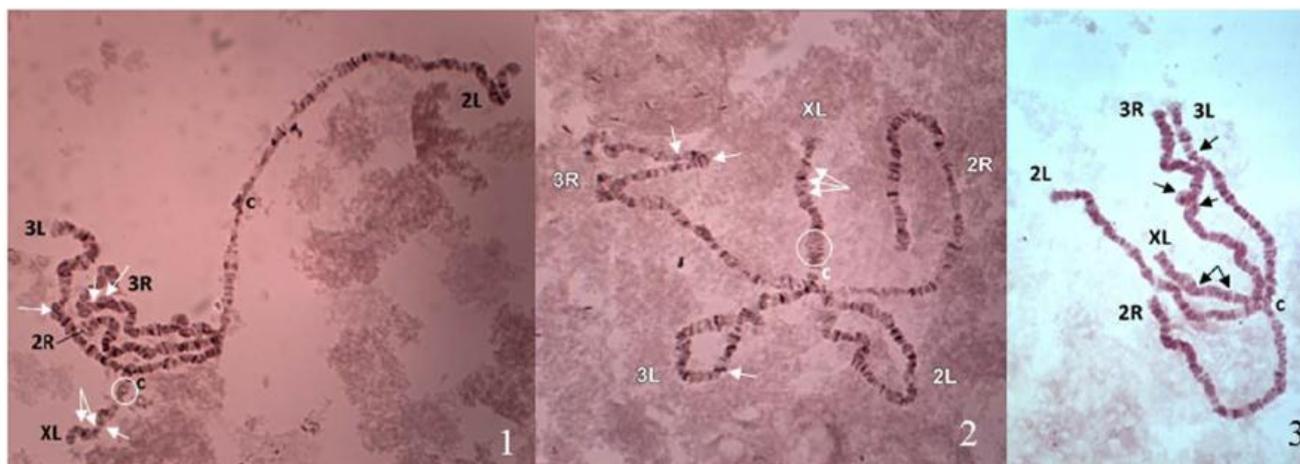


Рисунок 3.1.2 – Политенные хромосомы слюнных желез личинок IV-го возраста. 1 – *An. maculipennis*, 2 – *An. artemievi*, 3 – *An. sacharovi*. Стрелками и кружками обозначены диагностические области хромосом.

3.1.1.3 Молекулярно-генетическая идентификация

Для формирования молекулярно-генетической характеристики предполагаемого нового вида проведен анализ первичной структуры области второго внутреннего транскрибируемого спейсера кластера рибосомных генов и анализ фрагмента митохондриального гена *cox1*. Генетическая идентификация оказалась затруднена размещенными в GenBank ошибочными данными о структуре последовательности ITS2 другого вида комплекса – *An. martinius* (AY238407) как последовательности *An. artemievi*, поэтому в качестве доказательной базы валидности таксономического статуса *An. artemievi* параллельно были изучены структура ITS2 и *cox1* *An. martinius*. Молекулярно-генетический анализ образцов *An. martinius* проводился на личинках после цитогенетического подтверждения их таксономического статуса. Молекулярно-генетический анализ был проведен для 60 имаго и личинок предполагаемого нового вида. Консенсусная последовательность ITS2 пяти образцов размещена в GenBank под номером

AJ849885. Длина ITS2, фланкированного участками генов 5.S и 28S РНК, у *An. artemievi* составляет 449 пн. (AJ849886), у *An. maculipennis* – 422 пн. (AY238435), у *An. martinius* – 447 пн. (AJ849885).

Сравнение структуры ITS2 *An. artemievi* и *An. martinius* показало 13% различия нуклеотидного состава последовательностей, что соответствует межвидовым различиям в комплексе *maculipennis* (Proft *et al.*, 1999). Попарное сравнение последовательностей *An. artemievi* и *An. maculipennis* и *An. martinius* и *An. maculipennis* также выявляет их различия на межвидовом уровне – 9% и 16% соответственно. Последовательности *An. artemievi* и *An. martinius/An. maculipennis* различаются множественными инделами (до 14) и SNP (до 40).

Нуклеотидная последовательность фрагмента *cox1* *An. artemievi* размещена в GenBank под номером KU950428; последовательность фрагмента *cox1* *An. martinius* размещена в GenBank под номером KU950429. Попарное сравнение структуры *cox1* *An. artemievi*, *An. martinius* и *An. maculipennis* выявляет различия на уровне 6% между *An. artemievi* и *An. martinius*, 5% различия между видами *An. artemievi*–*An. maculipennis* и *An. martinius*–*An. maculipennis*. Уровень различий последовательностей обоих видов с гомологичными последовательностями других представителей комплекса – *An. messeae*, *An. labbranchiae*, *An. melanoon*, *An. sacharovi* – находится в пределах 4-6% для *An. artemievi* и 4-7% для *An. martinius* и соответствует уровню межвидовых различий.

На байесовской дендрограмме (рисунок 3.1.3), визуализирующей филогенетические взаимоотношения представителей подрода *Anopheles* и подрода *Myzomyia* по результатам анализа митохондриального фрагмента гена *cox1*, выделение *An. artemievi* как вида поддерживается высокими значениями апостериорных вероятностей. Следует отметить, что апостериорные вероятности оказываются низкими для большинства других палеарктических представителей комплекса, за исключением *An. sacharovi*.

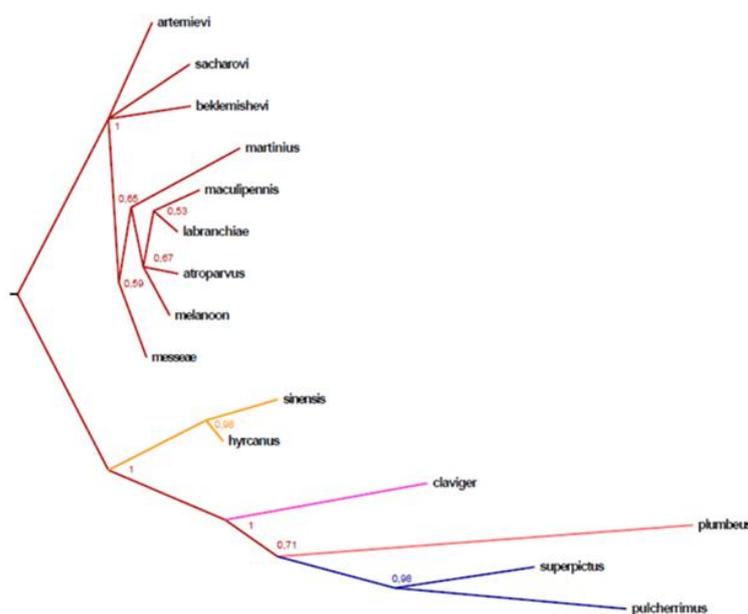


Рисунок 3.1.3 – Байесовская дендрограмма, визуализирующая филогенетические взаимоотношения представителей подрода *Anopheles* и подрода *Myzomyia* по результатам анализа митохондриального фрагмента гена *cox1*. В узлах указаны апостериорные вероятности. Цветами обозначены: темно-красным – комплекс «*maculipennis*», розовым – *An. plumbeus*, сиреневым – *An. claviger*, желтым – комплекс «*hyrcanus*», синим – подрод *Myzomyia*.

3.1.2 Генетическая верификация достоверности таксономического статуса *An. daciae*

Представитель комплекса *maculipennis* вид *An. daciae* был описан в 2004 году на основании мелких перекрывающихся с *An. messeae* количественных морфологических особенностей экзохориона яйца и специфической, по мнению авторов, структуры ITS2 (Nicolescu *et al.*, 2004). Между тем, нуклеотидная последовательность ITS2 *An. daciae* идентична гомологичной последовательности одной из молекулярных форм *An. messeae*, характеризующегося внутривидовым полиморфизмом структуры ITS2 на уровне 0.19-1.34% (Di

Luca *et al.*, 2004). Очевидная недостаточная обоснованность выделения вида из *An. messeae* определила проведение исследований на территории России для выяснения валидности таксономического статуса *An. daciae*.

3.1.2.1 Анализ первичной структуры ITS2 *An. messeae sensu lato*

ПЦР-ПДРФ анализ с использованием эндонуклеаз рестрикции *MroXI* и *BseGI* был выполнен для 150 особей *An. messeae s.l.* из Московской, Астраханской, Пензенской, Воронежской, Волгоградской, Ростовской областей, республики Калмыкия и Краснодарского края. Анализ показал, что образцы условно можно разделить на две группы – «чистые», у которых выявляется единственный специфический паттерн рестрикции, и «гибридные», со смешанным паттерном. Первая группа оказалась представлена образцами ДНК 44 особей. Паттерны рестрикции продуктов амплификации этих образцов по эндонуклеазе *MroXI* соответствовали *An. messeae*. Обработка продуктов амплификации рестриктазой *BseGI* не выявила специфических для данного фермента сайтов. Анализ образцов 106 особей, представляющих вторую группу, свидетельствовал о присутствии в их геноме двух вариантов последовательностей, одного – специфичного для *An. messeae* и второго – специфичного для *An. daciae*.

Прямое секвенирование образцов первой и второй групп и анализ хроматограмм показали, что в образцах первой группы, имеющих паттерны рестрикции, характерные для *An. messeae*, и представляющих географически удаленные популяции юга России и Западной Сибири, в изученных последовательностях обнаруживается единственный сигнал по сайтам 161, 165, 167 и 362, 382 (AM409762–AM409764, AM409783, AM409784, AM409775, AM409776). В этих сайтах располагаются две комбинации нуклеотидов – TTC и GG соответственно. В хроматограммах образцов второй группы в указанных выше сайтах обнаруживался двойной сигнал.

Для дальнейшего анализа было отобрано 16 образцов ДНК комаров второй группы, представляющих популяции Московской, Пензенской, Волгоградской и Астраханской областей, республики Калмыкия и Краснодарского края. Продукты амплификации отобранных образцов были клонированы и секвенированы. В общей сложности было секвенировано 29 клонов, среди которых были обнаружены все пять молекулярных вариантов *An. messeae*, а том числе и вариант ААТ АС, характерный для *An. daciae*, а также дополнительные комбинации, являющиеся сочетанием ранее описанных. Выявленные варианты молекулярных форм ITS2 представлены в таблице 3.1.1. Помимо указанных вариантов замен в структуре спейсера были обнаружены еще 17 вариабельных сайтов, которые определяют его внутривидовую изменчивость в пределах 2.3%.

Таблица 3.1.1 – Основные молекулярные варианты области ITS2 у *An. messeae*

Молекулярные варианты						
Описанные ранее (Di Luca <i>et al.</i> , 2004)					Описанные в настоящем исследовании	
1	2	3	4	5 = <i>An. daciae</i>	6	7
TTC AC	ATC AC	ATC GG	TTC GG	AAT AC	AAT GG	AAR GC

Полученные данные указывали на то, что европейская часть России как центр ареала и происхождения *An. messeae*, характеризуется высоким внутривидовым и внутривидовым полиморфизмом первичной структуры изученного фрагмента. Поскольку комбинация варианта нуклеотидной последовательности спейсера ААТ АС, характерная для *An. daciae*, выявлялись

повсеместно в образцах из центра ареала и в большинстве случаев встречались вместе с другими комбинациями, можно было предполагать, что появление варианта «*daciae*» в «чистом» виде по краю ареала стало следствием снижения полиморфизма этого многокопийного элемента в локальных популяциях, где в силу указанной причины, вероятно, представлен лишь один из вариантов последовательности.

Полученные результаты позволяли высказать несколько предположений о причинах внутригеномного полиморфизма ITS2 у *An. messeae sensu lato*, который мог быть как следствием многокопийности спейсера, так и следствием гибридизации различных молекулярных форм.

3.1.2.2 Анализ первичной структуры *cox1 An. messeae sensu lato*

Анализ первичной структуры *cox1 An. messeae sensu lato* был выполнен на основе данных GenBank. Медианная сеть гаплотипов *An. messeae sensu lato*, в том числе и гаплотипов *An. daciae*, представлена на рисунке 3.1.6.

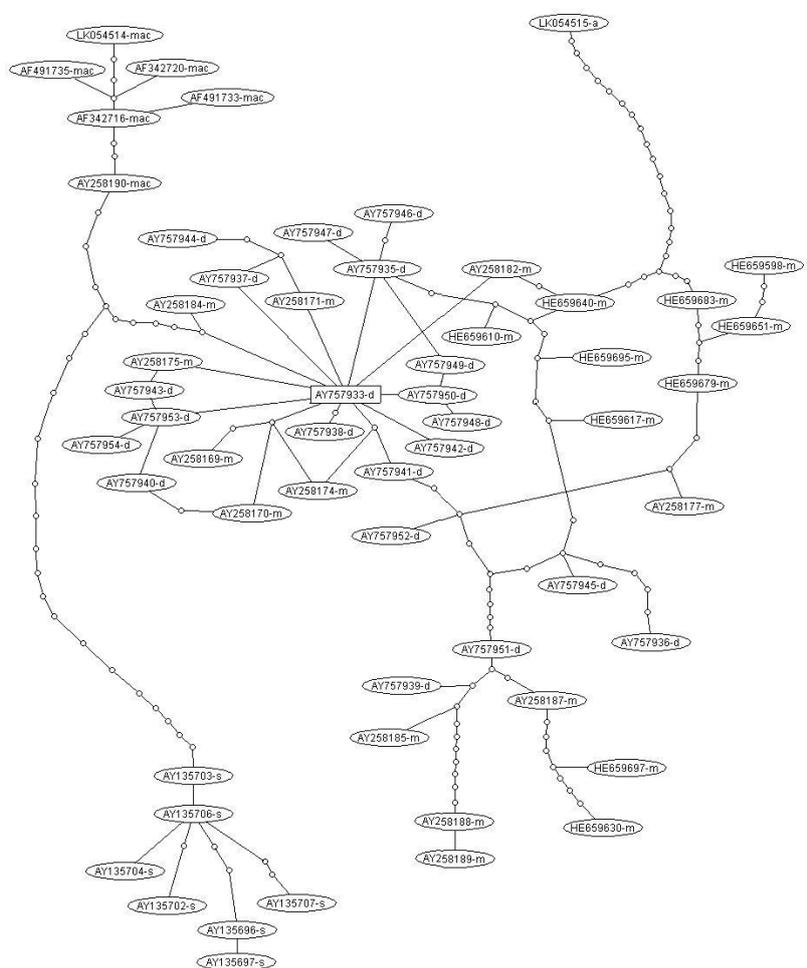


Рисунок 3.1.6 – Медианная сеть митохондриальных гаплотипов *An. daciae* и близкородственных видов комаров комплекса *An. maculipennis*. Реконструкция проведена в программе TCS на основе анализа полиморфизма фрагмента последовательности митохондриального гена *cox1*. Гаплотипы соединены ломаными линиями. Минимальное число нуклеотидных замещений, необходимое для преобразования одного гаплотипа в другой, обозначено числом отрезков соединяющих линий. Буквы после номера последовательности обозначают название вида: а – *atroparvus*, d – *daciae*, m – *messeae*, mac – *maculipennis*, s – *sacharovi*.

В анализ были включены гомологичные последовательности близкородственных видов комплекса – *An. atroparvus*, *An. maculipennis* и *An. sacharovi*, использованные в качестве внешней группы. Анализ медианной сети выявляет чёткую дифференциацию видов *An. atroparvus*, *An. messeae s. l.*, *An. maculipennis* и *An. sacharovi*. Любые два гаплотипа, относящиеся к разным видам, отличаются не менее, чем девятью филогенетически значимыми заменами. Случаев митохондриальной интрогрессии между данными видами комаров выявлено не было. В отличие от остальных видов *An. daciae* и *An. messeae* имеют единый митохондриальный

генофонд, и изменчивость *An. daciae* полностью находится в пределах внутривидовой изменчивости *An. messeae*. Полученные данные не поддерживают выделения *An. daciae*. Вместе с тем, следует заметить, что *An. messeae* полиморфный вид, и наличие криптических видов в пределах вида *An. messeae* вполне вероятно.

3.1.3 Распространение комаров комплекса *An. maculipennis* в Средней Азии, Закавказье и юге России

Описание нового вида *An. artemievi* потребовало уточнения распространения представителей комплекса. Генетическая идентификация и картирование были проведены для комаров видов *An. atroparvus*, *An. melanoon*, *An. persiensis*, *An. maculipennis*, *An. messeae*, *An. artemievi*, *An. beklemishevi*, *An. sacharovi*, *An. martinius*.

An. artemievi распространен в горных и предгорных районах Средней Азии – в Узбекистане – Ташкентской и Кашкадаринской областях, Кыргызстане – в Джалал-Абадской, Ошской, Таласской и Баткенской областях, юге Казахстана, севере Таджикистана в Согдийской области, а также в межгорных котловинах (Нарынская и Ферганская). Идентификация вида по находке в долине Амударьи в Туркменистане (окрестности г. Атамурад, бывш. Керки,) предполагает возможность распространения *An. artemievi* на равнины.

An. martinius тяготеет к равнинным ландшафтам. Вид отмечен на северо-востоке Туркменистана, в Каракалпакской области Узбекистана и Кызылординской области Казахстана. *An. martinius*, по всей видимости, способен заселять предгорные ландшафты, поскольку был идентифицирован вблизи предгорий Гиссарского хребта.

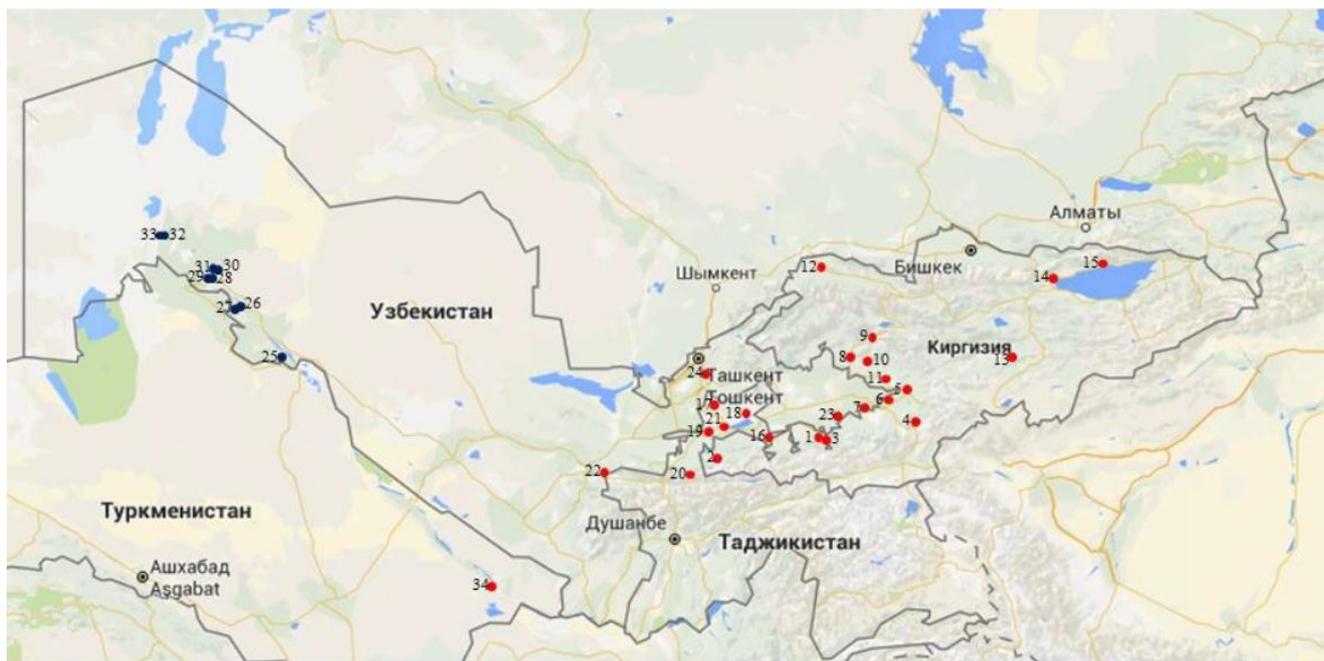


Рисунок 3.1.7 – Распространение комаров *An. artemievi* и *An. martinius* в Средней Азии. ● – *An. artemievi*, ● – *An. martinius*.

An. messeae отмечен во всех исследованных регионах на территории России. Остается нерешенным вопрос о самой южной границе его ареала на территории европейской части России. На территории Средней Азии *An. messeae* распространен в Иссык-Кульской области, на севере Нарынской области и в Чуйской области. Вид не обнаружен в Таласской области и не проникает в южный регион Кыргызстана.

Результаты исследования *An. artemievi*, *An. martinius*, *An. persiensis* и южной границы распространения *An. messeae* являются приоритетными. Данные о распространении ряда видов комплекса – *An. sacharovi*, *An. maculipennis*, *An. atroparvus*, *An. melanoon*, *An. persiensis* соответствуют литературным данным

3.2 Цитоплазматические репродуктивные симбиотические бактерии в нативных и инвазивных популяциях *H. axyridis*

Глобальная инвазия *H. axyridis*, следствием которой стало снижение биоразнообразия аборигенной энтомофауны в колонизированных регионах, актуализировала вопросы об источнике инвазии, направлениях миграционных потоков и обеспечивших предпосылки для возникновения высокого инвазивного потенциала изменениях генетической структуры популяций вида. Для выяснения этих вопросов оказались необходимы исследования генетической структуры как инвазивных, так и нативных популяций *H. axyridis* с привлечением традиционных и оригинальных генетических маркеров.

3.2.1 Внутривидовая дифференциация *H. axyridis* Pall. и генетическая структура нативных и инвазивных популяций как основа формирования способности к инвазии у *H. axyridis*

3.2.1.1 Изучение внутривидовой дифференциации *H. axyridis* на основании изменчивости фрагмента гена *cox1*

Для изучения внутривидовой дифференциации *H. axyridis* и выяснения особенностей и происхождения инвазивных популяций проведено исследование полиморфизма митохондриального гена *cox1*. Нуклеотидная изменчивость фрагмента этого гена длиной 567 пн. была изучена в трех нативных популяциях *H. axyridis* – Горно-Алтайска, Владивостока (Россия) и Киото (Япония) и 4 инвазивных популяциях – Денвера (США), Кэмбриджа (Великобритания), Берлина (Германия) и Турина (Италия). В общей сложности исследовано 162 последовательности, размещенные в базе данных GenBank (HM594302-HM594420 и HQ593064-HQ593106), в которых идентифицировано 13 гаплотипов. Данные представлены в таблице 3.2.1 и на рисунке 3.2.1.

Предковым гаплотипом *H. axyridis* является гаплотип H1, выявленный во всех изученных популяциях. Западная и восточная группы популяций *H. axyridis* различаются по частотам этого гаплотипа. В нативных популяциях восточной группы популяций и в инвазивных популяциях гаплотип H1 является доминирующим и встречается с частотой 75.0% – 97.1%. В популяции Горно-Алтайска, представляющей западную группу популяций вида, гаплотип H1 встречается с частотой лишь 34.6%, а доминирует гаплотип H5, обнаруживаемый у 53.8% особей.

На медианной сети, представленной на рисунке 3.2.1, обнаруживаются два кластера. Первый объединяет последовательности, встречающиеся у особей из популяций как восточной, так и западной группы, а также у особей из инвазивных популяций. Второй кластер образован митохондриальными гаплотипами, найденными только у особей западной группы популяций. Полученные данные о распределении митохондриальных гаплотипов подтверждают высказанные на основании исследований комплекса морфологических признаков *H. axyridis* предположения о подразделенности вида. Известно, что популяции Западной Сибири, в которую входит и горноалтайская популяция, полностью, либо в значительной степени образованы морфологической формой *axyridis*, редко встречающейся в популяциях Дальнего Востока. Для популяций восточной группы характерна морфологическая форма *succinea* (Dobzhansky, 1933, Блехман и др., 2010). Различия между популяциями внутри каждой из групп минимальны и не имеют определенного географического направления. В то же время уровень

различия по морфологическим признакам между западной и восточной группами популяций соответствуют подвидовому.

Таблица 3.2.1 – Распределение гаплотипов в нативных и инвазивных популяциях *H. axyridis*

Популяция	Статус популяций	Объем выборки	Гаплотипы													
			H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	H9	H10	H11	H12	H13	
Россия (Горно-Алтайск)	НАТИВНЫЕ	26	9				14	1	1				1			
Россия (Владивосток)		24	21		2											1
Япония (Киото)		19	1											1	2	
США (Денвер)	ИНВАЗИВНЫЕ	17	15		1	1										
Великобритания (Кэмбридж)		34	33	1												
Германия (Берлин)		22	21			1										
Италия (Турин)		20	15			2				2	1					
Всего		162	130	1	1	6	14	1	1	2	1	1	1	2	1	

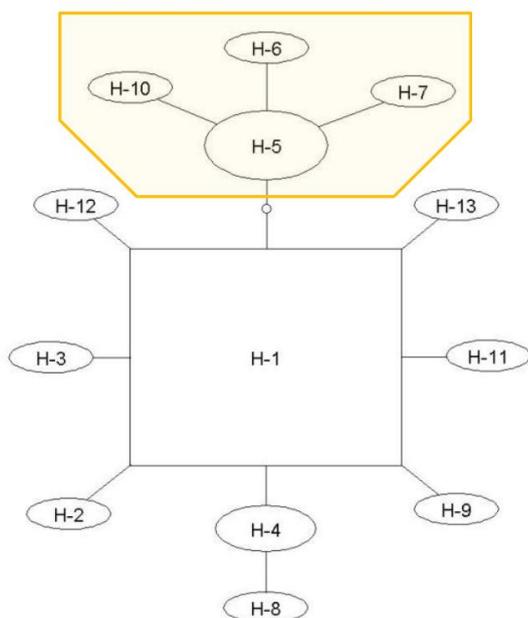


Рисунок 3.2.1 – Филогенетическая реконструкция митохондриальных гаплотипов *H. axyridis* по гену *cox1*. Желтой трапецией выделены «западные» варианты гаплотипов

Представленная на рисунке 3.2.1 медианная сеть характерна для видов, переживших в недавнем эволюционном прошлом взрыв численности, сопровождаемый расширением ареала. Картина географической изменчивости в нативных популяциях *H. axyridis* с учетом данных морфологического анализа говорит о том, что в эволюционном прошлом единый ареал вида распадался на две части, полностью изолированные друг от друга в течение длительного времени, после которого единство ареала было восстановлено. Вероятнее всего, такие изменения ареала происходили во время последнего плейстоценового оледенения, когда вид мог сохраниться как в дальневосточном регионе, так и на Алтае (причем в нескольких небольших изолированных рефугиумах), а с наступлением потепления в голоцене восстановить единство ареала с образованием в Сибири зоны вторичной интеграции.

Сравнение «инвазивных» гаплотипов указывает на то, что их генный пул гаплотипов сходен. Это сходство позволяет предполагать единство происхождения инвазивных популяций Старого и Нового света. Сравнение «инвазивных» гаплотипов с «аборигенными» гаплотипами дает основание считать, что инвазивные популяции произошли от популяций восточной группы.

3.2.1.2 Изучение уровня генетической изменчивости в нативных и инвазивных популяциях *H. axyridis*

Для подтверждения данных, полученных при изучении генетической структуры

нативных и инвазивных популяций с использованием фрагмента гена *cox1*, и для изучения уровня генетической изменчивости в нативных и инвазивных популяциях *H. axyridis* был проведен анализ с использованием микросателлитных маркеров.

В общей сложности по микросателлитным локусам генотипирована 271 особь из девяти популяций нативного ареала, 260 особей восьми популяций инвазивного ареала и 146 особей из биоконтрольных популяций.

Попарное сравнение популяций нативного ареала выявило их незначительную генетическую дифференциацию. Несмотря на значительные географические расстояния между местами сборов (в среднем около 2700 км), попарная оценка F_{ST} оказалась низкой, со средним значением 0.013. Анализ популяционной структуры в границах нативного ареала с использованием алгоритма программы STRUCTURE подтвердил подразделение популяций на две группы; среднее значение логарифма функции правдоподобия повышалось от значения $K=1$ до $K=2$, для которого оказалось максимальным. Первая группа представлена образцами популяций западных областей нативного ареала – (N-Russia1 – Абакан, N-Russia2 – Новосибирск и N-Kaza – Казахстан), второй включает образцы шести популяций восточной части ареала (N-China1, N-China2, N-China3, N-Japan1, N-Japan2 и N-Korea) (рисунок 3.2.2.).

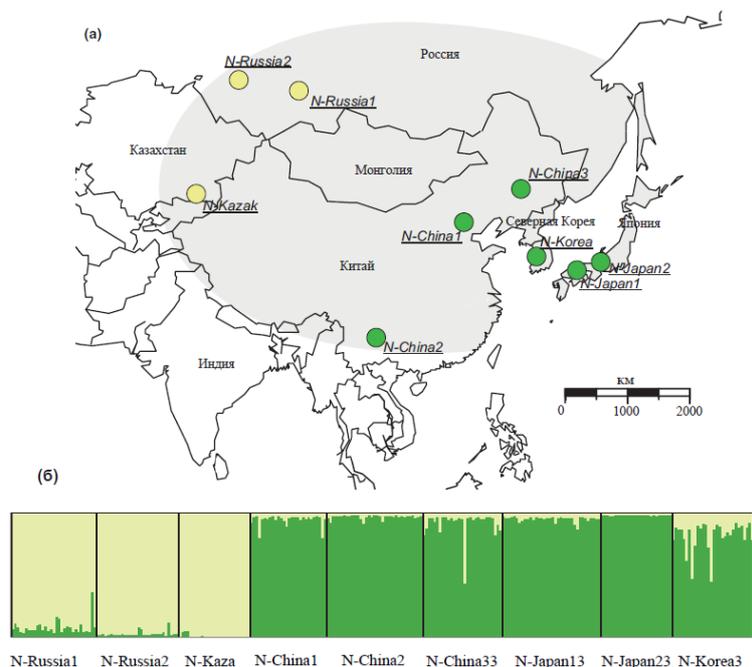


Рисунок 3.2.2 – а) Географическое происхождение и кластеризация нативных популяций *H. axyridis*. б) Кластеризация популяций *H. axyridis* по данным микросателлитного анализа. Зелёным цветом выделен восточный кластер, салатовым выделен западный кластер.

Среднее F_{ST} между популяциями двух кластеров составляет 0.021. В кластере западной группы анализ с использованием микросателлитных локусов не выявляет различий генетической структуры популяций. Популяции восточной группы генетически дифференцированы. Среднее попарное значение F_{ST} для популяций этой группы равно 0.007. Среди популяций Китая наиболее высокое значение $F_{ST}=0.010$ обнаружено между популяциями Пекина (центр восточной части ареала *H. axyridis*) и Шилиня (южная граница нативного ареала). Краевая материковая популяция Южной Кореи характеризуется наиболее высоким уровнем генетической дифференциации по отношению ко всем изученным популяциям восточной группы, что, вероятно, связано с её длительной географической изоляцией на Корейском полуострове.

Обнаружена значительная корреляция между значениями генетической дифференциации и географическими дистанциями внутри нативного ареала ($r^2=0.304$; $P<10^{-2}$; угол=0.008), что, скорее всего, отражает существование двух филогеографических групп. Последнее подтверждается отсутствием любой значимой корреляции, несмотря на значительные географические расстояния между точками сборов при рассмотрении образцов только из Восточной Азии (шесть образцов: $r^2=0.009$, $P=0.534$).

Уровень полиморфизма нативных популяций оказался достаточно высоким. Аллельное разнообразие по 18 микросателлитным локусам, скорректированное на 20 особей составило от 5.26 аллеля на локус в Казахстане до 6.59 аллеля на локус в японской популяции. В российских популяциях выявлено промежуточные значения аллельного разнообразия – 6.39 и 6.19 аллеля на локус в Абакане и Новосибирске соответственно. Популяции инвазивного ареала обнаруживают большую генетическую дифференциацию, чем популяции нативного ареала. Среднее значение F_{ST} для этих популяций составляет величину 0.064. Следует отметить два важных результата,

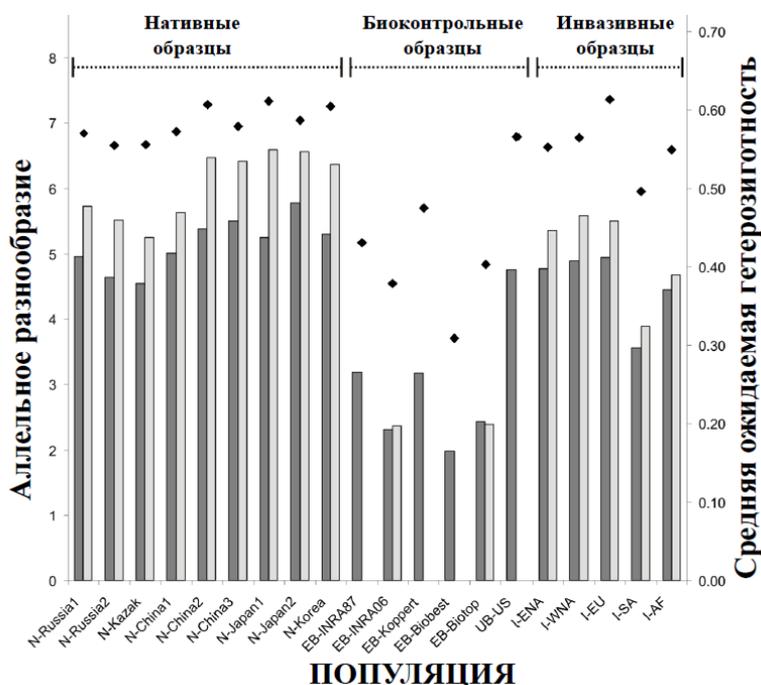


Рисунок 3.2.3 – Генетическое разнообразие в нативных, биоконтрольных и инвазивных популяциях *H. axyridis*. Ожидаемая гетерозиготность – H_e ; черные квадраты) среднее генетическое разнообразие по 18 (светло-серые столбцы) или 10 (темно-серые столбцы) микросателлитным локусам).

полученных для инвазивных популяций. Во-первых, изученные инвазивные популяции демонстрируют наиболее низкие значения F_{ST} с популяцией северо-востока Китая – N-China3, что может рассматриваться как свидетельство происхождения инвазивных популяций от нативных популяций именно этой части ареала *H. axyridis*. Во-вторых, уровень полиморфизма инвазивных популяций близок уровню полиморфизма нативных популяций. Значение средней гетерозиготности (H_e) по микросателлитным локусам для выборки особей из популяций нативной (N-Russia1, N-Russia2, N-Japan2) и инвазивной (Fra, DAK, SAF) частей ареала равно 0.571 и 0.568 соответственно и достоверно не отличается для обеих выборок. Сравнение значения среднего числа аллелей на локус в выборках из нативных, инвазивных и биоконтрольных популяций демонстрирует существенные различия. Среднее число аллелей в выборке инвазивных популяций равно 5.57 аллеля на локус, в выборке из нативных популяций равно 6.51 аллеля на локус (указанные значения достоверно не отличаются). Уровень биоразнообразия европейских биоконтрольных популяций оказывается значительно ниже и не превышает 2.4 аллеля на локус. Снижение уровня биоразнообразия ожидаемо и объясняется эффектом основателя. Весьма вероятно, что это снижение характерно для вида уровня полиморфизма оказывается критическим и определяет невозможность самоподдержания биоконтрольных популяций в природе.

3.2.1.3 Исследование демографических показателей в популяциях *H. axyridis*

Оценка эффектов приспособленности проведена по двум комплексным показателям – времени поколения и эффективности жизненного цикла. Время поколения было определено для самок. Под временем поколения понималось число дней «от яйца до яйца», т.е. число дней от откладки яиц до вылупления имаго, суммированное с числом дней до момента откладки самкой первой яйцекладки. Показатель эффективности жизненного цикла рассчитывался как произведение частот нескольких независимых величин – доли вылупившихся личинок от числа отложенных яиц, долю доживших до четвертого дня личинок от числа вылупившихся личинок,

и параметра плодовитости самок. Плодовитость самок оценивали по числу отложенных яиц в первые восемь дней яйцекладки. Всего проанализировано 7000 яиц, 1440 личинок и 180 самок в поколении F₃.

Показатель эффективности жизненного цикла не зависел значительно ни от типа скрещивания (внутрипопуляционные, межпопуляционные между особями из популяций с одинаковым статусом – нативных, либо инвазивных, межпопуляционные между особями из популяций с различным статусом – нативной и инвазивной) ($P=0.19$), ни от биогеографического статуса популяции (нативная, либо инвазивная) ($P=0.68$), ни от принадлежности особей к той или иной популяции ($P=0.64$). Время поколения у особей из инвазивных популяций оказалось существенно – на 3.4 дня меньше по сравнению с временем поколения особей из популяций нативного ареала (среднее время поколения у «инвазивных» особей – 23.5 дня против 26.9 дней у «нативных», $P=0.0061$). Этот признак обнаруживает значительную изменчивость под влиянием типа скрещивания ($P=0.0169$) (рисунок 3.2.4).

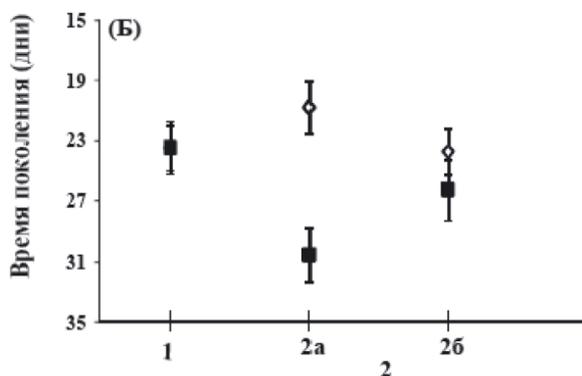


Рисунок 3.2.4 – Средние оценки времени поколения (Б) в нативных (черные квадраты) и инвазивных (белые ромбы) популяциях для всех типов скрещиваний: 1 – скрещивания с неродственным самцом из той же популяции, 2 – межпопуляционные скрещивания: 2a – скрещивания с самцом из другой случайно выбранной популяции с таким же биогеографическим статусом; 2б – скрещивания с самцом из другой случайно выбранной популяции с иным биогеографическим статусом.

У особей, появившихся от скрещиваний родителей из различных инвазивных популяций, значение времени поколения оказалось почти на 10 дней меньше, чем у особей, появившихся от таких же межпопуляционных скрещиваний родителей нативного ареала. Среднее время поколения составило 20.8 и 30.5 дней соответственно ($P=0.0029$). Полученные данные в популяциях *H. axyridis* как из нативных, так и из инвазивных областей являются новыми.

3.2.4 Изучение разнообразия, изменчивости и распространения репродуктивных симбиотических бактерий в нативных и инвазивных популяциях *H. axyridis*

Для оценки возможной роли симбиотических бактерий в формировании инвазивных популяций *H. axyridis* было проведено исследование видового состава и распространения репродуктивных симбионтов в популяциях нативного и инвазивного ареала *H. axyridis*. Зараженность *H. axyridis* симбиотическими бактериями была изучена в 16 популяциях вида – восьми нативных и восьми инвазивных. Из изученных восьми нативных популяций три представляют западную группу и пять – восточную группу популяций. Исследование зараженности 55 самок из популяций заповедника «Кедровая падь», Парижа и Мюнхена было проведено по их яйцекладкам.

3.2.4.1.1 Изучение разнообразия, изменчивости и распространения *Wolbachia* в нативных и инвазивных популяциях *H. axyridis*

При амплификации 430 образцов тотальной ДНК самок *H. axyridis* с праймерами, специфичными к фрагменту гена *fbpA*, обнаружено двенадцать *Wolbachia*-положительных образцов. Для идентификации аллельного профиля *Wolbachia* было выполнено мультилокусное типирование трех образцов из бухты Троицы, Саянских гор, Калининграда, полученные в результате мультилокусного типирования последовательности были депонированы в GenBank под регистрационными номерами ID: KM278170–KM278172 и KM288830–KM288841. Для

образцов из Парижа и Мюнхена был изучен фрагмент одного из наиболее изменчивых из пяти генов MLST – гена *fbpA*.

Результаты филогенетического анализа по генам MLST представлены на рисунке 3.2.5. *Wolbachia*, обнаруженная в популяции *H. axyridis* из бухты Троица, относится к супергруппе А. Линии *Wolbachia*, обнаруженные в образцах из Саян и Калининграда, относятся к супергруппе В, так же, как и *Wolbachia* – эндосимбионт *A. bipunctata*. Последовательности нуклеотидов фрагментов всех пяти генов MLST *Wolbachia* из Калининграда и Саян полностью совпадают. Нуклеотидные последовательности фрагментов генов *fbpA* и *ftsZ* образца из Праги также совпадают с аналогичными последовательностями образцов из Калининграда и Саян. Из данных литературы известно, что в двух нативных популяциях *H. axyridis* из Южного Китая обнаружена *Wolbachia*, относящаяся по последовательности фрагмента гена *ftsZ* к супергруппе В (EU627750.1, EU627751.1) (Ahmed *et al.*, 2010). Сравнение этих последовательностей с полученными для образцов Саян, Калининграда и Праги выявило однонуклеотидные замены по пяти сайтам последовательности фрагмента гена *ftsZ*. Вероятно, *Wolbachia* из популяций Китая и линия, обнаруженная в Саянах, Калининграде и Праге, относятся к разным молекулярным формам одной супергруппы (В).

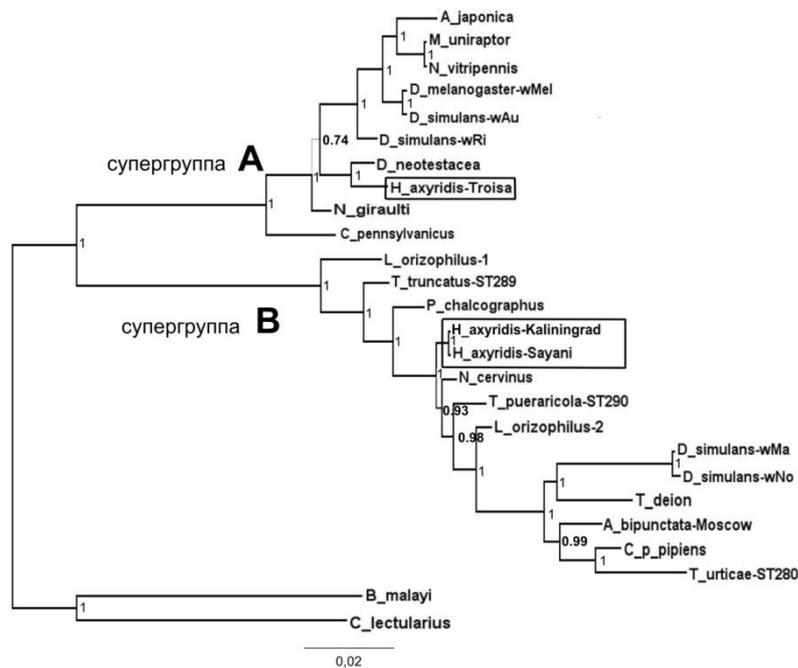


Рисунок 3.2.5 – Филогенетическая реконструкция 26 изолятов *Wolbachia* на основе анализа контигов из 5 генов, используемых для мультилокусного типирования (2079 пн). Порядок включения последовательностей генов в контиги: *coxA* – 402 нп., *fbpA* – 429 нп., *ftsZ* – 435 нп., *gatB* – 369 пн, *hcpA* – 444 пн. Имена трёх новых изолятов *Wolbachia* обведены рамкой. Нуклеотидные последовательности фрагментов пяти генов, используемых для мультилокусного типирования, полученные в данной работе, зарегистрированы со следующими номерами (GenBank ID: KM278170 – KM278172 и KM288830 – KM288841). Прописными буквами отмечены супергруппы *Wolbachia* по Baldo *et al.*, 2006. Величины байесовской вероятности приведены рядом с узлами филограммы.

Более интересными оказались результаты филогенетического анализа по фрагменту гена *fbpA* длиной 428 пн. (рисунок 3.2.6). *Wolbachia*, обнаруженная у *H. axyridis*, представляет несколько супергрупп. Семь линий входят в супергруппу В, две – супергруппу А, одна из линий – КР_2_6 кластеризуется с представителями супергруппы N, и одна линия попадает в кластер,

образованный обнаруженной у коллембол *Wolbachia* из весьма редкой у членистоногих супергруппы E.

Кластеризация поддерживается высокими значениями апостериорных вероятностей. Линии, включенные в супергруппу B и A неидентичны и различаются единичными синонимичными заменами (не более чем тремя при попарном сравнении в рамках своей супергруппы). Линия, обнаруженная у самки M_14_15 из Мюнхена, наиболее близка *Wolbachia* коллемболы *F. candida*. Однако уровень различий между последовательностями фрагмента *fbpA* составляет более 12%, что соответствует 52 однонуклеотидным заменам, определяющим 15 аминокислотных замен белковой последовательности длиной 142 аминокислоты. Линия KP_2_6, найденная у *H. axyridis* из Приморского края (поселок Барабаш) по структуре *fbpA* на 99% сходна с линией (ID: JN384040) из супергруппы N, найденной у тлей *Toxoptera citricida* (Augustinos *et al.*, 2011).

Уровень зараженности вольбахией, обнаруживаемый в популяциях нативного ареала, составляет от 0 до 4%. Данные по зараженности трех самок из поселка Барабаш являются качественными и количественно не учитываются из-за слишком малого объема выборки. Зараженность *Wolbachia* популяций инвазивного ареала *H. axyridis* оказывается выше – от 4% в Праге до 30% в Париже. В границах инвазивного ареала наблюдается и большее разнообразие бактериальных линий.

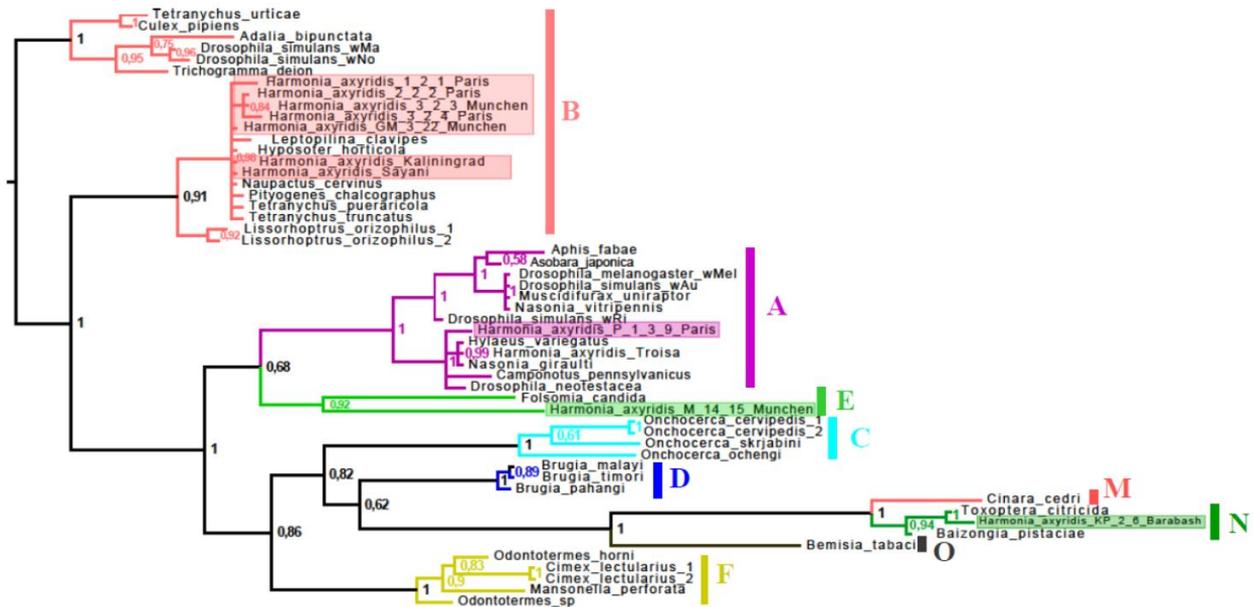


Рисунок 3.2.6 – Филогенетическая реконструкция 53 изолятов *Wolbachia* на основе анализа фрагмента гена *fbpA* (428 пн). Имена *Wolbachia* – симбионтов *H. axyridis* обведены рамкой. Прописными буквами отмечены супергруппы *Wolbachia*. Величины байесовской вероятности приведены рядом с узлами филограммы.

3.2.4.1.2 Изучение влияния *Wolbachia* на детерминацию пола у *H. axyridis*

Для изучения влияния *Wolbachia* на детерминацию пола у *H. axyridis* от инфицированных самок линий из групп A, B, E, N было получено поколение F₁. Морфологический анализ поколения F₁ подтвердил появление сыновей в их потомстве. Инфицированность потомства была подтверждена молекулярно-генетическим анализом случайно отобранных потомков обоих полов. В результате реакции амплификации с праймерами, гомологичными фрагменту гена *fbpA* фрагменты специфического размера 472 пн. были получены для образцов ДНК самок и самцов F₁. Результаты позволяют утверждать, что *Wolbachia* не оказывает андрогидного действия на *H. axyridis*.

3.2.4.2 Изучение разнообразия, изменчивости и распространения *Rickettsia* в нативных и инвазивных популяциях *H. axyridis*

Rickettsia была обнаружена у трех самок *H. axyridis* – из нативной популяции Новосибирска (1 самка) и инвазивной популяции Сочи (2 самки). Доля самок, инфицированных риккетсиями в инвазивных популяциях, составила 0.011 (с 99%-м доверительным интервалом от 0.001 до 0.051), для нативных: 0.005 (с 99%-м доверительным интервалом от 0.000 до 0.037). Различие в долях статистически незначимо (точное $P = 0.61$). Линии *Rickettsia*, обнаруженные в Сочи, оказались идентичны по первичной структуре изученного фрагмента. Линия, обнаруженная в Новосибирске, отличается от первых двух тремя нуклеотидными заменами. Две из них являются синонимичными, одна приводит к замене аминокислотного остатка изолейцина на валин. Результаты филогенетического анализа полученных последовательностей *Rickettsia* представлены на рисунке 3.2.8.

Филогенетический анализ показывает, что обнаруженные линии относятся к группе *R. bellii*, в отличие от риккетсий-эндосимбионтов большинства других видов кокциnellид, которые относятся к группе *Rickettsia AB* (Weinert *et al.*, 2007).

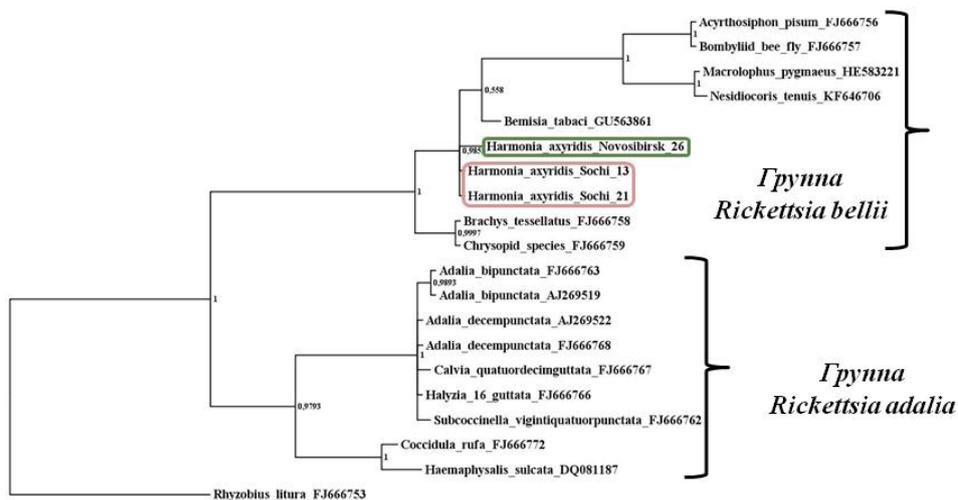


Рисунок 3.2.8 – Филогенетическая реконструкция 22 изолятов *Rickettsia* на основе анализа фрагмента гена цитратсинтазы *gltA* (367 пн). Имена трех новых изолятов *Wolbachia* обведены рамкой. Нуклеотидные последовательности фрагментов гена, полученные в данной работе и использованные для построения филограммы, зарегистрированы со следующими номерами (GenBank ID: KR296709 – KR296710). Величины байесовской вероятности приведены рядом с узлами филограммы.

3.2.4.3 Изучение разнообразия, изменчивости и распространения *Spiroplasma* в нативных и инвазивных популяциях *H. axyridis*

Spiroplasma не была обнаружена ни в одной из 8 изученных инвазивных популяций. Бактерия была выявлена в 16 индивидуальных образцах тотальной ДНК жуков из 6 нативных популяций. Доля инфицированных *Spiroplasma* особей в нативных популяциях составила 0.082 (0.039-0.145), а доля инфицированных *Spiroplasma* особей в инвазивных популяциях оказалась равной 0.000 (0.000-0.029) (в скобках указаны нижняя и верхняя границы 99% доверительного интервала). Различия между нативными и инвазивными популяциями имеет высокую статистическую значимость (точное $P = 3 \times 10^{-5}$).

В результате прямого секвенирования ПЦР-фрагментов, полученных на матрице суммарной ДНК 14 инфицированных жуков, были получены последовательности длиной 301

пн. Данные по выявленной нуклеотидной изменчивости этих фрагментов представлены в таблице 3.2.4. Для анализа в качестве стандарта был выбран штамм *Spiroplasma* HARFUKU1 (GenBank ID: AB127932), описанный у *H. axyridis* из Японии (Nakamura *et al.*, 2005). Сравнительный анализ выявил три молекулярные варианта, отличающиеся друг от друга единичными заменами, два из которых оказались новыми (GenBank ID: KR363169, KR363170). Две новые молекулярные формы *Spiroplasma* были обнаружены в популяции Новосибирска. Одна из форм (Новосибирск_1, GenBank ID: KR363169) существенно отличается от остальных наличием множественных мутаций – вставки (115insT), делеции (170delT) и двойной заменой (G146T), (A147G). Третья молекулярная форма, выявленная в двух образцах – образце из Горно-Алтайска № 9 и Киото № 13, идентична ранее описанному штамму из Японии HARFUKU2 (GenBank ID: AB127933) (Nakamura *et al.*, 2005). Большинство инфицированных самок *H. axyridis* из Горно-Алтайска, Биробиджана, Бухты Троица, Владивостока, и Киото заражено несколькими штаммами *Spiroplasma*. Для идентификации отдельных штаммов ПЦР-фрагменты были клонированы, и ряд индивидуальных клонов, представляющих каждый из клонированных фрагментов, были секвенированы. Результаты анализа штаммов *Spiroplasma* из самок с множественной инфекцией представлены в таблице 3.2.4.

Таблица 3.2.4 – Нуклеотидная изменчивость фрагмента размером 301 пн области ITS штаммов эндосимбиотической бактерии *Spiroplasma* из *H. axyridis*.

	Номера изменчивых нуклеотидов приведены по последовательности штамма <i>Spiroplasma</i> - HARFUKU1 (GenBank ID: AB127932)														
Места сбора и номера инфицированных самок <i>H. axyridis</i>	84	97	135	138	147	162	168	169	173	185	188	192	198	228	260
Горно-Алтайск_16; Биробиджан_16,29; Троица_5,21; Владивосток_29,37,42; Киото_11,15	Y				R					M					Y
Горно-Алтайск_9; Киото_13;	C				A					A					T
Новосибирск_19	C														
Новосибирск_1	G	C	G	T		C	T	G	C	A	A		C	T	
Фукуяма AB127932 (Япония) HARFUKU1	T	G	A	-	G	T	G	A	T	C	C	T	G	C	C
Фукуяма AB127933 (Япония) HARFUKU2	C				A					A					T

Примечание. Последовательность штамма, выбранного как стандартный, выделена жирным шрифтом. Указаны только нуклеотиды, не совпадающие со стандартной последовательностью. (В соответствии с нуклеотидным кодом IUPAC «Y» обозначает «C» или «T», «R» - «A» или «G», «M» - «A» или «C»).

Двойное инфицирование штаммами HARFUKU1 и HARFUKU2 выявлено в образцах западной (Горно-Алтайск) и восточной групп популяций. Эти штаммы найдены во всех пяти проанализированных локальностях. Кроме того, у некоторых особей *H. axyridis* из Биробиджана и Бухты Троица найдены редкие варианты последовательностей, которые могут возникать при рекомбинации двух основных. Три новых штамма *Spiroplasma* зарегистрированы в GenBank под следующими номерами: штамм: Bi10 – GenBank ID: KR363166, штамм Bi22 – GenBank ID: KR363167, штамм: Bi24 – GenBank ID: KR363168.

О количественном соотношении штаммов *Spiroplasma* в случае множественного инфицирования можно судить по соотношению независимо полученных плазмидных клонов. Из 105 проанализированных 73 клон идентичны штамму HARFUKU2, и 32 клон – штамму HARFUKU1 соответственно.

О вероятном функциональном значении двойной инфекции штаммами HARFUKU1 и HARFUKU2 в соотношении близком к 1:2, говорит её широкая распространённость по ареалу *H. axyridis* и более высокая копияность *Spiroplasma* в жуках с двойной инфекцией. Сравнение копияности *Spiroplasma* у жуков, перечисленных в таблице 3.2.5 с двойным инфицированием и жуков из Новосибирска, а также Киото № 13 и Горно-Алтайска № 9 для которых выявлена инфекция только одним штаммом *Spiroplasma* методом полуколичественной ПЦР выявило 10 кратное превышение копияности *Spiroplasma* в жуках с двойным инфицированием, вместо ожидаемого двукратного, при независимом контроле копияности каждого из штаммов. Наблюдаемая повышенная копияность *Spiroplasma* в жуках с двойной инфекцией может увеличивать её стабильность, понижая вероятность спонтанной потери *Spiroplasma*, что объясняет широкое распространение двойного инфицирования в центре ареала *H. axyridis* и наличие инфекции единственным штаммом *Spiroplasma* в популяциях Японии и Новосибирска, находящихся на краю ареала.

Результаты филогенетического анализа обнаруженных линий спироплазма представлены на рисунке 3.2.9. Анализ показывает, что *Spiroplasma*, обнаруженная у *H. axyridis*, является

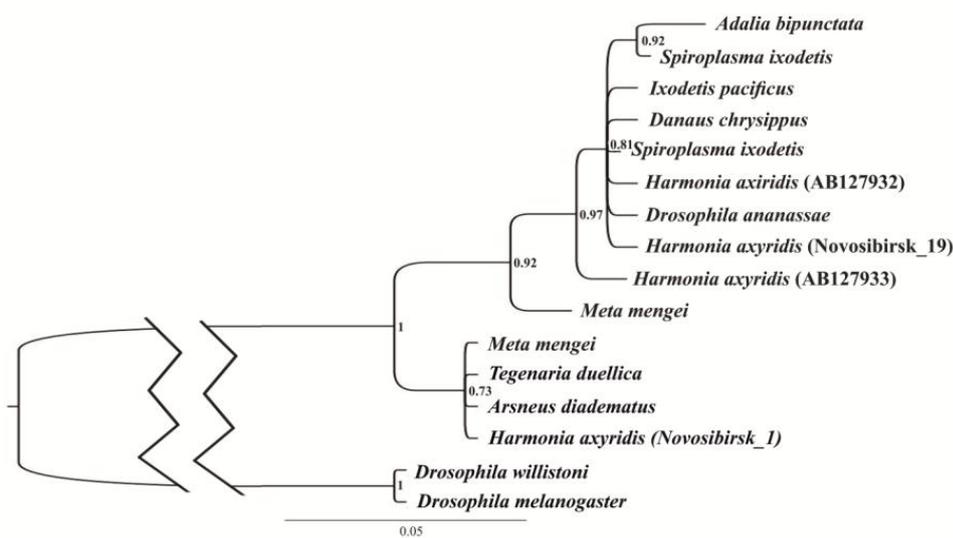


Рисунок 3.2.9 – Филогенетическая реконструкция штаммов *Spiroplasma* – эндосимбионта *H. axyridis*, построенная на основе анализа последовательности фрагмента ITS1 (301 пн.), включающей фрагмент гена 16S rRNA, межгенный спейсер ITS1 и фрагмент гена 23S rRNA. Величины байесовской вероятности приведены рядом с узлами филограммы.

представителем группы *Spiroplasma ixodetis*. Линия из образца Новосибирска № 1 филогенетически сходна с группой молекулярных форм *Spiroplasma*, инфицирующих паукообразных (рисунок 3.2.9). Данная линия, вероятно, недавно инфицировала *H. axyridis*, её биологические эффекты могут сильно отличаться от биологических эффектов основных штаммов *Spiroplasma* HARFUKU1 и HARFUKU2 и их производных.

Сводные данные по зараженности *H. axyridis* репродуктивными симбиотическими цитоплазматическими бактериями *Wolbachia*, *Rickettsia* и *Spiroplasma* представлены Таблице 3.2.5.

Таблица 3.2.5 – Зараженность нативных и инвазивных популяций *H. axyridis* репродуктивными симбиотическими бактериями

Статус популяции	Популяция	Число исследованных самок	Число инфицированных самок			Доля инфицированных самок (%)	
			<i>Wolbachia</i> *	<i>Rickettsia</i>	<i>Spiroplasma</i>		
Инвазивные	Берлин	30					
	Калининград	34	1			2.9	
	Сочи	42		2		4.7	
	Денвер	35					
	Турин	12					
	Прага	26	1			3.8	
	Париж	13	4			30.8	
	Мюнхен	39	4			10.3	
Нативные	Восточная группа	Биробиджан	20			2	10.0
		Владивосток	48			4	8.3
		Бухта Троицы	45	1		2	6.6 (2.2 _W +4.4 _S)
		Поселок Барабаш	3	1			–
		Киото	14			4	28.6
	Западная группа	Новосибирск	26		1	2	11.5 (3.8 _R +7.7 _S)
		Горно-Алтайск	20			2	10.0
		Саяны	23	1			4.3
		ИТОГО	430	12	3	16	

* (Горячева и др., 2015); _W – инфицированные *Wolbachia*; _S – инфицированные *Spiroplasma*; _R – инфицированные *Rickettsia*.

3.3. Изучение биологических эффектов, особенностей передачи, механизмов поддержания и наследования *Wolbachia* в системе *Drosophila melanogaster-Wolbachia*

3.3.1. Изучение биологических эффектов, влияющих на адаптационные возможности насекомого-хозяина

3.3.1.1 Получение излеченных от *Wolbachia* сублиний *D. melanogaster*

Для получения излеченных от *Wolbachia* сублиний мух инфицированная *Wolbachia* лабораторная линия *D. melanogaster* №95 (C(1)RM, у v f/Ybb⁻) была обработана тетрациклином, после чего случайным образом были отобраны две группы самок с разным (2-е и 7-е сутки) сроком вылета. Из 10-ти самок первой группы (2-е сутки отбора) три оказались стерильными, все 10 самок второй группы (7-е сутки вылета) были плодовитыми.

Из семи сублиний первой группы самок, выросших на тетрациклине, безбактериальной оказалась одна сублиния, названная 95/6. Свободным от *Wolbachia* оказалось потомство шести самок второй группы, одна из неинфицированных сублиний второй группы, обозначенная 95/8, была отобрана для дальнейших исследований. В результате были получены сублинии 95, 95/6, 95/8 *D. melanogaster* с идентичным генотипом и различным инфекционным статусом 95^{Wb+} и 95/6^{Wb-}, 95/8^{Wb-}.

3.3.1.2 Сравнительный анализ продолжительности жизни и старения самок с различным инфекционным статусом.

Для изучения продолжительности жизни и старения самок с различным инфекционным статусом были проведены два независимых эксперимента на самках инфицированной *Wolbachia* лабораторной линии №95.

У инфицированных самок средняя продолжительность жизни T_{50} , соответствующая 50%-ному уровню выживаемости, в первом и втором опытах оказалась сопоставимой и составила 61.0 ± 3.40 и 59.25 ± 3.44 суток соответственно. Результаты первого и второго этапов эксперимента были объединены для повышения достоверности. Обобщенные данные представлены на рисунке 3.3.1. На этом же рисунке представлены обобщенные данные по продолжительности жизни двух неинфицированных линий 95/6 и 95/8. Средняя продолжительность жизни на уровне T_{50} самок этих линий сходна и составляет соответственно 51.25 ± 3.41 и 50.75 ± 3.50 суток.

Сравнение результатов свидетельствует о существенно более высокой T_{50} самок с *Wolbachia* (60.37 ± 2.42) по сравнению с T_{50} неинфицированных самок с тем же генотипом (51.0 ± 2.44 ; $t=2.72$; $P<0.01$). На уровне 10% выживаемости эти различия выражены значительно – 75 суток и 57 суток, соответственно.

Анализ динамики зависимости индекса смертности (доли погибших самок в данный период времени среди всех) от возраста имаго (рисунок 3.1.1, г) показывает, что кривые смертности для самок с *Wolbachia* и без нее существенно расходятся после 45-ти суточного возраста из-за более быстрой гибели самок без *Wolbachia*. Если отношение T_{90}/T_{50} использовать как показатель скорости старения, где высокие значения T_{90}/T_{50} характеризуют постепенную и равномерную гибель стареющих особей, а его низкие значения – быструю реализацию процессов старения и гибели, то можно отметить, что у самок линии с *Wolbachia* (величина отношения 1.21) скорость реализации процессов старения заметно ниже, чем у генотипически идентичных самок без *Wolbachia* (величина отношения 1.11).

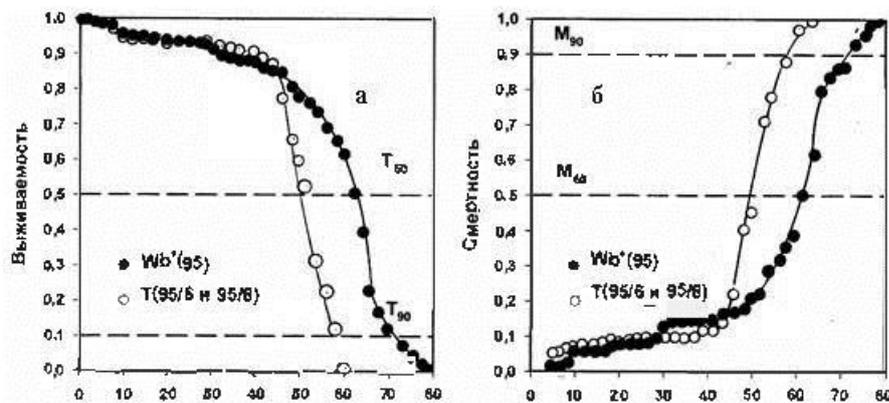


Рисунок 3.3.1 – Выживаемость (а) и смертность (б) в зависимости от возраста самок *D. melanogaster* с *Wolbachia* (-•-) и без нее (-o-).

3.3.1.3 Оценка сравнительной устойчивости Wb^+ и Wb^- сублиний *D. melanogaster* к энтомопатогенному грибу *Beauveria bassiana*

Одним из факторов, снижающих численность особей в популяциях насекомых в природе, являются вызванные энтомопатогенными грибами эпизоотии, в результате которых гибнет до 90% состава популяции, поэтому устойчивость к патогенным грибам может служить показателем жизнеспособности насекомых. *B. bassiana* – широко распространенный энтомопатогенный аскомицет, поражающий различные виды насекомых, в том числе и представителей отряда Diptera.

Результаты исследования сравнительной устойчивости инфицированных и неинфицированных *Wolbachia* линий представлены в таблице 3.3.1.

Таблица 3.3.1 – Устойчивость самок сублиний 95-й линии *D. melanogaster* к действию *B. bassiana*

	<i>Wb⁻</i>	<i>Wb⁺</i>
Число живых самок через 2 суток после заражения	112	169
Число живых самок через 7 суток после заражения	13	53
Доля выживших	0.12	0.31

Примечание – $t_d=4.04 > t_{st}=\{1.6; 2.0; 2.6; 3.3\}$ при числе степеней свободы $v_d=279$.

Согласно критерию Стьюдента, линии достоверно различаются по устойчивости к *B. bassiana*, что указывает на положительное влияние *Wolbachia* на жизнеспособность самок мух из зараженной сублинии. Трёхкратная повторность данного эксперимента с месячным перерывом стабильно показывает повышенную выживаемость инфицированной сублинии.

3.3.1.4 Оценка предпочтений к разным субстратам зараженных и незараженных мух *D. melanogaster* при откладке яиц

Проведена оценка предпочтений к разным субстратам у мух с различным инфекционным статусом. Результаты эксперимента представлены в таблице 3.3.2.

Таблица 3.3.2 – Предпочтение вида корма для откладки яиц у мух сублиний 95-й линии *D. melanogaster*

Родители, выращенные на корме на основе пшеничной крупы	Корм на основе пшеничной крупы	Корм на основе овсяной крупы
	Число вылетевших мух	
<i>Wb⁺</i>	143	132
<i>Wb⁻</i>	72	8

Для мух, инфицированных вольбахией, значение χ^2 составляет 0.36, что меньше $\chi^2_{st}=\{3.84; 6.64; 10.83\}$ при числе степеней свободы $v=1$. Результаты статистического анализа указывают на отсутствие предпочтений к корму при откладке яиц у *Wb⁺*-самок.

В отличие от *Wb⁺* самок, самки *Wb⁻* предпочитают корм на основе пшеничной крупы (χ^2 для *Wb⁻*=51.2, что больше $\chi^2_{st}=\{3.84; 6.64; 10.83\}$ при числе степеней свободы $v=1$).

Необходимо отметить, что число отложенных яиц соответствовало числу вылупившихся имаго, т.е. не наблюдалась гибель мух в процессе развития.

Мухи без *Wolbachia* предпочитают откладывать яйца на корм, приготовленный из пшеничной крупы, в то время как инфицированные мухи откладывают одинаковое количество яиц на оба субстрата. Аналогичный эксперимент с поколением родителей, выращенных на корме на основе овсяной крупы, так же показал наличие предпочтений к «своему» корму у мух без *Wolbachia* и отсутствие предпочтений у инфицированных мух. Такие результаты могли быть получены либо в случае нарушения вкусовой/обонятельной чувствительности у инфицированных мух, либо из-за повреждения механизма запоминания качеств(а) субстрата. Поскольку дополнительное исследование показало сохранение у зараженной сублинии вкусовой и/или обонятельной чувствительности (таблица 3.3.3), отсутствие предпочтений при откладке яиц у мух, инфицированных *Wolbachia*, может быть связано с нарушением, вероятно, какого-то эпигенетического механизма запоминания особенностей субстрата, использовавшегося в процессе их индивидуального развития.

Таблица 4. Сохранность вкусовой чувствительности у мух, инфицированных и неинфицированных *Wolbachia*

Родители	Число отложенных яиц		
	Стандартный корм	Улучшенный корм	Σ
Wb ⁺	210	492	702
Wb ⁻	142	312	454

Выявленные эффекты – повышенная продолжительность жизни, сниженная избирательность при выборе субстрата для откладки яиц, повышенная устойчивость к энтомопатогенам – по сути, являются элементами адаптивной стратегии инфицированной части субпопуляции, обеспечивающими виду выживание при экстремальных условиях окружающей среды. Эти эффекты объясняют стабильное поддержание бактерии в популяциях хозяина, поскольку в совокупности частично компенсируют спонтанную потерю *Wolbachia* при вертикальной передаче симбионта, обеспечивая «гарантированное» и, возможно, более многочисленное, чем у неинфицированных сородичей, потомство. Дополнительным источником компенсации могут быть повышенная конкурентоспособность преимагинальных стадий развития, элементы репродуктивного поведения, а также компенсация потери бактерии за счет ее вертикальной передачи через гаметы самца. Последние вопросы рассматриваются в следующем блоке исследования.

3.3.2 Исследование механизмов поддержания *Wolbachia* в популяциях хозяина

3.3.2.1 Сравнительный анализ конкурентоспособности инфицированных и неинфицированных *Wolbachia* линий *D. melanogaster*

Проведен анализ конкурентоспособности линий *D. melanogaster* на стадии личинки, различающихся по инфекционному статусу. Мухи, инфицированные *Wolbachia*, обладают достоверно более высокой приспособленностью (индекс конкуренции 63.7) по сравнению с неинфицированными бактерией мухами (индекс конкуренции 53.5 и 39.6 для линий 95/6 и 95/8 соответственно). Механизмом, обеспечивающим обнаруженный эффект, может быть, вероятно, небольшое ускорения развития инфицированных личинок на первых личиночных стадиях. Но конкурентоспособность личинок инфицированных самок логично объясняется также и с учетом результатов предыдущих экспериментов. Яйцекладку в пробирке можно рассматривать как модель яйцекладки в природе в условиях ограниченного количества субстрата. Контрольной точкой начала яйцекладки для самок является решение о пригодности-непригодности субстрата. Неинфицированные самки характеризуются избирательностью в отношении качества корма для личинок, в силу чего «принимают решение» о пригодности корма и начале яйцекладки очевидно позднее инфицированных самок, вероятно, к тому моменту, когда субстрат уже оказывается частично «засеян» инфицированными яйцами.

3.3.2.2 Оценка предпочтений в скрещиваниях у дрозофил, инфицированных и не инфицированных *Wolbachia*

Для понимания механизмов, обеспечивающих перманентную инфекцию *Wolbachia* в популяциях хозяина, были проведены эксперименты по изучению предпочтений в скрещиваниях инфицированных бактерией и неинфицированных мух *D. melanogaster*. В исследованиях по оценке предпочтений конкурентоспособности были использованы несколько лабораторных линий *D. melanogaster*. Базовой линией стала линия №95 – «белоглазая» линия, инфицированная *Wolbachia* с генотипом C(1)RM, *y v f/Ybb⁻*, генотип самцов этой линии – *w sn/Ybb⁻*; у особей обоих полов в кариотипе представлена мутантная Y-хромосома с частичной делецией кластера рРНК-генов – *Ybb⁻*, у самок X-хромосомы сцеплены. Для удобства

обсуждения эта линия обозначается как IW (infected white). Кроме линии №95 была использована также красноглазая инфицированная линия – C(1)RM, $y \ v \ f/Ybb^-/w^+sn^-$, отличающаяся от 95 линии X-хромосомой самца и аутосомами. Для получения красноглазой инфицированной линии самок линии №95 скрестили с самцами дикого типа. После обработки сублиний этой линии тетрациклином были получены неинфицированные сублинии с генотипом C(1)RM, $y \ v \ f/Ybb^-/w^+sn^-$. Красноглазая инфицированная линия обозначается как IR (infected red), выведенные от бактерии сублинии линий IW и IR обозначаются как CW1 (95/6), CW2 (95/8) – «cured white» и CR1, CR2 – «cured red» соответственно.

Перед началом эксперимента было получено 10 и более поколений от линий, обработанных ранее тетрациклином. В эксперименте были проанализированы предпочтения в спариваниях самок, различающихся по аллелям локуса *white* и инфекционному статусу (*Wolbachia*⁺/*Wolbachia*⁻). В тестах были использованы 6-8 дневные самцы и 8-10 дневные виргинные самки.

В первом эксперименте были изучены предпочтения самок при скрещиваниях с самцами с различным инфекционным статусом и различными аллелями по локусу *white*. Были исследованы 16 возможных комбинаций. Для проверки повторяемости тесты шести случайно выбранных комбинаций из шестнадцати были проведены дважды: весной 2005 года и осенью 2005 года. Поскольку в результате экспериментов с использованием линий CW1 и CW2 не были выявлены значимые различия в соответствии с тестом χ^2 Пирсона, результаты по этим двум линиям были объединены.

Wolbachia по разному влияла на избирательность скрещиваний (предпочтения в скрещиваниях) у самок. Вне зависимости от собственного инфекционного статуса и инфекционного статуса самца, самки предпочитали красноглазых самцов, инфекционный статус которых самками не учитывался. Самки копулировали с красноглазыми самцами в 617 скрещиваниях (85.5%) из 722, и лишь в 105 случаях (14.5%, $\chi_1^2=363.1$, $P=9.6 \times 10^{-80}$) выбор падал на белоглазого самца. Выбор инфицированных красноглазых IR-самцов происходил в 84.1% скрещиваний (290 скрещиваний в 345 тестах), а CR-самцов – в 86.7% скрещиваний (327 скрещиваний в 377 тестах) ($G_1=1.03$, $P=0.309$). В случае выбора белоглазого самца предпочтение отдавалось инфицированным белоглазым IW-самцам – 19.5% скрещиваний (60 скрещиваний в 307 тестах), тогда как неинфицированные белоглазые CW-самцы выбирались лишь в 10.8% скрещиваний (45 скрещиваний в 415 тестах) ($G_1=10.57$, $P<0.001$).

Инфицированные белоглазые IW-самки проявляют меньшую избирательность в скрещиваниях по сравнению с неинфицированными белоглазыми CW-самками. Белоглазые IW-самки копулировали с белоглазыми самцами в 24.6% скрещиваний (41 скрещивание в 167 тестах), тогда как неинфицированные белоглазые CW-самки проявляли большую избирательность и копулировали с белоглазыми самцами лишь с частотой 7.7% (16 скрещиваний в 209 тестах) ($G_1=20.63$, $P<0.001$). Белоглазые самки чаще скрещивались с самцами с таким же инфекционным статусом, что и они сами, чем с самцами с иным инфекционным статусом (наблюдалось некоторое, хотя и незначительное, предпочтение «своих» с точки зрения инфекционного статуса партнера по скрещиванию) – 17.7% скрещиваний (42 скрещивания в 238 тестах) и 10.9% (15 скрещиваний в 138 тестах), соответственно ($P=0.051$). У белоглазых самок не было выявлено предпочтений в отношении инфекционного статуса в скрещиваниях с красноглазыми самцами. В экспериментах было зафиксировано 85.9% скрещиваний белоглазых самок с красноглазыми самцами, имеющими тот же, что и самка, инфекционный статус (165 скрещиваний в 192 тестах) и 83.7% скрещиваний в случае, когда инфекционный статус красноглазого самца отличался от инфекционного статуса самки (154 скрещиваний в 184 тестах) ($P=0.322$). Неинфицированные красноглазые CR-самки обнаружили меньшую избирательность при скрещиваниях по сравнению с неинфицированными белоглазыми CW-самками и чаще скрещивались с белоглазыми самцами, чем неинфицированные белоглазые самки – 7.7% (16 скрещиваний в 209 тестах) и 18.3% (32 скрещивания в 175 тестах) соответственно ($P=0.003$). Инфицированные белоглазые самки чаще – в 24.6% случаев (41 скрещивание в 167 тестах) скрещивались с инфицированными

белоглазыми самцами при сравнении с красноглазыми инфицированными IR-самками 9.4% (16 скрещиваний в 171 тестах) ($P < 0.001$).

Таблица 3.3.5 – Результаты скрещиваний в группах: одна самка-два самца из линий, различающихся по цвету глаз

♀	♂1 (*R)	♂2 (*W)	Nr	Nw	Nr (%)
IW	IR	IW	29	14	67.4
IW	IR	CW	27	7	79.4
IW	CR	IW	42	15	73.7
IW	CR	CW	28	5	84.9
CW	IR	IW	23	2	92.0
CW	IR	CW	61	8	88.4
CW	CR	IW	45	1	97.8
CW	CR	CW	64	5	92.8
IR	IR	IW	24	7	77.4
IR	IR	CW	77	9	89.5
IR	CR	IW	20	0	100.0
IR	CR	CW	34	0	100.0
CR	IR	IW	24	5	82.8
CR	IR	CW	25	3	89.3
CR	CR	IW	40	16	71.1
CR	CR	CW	54	8	87.1

Примечание – Nr – число тестов, в которых самка копулировала с красноглазыми (*R) самцами; Nw – число тестов, в которых самка копулировала с белоглазыми самцами; $Nr(\%) = (Nr / (Nr + Nw)) \times 100$.

Красноглазые R-самки чаще скрещиваются с красноглазыми самцами с отличным от собственного инфекционным статусом (предпочитают «чужих») – 92.8% (103 скрещивания в 111 тестах) и 83.0% (195 скрещиваний в 235 тестах) скрещиваний соответственно ($P = 0.013$). У этих самок наблюдалась тенденция к предпочтению белоглазых самцов с отличным от собственного инфекционным статусом – 14.6% (30 скрещиваний в 205 тестах) скрещиваний – в сравнении с белоглазыми самцами со сходным инфекционным статусом – 12.8% скрещиваний (18 скрещиваний в 141 тестах). Неинфицированные красноглазые CW-самки проявляли меньшую избирательность в скрещиваниях по сравнению с инфицированными красноглазыми IR-самками – 18.3% (32 скрещивания с белоглазыми самцами в 175 тестах) и 9.4% (16 скрещиваний с белоглазыми самцами в 171 тестах) скрещиваний соответственно (точный тест Фишера: $P = 0.013$).

Полученные результаты указывают, что на выбор самками самцов влияют два фактора – бактериальная инфекция и отягощенность мутациями. *Wolbachia* снижает у инфицированных самок избирательность выбора партнера. Эффект предпочтения партнера со сходным генотипическим статусом («своего») наблюдается и в случае отягощенности мутациями. В отсутствие этих факторов у мух проявляется тенденция к предпочтению «чужих» (партнеров с отличным генотипом, и/или инфекционным статусом).

Во втором цикле экспериментов были изучены предпочтения самок при скрещиваниях с самцами с одинаковыми аллелями по локусу *white* и *singed*, но различным инфекционным статусом. Были протестированы четыре возможные комбинации: (1) ♀IW, ♂IW, ♂CW; (2) ♀CW, ♂IW, ♂CW; (3) ♀IR, ♂IR, ♂CR; (4) ♀CR, ♂IR, ♂CR.

Второй эксперимент показал, что инфицированные самцы оказываются более привлекательными для белоглазых самок вне зависимости от инфекционного статуса последних (инфицированные самки: $\chi_1^2 = 6.76$, $P = 0.009$; выведенные самки: $\chi_1^2 = 7.22$, $P = 0.007$).

В третьем эксперименте изучались предпочтения в скрещиваниях самцов. Были рассмотрены все четыре возможные комбинации: (1) ♀♀IW, ♀♀CW, ♂IW; (2) ♀♀IW, ♀♀CW, ♂CW; (3) ♀♀IR, ♀♀CR, ♂IR; (4) ♀♀IR, ♀♀CR, ♂CR. Результаты третьего эксперимента свидетельствуют об однонаправленности выбора самок белоглазыми самцами. Белоглазые самцы предпочитают белоглазых самок с тем же инфекционным статусом, что и они сами (критерий знаков: $Z = 2.92$, $P = 0.005$). Белоглазые самцы оплодотворили $100 + 82 = 182$ самки с идентичным собственному инфекционному статусу и $58 + 70 = 128$ самок с отличным от собственного инфекционным статусом ($\chi_1^2 = 6.05$, $P = 0.014$). У красноглазых самцов наблюдается тенденция к поддержке предпочтений самок с отличным от их собственного инфекционным статусом (критерий знаков: $Z = 1.02$, $P = 0.307$).

Красноглазые самцы оплодотворили $50 + 76 = 126$ самок с идентичным собственному инфекционному статусу и $68 + 89 = 157$ самок с отличающимся от собственного инфекционным статусом ($\chi_1^2 = 3.40$, $P = 0.065$).

Изучены индивидуальные предпочтения самцов в третьем эксперименте. Избирательность скрещиваний значительно различается у инфицированных и неинфицированных белоглазых самцов ($U = 105.0$, $N_1 = N_2 = 21$, $P = 0.01$). Анализ экспериментальных данных не выявил различий в избирательности скрещиваний у красноглазых самцов ($U = 73.5$, $N_1 = 17$, $N_2 = 13$, $P = 0.123$).

Полученные результаты позволяют предполагать, что *Wolbachia* повышает половую активность белоглазых самцов. В эксперименте инфицированные белоглазые самцы оплодотворили в среднем 8.95 самок каждый, тогда как неинфицированным самцам удалось оплодотворить каждому в среднем 7.14 самок ($t_{40} = 1.904$, $P = 0.060$). Представляется, что бактерия не оказывает влияния на половую активность красноглазых самцов ($t_{27} = 1.077$, $P = 0.290$).

Половая активность неинфицированных белоглазых самцов ниже, чем неинфицированных красноглазых. Первые оплодотворяют в среднем 7.14 самок каждый, а вторые – 9.38 ($t_{32} = -2.361$, $P = 0.024$). Инфицированные белоглазые и красноглазые самцы не различаются по половой активности ($t_{35} = -1.451$, $P = 0.156$).

3.3.2.3. Изучение передачи *Wolbachia* через гаметы самца

Для изучения передачи *Wolbachia* через гаметы самца были проведены межвидовые скрещивания мух *D. melanogaster* и *D. simulans* и три серии внутрилинейных скрещиваний *D. melanogaster*.

3.3.2.3.1. Изучение передачи *Wolbachia* в межвидовых скрещиваниях

Анализ передачи бактерии через гаметы самца в межвидовых скрещиваниях проводился на гибридах F_1 от скрещивания самок линии дикого типа «Черноморка» (ИОГен РАН) без *Wolbachia* с самцами *D. simulans* дикого типа, инфицированными *Wolbachia*. В результате скрещиваний было получено 626 гибридных самок F_1 , которые были индивидуально проанализированы на *Wolbachia* по пяти генам-маркерам, используемым при MLST. Анализ не выявил бактериального симбионта в проанализированных гибридах.

3.3.2.3.2. Изучение передачи *Wolbachia* во внутрилинейных скрещиваниях *D. melanogaster*

В эксперименте было проанализировано 1763 особи F_1 , из которых 305 оказались *Wolbachia* положительными, хотя и с очень низкой плотностью бактерии. При анализе поколения

F₂, полученного от вольбахия-положительных самцов F₁ из 580 проанализированных линий *Wolbachia* положительными оказались только четыре и, так же как в F₁, с очень низкой плотностью бактерии. Таким образом, частота передачи бактерии составила 17.3% в поколении F₁ и 0.7% в поколении F₂.

Результаты эксперимента указывают на то, что частота вертикальной передачи *Wolbachia* через гаметы самца не достаточна для полной компенсации неточности вертикальной передачи бактерии через яйцеклетку. В стабильном поддержании симбионта задействованы еще и элементы репродуктивного поведения, включая показанную ранее повышенную плодовитость инфицированных самок (Fast *et al.*, 2011; Toomey *et al.*, 2013), ассортативность выбора партнера и сниженную избирательность выбора субстрата для откладки яиц, а также повышенная устойчивость инфицированных мух к неблагоприятным условиям окружающей среды – пониженной температуре и повышенной влажности. К числу факторов, потенциально обеспечивающих дополнительный – горизонтальный – перенос бактерии, должны быть отнесены и эктопаразиты, но вопрос вклада эктопаразитов в горизонтальный перенос *Wolbachia* остается за рамками настоящего исследования.

3.3.2.3.3. Изучение плотности бактериальной популяции в F₁ и F₂ после передачи *Wolbachia* через гаметы самца

После успешной передачи *Wolbachia* через гаметы поколению F₁, либо поколению F₂ в мухах происходит снижение плотности бактериальной популяции в 600-1200 раз по отношению к плотности *Wolbachia* в образцах контрольной линии «Черноморка» (рисунок 3.3.2). У мух поколения F₁ и F₂ обнаруживается высокая индивидуальная изменчивость бактериальной плотности *Wolbachia*.

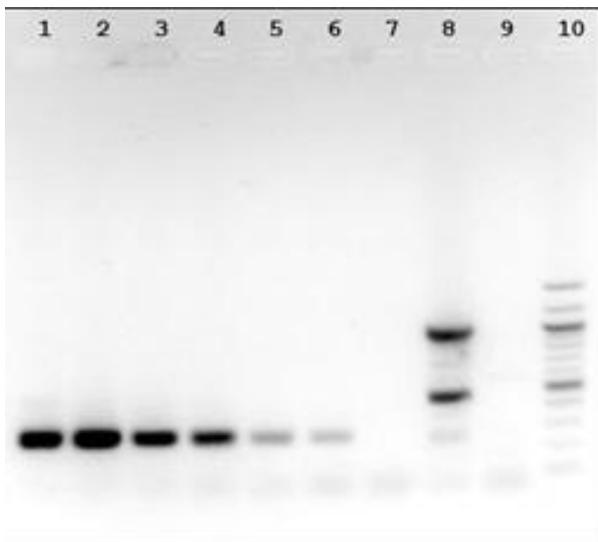


Рисунок 3.3.2 – Электрофореграмма ПЦР-продуктов гена *coxA* *Wolbachia*, полученных в результате амплификации ДНК из имаго линии Черноморка после последовательных пятикратных разбавлений – дорожки 1–7. Препарат ДНК имаго из линии мух F₁ после самцовой передачи без разбавления – дорожка 8. Отрицательный контроль – дорожка 9. Маркёр молекулярной массы - дорожка 10.

Примечание: Дополнительные фрагменты большего размера, чем ожидаемый, амплифицируемые на матрице геномной ДНК мух при внесении в реакционную смесь объемом 13мкл более 10нг тотальной ДНК и иногда видимые после проведения электрофореза продукта амплификации, не являются ДНК вольбахии.

Полученные результаты допускают альтернативную интерпретацию. Во-первых, положительный сигнал у особей поколения F₁ может появляться как результат амплификации фрагментов генома *Wolbachia*, оказавшихся в сперматозоиде в результате дефектов сперматогенеза и встроившихся впоследствии в геном части соматических клеток. В этом случае неизбежна потеря *Wolbachia* во втором поколении. С другой стороны, *Wolbachia* может быть перенесена в зиготу как единичная бактерии. Потеря *Wolbachia* в поколении F₂ в таком случае может быть объяснена либо неточной сегрегацией бактерии в цитоплазме зиготы с последующей потерей из линии зародышевых клеток, либо неспособностью преодолеть

иммунитет хозяина. Второй вариант – потеря единичной бактерии – представляется наиболее вероятным.

3.3.3 Пересеваемая клеточная культура как модель для изучения взаимодействия геномов в симбиотической системе *D. melanogaster-Wolbachia*

При изучении молекулярно-генетических механизмов взаимодействия геномов партнеров по симбиозу в ряде случаев желательны исследования в упрощенной системе пересеваемой клеточной культуры, в которой возможно моделирование ряда событий, приводящих к инфицированию организма хозяина.

3.3.3.1 Получение пересеваемой клеточной культуры

Пересеваемая клеточная культура *D. melanogaster*, инфицированная *Wolbachia*, была получена в течение шести месяцев с момента основания первичной культуры. События, происходящие в процессе получения пересеваемой клеточной культуры из эмбрионов *D.*

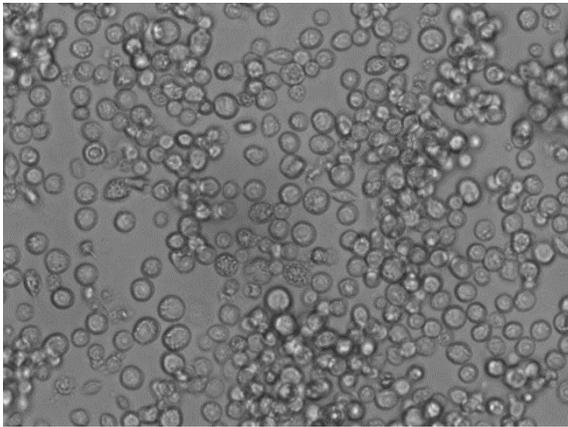


Рисунок 3.3.3 – Клеточная культура Dm2008Wb1, сублиния Dm Wb -22 (Wb^+)

пересеваемую. Полученная пересеваемая культура клеток *D. melanogaster*, инфицированная *Wolbachia*, была названа Dm2008Wb1. Клетки данной культуры имеют некоторые морфологические особенности (рисунок 3.3.3). Клетки мелкие, округлые, диаметр клеток клеточной культуры Dm2008Wb1 составляет 10–20 мкм, что вдвое меньше диаметра клеток пересеваемых культур *Drosophila*. Клетки образуют плотные, медленно растущие колонии, которые плотно прикреплены к поверхности чашки. *Wolbachia* стабильно поддерживается в клетках пересеваемой культуры.

Полученная культура была использована для выделения *Wolbachia*. Для получения бактерии был использован метод, основанный на механическом разрушении клеток стеклянными шариками с последующим отделением *Wolbachia* от неразрушенных клеток фильтрацией. При проведении исследования выяснилось, что *Wolbachia* присутствует не только внутри клеток, но и в культуральной жидкости, что позволяло опустить процедуру механического разрушения клеток. Появление бактерии в культуральной жидкости может быть связано с постоянным присутствием в культуре небольшого количества спонтанно гибнущих и разрушающихся клеток, из которых *Wolbachia* попадает в среду.

Получение живых бактерий в значительном количестве позволило использовать их для заражения клеточных культур. Инфицирование культур происходило только после обработки их

melanogaster, инфицированных *Wolbachia*, соответствовали описанным ранее для клеточной культуры *Drosophila*. В первые дни после получения клеточной суспензии клетки эмбрионов продолжали интенсивно делиться и дифференцироваться в различных направлениях, образуя находящиеся в постоянном ритмическом сокращении нервно-мышечные конгломераты. Апоптоз клеток первичной культуры происходил на 7–10-е сутки после начала культивирования, в ходе апоптоза погибло более 90% клеток. Последующие несколько месяцев клетки практически не делились, в этот период постепенно погибло большинство заложенных культур. Через 6 месяцев после начала культивирования появились первые колонии делящихся клеток, что явилось признаком трансформации первичной культуры в

клеток живыми бактериями. Внесение термоинактивированных бактерий, как и ожидалось, не приводило к инфекции. Дополнительное доказательство существования в культуре живых бактерий было получено при обработке клеток тетрациклином. Характерный для *Wolbachia* фрагмент гена *wspA* постепенно исчезал в течение трех последовательных пассажей при росте клеточной культуры на среде с тетрациклином.

3.3.3.2 Цитологическая идентификация *Wolbachia* в клетках пересеваемой культуры

Для визуализации бактерии в клетках пересеваемой культуры была проведена FISH-гибридизация клеток Dm2008Wb1 с W1 и W2 зондами на *Wolbachia*. Оценка плотности цитологическим методом оказалась затруднена из-за неравномерного распределения *Wolbachia* на ядерной мембране, где бактерии образуют агломераты размером несколько микрометров, и из-за неправильной сложной формы ядра.

На уровне индивидуальных клеток клеточной культуры плотность *Wolbachia* оказалась высоко варибельным признаком, что вероятно связано с характерной для клеточных культур насекомых несинхронностью деления клеток.

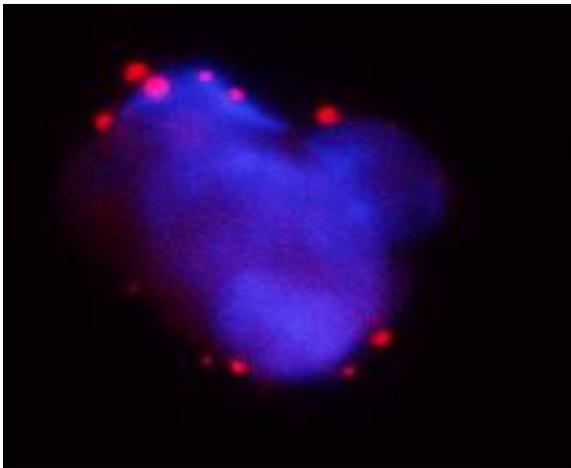


Рисунок 3.3.4 – FISH-гибридизация клеток Dm2008Wb1 (инфицированная вольбахией сублиния № 22) с W1 и W2 зондами на *Wolbachia*. Ядро клетки Dm2008Wb1 окрашено DAPI в синий цвет. Бактерии вольбахия видны как красные точки по гибридизации с W1 и W2 зондами на ген вольбахии 16S rDNA.

3.3.3.3 Инфекционность вольбахии из клеточной культуры Dm2008Wb1 для клеточных линий насекомых

Эксперименты по инфицированию были проведены для клеточных линий *D. melanogaster* S2 (Shneider, 1972), *D. virilis* 79f7Dv3g, черного таракана *Blattella germanica* BGE1 и BGE2, комара *Ae. aegypti* C6. Анализ инфицированности клеточных культур осуществлялся методом ПЦР, после замены среды и пяти пассажей на среде, свободной от бактерий. Клеточные линии *D. melanogaster*, свободные от *Wolbachia*, инфицировались симбионтом стандартным методом низкоскоростного центрифугирования при использовании отфильтрованной среды, свободной от клеток, но содержащей бактерию.

В аналогичных условиях клеточные линии *D. virilis* оказались устойчивыми к инфицированию *Wolbachia*. В наиболее успешном опыте по инфицированию клеточной линии *D. virilis* *Wolbachia* оказалась потеряна через 8 пассажей.

В клеточных культурах 79f7Dv3g, черного таракана *Blattella germanica* BGE1 и BGE2, комара *Ae. aegypti* C6 бактерия постепенно терялась после инфекции на протяжении от трёх до пяти пассажей.

3.3.4 Изучение зараженности лабораторных линий *Drosophila virilis*

Для уточнения вопроса о распространенности *Wolbachia* в лабораторных популяциях дрозофил группы *virilis* проанализировано 30 популяций 10 видов группы. В исследованных популяциях выявить симбиотическую бактерию не удалось.

3.3.5 Изучение рекомбинации между штаммами *Wolbachia* в условиях клеточной культуры

Принципиально важным, фундаментальным аспектом симбиоза для внутриклеточных бактерий является рекомбинация, обеспечивающая изменчивость и сохранность генома в условиях облигатного внутриклеточного существования. Многократно подтвержденный для *Wolbachia* биоинформационными методами, этот процесс ранее не фиксировали в эксперименте.

Для разработки модели экспериментальной рекомбинации двух штаммов *Wolbachia* была получена перmissive для заражения *Wolbachia* клеточная линия. Для этого ранее полученную линию клеток, стабильно инфицированную *Wolbachia*, излечили от бактерии обработкой тетрациклином и субклонировали.

Для идентификации аллельного профиля было выполнено мультилокусное типирование штаммов *Wolbachia* из линий мух дикого типа *D. melanogaster* (линия «Черноморка», ИОГен) и *D. simulans*. Штамм *Wolbachia* из линии мух *D. melanogaster* оказался практически идентичен стандартному штамму *wMel* (GenBank ID: NC_002978.6) по структуре фрагментов генов MLST, единственное найденное отличие состоит в транзиции в гене *gatB* G790A. Номер нуклеотида определён по полной последовательности гена *gatB* штамма *wMel*. Как и ожидалось, данная транзиция выявлена у *Wolbachia* как в линии мух «Черноморка», так и у *Wolbachia* клеточной линии Dm2008Wb1, производной от линии «Черноморка», а также у *Wolbachia* субклонов клеточной линии. Штамм *Wolbachia* из линии мух *D. simulans* идентичен стандартному штамму *wRi* по структуре фрагментов генов MLST (GenBank ID: CP001391.1).

Инфекция двумя штаммами *Wolbachia*: *wMel* и *wRi* обработанной тетрациклином клеточной линии Dm2008Wb1 привела к получению субклонов двух типов: содержащих и не содержащих *Wolbachia* после пятого пассажа. К первому типу относятся субклоны, не содержащие *Wolbachia*, или содержащие её с очень низкой копийностью; в этих субклонах произошла спонтанная потеря Y-хромосомы. В субклонах, содержащих *Wolbachia*, Y-хромосома сохраняется до настоящего времени.

Из 13 полученных клонов с успешной инфекцией *Wolbachia*, 9 содержали только штамм *Wolbachia wMel*, как следует из результатов секвенирования ПЦР-фрагментов гена *fbpA*, в 4 клонах выявлена двойная инфекция обоими штаммами.

Полученные субклоны клеточной культуры с двойной инфекцией стабильно сохраняли инфекционный статус на протяжении двух лет. Для выявления возможных рекомбинантов проведено мультилокусное типирование одного из клонов с двойной инфекцией (Dm-22-at4). ПЦР-фрагменты пяти MLST генов были клонированы в плаزمиды, и индивидуальные клоны секвенированы для идентификации принадлежности к штаммам *wMel* и *wRi*. В случае генов *coxA*, *ftsZ*, *gatB* и *hcpA* выявлены только родительские формы генов, указывающие на наличие двух штаммов *Wolbachia* в одной клетке. В случае гена *fbpA* были выявлены как родительские формы, так и форма с точковыми заменами, специфичными для обоих штаммов *Wolbachia* (Таблица 3.3.8). Расположение специфических замен двумя непрерывными блоками позволяет предположить возникновение такой формы в результате внутригенной рекомбинации. Внутригенная рекомбинация могла произойти как в момент инфицирования культуры, так и в ходе пассирования культуры с двойной инфекцией на протяжении двух лет.

Таблица 3.3.8 – Полиморфные сайты клонированных в плаزمидях ПЦР фрагментов гена *fbpA* из клеточного клона *Dm-22-at4* с выявленной двойной инфекцией штаммами *Wolbachia wMel* и *wRi*

Группа клонов с идентичными последовательностями гена <i>fbpA</i>	Номера нуклеотидов по нуклеотидной последовательности гена <i>fbpA</i> штамма <i>Wolbachia wMel</i> .									Число клонов данного типа
	333	337	342	345	393	492	531	579	585	
Идентичны <i>wMel</i>	A	G	A	C	A	A	G	G	G	18
Идентичны <i>wRi</i>	<i>g</i>	<i>a</i>	<i>g</i>	<i>t</i>	<i>c</i>	<i>g</i>	<i>a</i>	<i>a</i>	<i>a</i>	9
Рекомбинантная форма	A	G	A	C	A	<i>g</i>	<i>a</i>	<i>a</i>	<i>a</i>	10

В изученной паре штаммов *Wolbachia* в клетках *D. melanogaster* заметно лучше сохранялся штамм *wMel*, что ускоряло сегрегацию клонов. Вместе с тем следует отметить, что разделение клонов в данной системе не происходит полностью. Во всех клонах с наличием штамма *wRi* наблюдалось двойное инфицирование и чистые родительские формы гена *fbpA* и рекомбинантные формы удавалось отсекавировать только после процедуры клонирования ДНК ПЦР-фрагментов в плазмидях.

4 ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Понимание особенностей и закономерностей формирования видового состава, структуры, динамики развития и поддержания стабильности популяций насекомых лежит в основе интегрированных программ контроля численности эпидемиологически опасных и инвазивных видов. Эта глобальная научно-практическая задача требует проведения множества фундаментальных направлений исследований, включающих диагностику криптических видов, изучение изменчивости, полиморфизма и генетического груза переносчиков и инвайдеров, разработку вопросов сложной системы отношений насекомых с окружающей средой, их адаптаций и особенностей поведения. Генетическая детерминация большинства указанных процессов и признаков позволяет изучать их с применением комплексного аппарата классических и современных методов генетики, в том числе с использованием упрощенных модельных систем.

В ходе нашей работы была проведена генетическая идентификация сибсовых видов малярийных комаров рода *Anopheles*. Результатами этой части исследования стали описание нового вида в комплексе «*maculipennis*» – *An. artemievi* Gordeev et al. и делимитация данного вида от известных видов комплекса, а также сведение вида *An. daciae* к виду *An. messeae*. Было показано, что вид *An. artemievi* характеризуется специфическими молекулярно-генетическими признаками – структурой ITS2 и фрагмента гена *cox1*, и несвойственной другим видам комплекса совокупностью морфологических характеристик экзохориона и цитогенетических особенностей структуры политенных хромосом слюнных желез. Напротив, виду *An. daciae* присущи молекулярно-генетические признаки *An. messeae*, из которого первый был выделен. Сведение вида *An. daciae* к виду *An. messeae* поддерживается результатами анализа полиморфизма структуры ITS2 и *cox1*, свидетельствующих о подразделенности популяций полиморфного *An. messeae* и существовании предкового полиморфизма (Ваулин, Новиков, 2010; 2012), сформировавшегося до дивергенции предкового вида.

Описание нового вида – *An. artemievi* и сведение *An. daciae* к *An. messeae* оказываются важными в свете научно-практического применения полученных данных. Ареал и способность к передаче малярии *An. messeae* достаточно хорошо изучены, что позволяет существенно снизить финансовые вложения в исследования распространения этого переносчика в

Российской Федерации. *An. artemievi* на территории Российской Федерации не встречается. Его эпидемиологическое значение требует специального изучения.

Глобальная инвазия азиатской божьей коровки *H. axyridis* и необходимость управления численностью ее популяций в границах инвазивного ареала актуализировали поиск специфических особенностей, обеспечивающих быстрое распространение вида, и изучение генетической структуры популяций инвайдера для определения источника происхождения инвазивных популяций. Поскольку преадаптации к инвазии, на основе которых у *H. axyridis* появилась способность к успешному захвату новых территорий, сформировались в популяциях нативного ареала, в представленной работе была изучена генетическая структура нескольких нативных популяций азиатской божьей коровки. Показано, что единый ареал вида распадается на две генетически дифференцированные восточную и западную группы популяций. Этот результат подтверждается как данными анализа структуры фрагмента гена *cox1*, так и данными микросателлитного анализа по 18 локусам. Основным источником инвазии, по всей видимости, стали насекомые из популяции восточной группы. Результаты анализа предполагают, что инвазивные популяции имеют общее происхождение. Генетическими детерминантами, обеспечившими в числе прочего успешное укоренение и глобальную инвазию, стали очищение популяций от леталей и сохранение/восстановление генетической изменчивости в инвазивных популяциях на уровне, свойственном нативным популяциям *H. axyridis*.

Вопрос о потенциальном значении в процессах инвазии репродуктивных цитоплазматических симбионтов-прокариот, влияющих на соотношение полов в инфицированных популяциях, перераспределение ресурсов и вероятность инбридинга, практически не изучен. Появившиеся в последние годы данные, прежде всего о повышении плодовитости/потенциальной плодовитости зараженных бактериями самок и быстром распространении репродуктивных симбионтов в инвазивных биотипах инвайдеров, позволяли предполагать, что по крайней мере некоторые варианты бактерионосительства *H. axyridis* положительно ассоциированы с инвазивностью. Первым шагом на пути изучения этого вопроса стало определение видового состава и распространения в границах нативного и инвазивного ареала *H. axyridis* трех репродуктивных симбиотических бактерий – *Spiroplasma*, *Rickettsia* и *Wolbachia*. *Rickettsia* была обнаружена у *H. axyridis* впервые. *Rickettsia*-эндосимбионт *H. axyridis* относится к группе *Rickettsia bellii*, в отличие от *Rickettsia* АВ, инфицирующей других представителей семейства Coccinellidae, что может являться свидетельством заражения хозяина – *H. axyridis* – обнаруженной линией *Rickettsia* после дивергенции рода *Harmonia*. В работе продемонстрирована полиинфекция *H. axyridis* симбиотической бактерией *Wolbachia*. *Wolbachia* супергрупп «А», «Е» и «N» впервые обнаружена у хозяина. Невысокий уровень инфицированности не позволяет делать категоричные выводы о моменте заражения *H. axyridis* этими линиями. *Spiroplasma H. axyridis* является представителем группы *S. ixodeticis*. Найденные линии не идентичны, описаны два новых варианта последовательностей маркерной области генома бактерии (ITS1). В большинстве изученных случаев была найдена двойная инфекция, описываемая для *Spiroplasma* впервые. Плотность бактериальной популяции при двойном инфицировании на порядок выше, чем при единичной инфекции, что, вероятно, повышает стабильность наследования бактерии.

Rickettsia, *Wolbachia* и *Spiroplasma* представлены филогенетически различными линиями, что свидетельствует о неоднократных событиях инфицирования в эволюционной истории хозяина.

Невысокая – 3-5% – зараженность *H. axyridis* бактериями *Rickettsia* и *Wolbachia*, подтверждает незначительное влияние этих эндосимбионтов на формирование высокой инвазивности *H. axyridis*. Отсутствие в инвазивных популяциях хозяина *Spiroplasma*, достаточно широко распространенной в нативной части ареала – до 49% (Majerus et al. 1998), позволяет предполагать наличие отрицательной связи этого эндосимбионта с формированием высокого инвазивного потенциала *H. axyridis*, а также говорит о том, что *Spiroplasma* является более функционально значимым симбионтом для *H. axyridis*, чем *Rickettsia* и *Wolbachia*. Для

выяснения характера и специфических особенностей этой связи необходимы дальнейшие исследования.

Тонкие исследования биологических эффектов симбиотических отношений, их связи с генетическим фоном хозяина и изучение механизмов, обеспечивающих стабильное сохранение бактерии в популяциях хозяина выполнены на классической модельной системе *D. melanogaster-Wolbachia*. Полученные данные указывают на мутуалистические отношения партнеров, выражающиеся в повышении приспособленности зараженного хозяина за счет увеличения продолжительности жизни имаго, повышения конкурентоспособности инфицированных личинок, снижения избирательности выбора самками субстрата для откладки яиц, повышения устойчивости имаго к энтомопатогенам. Как было доказано ранее, сохранение бактерии в ряду поколений обеспечивается цитоплазматическим наследованием. В представленной работе показано, что частичная компенсация спонтанной потери симбионта возможна за счет реализации специфического репродуктивного поведения. Проведенные эксперименты выявили сложную систему ассортативных скрещиваний у *D. melanogaster*, зависящую от генотипа и инфекционного статуса линии. Компенсаторный вклад в поддержание симбионта вносит также альтернативное наследование *Wolbachia* через гаметы самца.

Вопрос о сохранении целостности бактериального генома в условиях облигатного внутриклеточного существования относится к числу фундаментальных вопросов биологии. В представленном исследовании впервые экспериментально показана внутригенная рекомбинация в условиях модельной системы клеточной культуры, инфицированной двумя линиями *Wolbachia*. Высказано предположение, что гомологичная рекомбинация может рассматриваться как на наиболее вероятный молекулярный механизм рекомбинации *Wolbachia* у *D. melanogaster*.

Перспективы дальнейшей разработки темы. В настоящее время разрабатываются принципиально новые подходы для контроля численности переносчиков малярии. Наиболее оригинальным представляется использование симбиотических бактерий, прежде всего *Wolbachia*, как генетической детерминанты, снижающей зараженность анофелин возбудителями малярии. Это направление находится на начальной стадии развития. Исследования, сфокусированные на понимание молекулярных механизмов сосуществования про- и эукариот в сложной трехкомпонентной системе комар-возбудитель малярии-*Wolbachia*, выполняются как на упрощенной модели клеточной культуры, так и, правда в очень ограниченном объеме, на организменном уровне. Изучение геномных механизмов коадаптаций возбудителей, переносчиков и *Wolbachia* с целью последующего использования результатов в интегрированных системах управления численностью переносчиков является наиболее значимой и интересной перспективой настоящей работы с фундаментальной и научно-практической точек зрения. Другим аспектом развития проблемы может стать изучение генетических факторов, детерминирующих возможность заражения и поддержание заражения комаров возбудителями малярии. Несмотря на полногеномное секвенирование некоторых видов анофелин, поставленный вопрос до сих пор не решен. Одним из путей решения является сравнительный анализ геномов и профилей экспрессии близкородственных видов, различающихся по способности к переносу малярии, и для этих целей весьма перспективным представляется анализ представителей комплекса «*maculipennis*», в том числе как нового вида *An. artemievi*, так и вида *An. messeae* – основного переносчика на территории Российской Федерации.

Исследование симбиотических систем, вопросов поддержания целостности бактериального генома и прежде всего механизмов взаимодействия партнеров – их генетических детерминант и биохимических цепей, а также накопление сведений о разнообразии и специфике этих взаимодействий позволят в будущем перейти к разработкам направленных на гены-мишени методов лечения заболеваний человека и животных. Использование упрощенных моделей клеточных культур существенно упрощает такие исследования за счет выравнивания генетического фона и устранения эффектов дополнительного контроля со стороны организма хозяина.

5. ВЫВОДЫ

1. Малярийный комар *Anopheles artemievi* Gordeev et al. является новым видом – представителем комплекса «maculipennis». *An. artemievi* характеризуется специфическими молекулярно-генетическими признаками – структурой ITS2 и фрагмента гена *cox1*, и несвойственной другим видам комплекса совокупностью морфологических характеристик экзохориона и цитогенетических особенностей структуры политенных хромосом слюнных желез.
2. *Anopheles messeae sensu lato* обнаруживает внутривидовой и в ряде случаев внутригеномный полиморфизм по молекулярным формам ITS2. Молекулярно-генетические характеристики – полиморфизм структуры ITS2 и митохондриального гена *cox1* – не поддерживают разделение *An. daciae* и *An. messeae* на самостоятельные виды.
3. Инвазивный вид азиатской божьей коровки *Harmonia axyridis* в границах нативного ареала генетически дифференцирован на восточную и западную группы популяций, что подтверждается данными анализа структуры фрагмента митохондриального гена *cox1* и данными микросателлитного анализа по 18 локусам. Характер распределения митотипов в нативном и инвазивном ареалах свидетельствует о том, что основным источником инвазии является популяция восточной группы. Инвазивные популяции, по всей видимости, имеют общее происхождение.
4. Факторами, обеспечившими успешное укоренение и глобальную инвазию *H. axyridis*, стали повышение жизнеспособности и восстановление генетической изменчивости в инвазивных популяциях на уровне, свойственном нативным популяциям.
5. *H. axyridis* инфицирована тремя видами репродуктивных цитоплазматических симбиотических бактерий – *Rickettsia*, *Wolbachia* и *Spiroplasma*. *Rickettsia*, *Wolbachia* и *Spiroplasma* представлены филогенетически различными линиями, что свидетельствует о неоднократных событиях инфицирования в эволюционной истории *H. axyridis*.
6. *Rickettsia* не оказывает значительного влияния на формирование высокой инвазивности *H. axyridis*. *Spiroplasma* является более функционально значимым симбионтом для *H. axyridis*, чем *Rickettsia* и *Wolbachia*. В инвазивных популяциях хозяина *Spiroplasma* отсутствует, что свидетельствует о наличии отрицательной связи этого эндосимбионта с формированием способности к инвазии у *H. axyridis*.
7. Наследуемая по материнской линии цитоплазматическая бактерия *Wolbachia* повышает приспособленность зараженного хозяина *D. melanogaster* за счет увеличения продолжительности жизни имаго, повышения конкурентоспособности инфицированных личинок, снижения избирательности выбора самками субстрата для откладки яиц, повышения устойчивости имаго к энтомопатогенам. Отношения партнеров в данной системе являются мутуалистическими.
8. Бактерия *Wolbachia* оказывает влияние на репродуктивное поведение хозяина – *D. melanogaster*. Сложная система ассортативных скрещиваний зависит не только от генотипа хозяина, но и от инфекционного статуса линий *D. melanogaster*. Реализации специфического репродуктивного поведения хозяина обеспечивает частичную компенсацию спонтанной потери *Wolbachia* при материнском наследовании. Компенсаторный вклад в поддержание симбионта вносит также альтернативное наследования *Wolbachia* через гаметы самца.
9. В условиях клеточной культуры происходит рекомбинация между линиями *Wolbachia*. Наиболее вероятным молекулярным механизмом рекомбинации *Wolbachia* у *D. melanogaster* является гомологичная рекомбинация.

**СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИСЕРТАЦИИ В ЖУРНАЛАХ ИЗ
СПИСКА ВАК**

1. Goryacheva I. Heritable bacterial endosymbionts in native and invasive populations of *Harmonia axyridis* / I. Goryacheva, A. Blekhman, B. Andrianov, I. Zakharov // *Biological invasions*. – 2016. – Вып. 11. – Doi: 10.1007/s10530-016-1298-8.
2. Горячева И.И. Генетическая структура нативных и инвазивных популяций *Harmonia axyridis* Pall. в свете глобальной инвазии / И.И. Горячева, А.В. Блехман // *Генетика*. – 2016. – Т. 52. – № 12. – С. 1358-1370.
3. Горячева И.И. Биологические эффекты симбиоза насекомых и внутриклеточной бактерии *Wolbachia pipientis* / И.И. Горячева, Б.В. Андрианов // *Успехи современной биологии*. – 2016. – Т. 136. – № 3. – С. 247-265.
4. Блехман А.В. Нативный ареал и биологические особенности инвазивной божьей коровки *Harmonia axyridis* / А.В. Блехман, И.И. Горячева // *Успехи современной биологии*. – 2016. – Т. 136. – № 5. – С. 461-471.
5. Горячева И.И. Генетическое разнообразие *Wolbachia pipientis* в нативных и инвазивных популяциях *Harmonia axyridis* Pall, 1773 (Coleoptera, Coccinellidae) / И.И. Горячева, А.В. Блехман, Б.В. Андрианов, Т.В. Горелова, И.А. Захаров // *Генетика*. – 2015. – Т. 51. – № 8. – С. 857-863.
6. Горячева И.И. Биологические эффекты *Wolbachia pipientis* – раскрытие генетических механизмов / И.И. Горячева, Б.В. Андрианов // *Успехи Современной Биологии*. – 2014. – Т. 134. – № 4. – С. 339-349.
7. Званцов А.Б. Распространение комаров комплекса *Anopheles maculipennis* (Diptera, Culicidae, Anophelinae) в Средней Азии / А.Б. Званцов, М.И. Гордеев, И.И. Горячева, М.Н. Ежов // *Медицинская паразитология и паразитарные болезни*. – 2014. – № 4. – С. 19-23.
8. Tayen A. Investigating the genetic load of an emblematic invasive species: The case of the invasive harlequin ladybird *Harmonia axyridis* / A. Tayen, A. Estoup, R.A. Hufbauer, V. Ravigne, I. Goryacheva, I. Zakharov, E. Lombaert, B. Facon // *Ecology and Evolution*. – 2013. – Т. 3 – № 4. – С. 864-871.
9. Кадамов Д.С. Малярийные комары (Diptera, Culicidae, Anopheles) Северного Таджикистана, их экология и роль в передаче возбудителей малярии / Д.С. Кадамов, А.Б. Званцов, С.С. Каримов, М.И. Гордеев, И.И. Горячева, М.Н. Ежов // *Медицинская паразитология и паразитарные болезни*. – 2012. – № 3. – С. 30-34.
10. Lombaert E. Inferring the origin of populations introduced from a genetically structured native range by approximate Bayesian computation: case study of the invasive ladybird *Harmonia axyridis* / E. Lombaert, T. Guillemaud, C. Thomas, L. Lawson Handley, J. Li, S. Wang, H. Pang, I. Goryacheva, I. Zakharov, E. Josselin, R. Poland, A. Migeon, J. van Lenteren, P. De Clercq, N. Berkvens, W. Jones, A. Estoup // *Molecular Ecology*. – 2011. – Т. 22. – С. 4654-4670.
11. Горячева И.И. Изучение переносчиков малярии в Кыргызстане методами ПЦР-ПДРФ и секвенирования / И.И. Горячева, А.Б. Званцов, М.И. Гордеев, О.В. Безжонова, Н.Т. Усенбаев, М.Н. Ежов // *Медицинская паразитология и паразитарные болезни*. – 2011. – № 1. – С. 34-38.
12. Blekhman A.V. Differentiation of *Harmonia axyridis* Pall. according to polymorphic morphological traits and variability of the mitochondrial COI gene / A.V. Blekhman, I.I. Goryacheva, I.A. Zakharov // *Moscow University Biological Sciences Bulletin*. – 2010. – Т. 65. – С. 174.
13. Блехман А.В. Внутривидовая дифференциация *Harmonia axyridis* Pall. по комплексу морфологических полиморфных признаков и изменчивости митохондриального гена

- COI / А.В. Блехман, И.А. Захаров, И.И. Горячева // Вестник Московского Университета. – 2010. – №. 4. – С. 50-53.
14. Андрианов Б.В. Получение новой пересеваемой клеточной линии *Drosophila melanogaster* из линии мух инфицированных внутриклеточной эндосимбиотической бактерией *Wolbachia pipientis* в природе/ Б.В. Андрианов, И.И. Горячева, И.Д. Александров, Т.В. Горелова // Генетика. – 2010. – Т. 46. – С. 14-17.
 15. Званцов А.Б. Обнаружение *Anopheles artemievi* Gordeev et al. (Diptera, Culicidae) в Туркменистане / А.Б. Званцов, К. Розыев, М.И. Гордеев, И.И. Горячева, Х. Хемзаев, М.Н. Ежов // Медицинская паразитология и паразитарные болезни. – 2010. – № 3. – С. 27-28.
 16. Гордеев М.И. Молекулярно-генетический анализ малярийных комаров комплекса *Anopheles maculipennis* (Diptera, Culicidae) Азербайджана / М.И. Гордеев, О.В. Безжонова, И.И. Горячева, Е.В. Шайкевич, А.Б. Званцов, С. Мамедов, Н. Мутдалибов, Э. Гасымов, М.Н. Ежов // Медицинская паразитология и паразитарные болезни. – 2010. – № 4. – С. 43-45.
 17. Markov A. Symbiotic Bacteria Affect Mating Choice in *Drosophila melanogaster* / A. Markov, O. Lazebny, I. Goryacheva, M. Antipin, A. Imasheva, A. Kulikov // Animal Behaviour. – 2009. – Т. 77. – С. 1011-1017.
 18. Кешишьян А. Генетический анализ малярийных комаров комплекса *Anopheles maculipennis* (Diptera, Culicidae) Армении / А. Кешишьян, М. И. Гордеев, О.В. Безжонова, И.И. Горячева, А.Б. Званцов, В.А. Давидянц, М.Н. Ежов // Медицинская паразитология и паразитарные болезни. – 2009. – № 3. – С. 24-28.
 19. Bezzhonova O.V. Intragenomic heterogeneity of rDNA internal transcribed spacer 2 in *Anopheles messeae* (Diptera: Culicidae) / O.V. Bezzhonova, I.I. Goryacheva // J. Med. Entomol. – 2008. – Т. 45. – № 3. – С. 337-341.
 20. Безжонова О.В. Малярийные комары комплекса *Anopheles maculipennis* (Diptera, Culicidae) Грузии / О.В. Безжонова, Г.А. Бабуадзе, М.И. Гордеев, И.И. Горячева, А.Б. Званцов, М.Н. Ежов, П. Имнадзе, М. Иосава, Г. Курцикашвили // Медицинская паразитология и паразитарные болезни. – 2008. – №3. – С. 32-36.
 21. Гордеев М.И. Комары рода *Anopheles* (Diptera, Culicidae) Тянь-Шаня: цитогенетический и молекулярно-генетический анализ / М.И. Гордеев, А.Б. Званцов, И.И. Горячева, Е.В. Шайкевич, М.Н. Ежов, Н.Г. Усенбаев, Ж.Ж. Жажева, Ш.М. Жахончиров // Медицинская паразитология и паразитарные болезни. – 2008. – № 3. – С. 25-32.
 22. Александров И.Д. Удаление эндосимбионта *Wolbachia* специфически снижает конкурентоспособность и продолжительность жизни самок и конкурентоспособность мух лабораторной линии *Drosophila melanogaster* / И.Д. Александров, М.В. Александрова, И.И. Горячева, Н.В. Рощина, Е.В. Шайкевич, И.А. Захаров // Генетика. – 2007. – Т. 43. – № 10. – С. 1372-1378.
 23. Пантелеев Д.Ю. Эндосимбиотическая бактерия *Wolbachia* повышает неспецифическую устойчивость к энтомопатогенам и изменяет поведение *Drosophila melanogaster* / Д.Ю. Пантелеев, И.И. Горячева, Б.В. Андрианов, Н.Л. Резник, О.Е. Лазебный, А.М. Куликов // Генетика. – 2007. – Т. 43. – № 9. – С. 1277-1280.
 24. Гордеев М.И. Малярийные комары (Diptera., Culicidae, Anopheles) долины Амударьи / М.И. Гордеев, И.И. Горячева, Е.В. Шайкевич, А.Б. Званцов, М.Н. Ежов // Медицинская паразитология и паразитарные болезни. – 2006. – № 1. –С. 25-30.
 25. Гордеев М.И. Описание нового вида *Anopheles artemievi* sp.n. (Diptera, Culicidae) / М.И. Гордеев, А.Б. Званцов, И.И. Горячева, Е.В. Шайкевич, М.Н. Ежов // Медицинская паразитология и паразитарные болезни. – 2005. – № 2. – С. 4-5.
 26. Горячева И.И. Бактерии рода *Wolbachia* – репродуктивные паразиты членистоногих / И.И. Горячева // Успехи современной биологии. – 2004. – Т. 124. – № 3. – С. 246-259.
 27. Гордеев М.И. Молекулярно-генетический анализ малярийных комаров Средней Азии / М.И. Гордеев, И.И. Горячева, А.Б. Званцов, Е.В. Шайкевич, М.Н. Ежов // Вестник Томского Государственного Университета. – 2004. – №3. – С. 17-19.

28. Гордеев М.И. Дополнение к списку комаров рода *Anopheles* (Diptera: Culicidae) Таджикистана и доминирующие виды переносчиков в современных очагах малярии в республике / М.И. Гордеев, М.Н. Ежов, А.Б. Званцов, И.И. Горячева, Е.В. Шайкевич, С.С. Каримов, Д.С. Кадамов // Медицинская паразитология и паразитарные болезни. – 2004. – № 3. – С. 16-21.
29. Захаров И.А. Распространение в популяциях *Adalia bipunctata* L. Евразии цитоплазматически наследуемой бактерии рода *Spiroplasma*, влияющей на соотношение полов / И.А. Захаров, И.И. Горячева, Е.В. Шайкевич, Ч.М. Доржу // Генетика. – 2000. – Т. 36. – № 2. – С. 191–194.
30. Jiggins F.M. Male-Killing *Wolbachia* in two species of insect / F.M. Jiggins, D. Bertrand, S.A. West, I. Goriacheva, I. Zakharov, J.H. Werren, R. Stouthammer, G.D.D. Hurst, J.H.G. von der Schulenburg, M.E.N. Majerus // Proc. R. Soc. Lond B. – 1999. – Т. 266. – № 1. – С. 735-740.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИСЕРТАЦИИ

31. Ejov M.N. Mosquitoes of the genus *Anopheles* (Diptera, Culicidae) in countries of the WHO European Region confronted with resurgence of malaria / M.N. Ejov, M.I. Gordeev, A.B. Zvantsov, I.I. Goriacheva, E.V. Shaikevich, O.V. Bezzhonova – Copenhagen: WHO. – 2008. – С. 1-60.
32. Горячева И.И. Молекулярно-генетические маркеры переносчиков малярии / И.И. Горячева, М.И. Гордеев – В «Научно-практическое руководство по малярии (эпидемиология, систематика, генетика)». Томск: Издательство Томского государственного университета, 2007. – С. 78-87.