

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

На правах рукописи

ГОРЯЧЕВА Ирина Игоревна

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

03.02.07 – генетика

ДИССЕРТАЦИЯ

**на соискание ученой степени
доктора биологических наук**

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

МОСКВА – 2016

ОГЛАВЛЕНИЕ

	ВВЕДЕНИЕ	7-19
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ		20-102
1.1	Генетическая идентификация малярийных комаров комплекса <i>Anopheles maculipennis</i>	20-27
1.1.1.	Морфологическая и цитогенетическая изменчивость видов комплекса <i>An. maculipennis</i>	20-23
1.1.2	Молекулярно-генетическая идентификация видов комплекса <i>An. maculipennis</i>	24-26
1.1.3	Инвазии и изменение ареалов комаров р. <i>Anopheles</i>	26-27
1.2	Феномен <i>H. axyridis</i> . Процессы биологических инвазий и репродуктивные симбионты	28-47
1.2.1	Глобальное распространение <i>H. axyridis</i>	30-33
1.2.2	Генетическая структура популяций <i>H. axyridis</i>	33-42
1.2.3.	Цитоплазматические симбионты <i>H. axyridis</i> и других видов кокцинеллид	42-47
1.3	<i>Wolbachia pipientis</i> – репродуктивный симбионт насекомых	48-102
1.3.1	Морфологические особенности <i>W. pipientis</i>	49
1.3.2.	Номенклатура линий <i>W. pipientis</i>	50
1.3.3	Филогения и геном <i>W. pipientis</i>	50-55
1.3.4	Межгенная и внутригенная рекомбинация у <i>W. pipientis</i>	55-57
1.3.5	Штаммы <i>Wolbachia</i> , инфицирующие <i>D. melanogaster</i>	57-60
1.3.6	Биологические эффекты <i>Wolbachia pipientis</i> у насекомых	60-85
1.3.6.1	Репродуктивный паразитизм <i>W. pipientis</i> у насекомых	60-77
1.3.6.2.	Биологические эффекты <i>W. pipientis</i> в симбиотических системах с насекомыми	77-85
1.3.7	Регуляция плотности <i>W. pipientis</i> в клетках хозяина	85-88
1.3.8	Локализация, передача и распределение <i>Wolbachia</i> в гаметогенезе и раннем эмбриогенезе	88-96
1.3.8.1	Локализация, передача и распределение <i>Wolbachia</i> в оогенезе и раннем эмбриогенезе	88-93
1.3.8.2	Локализация, распределение и плотность <i>Wolbachia</i> в сперматогенезе	93-96

1.3.9	Клеточные культуры насекомых, инфицированные <i>Wolbachia</i>	96-98
1.3.10	Перспективы использования <i>Wolbachia</i> для контроля численности насекомых и подавления способности к переносу вирусов и простейших	99-102
ГЛАВА 2. Материалы и методы		103-137
2.1.1	Насекомые	103-109
2.1.2	Вылечивание линии №95 от <i>Wolbachia</i>	109
2.1.3	Оценка продолжительности жизни имаго <i>D. melanogaster</i>	109-110
2.1.4.	Оценка конкурентоспособности инфицированных и неинфицированных <i>Wolbachia</i> ух <i>D. melanogaster</i>	110-111
2.1.5	Исследования сравнительной устойчивости Wb^+ и Wb^- сублиний <i>D. melanogaster</i> к энтомопатогенному грибу <i>Bauveria bassiana</i>	111
2.1.6	Оценка предпочтений Wb^+ и Wb^- сублиний мух <i>D. melanogaster</i> к субстратам при откладке яиц	112
2.1.7	Оценка влияния <i>Wolbachia</i> на конкурентоспособность самок и самцов <i>D. melanogaster</i> в скрещиваниях	112-113
2.1.7.1	Оценка предпочтений в скрещиваниях самок <i>D. melanogaster</i> с различным инфекционным статусом	113-114
2.1.7.2	Оценка предпочтений самцов <i>D. melanogaster</i> с различным инфекционным статусом	114
2.1.8	Изучение передачи <i>Wolbachia</i> через гаметы самца в межвидовых и внутривидовых скрещиваниях	115
2.1.9	Изучение плотности бактериальной популяции в F_1 и F_2 после передачи <i>Wolbachia</i> через гаметы самца	115
2.1.10	Оценка уровня генетического груза в популяциях <i>H. axyridis</i>	115-117
2.2	Методы молекулярно-генетического анализа	117-128
2.2.1	Выделение ДНК	117
2.2.2	ПЦР	118-127
2.2.2.1.	Идентификация и мультилокусное типирование <i>Wolbachia</i>	118-120
2.2.2.2	Идентификация <i>Rickettsia</i> и <i>Spiroplasma</i>	120-121
2.2.2.3	Идентификация Y-хромосомы в клетках клеточной культуры	121
2.2.2.4	Аmplификация фрагмента гена <i>coxI</i>	121
2.2.2.5	Идентификация комаров комплекса <i>An. maculipennis</i>	121-124
2.2.2.6	Микросателлитный анализ	125

2.2.3	Элюция продуктов амплификации	125-126
2.2.4	Клонирование	127
2.2.5	Секвенирование	127
2.3	Оценка внутри- и межпопуляционной изменчивости в популяциях <i>H. axyridis</i>	127-128
2.4	Филогенетический и статистический анализ	129-134
2.5	Получение клеточной линии <i>D. melanogaster</i> , инфицированной <i>Wolbachia</i>	135
2.6	Флуоресцентная гибридизация <i>in situ</i> <i>W. pipientis</i> в культуре клеток <i>D. melanogaster</i>	135-136
2.7	Инфицирование <i>W. pipientis</i> клеточных культур насекомых	136-137
2.8	Приготовление препаратов политенных хромосом слюнных желез личинок IV возраста комаров рода <i>Anopheles</i>	137
ГЛАВА 3. Результаты		138-248
3.1	Генетическая идентификация видов малярийных комаров комплекса <i>An. maculipennis</i>	138-159
3.1.1	Идентификация нового вида малярийных комаров <i>Anopheles artemievi sp.n.</i> в комплексе <i>maculipennis</i>	139-146
3.1.1.1	Идентификация по морфологическим признакам	139
3.1.1.2	Цитогенетическая идентификация	139-140
3.1.1.3	Молекулярно-генетическая идентификация	140-146
3.1.2	Генетическая верификация достоверности таксономического статуса <i>An. daciae</i>	147-151
3.1.2.1	Анализ первичной структуры ITS2 <i>An. messeae sensu lato</i>	147-150
3.1.2.2	Анализ первичной структуры <i>cox1</i> <i>An. messeae sensu lato</i>	150-151
3.1.3	Распространение комаров комплекса <i>An. maculipennis</i> в Средней Азии, Закавказье и юге России	152-155
3.1.4	Обсуждение	156-159
3.2.	Изучение влияния цитоплазматических репродуктивных симбиотических бактерий на формирования инвазивных популяций <i>H. axyridis</i>	160-206
3.2.1	Внутривидовая дифференциация <i>H. axyridis</i> Pall. и генетическая структура нативных и инвазивных популяций как основа формирования инвазивных популяций <i>H. axyridis</i>	161-172
3.2.1.1	Изучение внутривидовой дифференциации <i>H. axyridis</i> на основании изменчивости фрагмента гена <i>cox1</i>	161-165

3.2.1.2	Изучение уровня генетической изменчивости в нативных и инвазивных популяциях <i>H. axyridis</i>	165-170
3.2.1.3	Исследование генетического груза в популяциях <i>H. axyridis</i>	171-172
3.2.2.	Изучение разнообразия, изменчивости и распространения и репродуктивных симбиотических бактерий в нативных и инвазивных популяциях <i>H. axyridis</i>	173-206
3.2.2.1	Изучение разнообразия, изменчивости и распространения <i>Wolbachia</i> в нативных и инвазивных популяциях <i>H. axyridis</i>	173-182
3.2.2.1.1	Изучение влияния <i>Wolbachia</i> на детерминацию пола у <i>H. axyridis</i>	183
3.2.2.2	Изучение разнообразия, изменчивости и распространения <i>Rickettsia</i> в нативных и инвазивных популяциях <i>H. axyridis</i>	184-185
3.2.2.3	Изучение разнообразия, изменчивости и распространения <i>Spiroplasma</i> в нативных и инвазивных популяциях <i>H. axyridis</i>	186-193
3.2.3	Обсуждение	194-206
3.3.	Изучение биологических эффектов, особенностей передачи, механизмов поддержания и наследования <i>Wolbachia</i> в системе <i>Drosophila melanogaster-Wolbachia</i>	207-248
3.3.1	Изучение биологических эффектов, влияющих на адаптационные возможности насекомого-хозяина	207-214
3.3.1.1	Получение излеченных от <i>Wolbachia</i> сублиний <i>D. melanogaster</i>	207-208
3.3.1.2	Сравнительный анализ продолжительности жизни и старения самок с различным инфекционным статусом	208-210
3.3.1.3	Оценка сравнительной устойчивости Wb^+ и Wb^- сублиний <i>D. melanogaster</i> к энтомопатогенному грибу <i>Bauveria bassiana</i>	211
3.3.1.4	Оценка предпочтений к разным субстратам зараженных и незараженных мух <i>D. melanogaster</i> при откладке яиц	212-214
3.3.2	Исследование механизмов поддержания <i>Wolbachia</i> в популяциях хозяина	215-223
3.3.2.1	Сравнительный анализ конкурентоспособности инфицированных и неинфицированных <i>Wolbachia</i> линий <i>D. melanogaster</i>	215-216
3.3.2.2	Оценка предпочтений в скрещиваниях у дрозофил, инфицированных и не инфицированных <i>Wolbachia</i>	216-223
3.3.2.3	Изучение передачи <i>Wolbachia</i> через гаметы самца	224-227
3.3.2.3.1	Изучение передачи <i>Wolbachia</i> в межвидовых скрещиваниях	224
3.3.2.3.2	Изучение передачи <i>Wolbachia</i> во внутрилинейных скрещиваниях <i>D. melanogaster</i>	224-225
3.3.2.3.3	Изучение плотности бактериальной популяции в F_1 и F_2 после передачи <i>Wolbachia</i> через гаметы самца	226-227

3.3.3.	Пересеваемая клеточная культура как модель для изучения взаимодействия геномов в симбиотической системе <i>D. melanogaster-Wolbachia</i>	228-232
3.3.3.1	Получение пересеваемой клеточной культуры	228-230
3.3.3.2	Цитологическая идентификация <i>Wolbachia</i> в клетках пересеваемой культуры	231
3.3.3.3	Инфекционность вольбахии из клеточной культуры Dm2008Wb1 для клеточных линий насекомых	232
3.3.4	Изучение зараженности лабораторных линий <i>Drosophila virilis</i>	232
3.3.5	Изучение рекомбинации между штаммами <i>Wolbachia</i> в условиях клеточной культуры	233-237
3.3.6	Обсуждение	238-248
4	Заключение	249-254
5	Выводы	255-256
	Благодарности	257
	Список литературы	258-315
	Приложение А Места (точки) сбора комаров комплекса <i>maculipennis</i> в Средней Азии	316
	Приложение Б Места (точки) сбора комаров комплекса <i>maculipennis</i> в Закавказье	317
	Приложение В Места (точки) сбора комаров <i>An. messeae s.l.</i> в России	318
	Приложение Г Полиморфные сайты ITS2 <i>An. messeae</i>	319
	Приложение Д Попарные оценки F_{ST} между популяциями <i>H. axyridis</i>	320

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 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 сибсовы и гомосеквентные виды, должна позволить 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 симбионтную 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: цитоплазматическую несовместимость, феминизацию, партеногенез и андроцид (male-killing). 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.

Сохранение целостности и функциональности генома *Wolbachia* в условиях облигатного внутриклеточного существования, ограничивающего рекомбинацию, представляется принципиальным аспектом симбиотических отношений. 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. Большой 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 – *A. beklemishevi* и восстановили валидность вида *An. martinius* (Стегний, Кабанова, 1976; Stegnij, Kabanova, 1978; Стегний *и др.*, 1978; Стегний, 1976, 1980, 1981; Stegnii, 1997). 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 всего лишь пяти нуклеотидных замен полиморфной многокопийной последовательности второго внутреннего транскрибируемого спейсера кластера рибосомных генов (ITS2). Генетическая идентификация с использованием методов молекулярно-генетического анализа не применялась для *An. martinius*. 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-Ilan,

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 и наследованию окраски (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 андроцид (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 масштабы 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* на территории России и сопредельных государств со спорным таксономическим статусом:
 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 пересееваемой клеточной культуры как упрощенной модельной системы для изучения генетических аспектов симбиотических отношений между *D. melanogaster*-*W. pipientis* и изучение возможности рекомбинации *Wolbachia* в пересееваемой 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 Старого и Нового света *H. axyridis* имеют общее происхождение. В нативных и инвазивных популяциях *H. axyridis* выявлены различия по времени поколения как компоненте 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 А, В, Е и N. *Wolbachia* из супергрупп А, Е 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*.

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*. Изучена инфекционность *Wolbachia* штамм wMel для клеточных культур насекомых.

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*.

Апробация работы

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, Pennsylvania, 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 списка ВАК и 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.

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Генетическая идентификация малярийных комаров комплекса *Anopheles maculipennis*

Вопросы генетической идентификации представителей палеарктического комплекса *An. maculipennis* стали особенно актуальными в середине 90-х годов XX-го на пике эпидемии малярии в странах Европейского региона ВОЗ, ставшей закономерным итогом осложнения маляриогенной ситуации, вызванного военными конфликтами в Таджикистане, Азербайджане и Армении, массовыми миграциями населения и недостаточностью проводимых противомаларийных мероприятий.

Для борьбы с малярией в 1998 году была инициирована программа «Roll back malaria» – «Обращение малярии вспять» (World Health Organisation, 2001). В рамках этой программы была сформулирована задача ревизии фауны малярийных комаров для уточнения основных переносчиков малярии и контроля за численностью переносчиков. Эта задача могла быть решена только на основе методологии генетической идентификации видов.

1.1.1. Морфологическая и цитогенетическая изменчивость видов комплекса *An. maculipennis*

По данным 2011 года род *Anopheles* включает более чем 500 видов, значительная доля которых представлена комплексами часто не различимых морфологически-близкородственных видов, так же, как и у других представителей отряда Diptera. Из общего числа видов 465 являются официально признанными, а более 50-ти считаются неназванными представителями комплексов (Harbach, 2011). Около 70-ти видов способны к переносу возбудителей малярии человека (Service, Townson, 2002), из них 41 считаются видами/комплексами видов – основными переносчиками, способными к переносу возбудителей на уровне,

представляющем серьезную угрозу здоровью человека. К 2004 году комплекс *An. maculipennis* был представлен 10 палеарктическими видами, из которых четыре – *An. atroparvus*, *An. labranchiae*, *An. messeae* и *An. sacharovi* – относятся к числу основных переносчиков малярии (Sinka *et al.*, 2010, 2012).

Идентификация видов в комплексе *maculipennis* – один из наиболее трудных и спорных вопросов в систематике комаров. Методы видовой диагностики разрабатывались на протяжении всего двадцатого века и продолжают совершенствоваться в настоящее время. Этот путь является отражением основных направлений развития методологии в биологии: морфологические подходы сейчас дополнены внушительным арсеналом современных цитогенетических и молекулярно-генетических методов.

На ранних этапах исследований видовая диагностика комплекса проводилась по морфологическим признакам. К настоящему времени разработаны подходы и ключи к видовой дифференциации представителей комплекса *maculipennis* на стадии имаго и личинок, однако наиболее простым и удобным морфологическим методом видовой идентификации остается идентификация по структуре экзохориона яйца (Гуцевич *и др.*, 1970). К числу недостатков метода относится вариабельность признака в пределах вида и существование сибсовых видов, имеющих одинаковую структуру экзохориона (Rice, Barber, 1937; Чубкова, 1948; Гуцевич *и др.*, 1970).

Дифференциация видов комплекса *maculipennis* методами цитогенетического анализа основана на особенностях структуры политенных хромосом слюнных желез комаров. Кариотип малярийных комаров был описан в 1947 году Г. Фрицци (Frizzi, 1947). Кариотип представлен диплоидным набором, где $2n=6$. Аутосомы состоят из двух плеч, половые хромосомы всегда одноплечие. Длинное плечо хромосом обозначается индексом L, короткое – индексом R. X-хромосома (хромосома I) в слюнных железах личинок IV возраста представлена одним плечом II, на метафазных пластинках она двуплечая. По всей видимости, политенная X-хромосома соответствует эухроматиновому фрагменту (участку) короткого плеча митотической X-хромосомы. В клетках слюнных желез самцов

эта хромосома состоит только из одного гомолога и выглядит значительно тоньше, чем у самок (Стегний, 1991). Политенная Y-хромосома характеризуется очень маленьким (всего несколько дисков) диффузным плечом, на картах политенных хромосом эта хромосома не приводится. Хромосома II – метацентрическая, ее плечи IIR и IIL почти одинаковы, хромосома III – субметацентрическая, с более длинным IIR, и более коротким IIL плечами. Хромосомы имеют общий центромерный район, а гомологи находятся в состоянии сильной конъюгации. Помимо описания кариотипа, Фрицци провел схематическое сравнение политенных хромосом, выявил фиксированные перестройки между некоторыми западноевропейскими видами и составил хромосомную карту *An. atroparvus*. Хромосомный набор *An. atroparvus* – *An. labranchiae* признан филогенетически исходным для комаров комплекса *maculipennis*, при сравнительном описании хромосом других видов комплекса используются обозначения районов и участков хромосомной карты *An. atroparvus*. Весь хромосомный набор разбивается на 39 районов, начиная с дистального конца половой X-хромосомы. Районы разделены на участки, обозначаемые строчными буквами латинского алфавита.

В 60-е годы с использованием методики цитогенетического анализа были изучены североамериканские виды комплекса «*maculipennis*» (Kitzmilller *et al.*, 1967). Систематические исследования цитогенетики населяющих территорию Советского Союза палеарктических видов были начаты в 1972 году в Томском государственном университете (Кабанова *и др.*, 1972). К настоящему времени составлены фотокарты политенных хромосом слюнных желез 7 видов комплекса, детально изучен инверсионный полиморфизм видов, на основании результатов сравнительного анализа политенных хромосом палеарктических видов описан вид *Anopheles beklemishevi*, Stegny et Kabanova, 1976, и по результатам цитогенетического и гибридологического анализа восстановлена валидность вида *An. martinius* (Стегний, Кабанова, 1976; Stegnij, Kabanova, 1978; Стегний *и др.*, 1978, Стегний, 1976, 1980, 1981; Stegnii, 1997)

Для видов-двойников малярийных комаров комплекса *An. maculipennis* характерен специфический набор флукутуирующих парацентрических инверсий и различный уровень хромосомной изменчивости в популяциях. Наиболее полиморфными являются более молодые в филогенетическом отношении виды *An. beklemishevi* и *An. messeae* (Стегний, 1991, 1993).

Особый интерес с точки зрения настоящего исследования представляют кариотипы четырех видов малярийных комаров – *An. maculipennis*, *An. messeae*, *An. sacharovi* и *An. martinius*. Кариотипы указанных видов отличаются друг от друга и от «стандартного» эволюционно исходного кариотипа *An. atroparvus* специфическими фиксированными перестройками. Определенную сложность при интерпретации результатов цитогенетического анализа представляли гомосеквентные виды, такие, например, как *An. labranchiae* – *An. atroparvus* и *An. melanoon* – *An. maculipennis*, имеющие идентичную линейную структуру политенных хромосом. Генетическая дифференциация гомосеквентных видов стала возможной после описания межвидовых различий в архитектуре интерфазных политенных хромосом питательных клеток яичников (Стегний, 1979, 1987; Широкова и др., 1999). Было показано, что у различных видов в питательных клетках яичников гомологичные районы хромосом, участвующие в прикреплении к ядерной оболочке, различаются как морфологически, так и по характеру хромосомно-мембранных связей. Это позволяет проводить диагностику видов комплекса, имеющих идентичные по линейной структуре политенные хромосомы (Стегний, 1987; Шарахова и др., 1999). Развитие методологии цитогенетического анализа позволяет использование и дополнительных цитогенетических маркеров, таких, например, как являющееся видоспецифичным распределение гетерохроматиновых блоков в отдельных хромосомах (Стегний, Русакова, 2007).

1.1.2. Молекулярно-генетическая идентификация видов комплекса

An. maculipennis

Исследования комплексов видов комаров р. *Anopheles* методами молекулярно-генетического анализа начали активно развиваться с начала 90-х годов прошлого века. Эти исследования потребовали разработки унифицированных маркеров, которые, с одной стороны, позволили бы однозначно и четко решать вопросы идентификации видов и, с другой стороны, могли бы использоваться для большинства комплексов видов рода, что открывало перспективы сравнительного анализа. Среди маркеров ядерного генома наиболее удачным оказался фрагмент кластера рибосомных генов – область второго внутреннего транскрибируемого спейсера (ITS2), на основании данных о структуре которого были проанализированы палеарктический комплекс *An. maculipennis* (Proft *et al.*, 1999), североамериканский комплекс *An. quadrimaculatus* (Cornel *et al.*, 1996), индийский комплекс комаров *An. culicifacies* (Goswami *et al.*, 2005). Было показано, что в комплексе *maculipennis* уровень межвидовых различий семи видов (*An. maculipennis*, *An. labranthiae*, *An. atroparvus*, *An. martinius*, *An. melanoon*, *An. esseae* и *An. sacharovi*) по первичной структуре ITS2 составляет от 7.3 до 24%. Попарное сравнение структуры фрагмента показало, что наибольшие различия наблюдаются между видами *An. atroparvus* и *An. sacharovi* (24%), а наименьшие – между видами *An. melanoon* и *An. maculipennis* s.s. (7.3%).

Дальнейшие исследования, проведенные с использованием области ITS2 в качестве молекулярно-генетического маркера, позволили подтвердить ранние находки *An. messeae* в Греции (Linton *et al.*, 2001) и решить проблему видового статуса *An. melanoon* и *An. subalpinus*, сведя эти два вида к одному – *An. melanoon* – на основании идентичности первичной структуры маркера (Linton *et al.*, 2002).

С развитием методологии молекулярно-генетического анализа появилась возможность комплексного подхода к вопросам генетической идентификации видов комплекса. Исследования особенностей структуры маркерных областей генома начали дополняться анализом морфологических признаков. Важным

достижением стало открытие новых видов в комплексе *An. maculipennis*. В 2003 году на севере Ирана был описан *An. persiensis*, который по последовательности нуклеотидов ITS2 наиболее сходен с *An. messeae*, а по окраске экзохориона – с *An. melanoon* (Sedaghat *et al.*, 2003).

В начале 2004 г. было выявлено отсутствие внутривидовой изменчивости первичной структуры ITS2 у большинства видов комплекса, за исключением *An. messeae* и *An. melanoon* (Di Luca *et al.*, 2004). У *An. messeae* было обнаружено пять молекулярных форм, отличия между которыми варьировали от 0.19 до 1.34%. В Западной Европе были найдены все пять форм. Четвертая форма, названная «континентальной», была обнаружена также в Восточной и Западной Сибири. В том же 2004 году в Румынии на основании анализа структуры последовательности второго внутреннего транскрибируемого спейсера и мелких особенностей морфологии яиц был описан новый вид, *An. daciae*. Первичная структура ITS2 этого нового вида оказалась идентична первичной структуре пятой молекулярной форме *An. messeae* (Nicolescu *et al.*, 2004), которая в свою очередь отличалась от четвертой – континентальной формы заменами по пяти сайтам 161, 165, 167, 362, 382. Яйца *An. daciae* были меньше и имели более пятнистую окраску экзохориона, чем яйца *An. messeae*. Отсутствие данных об объемах выборок и значений достоверности различий позволяло поставить под сомнение сформулированный авторами вывод об открытии нового вида. На территории азиатской части России также были найдены две молекулярные формы *An. messeae*, обозначенные как А и В (Новиков *и др.*, 2004) и отличающиеся одна от другой по тем же пяти сайтам, по которым отличались *An. daciae* и континентальная форма *An. messeae*.

Использование данных о структуре второго внутреннего транскрибируемого спейсера оказалось эффективно для изучения филогенетических отношений в комплексе. Анализ данных о длине и структуре последовательности позволил уточнить/подтвердить происхождение некоторых видов. Было показано, например, что *An. beklemishevi* происходит от неарктических видов комплекса *An. maculipennis* (Kampen, 2005b), отличаясь от

всех палеарктических видов как по длине (700 пн. против 300-350 пн. у палеарктических видов комплекса), так и по структуре последовательности (Proft *et al.*, 1999; Kampen, 2005а, б).

Митохондриальные маркеры (*cox1*, *cox2*, *nd5* и др.), широко используемые при анализе других комплексов комаров р. *Anopheles*, оказались недостаточно эффективными для дифференциации видов комплекса *An. maculipennis* (Collins *et al.*, 1990). Эти маркеры чаще применяются при популяционных исследованиях.

1.1.3. Инвазии и изменение ареалов комаров р. *Anopheles*

Глобальное потепление, изменение окружающей среды в результате хозяйственной деятельности человека, развитие транспортного сообщения приводят к инвазиям эффективных переносчиков заболеваний человека. В список 100 наиболее опасных инвазивных видов, составленный специалистами Международного союза охраны природы (IUCN), вошли переносчик лихорадки Денге и лихорадки Чикунгунья комар *Aedes albopictus* (Skuse, 1895) и переносчик малярии человека североамериканский комар *Anopheles quadrimaculatus* (Say, 1824). К числу опасных инвазивных видов относится и другой представитель рода *Aedes* – *Ae. aegypti*, как и *Ae. albopictus* являющийся переносчиком лихорадки Денге и лихорадки Чикунгунья, а также желтой лихорадки и вируса Зика. Первые сообщения о размножающихся популяциях *Ae. aegypti* на территории бывшего Советского Союза – в районе Большого Сочи и в городах Абхазии относятся к 20-30 годам прошлого века (Сергиев *и др.*, 2008). С 50-х годов и вплоть до начала нашего века виды рода *Aedes*, прежде всего *Ae. aegypti* на Черноморском побережье Кавказа не обнаруживались. После достаточно длительного периода отсутствия колонии *Ae. aegypti* были найдены в этом регионе в 2001-2004 годах, в 2011 году были обнаружены комары *Ae. albopictus*, обитающие в Юго-Восточной Азии, в 2013 году появился вид *Ae. koreicus*, нативным ареалом которого являются Корея, Китай, Япония и Дальний Восток Российской Федерации.

Высокая экологическая пластичность *Ae. koreicus* – переносчика японского энцефалита, вероятно, позволит этому виду в будущем расширить свой ареал.

Для представителей комплекса *An. maculipennis* инвазии до настоящего времени не описаны, однако известны изменения ареалов, связанные, по всей видимости, с глобальным потеплением. Так на север вплоть до Беломорья продвинулся *An. maculipennis* (Москаев, 2012), имевший в 1979 году границу ареала в Ленинградской области (Стегний, 1991). Предполагается, что северная граница ареала *An. messeae* продвинулась в тундровую зону к побережью Северного ледовитого океана (Стегний и др., 2016).

1.2. Феномен *H. axyridis*. Процессы биологических инвазий и репродуктивные симбионты

Азиатская божья коровка *Harmonia axyridis* Pallas (1773) (Coleoptera: Coccinellidae) – широкоареальный вид кокцинеллид, встречающийся в границах своего естественного ареала в Западной и Восточной Сибири, на Дальнем Востоке и на севере Казахстана, Японии, Корее и Китае, где *H. axyridis* достигает южных провинций Юннань и Гуанчжи (Dobzhansky, 1924; Кузнецов, 2006; Воронцов, Блехман, 2001). Как агент биологического контроля тлей и кокцид *H. axyridis* неоднократно интродуцировалась в Северную и в Южную Америку и Европу. Глобальная инвазия со скоростью 100-500 км/год, захватившая в последние 28 лет четыре континента и более чем сорок государств, превратила этот вид не только в наиболее популярный объект популяционно-генетических исследований среди инвазивных видов насекомых (Sloggett, 2012), но и в модельный объект для изучения инвазий с позиций микроэволюции, экологии и конкурентных отношений в природных сообществах (Roy, Wajnberg, 2008).

Столь успешная инвазия несомненно обусловлена комплексом преадаптаций, существующих в нативных популяциях *H. axyridis*. Среди факторов, способствующих формированию таких преадаптаций, могут рассматриваться подразделенность популяций вида в границах естественного ареала, их высокая эффективная численность и зараженность репродуктивными эндосимбионтами. Последнее актуально в связи с полученными в последние годы данными о комплексном влиянии симбиотических микроорганизмов на жизнедеятельность хозяина (Hedges *et al.*, 2008; Teixeira *et al.*, 2008; Zélé *et al.*, 2012; Xie *et al.*, 2010), что позволяет по-новому рассматривать роль и значение цитоплазматических бактерий и простейших в процессах инвазий. В новых местообитаниях, где вселенцы сталкиваются с разнообразными и непривычными для них условиями существования, бактерионосительство, обеспечивающее хозяину большую пластичность и устойчивость к биотическим и абиотическим факторам окружающей среды, может рассматриваться как благоприятная

составляющая процессов адаптации на первых этапах инвазии. Вполне вероятно, что слабые «мягкие» адаптивные эффекты бактерионосительства сопровождаются более очевидными и неоднозначными для успеха инвазии репродуктивными эффектами симбионтов. Эти драматические, влияющие на половую структуру инвазивной популяции эффекты могут действовать как факторы, лимитирующие инвазию при ограниченной численности инвазивной популяции и приводить в случае андроцида к перераспределению ресурсов в пользу инфицированной субпопуляции, обеспечивая ее повышенную по сравнению с неинфицированной субпопуляцией выживаемость. Нельзя не учитывать и эволюционный аспект бактерионосительства, определяемый спецификой материнского наследования. Коэволюция хозяина и цитоплазматического симбионта приводит к формированию устойчиво ассоциированных с симбионтами митохондриальных гаплотипов и снижению изменчивости в инфицированных популяциях насекомых (von der Schulenburg *et al.*, 2002).

Для выяснения вопросов влияния симбиотических организмов на процессы инвазии требуется детальное изучение происхождения инвазивных популяций, временной и пространственной динамики генофондов нативных и инвазивных популяций инвазивных видов по признакам инфицированности, видового состава симбиотических организмов в инвазивных и нативных популяциях, а также репродуктивных и общебиологических эффектов каждого цитоплазматического симбионта.

В 1975 году методами генетического и цитологического анализа было показано, что нативные популяции *H. axyridis* в Японии заражены бактерией *Spiroplasma* (Matsuka *et al.*, 1975) – облигатным цитоплазматическим симбионтом, вызывающим андроцид среди потомства инфицированных самок и сдвиг в соотношении полов в инфицированных этой бактерией популяциях в сторону самок. В 2010 году в нативных популяциях *H. axyridis* Китая впервые была выявлена *Wolbachia* (Ahmed *et al.*, 2010), которая относится к супергруппе «В». Эти данные актуализировали вопрос о влиянии цитоплазматических репродуктивных симбионтов на процессы инвазий у азиатской божьей коровки.

1.2.3. Глобальное распространение *H. axyridis*

История мировой инвазии *H. axyridis* достаточно хорошо документирована. Пристальное наблюдение за этим видом осуществляется не только на тех континентах, которые он уже захватил, но и в Австралии, где *H. axyridis* до сих пор не обнаружена. Ниже приводятся данные о глобальном распространении вида.

Северная Америка. Первые документированные сведения об интродукции *H. axyridis* на территории Северной Америки относятся к 1916 году, когда насекомые были впервые завезены в Соединенные Штаты как агент биологического контроля (Iablokoff-Khnzorian, 1982, цит. по Brown *et al.*, 2011). В период с 1964 по 1982 год неоднократные выпуски *H. axyridis* проводились, по крайней мере, в четырнадцати штатах США (Gordon, 1985), но лишь в 1988 году появилось сообщение об укоренении азиатской изменчивой божьей коровки в штате Луизиана (Chapin, Brou, 1991). Последние выпуски *H. axyridis* в Луизиане проводились в 1973 году, и вид никогда не находили в местах последнего выпуска в течение более чем десяти лет, однако в 1988 насекомые были обнаружены в 360 км от места последнего выпуска. В 90-е годы были высказаны предположения о случайном характере интродукции *H. axyridis* в этом штате морским транспортом (Day *et al.*, 1994), поскольку все первые находки экзотических для Соединенных Штатов видов кокциnellид – шести к началу 90-х годов, в число которых входила и *H. axyridis* – были сделаны в непосредственной близости от морских портов восточного побережья. К 1994 году *H. axyridis* находили уже в 24 штатах, большинство из которых прилегало к западному и восточному побережьям Соединенных Штатов (Koch *et al.*, 2006). В настоящее время вид не выявлен лишь в Вайоминге и на Аляске.

Годом укоренения *H. axyridis* в Канаде считается 1994 год, когда она была обнаружена вблизи юго-восточного побережья Канады, в провинции Квебек, затем вид быстро распространился по всей южной части страны (Majka, McCorquodale, 2006) и сейчас обнаруживается во всех провинциях Канады, в том

числе и самой северной – на Ньюфаундленде, за исключением Лабрадора (восток) и Саскечевана (юг) (Hicks *et al.*, 2010).

В Мексике как агент биологического контроля *H. axyridis* интродуцировалась с 2001 года в штаты Чиуауа (север, штат граничит с США), Колима (западное побережье) и Юкатан (юго-восточное побережье) (Koch *et al.*, 2006). С 2006 года она была обнаружена в штатах, в которые никогда ранее не выпускалась – Коауила, Халиско, Морелос, Пуэбла, Мексика. Все эти штаты имеют общую границу с регионами интродукции за исключением самого южного штата Чьяпас.

Южная Америка. В Южной Америке как агент биологического контроля *H. axyridis* была интродуцирована лишь в Аргентине в 1986 году (Poutsma *et al.*, 2008) и Чили в 1998 году (Greze *et al.*, 2010). В Аргентине вид находили в 2001 году в Буэнос-Айресе (Saini, 2004), в 2004 году в Санта-Фе (Montero, Vignaroli, 2008), в 2008 году в Энтре-Риос – провинциях, расположенных на востоке и в центре северной части Аргентины.

В Чили в 1998 году были интродуцированы не способные к полету (Tourniaire *et al.*, 2000) биоконтрольные линии *H. axyridis* (Greze *et al.*, 2010), а первое указание об обнаруженных в природе генетически неродственных биоконтрольным божьих коровках появилось в 2003 году. В настоящее время вид укоренился в центральной части Чили, в провинциях Митрополит и Вальпараисо, где достаточно обилен.

В Бразилии *H. axyridis* не выпускалась, но сообщения о находках поступили из четырех штатов – Парана в 2002 году (de Almeida, da Silva, 2002), Сан-Паулу в 2004 году (Arruda Filho *et al.*, 2009), Минас-Жерайс в 2006 (Rezende *et al.*, 2010) и Бразилия в 2009 году (Martins *et al.*, 2009), что предполагает распространение вида с севера на восток.

H. axyridis укоренилась в Парагвае и распространилась на юге страны в департаментах Каагуасу, Итапуа (Коронель-Богадо) и Кордильера (Каакупе) (Silvie *et al.*, 2007). Самое раннее сообщение о появлении вида в Парагвае датируется 2006 годом.

С 2003 года *H. axyridis* появилась в Перу и сейчас встречается в регионах Лима и Тумбес (Grez *et al.*, 2010); оба региона расположены на побережье Тихого океана, последний граничит с Эквадором.

В работе Brown *et al.* (2011) сообщается о находках *H. axyridis* в западной Колумбии.

В Уругвае азиатская божья коровка была обнаружена в Канелоносе в 2009 году (взрослые насекомые, личинки там же в начале 2010 года) и в Монтевидео (2010 год) (Nedvěd, Krejčík, 2010). Оба этих населенных пункта находятся в южной части страны.

Поскольку *H. axyridis* быстро распространяется по Южной Америке, вполне вероятно, что в ближайшие годы она будет обнаружена и в других государствах континента.

Европа. В Европе ранние интродукции *H. axyridis* для контроля тлей на фруктовых деревьях проводились на Украине в 1964 году (Katsoyannos *et al.*, 1997) и в Белоруссии в 1968 году (Сидляревич, Воронин, 1973). В Западной Европе *H. axyridis* впервые была использована как агент биологического контроля в 1982 году во Франции и впервые продана в 1995 году (Coutanceau, 2006). В последующие годы вид являлся коммерчески доступным (Adriaens *et al.*, 2003).

H. axyridis закрепилась в Европе в начале 2000-х годов и быстро распространилась. К 2011 году вид укоренился в 27 государствах Западной и Восточной Европы, в том числе в ее восточной части – в Польше в 2006 году (Przewozny *et al.*, 2007), в Венгрии (Merkl, 2008) в 2008 году, в Латвии (Barševskis, 2009), Румынии и на Украине (Marko, Pozsgai, 2009) в 2009 году. На юге – в 2008 году – в Хорватии (Stanković *et al.*, 2010), Сербии (Thalji, Stojanovic, 2008), в 2009 году – в Болгарии (Tomov *et al.*, 2009) и Словении (Bravničar *et al.*, 2009). В 2010 году появились сообщения о *H. axyridis* в Боснии и Герцеговине (Kulijer, 2010). Самые северные находки *H. axyridis* зафиксированы в Норвегии (Тронхейм) в 2010 году (Saethre *et al.*, 2010), сообщалось также и о появлении божьей коровки на северных островах – в Ирландии (<http://www.invasivespeciesireland.com>).

В России инвазивные популяции *H. axyridis* найдены в Краснодарском крае – в 2011 году (Украинский, 2013), в Калининграде и в Крыму – в 2012 году (Ukrainsky, Orlova-Bienkowskaja, 2014), Москве – в 2015 (Захаров-Гезехус И.А., 2015).

Африка. В Африке *H. axyridis* была интродуцирована в Тунисе (EPPO, 2004) и в Египете (Ferran *et al.*, 2000). Статус вида в Северной Африке до настоящего времени остается неизвестным.

В Южной Африке *H. axyridis* укоренилась с 2001 года, когда появилось сообщение о находках вида на стадии личинок и куколок в Кейптауне и Стелленбоше (Западная Капская провинция) (Stals, 2010). В настоящее время эта божья коровка найдена во всех девяти провинциях ЮАР: в Западной Капской провинции она обитает с 2001 года, в Восточной Капской провинции – с 2006 года, в провинциях Квазулу-Натал, Свободное государство и Гаутенг с 2007-2008 годов, и с 2009 года в провинциях Мпумаланга, Северная Капская провинция и Лимпопо.

Вторым государством, для которого существуют подтвержденные сообщения о *H. axyridis*, является Лесото – горная страна, полностью окруженная Южно-Африканской республикой.

В 2010 году *H. axyridis* была найдена на западном побережье Кении (Кикамбала) и может здесь укорениться (Brown *et al.*, 2011), что указывает на толерантность вида к тропическому климату.

Австралия. Нам не известны сообщения о натурализации *H. axyridis* в Австралии.

1.2.4. Генетическая структура популяций *H. axyridis*

Критически важным для понимания причин инвазии, происхождения инвазивных популяций, направлений миграционных потоков и скорости проникновения вселенцев на новые территории является изучение генетической структуры популяций, позволяющее выявлять способствующие инвазиям

эволюционные преадаптации и обеспечивающее исходные данные о характерном для вида уровне генетической изменчивости и подразделенности популяций.

Первые исследования генетической структуры нативных популяций *H. axyridis* были выполнены в 20-х – 30-годах XX-го века Ф.Г. Добржанским (Dobzhansky, 1924, 1933, 1937). В своих классических работах он описал и изучил два морфологических признака *H. axyridis* – окраску элитр и пронотума.

Сейчас известно, что признак окраски элитр у *H. axyridis* наследуется моногенно и контролируется серией множественных аллелей, из которых четыре аллеля являются основными и располагаются в порядке доминирования следующим образом: *conspicua* > *spectabilis* > *axyridis* > *succinea*. Первые три аллеля – *conspicua*, *spectabilis* и *axyridis* – определяют развитие меланистической окраски, особенностью которой является черный фон с располагающимися на нем крупными светлыми пятнами. У гомо- и гетерозигот по аллелю *conspicua* на каждом из надкрылий имеется по одному крупному светлому пятну; у гомо- и гетерозигот *spectabilis* (кроме гетерозигот с *conspicua*) – по два крупных светлых пятна; гомозиготы по аллелю *axyridis* и гетерозиготы *axyridis/succinea* несут по шесть светлых пятен. Аллель *succinea* определяет светлый фон надкрылий с расположенными на этом фоне темными точками, число точек может достигать десяти (Tan, 1946).

Помимо рисунка элитр для изучения гетерогенности и динамики популяций используются еще два морфологических признака *H. axyridis* – элитральный гребень (поперечный хитиновый валик, расположенный на дистальных концах надкрылий) (Komai *et al.*, 1950; Komai, 1956; Komai, Chino, 1969; Блехман, 2008) и рисунок пронотума (Блехман, 2007). Первый из указанных признаков – элитральный гребень – является доминантным и наследуется моногенно. Наследование второго признака – рисунка пронотума – до настоящего времени не изучено, однако известно, что для рисунка пронотума характерна дискретная изменчивость, имеющая, по всей видимости, как генетическую, так и модификационную природу (Блехман, 2014). Рисунок пронотума в значительной мере сопряжен с рисунком элитр, что накладывает некоторые ограничения для

использования рисунка пронотума в качестве самостоятельного признака в популяционно-генетических исследованиях.

На основании анализа данных по полиморфизму окраски надкрылий Добржанский описал географическую изменчивость *H. axyridis* и, основываясь на оценке частот фенотипов, высказал предположение о делении ареала вида на три географические зоны – западную, восточную и Японию. В западной зоне (от реки Иртыш до западного Забайкалья и Монголии) доминировал тип *axyridis*, встречавшийся с частотой 100% в Томске и с частотой около 50% в западном Забайкалье; в восточной зоне, включающей Восточную Сибирь, Манчжурию, Китай и Корею, преобладал фенотип *succinea*, встречающийся с частотой 60% в Восточном Забайкалье и с частотой более 85% во Владивостоке. В Японии преобладал фенотип *conspicua*. Ф.Г. Добржанский считал, что характер географической изменчивости рисунка элитр у *H. axyridis* свидетельствует о начальной стадии дифференциации вида из единой смешанной популяции на относительно мономорфные географические расы, и такая смешанная популяция обитает в Китае и Восточной Сибири.

Позже детальные исследования географической изменчивости *H. axyridis* проводились только на территории Японии (Komai *et al.*, 1950; Komai, 1956; Komai, Chino, 1969). Было показано наличие клинальной географической изменчивости типов рисунка элитр (и соответствующих им аллелей) *succinea* и *conspicua* в направлении с северо-запада на юго-восток. Доля варианта *succinea* составила в популяциях острова Хоккайдо 40-60%, в северной части острова Хонсю – 30–40%, в центральной части острова – от 20-30% до 15%, на острове Сикоку – примерно до 10%, а на самом южном из четырех основных островов японского архипелага – острове Кюсю – доля варианта *succinea* не превысила 2-6%. Относительная частота типа *conspicua* изменялась в противоположном направлении – на самом северном из японских островов – острове Хоккайдо частота фенотипа составила 30-40%, постепенно повышаясь до примерно 50% в северной части острова Хонсю, до 60-70% в районе Нагойя – Джиху и на острове Сикоку, и превышая 80% на острове Кюсю. Исследователям не удалось выявить

каких-либо закономерностей распространения по территории Японии фенотипов *spectabilis* и *axyridis*. Частота фенотипа *spectabilis* составляла более чем 25% на островах Хоккайдо и Хонсю, в Токио – 7.3%, 20% на острове Сикоку и более 10% на острове Кюсю. Частота типа *axyridis* на острове Хоккайдо оказалась меньше 1%, на острове Хонсю колебалась от 3-6% до 14.5%, на острове Сикоку составляла 6-8%, на острове Кюсю – чуть более 2% (Komai *et al.*, 1950; Komai, 1956).

Данные о генетической структуре популяций *H. axyridis* в Китае весьма отрывочны и в целом сходны с результатами Добржанского (Komai, Chino, 1969). Показано клинальное – с севера на юг – уменьшение частоты фенотипа *succinea* от 85% до 58% и увеличение частот фенотипов *conspicua* и *spectabilis*.

В материковых и островных популяциях Кореи преобладают жуки с фенотипом *succinea* (92% и 60.6% соответственно) (Балуева, 2009).

На территории России генетическая структура популяций *H. axyridis* по морфологическим признакам после Добржанского изучалась в разное время разными авторами (Богданов, Гагальчий, 1986; Холин, 1990; Воронцов, Блехман, 1986; Корсун, 2004; Блехман, 2009). Наиболее обстоятельный анализ был выполнен Н.Н. Воронцовым и А.В. Блехман для популяций из различных частей ареала вида; данные этих авторов в целом совпали с данными Добржанского (Dobzhansky, 1933). С учетом многолетних исследований полиморфизм по морфологическим признакам в пределах нативного ареала *H. axyridis* можно считать сбалансированным и устойчивым.

В инвазивных популяциях Европы найдены три варианта окраски *H. axyridis* – форма *succinea*, форма *spectabilis* и форма *conspicua*. Как правило, европейские популяции образованы смесью всех трех форм, но форма *succinea* по численности доминирует. Очевидная устойчивость данных по частотам цветовых форм в Европе представляет некоторые доказательства генетического сходства популяций различных европейских государств. Было высказано предположение, что такое возможное генетическое сходство является результатом

распространения вида в Европе из очень ограниченной области (Brown *et al.*, 2008).

Несмотря на очевидную привлекательность морфологических признаков с точки зрения доступности и простоты изучения, их полиморфизм явно недостаточен для ответа на вопрос о происхождении инвазивных популяций, для этого необходимо использование более полиморфных биохимических и молекулярно-биологических маркеров.

В 1997 году было проведено исследование генетической структуры инвазивных популяций *H. axyridis* на основании полиморфизма изозимов и особенностей окраски и вариантов рисунка (Krasfur *et al.*, 1997). Ценность указанной работы сложно переоценить, поскольку именно в ней впервые был поставлен вопрос о происхождении североамериканских популяций *H. axyridis* и генетических изменениях, которые могут коррелировать с географическим распространением и ростом инвазивных популяций. Следует отметить, что к 1997 году авторами уже был накоплен опыт изучения генетической структуры популяций кокциnellид, и выполненное исследование позволило сравнить генетическую структуру популяций *H. axyridis* с генетической структурой популяций других видов божьих коровок.

В обсуждаемой работе у *H. axyridis* были выявлены полиморфные локусы, проведена оценка генного разнообразия и уровня генетической дифференциации популяций на биологическом материале, собранном в 1993-1995 годах. Доля полиморфных локусов, составляющая 58%, и среднее генное разнообразие $16.75 \pm 2.98\%$ в изученных инвазивных популяциях *H. axyridis* соответствовали аллозимному полиморфизму и оценкам генного разнообразия (19.1 ± 3.4) (Krasfur *et al.*, 1992, 1995) у других видов Coccinellidae. Такое разнообразие, являющееся следствием большого эффективного размера популяции и высокой интенсивности генного потока (Graur, 1985), по мнению авторов, можно было считать типичным для Coleoptera. Была выявлена незначительная, но статистически значимая репродуктивная изоляция между изученными популяциями, хотя географическая дифференциация популяций представлялась неочевидной. Уменьшение

изменчивости цвета и вариантов рисунка авторы связали с генетически дрейфом, который подтверждался высокосignификантной дифференциацией частот аллелей между популяциями.

Наиболее важным выводом работы следует считать вывод о незначительных популяционных «бутылочных горлышках» при натурализации вида в Северной Америке. Для объяснения сделанного вывода были предложены несколько сценариев. Высокий уровень генного разнообразия в каждом образце *H. axyridis* очевидно свидетельствовал о том, что уменьшение гетерозиготности, которое неизбежно происходило при натурализации локальных колоний, компенсировалось потоком генов между колониями, на что указывало низкое значение F_{ST} (0.025 ± 0.005). Генные потоки могут вполне обоснованно объясняться особенностями биологии вида. Известно, что в границах нативного ареала жуки в субпопуляциях разлетаются перед спариванием, из-за чего спаривания являются случайными на больших территориях. Эта особенность, несомненно, оказывающая гомогенизирующий эффект на пространственные компоненты генного разнообразия, свойственна не только *H. axyridis*, но и другим видам божьих коровок, для которых известны перемещения на большие расстояния (Lee, 1980). Однако, маловероятно, что эффективная дистанция разлета являлась континентальной. Скорее, либо одна или несколько популяций были основаны небольшим числом жуков, и эти популяции оставались изолированными до момента обнаружения в 1993 и 1994 годах, либо маленькие дискретные популяции начали натурализоваться (и многие погибли) в последние 15-80 лет. Поскольку такие маленькие популяции росли, поток генов между ними возрастал более либо менее одновременно до наблюдаемого уровня. Последний вариант представляется авторам маловероятным из-за того, что *H. axyridis* – крупная и заметная божья коровка, и весьма сомнительно, что ее популяции оставались незамеченными в течение длительного времени.

Генетическое сходство между североамериканскими популяциями *H. axyridis* неоспоримо свидетельствовало о единственном источнике происхождения этих популяций; но был ли этот источник потомком лабораторной

культуры Министерства сельского хозяйства США, либо имела место инвазия, произошедшая естественным путем? Отсутствие оценок аллозимного генного разнообразия популяций Старого Света и популяций биологических лабораторий США не позволил авторам сделать вывод об источнике инвазии.

Вопрос о происхождении инвазивных популяций обострился к середине-концу первого десятилетия XXI века, что оказалось связанным с масштабным распространением *H. axyridis* в Европе, Африке и Южной Америке.

Одновременно с описываемыми ниже нашими исследованиями была предпринята попытка (Thomas *et al.*, 2010) определить предковую популяцию и пути инвазии на основании особенностей структуры фрагмента гена цитохромоксидазы 1 (*cox1*), широко используемого для филогенетических исследований и вопросов происхождения инвазивных популяций. Было изучено 111 особей, представляющих 9 нативных популяций из России, Китая, Японии и Казахстана, 8 инвазивных популяций – Бельгии, Бразилии, Великобритании, Южной Африки, Соединенных Штатов и три биоконтрольные популяции из Франции и Бельгии, и показано, что практически во всех исследованных популяциях мажорным является единственный гаплотип, от которого все остальные гаплотипы отличаются максимально двумя мутационными шагами. Были выявлены низкий уровень дивергенции между особями из различных регионов, являющийся признаком недавнего расширения ареала, и слабая географическая структурированность популяций. В двух парах популяций – популяциях Вашингтона (США) и Гельдерберга (Южная Африка) и популяциях Колорадо (США) и Куритиба (Бразилия) были обнаружены редкие гаплотипы. Данные позволяли предполагать, что две популяции США могли стать источником инвазивных популяций Южной Африки и Бразилии. К сожалению, в публикации отсутствуют ссылки на регистрационные данные последовательностей и точные места сборов насекомых, что делает невозможным более подробное обсуждение полученных результатов. В более поздних исследованиях с использованием этого же митохондриального маркера был выявлен единственный гаплотип в трех популяционных выборках из двух

географически удаленных местообитаний *H. axyridis* на территории США – в штатах Орегон, расположенном на тихоокеанском побережье, и штате Кентукки, находящемся вблизи атлантического побережья Соединенных Штатов (Greenstone *et al.*, 2011).

Развитие методик микросателлитного типирования (Loiseau *et al.*, 2009), статистической обработки результатов и моделирования (Tamura *et al.*, 2011, Ronquist *et al.*, 2012) значительно расширили возможности изучения генетической структуры популяций *H. axyridis*. В 2010 году был проведен анализ генетической структуры ряда нативных, инвазивных и биоконтрольных популяций с использованием нейтральных молекулярно-генетических маркеров – 18 микросателлитных локусов – с последующей оценкой конкурирующих сценариев интродукции. Этот анализ однозначно поддержал сценарий, в соответствии с которым в Северной Америке существуют два центра распространения вида, возникшие независимо от популяций нативного ареала. Западный центр появился в результате гибридизации двух групп выходцев – из западной и восточной групп популяций нативного ареала, тогда как восточный центр основан выходцами из восточной группы популяций нативного ареала *H. axyridis*. Западный центр стал «плацдармом» глобальной инвазии, с него произошли независимые инвазии *H. axyridis* в Южную Америку, Африку и Европу (Lombaert *et al.*, 2010). Европейские инвазивные популяции возникли в результате гибридизации насекомых из плацдармной популяции Северной Америки и одной из биоконтрольных европейских популяций, основанной в 1982 году. Смешивание особей из плацдармной и биоконтрольной популяций было подтверждено позже данными анализа фенотипических признаков, таких как доля вылупившихся из яиц личинок, выживание личинок, время развития, время первой яйцекладки, плодовитость, совокупная жизнеспособность, выживание в отсутствии корма (Turgeon *et al.*, 2011).

Плацдармная популяция Северной Америки прошла через «бутылочное горлышко», которое оценивается в 140-160 особей и 20 поколений (Lombaert *et al.*, 2010; Lombaert, 2011).

«Бутылочные горлышки», характеризующиеся малой эффективной численностью популяции, переживают все интродуцированные популяции (виды). Последствия таких «бутылочных горлышек» весьма разнообразны.

В большинстве случаев «бутылочные горлышки» отрицательно влияют на жизнеспособность популяции. Они неизбежно приводят к эффекту основателя и, как следствие, – снижению уровня генетической изменчивости популяции, что отрицательно влияет на возможности адаптации вселенцев к новым и необычным для них условиям окружающей среды. Популяция с малой эффективной численностью подвергается случайному эффекту «дрейфа генов» и инбредной депрессии, ограничивающей рост и возможности выживания популяции. Уровень генетической изменчивости, характерный для нативных популяций вида, может быть восстановлен в натурализованной популяции за счет множественных повторных интродукций, которые смягчают эффекты основателя, восполняя потерю стохастической изменчивости и уменьшая инбредную депрессию. За счет рекомбинации новых и уже имеющихся генотипов могут образовываться генотипы с физиологическими свойствами, благоприятными для освоения новой среды (Allendorf, Lundquist, 2003; Dlugosch, Parker, 2008; Moritz, 1999; Салменкова, 2008).

Последствием «горлышка бутылки» может стать повышение индивидуальных и популяционных характеристик (Bouzat, 2010; Goodnight, 1988). В некоторых теоретических условиях бутылочные горлышки среднего размера эффективно очищают популяцию от аллелей, вызывающих инбредную депрессию (Glémin, 2003). Такой процесс очищения от вредных аллелей впервые был подтвержден на модельной лабораторной системе у *Drosophila melanogaster* (Swindell, Bouzat, 2006).

Косвенные доказательства очищения популяций от вредных аллелей были получены и для *H. axyridis* (Facon *et al.*, 2011) при сравнении в лабораторных условиях жизнеспособности нативных и инвазивных природных популяций. Оценка жизнеспособности проводилась по двум независимым признакам – времени поколения и эффективности жизненного цикла в условиях контрастных

для каждой популяции уровней родства – инбредного и аутбредного. Оба признака были изучены у самок. Время поколения рассчитывалось как период времени от яйца до имаго + период времени до начала яйцекладки. Время поколения является важным признаком жизнеспособности популяции, поскольку более короткое время поколения приводит к более быстрому росту популяции (Cole, 1954). Эффективность жизненного цикла рассчитывалась как произведение доли вылупившихся личинок на долю выживших личинок и плодовитость самок. Было показано, что время поколения в инвазивной популяции на 6.3 дня короче, чем этот же показатель в нативной популяции ($p=0.0005$). В нативных популяциях, в отличие от инвазивных, проявлялась значительная инбредная депрессия в отношении указанного признака: коэффициент инбредной депрессии в нативных популяциях составил $\delta=0.21$, $p=0.03$. Инвазивные популяции не страдают от инбредной депрессии ($\delta=-0.05$, $p=0.57$) и способны поддерживать аутбредный фенотип. Инвазивные популяции имели более высокие средние показатели по сравнению с нативными популяциями и по второму признаку – эффективности жизненного цикла. Сравнительный анализ, показавший снижение инбредной депрессии в инвазивных популяциях по сравнению с популяциями нативного ареала, подтвердил исходную гипотезу об очищении инвазивной популяции от вредных рецессивных аллелей при прохождении через «горлышко бутылки».

Последние исследования биологических особенностей инвазивных популяций свидетельствуют о генетических изменениях, способствующих быстрому распространению вида на новых территориях (Lombaert *et al.*, 2014).

1.2.5. Цитоплазматические симбионты *H. axyridis* и других видов

КОКЦИНЕЛЛИД

К особенностям *H. axyridis*, потенциально благоприятным для захвата новых территорий, традиционно относят:

– особенности морфологии и развития – крупный размер, высокую плодовитость, короткое время развития от яйца до имаго (Michaud, 2002; Félix, Soares, 2004; Labrie *et al.*, 2006; Hemptinne *et al.*, 2012),

– полифагию (Majerus *et al.*, 2006), каннибализм (Michaud, 2003) и высокую агрессивность по отношению к другим видам (Ware, Majerus, 2008),

– высокую экологическую пластичность (Roy *et al.*, 2006; Berkvens *et al.*, 2008, 2010), высокую холодоустойчивость и низкую чувствительность к естественным врагам, обеспечиваемую высоким иммунитетом и мощной химической и физической защитой (Cottrell, Shapiro-Ilan, 2008; Ware, Majerus, 2008; Nedvěd *et al.*, 2010).

Однако Слоггетт в своем концептуальном обзоре (Sloggett, 2012) указывал на необходимость поиска специфических для *H. axyridis* биологических признаков, которые объясняли бы появление у вида высокой инвазивности, и выявления коррелятивных связей между «необычными» признаками и их проявлением с точки зрения ценности таких признаков при заселении новых территорий. К числу «необычных» признаков *H. axyridis* может быть отнесена зараженность вида репродуктивными симбионтами, влияющими на соотношение полов в инфицированных популяциях, перераспределение ресурсов и вероятность инбридинга. Вопрос о потенциальном влиянии цитоплазматических симбионтов на процессы инвазии практически не изучен.

В число репродуктивных симбионтов членистоногих входят как бактерии, так и эукариотические простейшие. Бактерии представлены классами α -Proteobacteria – *Rickettsia sp.*, *Wolbachia pipientis*, Mollicutes – *Spiroplasma ixodetis* и γ -Proteobacteria – *Arsenophonus nasoniae*, а также типом Bacteroidetes – *Cardinium hertigii*, *Flavobacterium sp.* (Duron *et al.*, 2008). К числу репродуктивных эукариотических симбионтов относятся представители отдела Microsporidia, вызывающие у некоторых видов насекомых гибель самцов на поздних личиночных стадиях.

Репродуктивные симбиотические бактерии распространены среди членистоногих значительно шире, чем это предполагалось еще десять лет назад.

Скрининг 2052 артропод, представляющих 136 видов из трех классов – Arachnida, Insecta и Malacostraca подтвердил наличие бактериальной инфекции у 32.4% изученных видов. *Wolbachia* была найдена у 31 вида (22.8%), *S. ixodetis* – у 9 видов (6.6%), *Arsenophonus* – у 6 видов (4.4%), *Cardinium* инфицировал 6 видов (4.4%), *Rickettsia* из группы сыпного тифа была обнаружена лишь у 1 вида (0.7%), *S. poulsoni* инфицировала один вид (0.7%) (Duron *et al.*, 2008).

Симбиотические репродуктивные бактерии кокцинеллid. Скрининг популяций кокцинеллid показал, что репродуктивными бактериальными симбионтами заражено более половины изученных видов (Weinert *et al.*, 2007). С учетом более ранних работ можно утверждать, что на сегодняшний день инфекционный статус подтвержден для 14 видов божьих коровок: *Rickettsia* обнаружена у девяти видов, *Wolbachia* – у шести, *Spiroplasma* – у трех видов, при этом один вид божьих коровок – *Adalia bipunctata* – инфицирован тремя видами симбиотических бактерий, а пять видов кокцинеллid – двумя видами бактерий. Из этих пяти видов у трех – *Halyzia decimguttata*, *Calvia quattuordecimguttata*, *Chilocorus bipustulatus* – две различные бактерии никогда не инфицировали одно и то же насекомое, у двух видов – *Rhyzobius litura* и *Cocidula rufa* нетипичная смешанная двойная инфекция *Rickettsia*+*Wolbachia* была обнаружена на индивидуальном уровне.

Уровень инфицированности популяций существенно колеблется от 1% до 89%, со средним значением около 5%.

У *Adalia bipunctata* (Werren *et al.*, 1994; Захаров *и др.*, 1998; Hurst *et al.*, 1999б), *Adalia decempunctata* (von der Schulenburg *et al.*, 2001), *Adonia variegata* (Hurst *et al.*, 1999а), *Coleomegilla maculata* (Hurst *et al.*, 1997), *Anisisticta novemdecimpunctata* (Tinsley, Majerus, 2006) бактериальные симбионты вызывают гибель особей мужского пола на ранних стадиях преимагинального развития – андроцид. Этот эффект детерминируется у *A. bipunctata* бактериями *Rickettsia*, *W. pipientis* и *Spiroplasma*, у *A. decempunctata* – *Rickettsia*, у *A. variegata* и *C. maculata* – *Flavobacterium sp.*, у *A. novemdecimpunctata* – *Spiroplasma*. Основным последствием андроцида на семейном и популяционном уровне является сдвиг в

соотношении полов в сторону самок. В популяциях *Rhyzobius litura* и *Coccidula rufa* также обнаруживается сдвиг в соотношении полов в сторону самок, подтверждающий, что симбиотические бактерии влияют на репродукцию хозяина. Однако у этих видов бактериями инфицировано значительное число самцов, что позволяет предполагать частичную супрессию андроцида.

Наиболее подробно изучено распространение репродуктивных симбионтов у *A. bipunctata*. Исследования показали, что в аллопатрических популяциях этого вида обнаруживается как моноинфекция какой-либо одной из симбиотических бактерий, так и полиинфекция *Rickettsia*+*Wolbachia*+*Spiroplasma*. Моноинфекция была обнаружена в северных популяциях *A. bipunctata* – в Санкт-Петербурге (*Spiroplasma*) и Кеми (*Rickettsia*) (Шайкевич и др., 2012), полиинфекция – в популяции центральной части ареала – в Москве (Majerus et al., 2000). В каждом конкретном случае уровень инфицированности популяций симбиотическими бактериями оказывался различным.

Симбиотические репродуктивные бактерии *H. axyridis*. Нативные популяции *H. axyridis* заражены бактерией *Spiroplasma* – облигатным цитоплазматическим симбионтом, вызывающим андроцид потомства инфицированных самок и сдвиг в соотношении полов в инфицированных этой бактерией популяциях в сторону самок. Впервые *Spiroplasma* была выявлена в 1975 году в японских популяциях *H. axyridis* методами генетического и цитологического анализа (Matsuka et al., 1975), значительно позднее зараженность японских и континентальных популяций вида была подтверждена уже молекулярно-генетическими методами (Majerus et al., 1999; Захаров и др., 1999). Доля инфицированных самок в разных популяциях различна – в Саппоро она составила 31% (Majerus et al., 1998), в Западной Сибири – 7% в Кызыле и 12% в Новосибирске (Захаров и др., 1999), на Алтае – около 2% (Majerus et al., 1998). Во всех указанных популяциях наблюдался сдвиг в соотношении полов в сторону самок.

В 2010 году в нативных популяциях *H. axyridis* Китая впервые была выявлена *Wolbachia* (Ahmed et al., 2010), которая относится к супергруппе «В».

Сведения о распространении этой высоко полиморфной бактерии, также, как и сведения о ее биологических и репродуктивных эффектах в популяциях *H. axyridis*, в литературе к настоящему времени отсутствуют.

Эукариотические симбионты кокциnellид. Общими эукариотическими патогенами кокциnellид являются микроспоридии. Это спорообразующие простейшие, филогенетически близкие грибам (Capella-Gutiérrez *et al.*, 2012), облигатные внутриклеточные паразиты. В литературе описано около 1300 видов микроспоридиев (Corradi, Keeling, 2009), наиболее распространенной группой считаются представители рода *Nosema* (Sprague, 1982). У некоторых членистоногих микроспоридии вызывают гибель самцов на поздних преимагинальных стадиях развития, как правило, на четвертой личиночной стадии, что приводит к отклонению в соотношении полов в сторону самок на семейном и популяционном уровнях. Микроспоридии являются причиной хронических заболеваний хозяйственно ценных насекомых (Bhat *et al.*, 2009).

На сегодняшний день описаны шесть видов микроспоридий, инфицирующих восемь видов кокциnellид (Lipa, Steinhaus, 1959; Cali, Briggs, 1967; Lipa, 1968; Lipa *et al.*, 1975; Vjørnson *et al.*, 2011; Vilcinkas *et al.*, 2013). Следует отметить, что некоторые виды божьих коровок – *Hippodamia convergens*, *Coccinella septempunctata*, *Adalia bipunctata* заражены несколькими видами микроспоридий, тогда как для других видов – *Hippodamia tredecimpunctata*, *Myrrha octodecimguttata*, *Coccinella trifasciata perplexa* – известна лишь моноинфекция.

Репродуктивные эффекты микроспоридий у кокциnellид практически не изучены. У божьих коровок *Hippodamia convergens* Guérin-Méneville (1842) (Coleoptera: Coccinellidae) микроспоридии *Tubulosema hippodamiae* незначительно увеличивают время развития от яйца до имаго и незначительно снижают плодовитость инфицированных самок и выживаемость имаго (Joudrey, Vjørnson, 2007). У двуточечной божьей коровки *A. bipunctata*, также как и у *H. convergens*, микроспоридиальная инфекция ассоциирована с удлинением периода личиночного развития (Steele, Vjørnson, 2012).

К числу симбиотических репродуктивных эукариот, инфицирующих *H. axyridis*, относятся два вида микроспоридий – *Tubulosema hippodamiae* (Bjørnson *et al.*, 2011) и *Nosema thompsoni* (Vilcinskas *et al.*, 2013). Эффекты *T. hippodamiae* на *H. axyridis* не известны. Наиболее интересные данные были получены Вилсинскасом с соавторами при изучении *N. thompsoni* (Vilcinskas *et al.*, 2013). Было показано, что введение инфицированной микроспоридиями гемолимфы *H. axyridis* имаго *Coccinella septempunctata* L. (1758) (Coleoptera: Coccinellidae) вызывает гибель последних через две недели после инъекции. Высокая численность толерантных микроспоридиев в гемолимфе *H. axyridis*, их низкая физиологическая активность, подтвержденная отсутствием экспрессии микроспоридиальных генов при анализе транскриптома яиц и взрослых насекомых, способность микроспоридиев убивать жуков *C. septempunctata*, по мнению авторов, поддерживают гипотезу о том, что эти паразитические микроорганизмы способствуют доминированию *H. axyridis* над аборигенными видами в природных сообществах. Следует, впрочем, заметить, что результаты этого исследования неоднозначно оцениваются специалистами. Отмечается, в частности, что при введении микроспоридий *C. septempunctata* инъекцией в гемолимфу не имитируется естественный перенос микроорганизма (Sloggett, 2013) и игнорируются естественные барьеры инфекции, прежде всего среда средней кишки (Solter, 2013). Высказывается замечание об отсутствии данных о дифференциальной плотности микроспоридиев на разных этапах преимагинального развития *H. axyridis*, прежде всего в яйцах и ранних стадиях эмбрионального развития (de Jong, 2013). По мнению автора, плотность микроспоридиев может влиять на поедание яиц *H. axyridis* аборигенными видами божьих коровок.

1.3. *Wolbachia pipientis* – репродуктивный симбионт насекомых

Wolbachia pipientis – внутриклеточная наследуемая по материнской линии альфа-протеобактерия, репродуктивный паразит членистоногих и нематод. По последним данным она инфицирует около 40% видов наземных членистоногих (Zug, Hammerstein, 2012). Симбионт был обнаружен в 1924 году у комаров *Culex pipiens* М. Хертигом и С.Б. Вольбахом, в 1936 г. М. Хертиг выполнил его формальное описание (Hertig, 1936), и с этого момента бактерия стала называться *Wolbachia pipientis*. В настоящее время *W. pipientis* является типовым и единственным представителем рода *Wolbachia*, входящим в порядок Rickettsiales. Симбиоз насекомых с *Wolbachia* считается сравнительно молодым, его возраст оценивается не более чем в 150 млн. лет.

90-е годы XX-го века были отмечены резко возросшим интересом исследователей к бактерии. Этот интерес был обусловлен широкой распространенностью *Wolbachia* среди членистоногих и своеобразием затрагивающих систему полового размножения хозяина последствий инфекции. В то время обсуждались лишь очевидные репродуктивные эффекты, детерминируемые *Wolbachia*, такие как цитоплазматическая несовместимость (Yen, Barr, 1971), партеногенез (Stouthamer *et al.*, 1999), феминизация (Rousset *et al.*, 1992) и андроцид (Jiggins *et al.*, 1998, 2000). В 2001 список репродуктивных эффектов *Wolbachia* был расширен, поскольку стало известно, что *Wolbachia* необходима для успешного завершения оогенеза у некоторых линий мелких паразитических ос *Asobara tabida* (Dedeine *et al.*, 2001). Описываемый случай стал первым примером облигатного симбиоза *W. pipientis* и насекомого.

Лишь в начале нашего века специалисты обратились к изучению слабых репродуктивных и адаптивных эффектов, возникающих у хозяина в присутствии этой бактерии. Для нескольких видов насекомых было показано, что пороговые, сложно детектируемые последствия инфекции имеют положительное влияние на приспособленность и, в конечном итоге, на репродуктивный успех хозяина. Открытие положительного влияния *Wolbachia* на репродуктивный успех хозяина

является наиболее значимым теоретическим итогом этих исследований, формирующим современное понимание значения *W. pipientis* для биологии насекомых.

1.3.3. Морфологические особенности *W. pipientis*

W. pipientis (Rickettsiales: Rickettsiaceae: Wolbachieae: *Wolbachia*) – риккетсия-подобная грамотрицательная неподвижная бактерия (Hertig, 1936). Её клетки диморфны; представлены либо очень мелкими (диаметр 0.25-0.5 мкм), либо достаточно крупными коккоидными (диаметр 1-1.8 мкм) или неправильными палочковидными формами (длина 0.5-1.3 мкм). В эукариотической клетке вольбахия находится в цитоплазматических пузырьках и часто окружена трехслойными мембранами, необходимыми для осуществления контроля хозяина над симбионтом (Louis, Nigro, 1989). Бактерия размножается делением, может образовывать спороподобные формы (Дудкина *и др.*, 2004).

W. pipientis обнаруживается в цитоплазме клеток репродуктивных органов, мальпигиевых сосудов, мышечных, нервных тканей и гемоцитов артропод. Особенно велика численность бактерий в яичниках и семенниках. В яичниках наиболее инфицированными оказываются питающие клетки, в которых микроорганизм размножается. Содержимое питающих клеток используется для развития яиц, в которые бактерия попадает, вероятно, через цитоплазматические мостики.

У одних видов *Wolbachia* инфицирует только самок, у других видов – особей обоих полов, причем численность её в одном хозяине значительно различается у разных видов. В яйцах мелкой паразитической осы рода *Trichogramma* находится 250-670 бактерий (Stouthamer, Werren, 1993), в яйцах разных линий видов рода *Drosophila* от 2600-18000 до 500000 бактерий (Clark, 2000, Bourtzis *et al.*, 1996), численность бактериальных клеток в инфицированных самцах оценивается величиной $1.7- 36.5 \times 10^6$ (Bourtzis *et al.*, 1996).

1.3.4. Номенклатура линий *W. pipientis*

Поскольку *W. pipientis* инфицирует до 20% до видов насекомых (Bandi *et al.*, 2001), вопросы номенклатуры приобретают особую актуальность для корректного наименования бактериальных линий.

При обозначении некоторых широко известных штаммов используется первая буква от наименования *Wolbachia* – *w*, за которой следуют несколько первых букв названия местности, в которой были собраны насекомые. Например, аббревиатура *wRi* означает, что бактерия была обнаружена у *D. simulans*, собранной в Райверсайде (Riverside), Калифорния.

В 1998 г. была предложена специальная система для наименования линий. Название предлагалось составлять из первой буквы родового имени бактерии – *w* (*Wolbachia*), за которой должны следовать несколько других, указывающих вид, из которого была выделена та или иная новая линия (Zhou *et al.*, 1998). Например, *Wolbachia*, выделенная из *Formica exsecta* обозначается как *wFex*. Поскольку вид инфицирован несколькими линиями, то вслед за буквами указывается дополнительно номер линии – *wFex1-wFex5* (*Formica exsecta*, линии 1-5) (Reuter, Keller, 2003).

На практике используются оба варианта "рабочей" номенклатуры.

1.3.5. Филогения и геном *W. pipientis*

Вариабельный вид *W. pipientis* образован множеством репродуктивно изолированных штаммов, объединяемых в настоящее время в супергруппы (Baldo *et al.*, 2006б). Ранние исследования филогении *Wolbachia*, проведенные на основании анализа первичной структуры последовательности гена *16S РНК*, позволили установить, что *W. pipientis* является представителем Alphaproteobacteria и родственна бактериям из родов *Ehrlichia*, *Anaplasma* и *Neorickettsia* (O'Neill *et al.*, 1992). Бактерии *Wolbachia*, выявленные у артропод и

филяриальных нематод, образуют монофилетическую группу (Rousset *et al.*, 1992; Stouthamer *et al.*, 1993; Sironi *et al.*, 1995).

Исследование первичной структуры генов *ftsZ* и *wspA*, более изменчивых, чем ген *16S PНК*, показало, что бактерии, инфицирующие насекомых и ракообразных, образуют две клады А и В (Werren *et al.*, 1995; Zhou *et al.*, 1998); на основании структуры фрагмента гена *ftsZ* время дивергенции клад оценивается в 58.3-66.6 млн. лет. Отсутствие конгруэнтности филограмм бактериальных линий и видов-хозяев свидетельствует об интенсивном межвидовом переносе бактерии.

Анализ бактерий филляриальных нематод выявил существование дополнительных клад С и D (Bandi *et al.*, 1998); с момента описания клад С и D они стали называться супергруппами.

Развитие методологии мультилокусного типирования линий *Wolbachia* и существенное расширение числа типированных линий, обнаруженных у филогенетически удаленных хозяев бактерии, привели к увеличению числа бактериальных супергрупп. До самого последнего времени все известные штаммы *Wolbachia* были разделены на восемь супергрупп на основе анализа нуклеотидных последовательностей белок-кодирующих генов *ftsZ*, *groEL*, *gltA* и *dnaA*. Сейчас число супергрупп *Wolbachia* достигло 17 (Ros *et al.*, 2009; Augustinos *et al.*, 2011). Можно предполагать, что расширения спектра исследованных видов приведет к увеличению числа бактериальных супергрупп.

В супергруппу Е входят представители *Wolbachia*, инфицирующие Collembola (Czarnetzki, Tebbe, 2004; Vandekerckhove *et al.*, 1999), в супергруппу F – *Wolbachia* артропод (термитов, клопов, сверчков, вшей, скорпионов, пауков) и филляриальных нематод (Casiraghi *et al.*, 2005; Lo *et al.*, 2002, 2007; Rasgon, Scott, 2004), в супергруппу G – *Wolbachia* пауков (Rowley *et al.*, 2004), в супергруппу H – *Wolbachia* термитов (Bordenstein, Rosengaus, 2005). Супергруппа I включает штаммы, инфицирующие паразитирующих на растениях нематод, супергруппа J образована *Wolbachia* филляриальной нематоды *Dipetalonema gracile* (Ros *et al.*, 2009), *Wolbachia* из супергруппы К является симбионтом клещей рода *Bryobia* (Ros *et al.*, 2009; Harris *et al.*, 2010). Супергруппа L содержит штаммы,

обнаруженные у фитопаразитических нематод, *Wolbachia* супергрупп М и N была обнаружена у тлей (Augustinos *et al.*, 2011). Бактерии *Wolbachia* spp. супергруппы О выявлены у белокрылки *Bemisia* (Bing *et al.*, 2014). Супергруппы Р и Q включают штаммы *Wolbachia*, инфицирующие клещей – эктопаразитов птиц (Glowska *et al.*, 2015).

Штаммы *Wolbachia* из австралийских пауков, объединенные в супергруппу G, первоначально были выделены в особую супергруппу на основании анализа изменчивости генов *wsp* и 16S рPHK (Rowley *et al.*, 2004). Впоследствии было показано, что супергруппа G возникла в результате рекомбинации штаммов из супергрупп А и В (Baldo, Werren, 2007). Наиболее сложная ситуация сложилась с супергруппой F. *Wolbachia* из этой супергруппы инфицируют как нематод, так и клопов, вшей, тараканов, мух и муравьиных львов (Casiraghi *et al.*, 2005). Вероятно, супергруппу F можно считать искусственной, отражающей не монофилию образующих ее штаммов, а скорее события рекомбинации и горизонтального переноса фрагментов генома бактерии.

Большинство известных штаммов относятся к супергруппам А и В. Эти штаммы инфицируют самые разные группы членистоногих, у которых вызывают модификации репродуктивного поведения и влияют на ряд аспектов биологии своих хозяев. Штаммы супергрупп С и D инфицируют нематод и никогда не вызывают модификаций репродуктивного поведения (Bandi *et al.*, 1998).

Филогенетические связи между супергруппами остаются невыясненными. Во-первых, до настоящего времени не удалось и, скорее всего, уже никогда не удастся обнаружить подходящую внешнюю группу для укоренения филогенетического дерева (Lo *et al.*, 2002, 2007). Наиболее близкими родственниками, с которыми у *W. pipientis* обнаруживается 90% сходство последовательности гена 16SPHK, являются представители клады, включающей роды *Anaplasma* и *Ehrlichia*. Последний общий предок вольбахии и этой внешней группы существовал, по всей видимости, несколько сотен миллионов лет назад, и столь значительное время дивергенции не позволяет корректно провести филогенетический анализ. По этой же причине – значительном времени

дивергенции – неудачной оказалась и попытка анализа филогенетических отношений между супергруппами *W. pipientis* с использованием белок-кодирующих последовательностей (Casiraghi *et al.*, 2005). Второй причиной, по которой филогенетические связи между супергруппами остаются не определенными, является огромное количество штаммов *Wolbachia* и их значительная изменчивость, связанная как с длительной репродуктивной изоляцией, так и с возможными событиями рекомбинации, неизбежно создающими конфликты классификации при использовании любого из вариантов мультилокусного типирования (Augustinos *et al.*, 2011). Упрощение процедуры секвенирования и сравнительно небольшой размер генома *Wolbachia*, вероятно, позволит избегать противоречий классификации путем секвенирования всего генома штамма и проведения полногеномных сравнений (Woolfit *et al.*, 2013).

В настоящее время для рутинной дифференциации бактериальных линий, как правило, используются данные о структуре белок-кодирующих генов «домашнего хозяйства». Схема типирования штаммов *Wolbachia* на основе анализа первичной структуры внутренних фрагментов пяти генов *gatB*, *coxA*, *hcrA*, *fbpA*, и *ftsZ* размером 400-500 пн. каждый получила название мультилокусного типирования или MLST. В дополнение к ней используются данные анализа изменчивости четырех гипервариабельных фрагментов гена *wspA* (Baldo *et al.*, 2006б; Paraskevopoulos *et al.*, 2006). Отдельная последовательность каждого из этих генов определяется как уникальный аллель. Специфическая комбинация пяти аллелей определяет аллельный профиль линий *Wolbachia*.

Первым полностью прочитанным и аннотированным геномом *Wolbachia* стал относящийся к супергруппе А геном штамма *wMel* из *D. melanogaster* (Wu *et al.*, 2004). Геном *wMel* представлен единственной кольцевой молекулой ДНК размером 1.267.782 пн. Уникальной особенностью этого генома как генома внутриклеточной бактерии является его высокая насыщенность повторяющейся ДНК и ДНК мобильных генетических элементов. Повторяющиеся последовательности представлены 158 семействами. Крупные повторы длиной более 200 пн. образуют 19 семейств и составляют 14.2% генома *wMel*. Из этих

семейств 15 соответствуют мобильным генетическим элементам, включающим семь типов IS-элементов и четыре ретротранспозона. Большинство из этих элементов неспособны к автономному переносу, поскольку гены транспозазы, по всей видимости, потеряли активность из-за многочисленных мутаций или инсерций других транспозонов. С экспансией повторяющихся последовательностей, которые могут служить сайтами рекомбинации, связывают значительное число внутригеномных перестроек – транслокаций и инверсий. Помимо повторяющихся последовательностей в геноме бактерии обнаружено три профага.

Облигатное внутриклеточное существование наложило отпечаток на комплекс генов *wMel*. Геном утратил гены, участвующие в биосинтезе клеточной оболочки, включая значительное число генов, необходимых для синтеза липополисахаридов, и ген аланин рацемазы, которая добавляет D-аланин при синтезе клеточной стенки. Ряд других генов, участвующих в процессах синтеза клеточной стенки, в геноме *wMel* хотя и представлены, однако дефектны. К числу таких генов относится ген маннозы-1-фосфат гуанилилтрансферазы, разделенный на две кодирующие последовательности WD1224 и WD1227 инсерцией IS5-элемента. Замечательным отличием генома *wMel* от малых редуцированных геномов других внутриклеточных бактерий является наличие дупликаций, большинство из которых представляют собой тандемные повторы. К числу дублированных генов относится ген белка оболочки бактерии *wsp*, используемый для филогенетического анализа. В геноме обнаружены два его паралога WD0009 и WD0489, обозначенные *wspB* и *wspC*, соответственно, с высокой степенью дивергенции от гена *wspA* (Braig *et al.*, 1998; Zhou *et al.*, 1998).

Геном *wMel* содержит гены, необходимые для гомологичной рекомбинации, включая ген *RecA*, гены полимераз с функцией редактирования неправильно вставленных оснований и функцией эксцизионной репарации, и гены регуляции транскрипции. В геноме обнаружены также гены потенциально вовлеченных во взаимодействие с хозяином белков, в том числе белки IV типа секреции, и анкириновые повторы, кодирующие тандемные мотивы из 33 аминокислот.

К настоящему времени получены нуклеотидные последовательности предкового по отношению штамму *wMel* штамма *wMelCS* и уникального патогенного штамма *wMelPop*, а также ряда их производных из клеточных культур и комаров *Aedes aegypti* (Woolfit *et al.*, 2013). Помимо генома *Wolbachia*, инфицирующей *D. melanogaster*, проаннотировано еще три ее полных генома: штамма супергруппы А *wRi* из *Drosophila simulans* (Klasson *et al.*, 2009), штамма супергруппы В *wPip* из *Culex quinquefasciatus* Pel (Klasson *et al.*, 2008), и относящегося к супергруппе D штамма *wVm* из нематоды *Brugia malayi* (Foster *et al.*, 2005). В разной степени готовности находятся проекты геномного секвенирования еще девяти штаммов *Wolbachia* из *Glossina morsitans*, *Culex quinquefasciatus*, *Nasonia vitripennis*, *Muscidifurax uniraptor*, *Culex pipiens molestus*, *Drosophila simulans*, *Drosophila willistoni*, *Drosophila ananassae*, *Diaphorina citri*.

1.3.6. Межгенная и внутригенная рекомбинация у *W. pipientis*

Первое экспериментальное свидетельство внутригенной рекомбинации у *W. pipientis* было получено для линии, инфицирующей мясных мух *Protocallifora* и их паразитоидов – ос рода *Nasonia*: *N. vitripennis*, *N. giraulti* и *N. longicornis* (Werren, Bartos, 2001). Особи этих трех видов соинфицированы каждый двумя линиями *Wolbachia* – одной из супергруппы А и другой из супергруппы В. В пределах супергруппы штаммы, инфицирующие названные видов ос, филогенетически близки. У *Wolbachia* мясных мух первые 204 пн. с 5'-конца фрагмента гена *wspA* гомологичны последовательности *wspA* *N. vitripennis*, тогда как область длиной 188 пн. на 3'-конце фрагмента гомологична последовательностям, обнаруженным у *N. giraulti* и *N. longicornis*.

Рекомбинация по гену *wspA* отмечена также для изопод *Armadillidium vulgare* (Crustacea, Oniscidea) (Verne *et al.*, 2007), муравьев *Formica exsecta* (Reuter, Keller, 2003), клеща *Briobia sarothamni* (Ros *et al.*, 2012), галловых ос *Andricus mukaigawae* (Yang *et al.*, 2013). У *A. vulgare*, природные популяции которого инфицированы тремя линиями *Wolbachia* – *wVulC*, *wVulM* и *wVulP*, ген *wspA* и

примыкающая к нему область обнаруживают два события рекомбинации с четырьмя точками разрывов. Рекомбинантные фрагменты обнаружены в линии *wVulP*. Первый встроен в четвертую высоковариабельную область *wspA* (точки разрывов находятся в положениях 495-505 и 564-599) и филогенетически связан с линией *wVulM*. Второй рекомбинантный участок располагается на 3'-конце изученной области (504 пн.) и филогенетически ближе линии *wVulC*. У муравьев *F. exsecta* было обнаружено пять линий *Wolbachia* – *wFex1-wFex5*. Каждая особь инфицирована как минимум четырьмя линиями *wFex2-wFex5*, линия *wFex1* проявляет жесткую ассоциацию с тремя митохондриальными гаплотипами. Анализ фрагмента гена *wspA* свидетельствует о том, что линии *wFex3* и *wFex5* возникли в результате гомологичной рекомбинации линий *wFex2* и *wFex4*. Рекомбинантные последовательности состоят из двух частей, полученных от родительских линий, с точками разрывов между 294 и 348 нуклеотидами изученного фрагмента. Последовательность фрагмента *wspA*, найденная у *B. sarothamni* является рекомбинантом между последовательностями *wspA Wolbachia* из *B. kissophila* и *Tetranychus urticae*. Галловые осы *A. mukaigawae* инфицированы пятнадцатью линиями *Wolbachia*, кластеризующимися в 6 групп. Анализ последовательностей подтверждает наличие трех событий рекомбинации; каждый из рекомбинантов содержит фрагменты двух предковых линий в последовательности гена *wspA*.

Множественные события рекомбинации были зафиксированы и для гена *gltA* при изучении 22 линий *Wolbachia* из супергрупп А и В (Baldo *et al.*, 2006б). Межгенная рекомбинация между генами *wspA* и *ftsZ* обнаружена у жука-малинника *Byturus affinis* (Malloch, Fenton, 2005), между генами *wspA* и *trmD* у клещей рода *Briobia* (Ros *et al.*, 2012), а также между генами *gltA*, *dnaA*, *ftsZ*, и *groEL* (Baldo *et al.*, 2006б). Рекомбинация между генами *ftsZ*, и *groEL* показана для *Wolbachia* из муравья *Camponotus vafer*, рекомбинантный вариант последовательности между генами *gltA* и *dnaA* обнаружен у мясной мухи *Protocallifora* sp., рекомбинационные события выявлены между генами *dnaA* и

groEL у мясной мухи *Protocalliphora* sp., осы *Encarsia formosa*, бабочки *Acraea eponina* и *Drosophila innubila*.

1.3.7. Штаммы *Wolbachia*, инфицирующие *D. melanogaster*

Вид *D. melanogaster* инфицирован тремя штаммами *W. pipientis*. Все три штамма имеют монофилетическое происхождение и инфицируют 63% выловленных в природных популяциях линий мух. Существенной разницы в доле инфицированных линий в выборках дрозофил из Северной Америки, Европы и Африки не наблюдается (Richardson *et al.*, 2012; Early *et al.*, 2013). В линиях *D. melanogaster*, собранных в природе до 1950 года, обнаруживается *Wolbachia* штамма *wMelCS*. Позднее в природных популяциях стали находить в основном *Wolbachia* штамма *wMel* (Riegler *et al.*, 2005). Быстрая замена у *D. melanogaster* одного штамма *Wolbachia* другим доминирующим указывает на сильное давление отбора в пользу штамма *wMel* или другого тесно сцепленного с ним маркера, возможно, определенного митохондриального гаплотипа или другой внутриклеточной бактерии. Механизм этого отбора не вполне ясен. Обычное в подобных случаях предположение о цитоплазматической несовместимости, которую вызывает новый штамм *Wolbachia*, в данном случае не верно. Широко распространенные штаммы *Wolbachia wMel* и *wMelCS* не вызывает модификаций полового размножения *D. melanogaster* за исключением слабо выраженной цитоплазматической несовместимости, которая наблюдалась только в некоторых лабораторных линиях *D. melanogaster* австралийского происхождения. Скрещивания инфицированных *Wolbachia* самцов с самками из неинфицированных линий приводят к гибели от 0% до 30% эмбрионов (Hoffmann *et al.*, 1994). В линиях *D. melanogaster* дикого типа инфекция *Wolbachia* не приводит к возникновению цитоплазматической несовместимости, но при разведении мух в лаборатории, неизбежно сопровождающемся инбридингом и снижением гетерозиготности, в ряде линий возникает слабо выраженная цитоплазматическая несовместимость (Hoffmann *et al.*, 1998). Отсутствие

значимой для природных популяций цитоплазматической несовместимости, вызванной *Wolbachia*, не связано с отсутствием у бактерии способности детерминировать этот признак. Межвидовой перенос *wMel* из *D. melanogaster* мухам *D. simulans* приводит к цитоплазматической несовместимости, уровень которой в некоторых случаях достигает 100% (Poinsot *et al.*, 1998).

Штамм *Wolbachia wMelPop* является исключительным случаем патогенного эндосимбионта, который активно размножается в клетках мозга, сетчатки и мышц *D. melanogaster* и сокращает продолжительность жизни своего хозяина в два раза по сравнению с незараженной линией (Min, Benzer, 1997). Данный штамм *Wolbachia* был выделен из мутантной гибридной линии дрозофилы *w¹¹¹⁸*. Самцы, использовавшиеся в создании этой линии, подвергались облучению, однако, до настоящего времени остается неизвестным, имеет ли отношение облучение к возникновению мутации, превратившей непатогенный штамм *Wolbachia* в патогенный. Показано, что повышенная температура (29⁰С вместо 25⁰С) усиливает патогенность *wMelPop* (Min, Benzer, 1997). Существенное снижение выживаемости мух и образование конгломератов электронно-плотных структур свидетельствуют о том, что разрушающиеся бактерии являются главным фактором, снижающим продолжительность жизни мух (Струнов *и др.*, 2013). Степень выраженности патологических изменений в тканях мух оказалась пропорциональна количеству бактерий в клетках. При 16⁰С бактерий накапливалось меньше, и патогенность *wMelPop* для *D. melanogaster* оказывалась сниженной (Струнов *и др.*, 2013). Эти результаты позволяли предполагать, что патогенность *wMelPop* связана не с особыми факторами патогенности, а скорее с увеличенной плотностью бактерий, которой достигает этот штамм.

Сравнение геномов штаммов *Wolbachia* выявило чрезвычайно большое сходство *wMelPop* с непатогенным штаммом *wMelCS* из мух Canton-S. Единственное отличие состояло в трипликации фрагмента длиной 19 тысяч пн. в геноме *wMelPop*. В геноме штаммов *wMelPop-CLA* и *wMelPop-PGYR*, производных от штамма *wMelPop*, данный фрагмент полностью делетирован. Утрата фрагмента коррелирует со снижением патогенности штаммов *wMelPop*-

CLA и *wMelPop-PGYP* (Woolfit *et al.*, 2013). Кроме отмеченной большой трипликации геномы штаммов *wMelPop* и *wMelCS/Canton-S* не различаются даже точковыми заменами. Геномы штаммов *wMelPop* и *wMel*, напротив, различаются 156 SNPs и инделами. Из них 104 SNPs и 8 инделов произошли в белок-кодирующих последовательностях, что привело к 78 аминокислотным заменам и 5 мутациям сдвига рамки. Направление изменчивости весьма примечательно. В более молодом распространяющемся штамме *wMel* все пять мутаций сдвига рамки приводят к формированию укороченных и, вероятно, нефункциональных генов по отношению к консенсусной последовательности этих генов у риккетсий. Инактивированы у *wMel* следующие пять генов: WD1155, WD0026-WD0027, WD1043-WD1044, WD1215-WD1216, WD1231-WD1232 (Richardson *et al.*, 2012). Кроме того, ряд генов, вероятно, поврежден вследствие точковых замен. Учитывая все вышесказанное, можно сделать вывод о том, что в процессе эволюции *Wolbachia* в геноме *D. melanogaster* происходит потеря генов и бактериальных клеточных функций.

Полногеномное сравнение полностью подтвердило ранее найденные отличия между штаммами *wMel* и *wMelPop*, обнаруженные при секвенировании фрагментов генома *Wolbachia* (Sun *et al.*, 2003, Riegler *et al.*, 2005; Riegler *et al.*, 2012). Оба штамма *wMel* и *wMelPop* содержат 13 копий транспозона IS5, из которых 12 являются одинаковыми. IS5 транспозон *wMel*, локализованный между генами WD0516 и WD0517, отсутствует в геноме *wMelPop*. Инсерция IS5 в ген WD1310 найдена только у штамма *wMelPop*. Обнаружены дополнительные дубликации анкириновых повторов в генах WD0550 и WD0766 в штамме *wMelPop*. Область тандемных повторов VNTR-141 у сравниваемых штаммов различается числом повторов. Обнаружена инверсия длиной примерно 143 тысячи пн., включающая гены с WD0399 по WD0536, фланкированная инвертированными повторами.

Последовательное пассирование *wMelPop* в клеточной культуре *Aedes albopictus* привело к появлению множественных мутаций (Woolfit *et al.*, 2013). Новая инсерция транспозона IS5 произошла в спейсерную последовательность

между генами WD0765 и WD0766. Фрагмент генома длиной 57 тыс. пн., образованный трипликацией 19 тысяч пн. фрагмента, оказался делетирован. Данный фрагмент фланкирован двумя почти идентичными последовательностями WD0506 и WD0518, имеющими гомологию с ретротранспозонами. Делеция, вероятно, появилась в результате гомологичной рекомбинации между указанными последовательностями. В гене RNase P (WD0200) возникла несинонимичная однонуклеотидная замена, мутация сдвига рамки была обнаружена в домене глутаредоксина (WD0758), в гене аспартилтРНКсинтазы (WD0413) была выявлена 10 нуклеотидная делеция. Если судить о вероятном эффекте мутаций на основании известных для этих генов мутантов других бактерий, то, по всей видимости, такими эффектами будут окислительный стресс и температурочувствительность (Rouhier *et al.*, 2010; Martin *et al.*, 1997).

Отмеченные мутации могут отражать как процесс адаптации *Wolbachia* из *D. melanogaster* к клеткам комаров, так и гипермутабельное состояние, индуцированное условиями клеточной культуры.

1.3.8. Биологические эффекты *Wolbachia pipientis* у насекомых

1.3.6.1. Репродуктивный паразитизм *W. pipientis* у насекомых

Цитоплазматическая несовместимость. Самым известным, самым распространенным и наиболее изученным репродуктивным эффектом *Wolbachia* является цитоплазматическая несовместимость (ЦН). Цитоплазматическая несовместимость впервые была открыта у комаров *C. pipiens* (Yen, Barr, 1971), и сейчас описана у представителей всех отрядов насекомых (Harris, Braig, 2003).

Цитоплазматическая несовместимость часто рассматривается как условная мужская стерильность. Этот эффект возникает при скрещиваниях особей, несущих различающиеся цитоплазматические элементы – либо при скрещиваниях инфицированных самцов с неинфицированными самками, и в этом случае говорят об однонаправленной цитоплазматической несовместимости, либо в

скрещиваниях особей, несущих различные штаммы *Wolbachia*, такой тип несовместимости называют двунаправленной цитоплазматической несовместимостью.

Цитологические исследования связывают цитоплазматическую несовместимость с серьезными нарушениями первого митотического деления (Breeuwer, Werren, 1990). У ос *Nasonia vitripennis* эти нарушения обнаруживаются в метафазе и проявляются в дефектах конденсации отцовского хроматина (Breeuwer, Werren, 1990), который в спутанном состоянии располагается в непосредственной близости от хорошо сконденсированных материнских хромосом. На более поздних стадиях митоза неправильно конденсированные отцовские хромосомы фрагментируются, и некоторые фрагменты попадают в дочерние ядра (Reed, Werren, 1995; Tram *et al.*, 2006), задерживая последующие митотические деления. У *D. melanogaster* и *D. simulans* во время анафазы и телофазы наблюдаются многочисленные хромосомные мосты (Lassy, Karr, 1996; Callaini *et al.*, 1997; Tram *et al.*, 2006), являющиеся видимым проявлением хромосомных транслокаций, либо неполной репликации ДНК. Следует отметить, однако, что цитоплазматическая несовместимость сопровождается целым комплексом событий на стадиях, предшествующих стадиям метафазы и анафазы первого митоза. После проникновения мужского пронуклеуса в яйцеклетку из него в интерфазе удаляются обеспечивавшие плотную упаковку хроматина протамины, это происходит после распада ядерной оболочки пронуклеуса. Протамины замещаются материнскими гистонами, однако замещение происходит с некоторой задержкой, гистоны H3.3 и H4 на отцовской ДНК размещаются неправильно, концентрируясь на периферии ядра. Помимо неправильного размещения гистонов отмечается задержка, либо блокировка репликации ДНК в мужском пронуклеусе (Landmann *et al.*, 2010). К числу событий профазы первого митоза, ассоциированных с цитоплазматической несовместимостью, относят задержку распада ядерной оболочки и активации циклин-зависимой киназы 1 (Cdk1) в мужском пронуклеусе (Tram, Sullivan, 2002). Последнее может быть следствием задержки клеточного цикла в области контрольных точек из-за

повреждения ДНК мужского пронуклеуса. Кроме того, у эмбрионов *D. simulans*, полученных от скрещиваний, в которых наблюдается цитоплазматическая несовместимость, обнаруживается избыток несвязанных с материнским и отцовским пронуклеусами centrosом (Lassy, Karr, 1996; Callaini *et al.*, 1997) и бочкообразное безcentросомное веретено деления, свидетельствующие об отсутствии связи мужского пронуклеуса с centrosомами (Robinson *et al.*, 1999).

Дефекты первого митоза не являются следствием присутствия *Wolbachia* в эмбрионах, поскольку бактерия удаляется из сперматозоида при его созревании (Bressac, Rousset, 1993; Clark *et al.*, 2002). Вероятным медиатором действия *Wolbachia* может быть эпигенетически наследуемый фактор, связанный с хроматином отцовского генома. В элегантном исследовании на гиногенетических самках *Drosophila* (Presgraves, 2000), которые откладывают диплоидные яйца, нуждающиеся для активации процесса развития во внеядерных отцовских факторах, но не в мужском пронуклеусе, было показано, что при скрещивании таких самок с самцами, инфицированными *Wolbachia*, появляется жизнеспособное потомство, несущее материнские хромосомы. Полученный результат указывает на то, что цитоплазматическая несовместимость, может быть обусловлена индуцированным *Wolbachia* повреждением мужского пронуклеуса.

Фенотип ЦН может быть супрессирован, если инфицированные самцы скрещиваются с самками, несущими ту же линию *Wolbachia* (Werren, 1997). В этом случае отцовские хромосомы полностью конденсируются и нормально расходятся в анафазе, результатом чего становится появление жизнеспособных эмбрионов (Lassy, Karr, 1996; Callaini *et al.*, 1997; Reed, Werren, 1995; Tram, Sullivan, 2002). Феномен, при котором яйца инфицированных матерей супрессируют индуцируемые цитоплазматической несовместимостью дефекты конденсации отцовского хроматина, известен как спасение. Цитоплазматическая несовместимость и спасение были формализованы в модели Модификации/Спасения (Modification/Rescue (Mod/Resc) (Poinsot *et al.*, 2003). Модификация происходит при сперматогенезе: она повреждает отцовские хромосомы при дифференциации сперматозоида, что приводит к

цитоплазматической несовместимости; *Wolbachia* самок противостоит этим эффектам отцовских хромосом.

Каждая линия *Wolbachia* может быть охарактеризована функционально по признакам Mod и Resc. В природе наблюдаются все комбинации Mod и Resc + и –, но представляется, что форма Mod+/Resc+ является наиболее общей, способной как вызывать цитоплазматическую несовместимость, так и спасти от нее (Werren, 1997; McGraw, O'Neill, 1999; Charlat *et al.*, 2001; Zabalou *et al.*, 2008).

Попытки создания молекулярно-генетической модели спасения привели к формированию трех групп гипотез. Все они объясняют супрессию дефектов конденсации и сегрегации отцовских хромосом особыми возникающими в присутствии *Wolbachia* условиями материнской цитоплазмы. В соответствии с первой группой гипотез цитоплазма прямо влияет на состояние мужского пронуклеуса, корректируя дефекты, индуцированные цитоплазматической несовместимостью. Один из сценариев широко известен как модель ключа и замка. В рамках этого сценария предполагается, что *Wolbachia* производит фактор, который связывает компонент мужского пронуклеуса, а за счет материнской *Wolbachia* обеспечивается второй компонент, которым замещается первый (Poinsot *et al.*, 2003).

Гипотезы второй группы предполагают, что спасение происходит в женском пронуклеусе за счет компенсации изменений. Весьма специфическая версия гипотез этой группы известна как модель рассинхронизации. Предполагается, что причиной эмбриональной летальности, индуцированной цитоплазматической несовместимостью, является рассинхронизация поведения отцовского и материнского пронуклеуса. Спасение достигается за счет компенсаторных изменений в мужском, либо женском пронуклеусе, что восстанавливает согласованное во времени поведение обоих пронуклеусов. Эта модель обязана своим появлением исследованиям на эмбрионах морских ежей, где было показано, что относительную согласованность клеточного цикла в мужских и женских пронуклеусах можно контролировать за счет избирательной активации контрольной точки при индивидуальной экспозиции сперматозоида

или яйца фактором сшивания ДНК (Sluder *et al.*, 1995). Доказательства того, что подобные механизмы могут функционировать и в эмбрионах с цитоплазматической несовместимостью были получены, когда выяснилось, что активация Cdk1 (циклин-зависимой киназы 1) и распад ядерной оболочки специфически задерживаются относительно женского пронуклеуса в эмбрионах с цитоплазматической несовместимостью (Tram, Sullivan, 2002). Однако синхронность клеточного цикла между двумя пронуклеусами может быть восстановлена обработкой ооцита фактором сшивания ДНК за счет задержки момента начала дробления, пока ферменты репарации устраняют поперечные сшивки ДНК.

В соответствии с третьей группой гипотез спасение обеспечивается направленным воздействием на цитоплазматические события клеточного цикла. Например, смертность при цитоплазматической несовместимости может быть результатом асинхронности модифицированного мужского пронуклеуса и материнской цитоплазмы. Эксперименты на эмбрионах *Xenopus* показали, что митотический цикл цитоплазмы не только проходит независимо от ядра, но и является доминирующим по отношению к циклу репликации ДНК, поскольку деления дробления эмбриона продолжают даже после удаления мужского пронуклеуса (Ephrussi *et al.*, 1991). Экспериментальная инкубация интерфазного ядра в митотическом цитоплазматическом экстракте преждевременно приводит в действие синтез ДНК и хромосомную конденсацию. Следовательно, цитоплазматическая несовместимость может быть следствием специфического замедления событий в мужском пронуклеусе, а спасение – результатом компенсаторного замедления митотических событий, приводимых в действие цитоплазмой, таких, например, как сборка веретена деления.

При цитологических исследованиях описанные выше модели не различимы.

Феномен цитоплазматической несовместимости определяется особенностями формирования первого митотического веретена деления насекомых. В этом классе членистоногих после слияния пронуклеусов, мужской и женский набор хромосом остаются разделенными на стадии метафазы (Callaini *et*

al., 1997). С отцовским и материнским набором хромосом взаимодействуют различные микротрубочки. Такое разделение веретена деления между хромосомными наборами частично связано с тем, что ядерная оболочка мужского и женского ядер распадается лишь частично, и оставшаяся значительная часть неповрежденной ядерной оболочки действует как физический барьер между материнским и отцовским хромосомным наборами. В результате этого в анафазе первого деления дробления два хромосомных набора остаются разделенными и смешиваются только в телофазе. Такая организация веретена деления, известная как гономерическое веретено деления, является уникальной особенностью первого митотического деления насекомых (Callaini *et al.*, 1997).

У эмбрионов *D. simulans*, для которых отмечается цитоплазматическая несовместимость, материнский хромосомный набор успешно проходит стадии метафазы и анафазы, тогда как отцовские хромосомы не разделяются в метафазе (Callaini *et al.*, 1997). Эта остановка, вероятно, является результатом активации контрольных точек сборки веретена деления. Во всех других изученных клетках, активация контрольных точек сборки веретена деления предупреждала сегрегацию полного хромосомного набора. Однако у эмбрионов с цитоплазматической несовместимостью самцовая половина гономерического веретена деления останавливается на стадии метафазы, тогда как другая половина вступает в анафазу. Это указывает на независимую регуляцию контрольной точки веретена деления в отношении отцовского и материнского наборов хромосом. Независимый контроль перехода от метафазы к анафазе материнской и отцовской половин первого митотического веретена деления у насекомых объясняет различные результаты развития при цитоплазматической несовместимости у гаплодиплоидных и диплоидных насекомых. Например, у трех близкородственных гаплодиплоидов в роде *Nasonia* цитоплазматическая несовместимость приводит к эмбриональной смертности у *N. longicornis* и *N. giraulti*, тогда как у ос *N. vitripennis* следствием цитоплазматической несовместимости является переход к исключительно мужскому потомству (Bordenstein *et al.*, 2003). Цитологический анализ первого митотического деления

у этих трех видов показал, что эмбриональная смертность является результатом неправильной сегрегации отцовского хроматина во время первого митоза, что приводит к анеуплоидии дочерних ядер. И напротив, мужское потомство у *N. vitripennis* является результатом того, что отцовские дефекты, индуцированные цитоплазматической несовместимостью настолько серьезные, что отцовские хромосомы не вступают в анафазу, вероятно из-за активации комплекса контрольных точек веретена деления. Однако, из-за того, что обе половины веретена деления функционируют независимо в отношении перехода от метафазы к анафазе, материнские хромосомы разделяются нормально, давая жизнеспособные гаплоидные дочерние митотические клетки. В конечном итоге эти эмбрионы развиваются в гаплоидных самцов. Таким образом, если повреждения упаковки хромосом не очень серьезны, то активация контрольных точек веретена деления не происходит. В этом случае наблюдается неправильное разделение хромосом, что в конечном итоге приводит к появлению нежизнеспособных анеуплоидных ядер. Однако, если результатом цитоплазматической несовместимости является серьезное нарушение конденсации отцовских хромосом, то происходит активация контрольной точки веретена деления, что в конечном итоге приводит к появлению гаплоидного мужского потомства. У строго диплоидных видов насекомых гаплоидные эмбрионы нежизнеспособны, и результатом цитоплазматической несовместимости является эмбриональная смертность.

Индуцируемые *Wolbachia* партеногенез, феминизация и андроцид встречаются реже и изучены существенно хуже, чем цитоплазматическая несовместимость.

Партеногенез. Естественный партеногенез – возникновение вполне развитого организма из неоплодотворенной яйцеклетки – обычен у членистоногих, хотя встречается у всех типов беспозвоночных и у некоторых позвоночных животных. По способности давать посредством партеногенеза самцов и самок различают:

- аррентокию, при которой из неоплодотворенных яиц развиваются только самцы;
- телитокию, при которой из неоплодотворенных яиц развиваются только самки;
- дейтеротокию, при которой из неоплодотворенных яиц развиваются особи обоего пола.

В тех случаях, когда популяции партеногенетического вида состоят исключительно из самок, одно из главных биологических преимуществ партеногенеза заключается в ускорении темпа размножения и быстром увеличении численности популяции, поскольку все особи популяции способны оставить потомство.

Телитокия, детерминированная цитоплазматическими бактериями, среди насекомых известна у представителей отряда перепончатокрылых и у трипсов. У гапло-диплоидных ос рода *Trichogramma*, а также у осы *Asobara japonica* партеногенез индуцируется *W. pipientis* (Arakaki *et al.*, 2001; Stouthamer *et al.*, 1999; Kremer *et al.*, 2009).

Первые доказательства связи телитокии с цитоплазматическими элементами были получены в экспериментах по замене ядерного генома аррентокичных линий на ядерный геном телитокичных линий у паразитической осы *Trichogramma pretiosum* (Stouthamer *et al.*, 1990). Сохранение аррентокии у самок из аррентокичных линий после замены 99.6% их ядерного генома на геном самок телитокичных линий заставило предположить наличие влияния на репродукцию цитоплазматических элементов. Это предположение было подтверждено восстановлением нормальной репродукции у телитокичных самок после "лечения" антибиотиками и под действием высокой (выше 30⁰С) температуры. После применения антибиотиков виргинные самки ос переходили к аррентокии. В дальнейшем присутствие бактерии в клетках членистоногих было выявлено микроскопическими методами, а окончательный филогенетический статус симбионта был установлен после анализа последовательности гена 16S рРНК (Stouthamer *et al.*, 1990, 1993).

Решающее значение для формирования пола будущего потомства имеет механизм партеногенеза, определяющий генотип партеногенетического зародыша. У большинства насекомых имеют место модификации оогенеза, происходящие до или во время мейоза, в результате которых либо число хромосом не уменьшается до гаплоидного, либо диплоидия восстанавливается за счет слияния двух гаплоидных продуктов мейоза. В большинстве изученных случаев механизмом восстановления диплоидии у инфицированных *Wolbachia* членистоногих была гаметическая дупликация (эндомитоз), происходящая в первом митотическом делении (Stouthamer, Kazmer, 1994). Мейоз протекает одинаково у инфицированных и неинфицированных самок до стадии единственного пронуклеуса. У неинфицированных самок гаплодиплоидных видов после оплодотворения и восстановления диплоидии из яйца развиваются диплоидные особи женского пола. Если яйца таких самок остаются неоплодотворенным, то после некоторой паузы гаплоидный пронуклеус приступает к митозу, в анафазе которого два гаплоидных набора хромосом мигрируют к противоположным полюсам. В результате митоза образуются две гаплоидные клетки, из которых в конечном итоге развивается гаплоидный самец (Stouthamer, Kazmer, 1994). В яйцах, отложенных инфицированными самками, оба гаплоидных хромосомных набора, образовавшиеся в результате репликации в интерфазе первого митотического деления, мигрируют к одному полюсу, что приводит к образованию одного диплоидного продукта митоза. Появляющаяся в результате гаметической дупликации самка является абсолютной гомозиготой. Цитогенетические наблюдения за поведением хромосом полностью подтверждаются результатами биохимических исследований, выполненных с использованием аллозимных маркеров.

По всей видимости, такой относительно редкий (по крайней мере, у насекомых) цитогенетический процесс, как гаметическая дупликация, является основным, но не единственным механизмом восстановления диплоидии. При гаметической дупликации рецессивные летальные гены выявляются немедленно, в то время как другие цитогенетические механизмы, которые репрессируют мейоз

или основаны на слиянии пронуклеуса и полярного тельца, могут поддерживать гетерозиготность в течение длительного времени. Анализ микросателлитных локусов у клеща *Bryobia praetiosa* показал, что механизмом поддержания диплоидии у него является функциональная апомиктическая дупликация (Weeks, Breeuwer, 2001).

Феминизация. Развитие признаков пола, как и большинства других признаков организма, определяется генотипом и факторами внешней среды. У животных половая дифференциация затрагивает все уровни организации особи, а сам процесс дифференциации достаточно сложен, поскольку развивающиеся организмы исходно бисексуальны. Первичная бисексуальность эмбрионов животных позволяет изменять направление их развития – переопределять пол в онтогенезе. Переопределение пола в естественных условиях может являться либо реализацией генетической программы организма, либо быть следствием тех или иных воздействий или изменений, разрушающих цепь последовательных процессов, определяющих развитие признаков пола: мутаций или факторов внешней среды. Изменения направления дифференциации пола – маскулинизация либо феминизация – известны как у беспозвоночных, так и у позвоночных животных. Естественная феминизация функциональных самцов описана у рыб – морского гермафродита черного окуня *Acanthopagrus schlegeli* Bleeker (Lee *et al.*, 2001). У моллюсков рода *Crepidula* известна феминизация под влиянием гормонов, выделяемых особями колонии, находящимися в женской фазе развития. Переопределение пола под влиянием цитоплазматических микроорганизмов, по всей видимости, можно считать специфическим случаем переопределения пола под влиянием факторов внешней среды.

У насекомых индуцируемая *Wolbachia* феминизация известна для представителя отряда Lepidoptera – бабочка *Eurema hecabe* (Hiroki *et al.*, 2002) и представителя отряда Hemiptera – цикадки *Zyginidia pullula* (Negri *et al.*, 2006). Генетической основой детерминации пола *E. hecabe* является женская гетерогамия (ZZ/ZW), пол у *Z. pullula* определяется системой XX/X0, при которой

самки гомогаметны. Феминизация представителей обоих отрядов подтверждена методами цитогенетического анализа.

В некоторых случаях у обоих видов в потомстве самок-феминизированных самцов обнаруживаются интерсексы.

У *E. hecabe* интерсексы появляются после обработки личинок из потомства феминизированных самцов тетрациклином. Признаки обоих полов проявляются у взрослых насекомых в структуре крыльев, репродуктивных органов и гениталий; бабочки с нормальными крыльями неспособны к полету. Вскрытие погибших куколок линий, ведущих свое происхождение от генетических самцов, выявляет полностью завершённый морфогенез у невылупившихся насекомых. У бабочек, личинки которых обрабатывались тетрациклином на первой личиночной стадии, промежуточные признаки выражены существенно сильнее, чем у бабочек, появляющихся из личинок, обработанных тетрациклином на более поздних – третьей и четвертой – стадиях личиночного развития. Обработка тетрациклином личинок на первой стадии развития приводит к частому появлению интерсексов; но интерсексы редко появляются после тетрациклиновой обработки личинок четвертого возраста. Обработка личинок, находящихся на первой или второй стадиях развития, сопровождается последующей высокой смертностью насекомых на стадии вылупления из куколок. Появление интерсексов связывается с ослаблением феминизирующего действия *Wolbachia* из-за снижения ее плотности после обработки тетрациклином личинок из потомства феминизированных самцов и необходимостью длительного воздействия бактерии для формирования женского фенотипа (Narita *et al.*, 2007).

У лабораторных линий *Z. pullula* интерсексы составляют почти половину потомства самок-феминизированных самцов (Negri *et al.*, 2006). Морфологически интерсексы характеризуются мужскими половыми признаками на последнем абдоминальном сегменте. Выраженность морфологических и анатомических признаков противоположного пола у таких особей существенно варьирует. У большей части интерсексов, доля которых оказывается выше 99%, обнаруживаются женские половые железы, характеризующиеся измененной

морфологией уменьшенного в размерах гермариума, имеющего неправильную форму с нечеткой поляризацией, и более плотно, чем в норме, прилегающими друг к другу овариолами (Negri *et al.*, 2008; Negri *et al.*, 2009). У меньшей части особей, доля их составляет менее 1% от общего числа интерсексов, обнаруживаются полностью неправильное строение аногенитальной зоны с уродливым яйцекладом и мужские половые железы, гистологически идентичные семенникам нормальных самцов и содержащие созревшие сперматозоиды и зародышевые клетки на разных стадиях развития. Наблюдаемая варьирующая экспрессивность признаков, по всей видимости, определяется плотностью *Wolbachia* в тканях интерсексов. У интерсексов с мужскими гонадами плотность бактерии оказывается на четыре порядка ниже, чем у интерсексов с женскими половыми железами. У интерсексов с мужскими гонадами профиль метилирования соответствует мужскому типу. У интерсексов с яичниками профиль метилирования соответствует женскому типу, что свидетельствует о влиянии бактерии на экспрессию генов половой дифференцировки и развития. С учетом данных о плотности *Wolbachia* у интерсексов с мужскими гонадами становится очевидно, что геномный импринтинг под влиянием *Wolbachia* происходит в случаях превышения бактерией пороговой плотности, а сама бактерия оказывается вовлечена в репрограммирование геномного импринтинга хозяина как в соматических, так и в половых клетках.

Анализ транскриптома инфицированных и неинфицированных имаго *Z. pullula* показывает, что бактерия значительно меняет паттерны экспрессии хозяйских генов, но эти изменения ни в коем случае не ограничены феминизацией генетических самцов и не связаны исключительно с репродуктивным фенотипом. Экспрессия 66.46% генов не затрагивается *Wolbachia*, бактерия влияет на экспрессию 20.36% генов вне зависимости от полового кариотипа, либо фенотипа особей. Экспрессия 7.97% генов также изменяется под влиянием *Wolbachia*, паттерны экспрессии этих генов сходны у неинфицированных особей обоих полов, а у инфицированных самцов и самок бактериальная инфекция изменяет экспрессию этих генов в противоположных направлениях в соответствии с

кариотипом (Asgharian *et al.*, 2014). Именно эта последняя группа генов может быть вовлечена в процессы феминизации инфицированных *Wolbachia* самцов *Z. pullula*.

Андроцид. Андроцидом, или бессамцовостью (в английской литературе – male-killing – убийство самцов) называют эффект цитоплазматических бактерий, проявляющийся в дифференциальной смертности особей мужского пола. Взрослое потомство инфицированных цитоплазматическими симбионтами самок уменьшено вдвое по сравнению с числом отложенных яиц и состоит полностью или преимущественно из особей женского пола, поскольку самцы гибнут на той или иной стадии преимагинального развития. Явление цитоплазматической бессамцовости известно сейчас более чем у 20 видов насекомых и клещей. Различают ранний андроцид, при котором гибель самцов происходит в эмбриогенезе или на первых личиночных стадиях, и поздний андроцид, при котором гибель самцов происходит на последних личиночных стадиях. Ранний андроцид был первым "необычным" эффектом, возникающим под влиянием цитоплазматических симбионтов, описанным у насекомых. Я.Я. Лус в 1932 г. заметил и позднее описал (Лус, 1947) отсутствие самцов в семьях самок из ленинградской популяции двуточечной божьей коровки *Adalia bipunctata* L. (Insecta: Coleoptera: Coccinellidae). Показав наследование этой особенности строго по материнской линии, он, однако, допускал возможность детерминации наблюдаемого эффекта ядерными генами. Вывод о бактериальной природе бессамцовости был сделан английскими исследователями только в 1992 г. после серий экспериментов по восстановлению нормальной репродукции под влиянием антибиотиков (Hurst *et al.*, 1992). В последующее десятилетие в России и Англии были выполнены комплексные работы по идентификации цитоплазматических симбионтов *A. bipunctata*, в ходе которых было показано, что двуточечная божья коровка инфицирована тремя различными бактериями – *Rickettsia*, *Spiroplasma* и *Wolbachia*, имеющими одинаковый фенотипический эффект (Werren *et al.*, 1994; Захаров *и др.*, 1998, 2000).

Андроцид, возникающий под влиянием вольбахии, среди представителей Coccinellidae известен у *Coccinella undecimpunctata* (Elnagdy *et al.*, 2013), среди Lepidoptera у *Acraea encedon* и *Acraea encedana* (Jiggins *et al.*, 1998, 2000), *Hipolimnas bolina* (Dyson, Hurst, 2004), *Ostrinia scapularis* и *Ostrinia furnacalis* (Kageyama *et al.*, 1998, 2002; Fujii *et al.*, 2001; Kageyama, Traut, 2004; Sakamoto *et al.*, 2007), *Spodoptera exempta* (Walker, 1856) (Graham, Wilson, 2012), среди Diptera – у *Drosophila bifasciata* (Hurst *et al.*, 2000).

Наиболее интересными оказались исследования по изучению андроцида у *O. scapularis* и *O. furnacalis*. В ранних работах было показано, что в инфицированных *Wolbachia* линиях потомство состоит исключительно из самок (Kageyama *et al.*, 1998, 2002, 2003), тогда как в неинфицированных линиях соотношение полов потомства достоверно не отличается от соотношения 1:1. После обработки инфицированных самок тетрациклином на стадии ранней личинки в их потомстве появлялись уже только самцы. Наблюдения были интерпретированы как феминизация генетических самцов. Позже, однако, выяснилось, что как в инфицированных, так и в неинфицированных линиях всегда самки имеют женский кариотип WZ, а самцы – мужской ZZ. В момент вылупления из яиц особи с кариотипами WZ и ZZ представлены в соотношении 1:1 в потомстве неинфицированных, инфицированных *Wolbachia* и вылеченных от *Wolbachia* самок. Кариотип ZZ оказался несовместим с *Wolbachia*, в потомстве инфицированных самок кариотипические самцы ZZ погибали на личиночной стадии развития, тогда как бактерия, по всей видимости, оказывается необходимой для развития особей с женским кариотипом, поскольку в потомстве вылеченных самок погибали кариотипические самки WZ.

Изучение транскрипции ключевого гена *doublesex* (*dsx*) каскада детерминации пола показало, что во всех инфицированных *Wolbachia* особях вне зависимости от их генетического пола (ZZ или ZW) сплайсинг кДНК проходил по женскому типу. В этом случае имела место феминизация генетических самцов (ZZ). Напротив, у особей, вылеченных от *Wolbachia*, сплайсинг кДНК осуществлялся по мужскому типу, что указывало на маскулинизацию

генетических самок (ZW) после элиминации бактерии. В любом из описанных случаев нежизнеспособными оказывались эмбрионы/личинки, у которых не совпадали генетический и фенотипический пол (кариотип и тип сплайсинга ключевого гена экспрессии пола) (Sugimoto, Ishikawa, 2012).

На цитологическом уровне события, сопровождающие андроцид, были изучены у *D. bifasciata* (Riparbelli *et al.*, 2012). Так же, как и при цитоплазматической несовместимости, у погибших эмбрионов наблюдались множественные нарушения развития, проявляющиеся в неправильной конденсации хроматина и нарушениях в разделении хроматид с образованием хромосомных мостов, аномальном митотическом веретене деления и потере centrosом. Эти нарушения происходили на разных стадиях развития мужских эмбрионов. Они приводили либо к смерти эмбрионов во время ранних ядерных циклов деления, либо к появлению уже на более поздних стадиях развития крупных дефектных участков клеточной бластодермы, и, в конечном итоге, развитию аномальных эмбрионов, погибающих перед вылуплением. Было высказано предположение, что *Wolbachia* выбирает мишенью для своего воздействия хроматин самца, разрушая сборку митотического веретена деления и, как следствие, приводя к аномалии в сегрегации хромосом.

На популяционном уровне андроцид может приводить к экстремальному сдвигу соотношения полов в сторону самок. В 2001 году в популяции бабочек *H. bolina* острова Самоа, где инфицированными оказались 99% самок, на 100 самок приходился один самец. Поразительно, но такое соотношение полов в популяции поддерживалось около 100 лет (400 поколений) (Dyson, Hurst, 2004). В популяциях бабочек *A. encedon* доля инфицированных самок от общего числа изученных в ряде случаев превышала 99%, и самцы в таких популяциях встречались с частотой 1-2% (Jiggins *et al.*, 2000). Ответом на андроцид стало быстрое распространение в популяции *H. bolina* сцепленной с 25 хромосомой доминантной системы супрессии, в присутствии которой выживает часть инфицированных вольбахией самцов. Эта система супрессии распространилась в островной популяции *H. bolina* в период с 2001 по 2006 годы и привела к

быстрому росту числа самцов, доля которых к концу указанного периода приблизилась к 50% (Hornett *et al.*, 2006, 2014).

Молекулярные механизмы феминизации и андроцида до настоящего времени остаются неизвестными. В последние годы была сформулирована любопытная гипотеза, связывающая индуцируемые вольбахией феминизацию и андроцид с влиянием бактерии на эндокринные процессы, управляющие развитием и репродукцией. По мнению авторов гипотезы *Wolbachia* способна корректировать половой фенотип за счет взаимодействия с гормональными цепями насекомого-хозяина, оказывая влияние на молекулярные механизмы дифференциации пола (Negri *et al.*, 2010; Negri, 2012). В рамках высказанной концепции появление интерсексов связывается с дисбалансом, либо конфликтом между мужскими и женскими половыми гормонами и/или рецепторами гормонов. В качестве кандидатов на взаимодействие с *Wolbachia* рассматриваются две группы гормонов - экдистероиды и инсулинподобные гормоны. Экдистероиды влияют на такие важные аспекты репродукции насекомых как развитие яичников, оогенез, биосинтез вителлогенина и половое поведение (Swevers *et al.*, 2005; Ganter *et al.*, 2007). Инсулинподобные гормоны регулируют рост, метаболизм, плодовитость и продолжительность жизни, а также влияют на синтез стероидов за счет стимуляции роста предгрудинных желез, в которых образуется экдизон (Truman, 2006). Хотя прямые доказательства действия этих гормонов на процессы феминизации и андроцида отсутствуют, доступные косвенные данные сопоставимы с данными, полученными на других видах насекомых.

У *E. hecabe* дефекты вылупления из куколок похожи на дефекты, обнаруженные у *Blattella germanica* и *D. melanogaster* с нокаутированными рецепторами экдизона (EcR-мутантов) (Cruz *et al.*, 2006; Davis *et al.*, 2005). Поскольку доказано, что у некоторых видов чешуекрылых титр экдистероидов регулирует специфическое для пола развитие крыльев (Lobbia *et al.*, 2003), появление промежуточных половых признаков в морфологии крыльев у *E. hecabe*, частично вылеченных от *Wolbachia* (Narita *et al.*, 2007), может быть связано с действием экдистероидов.

Возможное взаимодействие инсулинподобных гормонов и *Wolbachia* было продемонстрировано на дрозофилидах. У *Drosophila* ген *chico* кодирует субстрат основного инсулинового рецептора, и продукт гена вовлечен в регуляцию роста. Мутации гена *chico* нарушают пролиферацию фолликулярных клеток яичников и блокируют развитие клеток яйцевых камер в направлении дифференцировки вителлогенеза. Таким образом, мутация блокирует передачу сигналов инсулина, необходимых для синтеза белков желтка и поглощения белков ооцитами (Richard *et al.*, 2005). Самки, гомозиготные по *chico*, стерильны. Поскольку в присутствии *Wolbachia* эти мутанты дают потомство (Clark *et al.*, 2005), действие бактерии на гормональную регуляцию, включая синтез экдистероидов, может рассматриваться как комплементирующее дефекты инсулинового пути и/или стерильность. Недавние исследования мутантов *Drosophila* по генам, вовлеченным в сигнальные пути инсулина/инсулинподобных факторов роста (IIS), а это особи, характеризующиеся карликовостью, уменьшенной плодовитостью и увеличенной продолжительностью жизни самок, указывают на то, что *Wolbachia* может усиливать передачу инсулинового сигнала. Удаление симбионта уменьшает IIS, усиливая IIS-фенотип в направлении экстремальной карликовости, стерильности, ожирения и уменьшенной продолжительности жизни (Ikeya *et al.*, 2009).

Среди известных случаев индуцируемого *Wolbachia* андроцида наиболее интересным считается андроцид у *O. scapulalis* и *O. furnacalis*. Неполное вылечивание от *Wolbachia* приводит у этих видов к появлению особей с фенотипом интерсексов, что расценивается авторами исследования как неудачная попытка феминизации под влиянием бактерии либо во время эмбриогенеза, либо в течение периода личиночного развития хозяина.

Эмбриогенез происходит в среде, обогащенной стероидными гормонами, которые влияют на координацию морфогенеза (Kozlova, Thummel, 2003; Gaziova *et al.*, 2004). Как изменяется уровень экдистероидов и гормонов у *O. scapulalis* и *O. furnacalis* неизвестно. Но данные, полученные на *D. melanogaster*, свидетельствуют о том, что уровень экдистероидов начинает расти в течение раннего эмбриогенеза примерно во время гастрюляции и достигает максимума на

стадии 11-12 во время миграции половых клеток, которая является одним из наиболее важных морфогенетических событий, формирующих строение тела на первой личиночной стадии. Это случается приблизительно в период чередования экспрессии генов *shadow (sad)* и *disembodied (dib)*, кодирующих ключевые энзимы биосинтеза экдизона, в том числе цитохрома P450 (Warren *et al.*, 2002). Наблюдения за механизмами эмбриональной смертности самцов *Drosophila*, инфицированных *Spiroplasma* (другой симбиотической бактерией) позволили установить, что эмбриональное развитие самцов останавливается перед сегментацией (Bentley *et al.*, 2007). Таким образом, если *Wolbachia* влияет на пути синтеза экдистероидов, она может являться помехой/препятствием пространственной и временной экспрессии цитохрома P450, необходимого для нормального развития самцов, и вызывать андроцид.

Подводя итог, следует отметить, что такие фенотипические эффекты как цитоплазматическая несовместимость, партеногенез, феминизация и андроцид встречаются лишь у незначительной доли – 3.65% инфицированных *Wolbachia* видов членистоногих (<http://pubmlst.org>). Влияние бактерии на большую часть инфицированных ею видов до настоящего времени остается неизученным или малоизученным.

1.3.6.2 Биологические эффекты *W. pipientis* в симбиотических системах с насекомыми

Ярким примером мутуалистических отношений *Wolbachia* с насекомыми является компенсация дефектов оогенеза у мух *Drosophila* и мелких паразитических ос *Asobara tabida* (Dedeine *et al.*, 2001, 2004).

Компенсация дефектов оогенеза под влиянием *Wolbachia* у *D. melanogaster* была описана выше (см. раздел молекулярные механизмы феминизации и андроцида).

У *A. tabida* каждая особь заражена тремя линиями *Wolbachia* – *wAtab1*, *wAtab2* и *wAtab3*. Эти линии идентичны у насекомых из изученных европейских и

североамериканских популяций. Линии *wAtab1* и *wAtab2* вызывают цитоплазматическую несовместимость (Dedeine *et al.*, 2004, 2005). Линия *wAtab3* детерминирует полную зависимость репродукции самок от бактерии, супрессируя преждевременный апоптоз клеток-кормилок на критической стадии среднего оогенеза и обеспечивая, таким образом, созревание яйцеклетки (Pannebakker *et al.*, 2007). Существует внутривидовая изменчивость уровня зависимости, определяемая генетическим фоном хозяина. Безбактериальные самки европейских популяций не способны к образованию ооцитов, тогда как у апосимбиотических самок из североамериканских популяций ооциты образуются, однако безбактериальные эмбрионы не развиваются, либо вылупившиеся личинки погибают на ранних стадиях развития.

Анализ генетических основ зависимости репродукции самок от *Wolbachia* показал, что бактерия способна защищать клетки *A. tabida* от избытка железа (Kremer *et al.*, 2009; Gill *et al.*, 2014), нарушающего развитие и приводящего к резкому снижению выхода имаго. Железо является необходимым элементом белков дыхательной цепи, которые содержат его в форме железо-серного кластера и гема. Когда железосодержащие белки, такие, например, как цитохром, деградируют, железо аккумулируется лизосомами. Это железо потенциально токсично для клетки, поскольку реагирует с перекисью водорода с образованием высоко активных гидроксильных радикалов, что приводит к пермеабиллизации лизосомальной мембраны и утечке содержимого лизосомы, которое повреждает белки и другие клеточные компоненты. Клетки используют ряд механизмов для предотвращения окислительного повреждения.

Wolbachia способна смягчать неблагоприятные последствия избытка железа путем повышения экспрессии собственного железосвязывающего белка – бактериоферритина. Фиксация свободного двухвалентного железа препятствует апоптозу клеток хозяина. Связывание избыточного железа, вероятно, свойственно большинству симбиотических систем насекомое-*Wolbachia*.

У *D. melanogaster* вольбахия повышает плодовитость инфицированных мух на диете с низким содержанием железа. Механизм этого явления остается невыясненным (Brownlie *et al.*, 2009).

Мутуалистические отношения, демонстрирующие полную зависимость партнеров друг от друга, известны для постельного клопа *Cimex lectularius* и *Wolbachia* (Hosokawa *et al.*, 2010). Этот случай похож на ранее описанные для *Acyrtosiphon pisum*–*Buchnera aphidicola* и *Glossina brevipalpis*–*Wigglesworthia glossinidia* (Shigenobu *et al.*, 2000; Akman *et al.*, 2002). *B. aphidicola* обеспечивает тлю *A. pisum* незаменимыми аминокислотами, *W. glossinidia* синтезирует витамин В, восполняя его дефицит у мухи цеце *G. brevipalpis*. Обе бактерии обитают в специализированных клетках хозяина – бактериоцитах, образующих симбиотический орган бактериом. Так же, как у *A. pisum* и *G. brevipalpis*, у *C. lectularius* *Wolbachia* локализована в бактериоме, передается в ооциты вертикально через клетки-кормилки и инфицирует бактериом эмбриона уже на ранних этапах развития. Элиминация бактерии приводит к задержке роста и стерильности имаго; восстановление репродукции наблюдается при добавлении к корму клопов витамина В. Потребность *C. lectularius* в витамине В обеспечивается линией *Wolbachia* wCle (супергруппа F), в геноме которой был обнаружен биотиновый оперон, отсутствующий в геномах других ассоциированных с насекомыми линий *Wolbachia* (Nikoh *et al.*, 2014). Компактный биотиновый оперон wCle содержит полный набор генов синтеза биотина – *bioC*, *bioH*, *bioF*, *bioA*, *bioD*, *bioB*. Филогенетический анализ этих генов свидетельствует о том, что полный биотиновый оперон был встроен в геном предковой линии wCle в результате рекомбинации с геномом неродственной бактерии, вероятно факультативного эндосимбионта *Cardinium*, либо *Rickettsia*, при совместном инфицировании одного насекомого-хозяина.

У ряда видов отмечается повышение плодовитости и потенциальной плодовитости в присутствии *Wolbachia*. У комаров *Aedes albopictus* зараженные *Wolbachia* самки откладывают больше яиц по сравнению с незараженными самками, причем процент вылупления инфицированных яиц выше, чем

неинфицированных (Dobson *et al.*, 2002, 2004). Однако, перенос комарам этого вида бактерии *wPip* из комаров *Culex pipiens molestus* (Forsk.) приводит к цитоплазматической несовместимости, сопровождающейся снижением плодовитости самок и процента вылупления яиц (Calvitti *et al.*, 2010). У самцов *Ae. albopictus* различия в продолжительности жизни, частоте скрещиваний, конкурентоспособности спермы и конкурентоспособности при скрещиваниях между инфицированными и неинфицированными особями не обнаруживаются (Calvitti *et al.*, 2009). У инфицированных вольбахией ос *Eretmocerus mundus* появляется больше потомства (De Barro, Hart, 2001), чем у неинфицированных. Последовательное увеличение плодовитости самок лабораторных линий за двадцатилетний период наблюдений было отмечено у *D. simulans*, инфицированных *wRi* (Weeks *et al.*, 2007). Цитологические механизмы, определяющие повышение плодовитости, были изучены у мух *D. mauritana*, зараженных *Wolbachia wMau* (Fast *et al.*, 2011). Было показано, что бактерия повышает количество откладываемых самками яиц за счет повышения числа митозов зародышевых стволовых клеток и снижения апоптоза в гермариуме. В гермариуме *Wolbachia* размножается в нишевых пространствах, откуда проникает в цитоплазму питающих клеток и ооцитов (Toomey *et al.*, 2013). Тропизм *Wolbachia* в нишевых пространствах яичников высоко консервативен; он способствует вертикальной и горизонтальной передаче бактерии и поддерживается отбором. В зародышевых клетках ниш мужских гонад тропизм бактерии высоко изменчив даже у филогенетически близких бактериальных линий *D. melanogaster* (Toomey, Frydman, 2014).

В последние годы стало очевидно, что во многих таксонах вторичные симбионты модулируют взаимодействие между хозяином и его паразитами, играя ключевую роль в защите своего хозяина от инфекции или паразитизма. (Jaenike, 2012; Haine, 2008; Oliver *et al.*, 2003; Jaenike *et al.*, 2010; Xie *et al.*, 2010, 2014; Hedges *et al.*, 2008; Teixeira *et al.*, 2008; Scarborough *et al.*, 2005; Weiss *et al.*, 2011). Симбиотические бактерии защищают своих хозяев либо ограничивая титр

патогенов (повышая устойчивость хозяина), либо уменьшая вредные последствия патогенов (повышая толерантность хозяина) (Schneider, Ayres, 2008).

В 2008 году был продемонстрирован антивирусный эффект *Wolbachia* для *D. melanogaster* (Hedges *et al.*, 2008; Teixeira *et al.*, 2008). У инфицированных мух с различными генотипами отмечалась задержка гибели после введения им вирусов *Drosophila C virus* (DCV; Dicistroviridae), *cricket paralysis virus* (CrPV; Dicistroviridae) и *Nora virus*, и снижение смертности на 60-65% после введения *Flock House virus* (FHV; Nodaviridae). Было показано, что в присутствии *Wolbachia* у *D. melanogaster* уменьшена вирусная нагрузка (Teixeira *et al.*, 2008). Титр DCV оказался в 10000 раз ниже у инфицированных мух, чем титр вируса у неинфицированных особей, что свидетельствовало о негативном влиянии *Wolbachia* на пролиферацию DCV. Поскольку различия в титре вируса у инфицированных и неинфицированных мух были существенно выше, чем различия этого показателя у мух дикого типа и мутантов по генам антивирусной устойчивости *Dcr-2*, *ago-2*, *hop*, был сделан вывод о том, что бактерия является основным фактором устойчивости *D. melanogaster* к С вирусу (Dostert *et al.*, 2005; Galiana-Arnoux *et al.*, 2006; van Rij *et al.*, 2006; Teixeira *et al.*, 2008). Устойчивость к FHV связана с повышением толерантности инфицированных мух (Teixeira *et al.*, 2008; Chrostek *et al.*, 2013).

Линии *Wolbachia* значительно различаются по способности к антивирусной защите, для некоторых бактериальных линий антивирусная защита продемонстрирована, другие линии такую защиту не обеспечивают (Osborne *et al.*, 2009; Martinez *et al.*, 2014). У *D. simulans* протективным эффектом обладают линии *wAu* и *wRi*, а также линия *wMel* *D. melanogaster*. Линия *wAu* обеспечивает 90% выживание мух после введения им DCV. У линий *wHa* и *wNo* антивирусный эффект бактерии не обнаруживается. Изменчивость уровня антивирусной защиты, обеспечиваемой различными бактериальными линиями, строго коррелирует с плотностью бактериальных линий в тканях хозяина (Osborne *et al.*, 2009; Lu *et al.*, 2012; Chrostek *et al.*, 2013; Martinez *et al.*, 2014). Вопрос о плотности бактерий разных линий наиболее подробно изучен для *D. melanogaster* (Chrostek *et al.*,

2013). Было показано, что линии группы *wMelCS* характеризуются более высоким протективным эффектом по сравнению с линиями группы *wMel*: титр *DCV* в линиях группы *wMelCS* оказался в среднем в два раза ниже, чем в линиях группы *wMel*, и коррелировал с высокой бактериальной плотностью. Титр *Wolbachia* в *wMelCS*-подобных линиях был в 2.55 раза выше, чем в *wMel*-подобных. Различие в плотности бактерий связано с повышенной скоростью пролиферации *Wolbachia* *wMelCS*-подобных линий. Отрицательным эффектом высокой бактериальной плотности является сниженная продолжительность жизни мух, инфицированных линиями группы *wMelCS*. Самый короткий жизненный цикл, самая высокая бактериальная плотность и самый низкий титр *DCV* был обнаружен у *wMelPop*. Поскольку в настоящее время в мире происходит быстрое замещение *wMelCS* вариантом *wMel*, можно сделать вывод о том, что баланс между пользой бактерионосительства и его «стоимостью» смещен в сторону «стоимости», и отбор идет в сторону более низкого уровня защиты, но и меньшей «стоимости» инфекции.

Поиск молекулярно-генетических механизмов формирования фенотипических различий между линиями привел к картированию в геноме *wMelPop* области размером около 21 кб, определяющей геномную регуляцию пролиферации *Wolbachia*. Фрагмент, образованный 8-ю генами, был назван *Octomom* (Chrostek *et al.*, 2013; Chrostek, Teixeira, 2015). *Octomom* фланкирован двумя повторяющимися последовательностями в одинаковой ориентации. 5'-область повторяющейся последовательности аннотирована как псевдоген референсного генома *wMel* (AE017196), но может кодировать белковый домен обратной транскриптазы. В геноме *wMel* 3'-повторяющийся регион разделен на две части из-за инсерции *ISWpi1* (*IS5*) транспозона, однако эта область отсутствует в геноме *wMelCS*-подобных линий, включая *wMelPop*. Поэтому в геноме *wMelPop* фрагмент, фланкирующий *Octomom* на 3'-конце, полностью идентичен фрагменту на 5'-конце. *Octomom* содержит восемь генов, кодирующих белки, потенциально вовлеченные в процессы репликации, репарации,

рекомбинации, транспозиции и транскрипции. Эти гены представляют собой оперон.

Было показано, что копияность *Octomom* детерминирует титр *Wolbachia* и экспрессивность летального и протективного антивирусного фенотипов. Область характеризуется индивидуальной изменчивостью числа копий, которое варьирует от одной до восьми. Амплификация происходит за счет тандемной дупликации. Число копий повышается при отборе на многокопийность *Octomom*, многокопийные варианты неустойчивы, и при ослаблении отбора в таких линиях происходит спонтанная потеря копий *Octomom* до одной. Последнее однозначно свидетельствует о том, что *wMelPop* генетически, а, следовательно, и фенотипически, нестабильна.

Открытие *Octomom* дает уникальную возможность исследований на молекулярном уровне механизмов взаимодействия между хозяином и *Wolbachia*. Здесь следует отметить, что для эндосимбионтов крайне редко удается установить связь между генотипом и фенотипом из-за невозможности культивирования их *in vivo*. Ранее предварительные результаты были получены лишь для *Buchnera aphidocola*, точковая мутация в геноме которой влияет на температурную толерантность ее хозяина – тли *Acyrtosiphon pisum* (Dunbar *et al.*, 2007).

Антивирусная защита была зафиксирована и у комаров *Ae. albopictus*, естественно инфицированных линиями *Wolbachia* *wAlbA* и *wAlbB*. В клеточной культуре C6/36 клеток *Ae. albopictus* показано снижение уровня репликации вируса птичьего гриппа (СНІKV) в присутствии *wAlbB* (Raquin *et al.*, 2015). *Wolbachia* повышает устойчивость к вирусу лихорадки Западного Нила (*West Nile virus* – *WNV*) у *D. melanogaster* и *C. quinquefasciatus*. У инфицированных насекомых, так же, как и в приведенных выше примерах с *DCV* и *CrPV*, снижен титр *WNV* (Glaser, Meola, 2010).

Как отмечалось выше, устойчивость хозяина к патогенам в присутствии *Wolbachia* может быть опосредована конкуренцией за ресурсы между бактерией и патогенными микроорганизмами. К числу критически важных для насекомых молекул относится холестерол. В клетках насекомых холестерол является

предшественником стероидных гормонов, участвующих в оогенезе насекомых, и необходим для сохранения стабильности клеточной мембраны и клеточного сигналинга. Репликация *Wolbachia* является холестерол-зависимой, поскольку для формирования вакуоли, окружающей каждую бактерию, необходимы холестерол-богатые мембраны хозяина (Cho *et al.*, 2011), а само выживание бактерии может быть связано с использованием холестерола хозяина (Lin *et al.*, 2003).

И у насекомых, и у *Wolbachia* отсутствует путь биосинтеза холестерола, потому и бактерия, и ее хозяин зависят от этого спирта и конкурируют за его поступление с пищей. В клетках насекомых холестерол является предшественником стероидных гормонов, участвующих в оогенезе насекомых, и необходим для сохранения стабильности клеточной мембраны. Репликация *Wolbachia* является холестерол-зависимой, поскольку для формирования вакуоли, окружающей каждую бактерию необходимы холестерол-содержащие мембраны хозяина (Cho *et al.*, 2011), а метаболизм бактерии невозможен без транспорта этого спирта в клетки хозяина (Lin *et al.*, 2003). Холестерол необходим для репликации не только *Wolbachia*, но и вирусам, причем они настолько зависят от холестерола насекомого-хозяина, что иммунный ответ на некоторые вирусные инфекции включает в себя понижающую регуляцию стеролов (Blanc *et al.*, 2011). Можно предполагать, что, конкурируя за холестерол *Wolbachia* влияет на размножение и распространение вирусов в организме хозяина.

Исследования влияния диеты с высоким и низким содержанием холестерола на устойчивость *D. melanogaster*, инфицированной *wMelPop* и *wMelCS*, к DCV показали, что высокий уровень холестерола в корме коррелирует со снижением устойчивости мух к вирусу. Мухи, содержащиеся на диете с высоким уровнем холестерола (эксперимент), погибали на 2-5 дней раньше, чем мухи, выкармливаемые на стандартном корме (контроль), а вирусная нагрузка *D. melanogaster* в эксперименте оказалась выше, чем у мух контрольной группы. За единственным исключением, уровень холестерола в корме мух не влиял на плотность *Wolbachia*. Полученные результаты можно истолковать в поддержку

гипотезы опосредованной *Wolbachia* молекулярной конкуренции при блокировке патогенов.

Wolbachia не обеспечивает защиту *Drosophila* от ДНК-вирусов (Teixeira *et al.*, 2008), бактерий (Wong *et al.*, 2011; Ye *et al.*, 2013) и паразитических ос, бактерия защищает комаров *Ae. aegypti* от филарийных нематод и некоторых бактерий (Kambis *et al.*, 2009; Ye *et al.*, 2013).

Помимо множества положительных эффектов бактерионосительства у насекомых отмечаются и некоторые отрицательные последствия бактериального заражения. Для паразитической осы *Leptopilina heteronoma* показано снижение плодовитости и выживания имаго, а также значительное уменьшение двигательной активности у инфицированных *Wolbachia* ос (Fleury *et al.*, 2000). Циркадные ритмы, время развития и соотношение полов в потомстве не были затронуты инфекцией.

1.3.7. Регуляция плотности *W. pipientis* в клетках насекомых

Многочисленные исследования свидетельствуют о том, что бактериальные эффекты *Wolbachia* являются функцией плотности бактерий, а сама плотность зависит как от особенностей генома хозяина и бактериального генома, так и от абиотических факторов.

Первые указания, свидетельствующие о влиянии генотипа хозяина на плотность бактериальной популяции, были получены в конце 90-х–начале 2000-х годов в экспериментах по межвидовому переносу *Wolbachia* у дрозофил (*D. melanogaster* и *D. simulans*) и молей (*Ephestia kuehniella* и *Cadra cautella*) (Boyle *et al.*, 1993; Poinot *et al.*, 1998; McGraw *et al.*, 2002), а также при изучении множественно инфицированных *Wolbachia* видов насекомых (Ikeda *et al.*, 2003; Mouton *et al.*, 2003, 2004, 2006, 2007; Kondo *et al.*, 2005). Уже тогда было отмечено, что в большинстве случаев плотность бактериальных линий при множественной инфекции константна и регулируется хозяином независимо, линии не конкурируют между собой, плотность *Wolbachia* последовательно

повышается в период эмбрионального и личиночного развития. Единственным исключением, пожалуй, стала работа на жуках *Callosobruchus chinensis*, инфицированных двумя линиями бактерии – *wBruCon* и *wBruOri* (Kondo *et al.*, 2005), где была показана супрессия линии *wBruCon* линией *wBruOri* при соинфекции.

Эффекты бактериального генома обнаруживаются на идентичном генетическом фоне хозяина; они проявляются в дифференциальной плотности *Wolbachia* (McGraw *et al.*, 2002; Ikeda *et al.*, 2003; Mouton *et al.*, 2004) и в специфическом линейном передне-заднем распределении бактерии в яйце (Veneti *et al.*, 2004). Сложный межвидовой перенос *wMelPop* в пересеваемую клеточную культуру *Ae. albopictus* с последующим заражением этой бактериальной линией клеточных культур комаров *Ae. aegypti* и *An. gambiae* и заключительным переносом *wMelPop* из клеточных культур *Ae. aegypti* и *An. gambiae* в *D. melanogaster* показал, что при переносе бактерии происходит ее генетическая адаптация к новой внутриклеточной среде (к новому для неё генетическому фону хозяина). Эта адаптация проявилась в изменении свойств линии: потере инфекционности и снижении плотности в ряду поколений (McMeniman *et al.*, 2008).

Молекулярные механизмы взаимодействия геномов хозяина и симбионта, регулирующие бактериальный титр, начали изучаться с конца первого десятилетия нашего века. Было показано, что *Wolbachia* вызывает изменение спектра экспрессии малых регуляторных РНК, вовлеченных в регуляцию бактериальной плотности. Удобными объектами такого рода исследований оказались пересеваемые клеточные культуры. В пересеваемой клеточной культуре *Ae. aegypti*, зараженной *Wolbachia wMelPop-CLA*, была выявлена индукция двух микро-РНК – микро-РНК_{aae-miR-12} и _{aae-miR-2940} (Osei-Amo *et al.*, 2012; Hussain *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2013). Потенциальными мишенями для _{aae-miR-12} являются 2 гена. Выраженное ингибирование транскрипции показали следующие гены: (MCM6) – ген белка, участвующего в лицензировании репликации ДНК, и (MCT1) – ген белка монокарбоксилат транспортер.

Реальность найденной связи была подтверждена в эксперименте по трансфекции клеток пересеваемой культуры Aag2 синтетической РНК aae-miR-12. После трансфекции наблюдалось ингибирование транскрипции этих двух генов. Биологический смысл полученных результатов не вполне ясен. В экспериментах с помощью ингибиторов aae-miR-12 показано, что для поддержания *Wolbachia* в клетках комара, возможно, необходима сама микро-РНК, хотя эффекты микро-РНК и всех регулируемых этой РНК белков довольно трудно разделить.

При заражении комаров *Ae. aegypti* тем же штаммом *Wolbachia* – wMelPop-CLA показана индукция экспрессии микро-РНК aae-miR-2940. Эта микро-РНК усиливает транскрипцию гена металлопротеазы *m41ftsh* и подавляет транскрипцию гена 5-цитозин ДНК метилтрансферазы (*AaDnmt2*). Оба гена включены в регуляцию бактериальной плотности. Металлопротеаза необходима для поддержания высокой плотности *Wolbachia* и, по всей видимости, играет существенную роль в репликации бактерии, поскольку независимое от данной микро-РНК выключение гена металлопротеазы оказывает отрицательное влияние на бактериальную плотность (Hussain *et al.*, 2011). Сайленсинг экспрессии гена *AaDnmt2* приводит к повышению бактериальной плотности у комаров (Zhang *et al.*, 2013).

Среди механизмов регуляции плотности *Wolbachia* в симбиотических ассоциациях указывается и автофагия, описанная для клеточных культур *D. melanogaster* PC15, инфицированной wMelPop, и *Ae. albopictus* C6/36, инфицированной wAlbB. Снижение бактериального титра в обоих случаях наблюдалось после активации автофагии, либо в результате обработки рипамицином, который блокировал сигнальный путь mTOR, регулирующий клеточный рост, либо в результате сайленсинга amTOR специфической микро-РНК.

Действие рипамицина на мух характеризуется разнонаправленностью эффектов. В ооцитах самок, выращиваемых на среде с добавлением рипамицином, отмечено увеличение титра *Wolbachia* в 1.7 раза (Serbus *et al.*, 2015), однако у потомства самок *D. melanogaster*, в корм которых добавлялся

рипамицин, наблюдалось снижение плотности бактериальной популяции, как и в пересеваемых клеточных культурах.

К числу абиотических факторов, для которых показано влияние на бактериальную плотность, относятся температура окружающей среды и диета хозяина. У бабочек *L. heteronoma* плотность бактерий для трех различных линий *Wolbachia* была максимальной при температуре 26⁰С (Mouton *et al.*, 2006). У *D. melanogaster* и *D. simulans* наблюдалось снижение титра *Wolbachia* при содержании на обогащенной дрожжами корме, и повышение при содержании на корме с повышенным содержанием сахарозы, последнее авторы объясняют влиянием механизмов, связанных с сигнальными путями инсулина (Serbus *et al.*, 2015).

1.3.8. Локализация, передача и распределение *Wolbachia* в гаметогенезе и раннем эмбриогенезе

Процессы, протекающие в оогенезе и сперматогенезе, характеризуются эволюционной консервативностью и сходны у различных видов насекомых (Fuller, 1998). *Wolbachia* передается следующему поколению преимущественно через женскую зародышевую линию. Точность передачи бактерии у *D. melanogaster* и *D. simulans* в лабораторных условиях приближается к 100%, в природе точность передачи бактерии составляет около 97% (Hoffmann *et al.*, 1990, 1998; Weeks *et al.*, 2007).

1.3.8.1. Локализация, передача и распределение *Wolbachia* в оогенезе и раннем эмбриогенезе

Критически важные события, обеспечивающие передачу бактерии следующему поколению, происходят в оогенезе. Как и во многих других случаях, наиболее изученным является оогенез *Drosophila*, поэтому преимущественно именно в этой системе будут рассмотрены основные этапы созревания женских

половых клеток и особенности распределение *Wolbachia* на этапах оогенеза и раннего эмбриогенеза.

Взрослые самки дрозофилы имеют яичники телотрофического типа, в которых питающие клетки собраны в проксимальном отделе яичника в единую для всех ооцитов питающую камеру. Яйцевые трубочки – овариолы – формируют яйцевые камеры, называемые фолликулами. Дистальная область каждой овариолы, образованная мелкими верхушечными фолликулами, соответствует гермариуму, в котором проходят митоз первичных зародышевых клеток и формирование оогониев и юных ооцитов. В гермариуме *Drosophila* выделяют три района – 1, 2 и 3, в одном из которых – районе 2 – происходит апоптоз (Dansereau, 2008). Гермариум содержит 2-3 стволовые клетки зародышевой линии (germline stem cells – GSCs). Развитие ооцита начинается в районе 1 гермариума с деления стволовой клетки, которое приводит к появлению дочерней стволовой клетки и бластоциста, вступающего в дифференциацию. По мере продвижения по гермариуму бластоцист претерпевает четыре митотических деления, сопровождающихся неполным цитокинезом, в результате которого образуется 16 клеток зародышевой линии, называемых цитоцистами, связанных друг с другом цитоплазматическими мостиками – круговыми каналами. Сформировавшаяся таким образом структура называется цистой (King, 1970). В этой же области задняя клетка с четырьмя круговыми каналами дифференцируется в ооцит, а остальные 15 клеток становятся питающими клетками, или клетками-кормилками. В районе 3 гермариума циста окружается соматическими фолликулярными клетками ниш. С этого момента окруженная фолликулярными клетками циста называется яйцевой камерой.

Wolbachia обнаруживается в стволовых клетках зародышевой линии яичников инфицированных самок и во время митоза распределяется между дочерней стволовой клеткой и дифференцирующимся бластоцистом. Механизм равномерного распределения бактерии между стволовой клеткой и бластоцистом до настоящего времени остается неизвестным. Бактерии видны на стадиях 2-, 4-, 8- и 16-ти клеточной цисты и относительно равномерно распределены по всем ее

клеткам (Ferree *et al.*, 2005). Поскольку плотность *Wolbachia* в нишевых клетках выше, чем в клетках цисты, нишевые клетки рассматриваются как источник *Wolbachia*, из которого бактерия может попадать в клетки зародышевой линии цисты (Frydman *et al.*, 2006).

Во время стадий 1 и 2 *Wolbachia* распределена со сходной плотностью в цитоплазме как ооцита, так и клеток-кормилок. Равномерное распределение бактерии в цитоплазме клеток-кормилок сохраняется практически до завершения оогенеза, тогда как в ооците *Drosophila Wolbachia* концентрируется между передним кортексом и ядром приблизительно на стадии 3. К 6 стадии передняя концентрация бактерии становится наиболее отчетливо выраженной, поскольку скопление бактерий образует «шапочку» (cup) на передней периферии ядра. Ассиметричное распределение *Wolbachia*, по всей видимости, в значительной степени зависит от цитоскелета яйцевой камеры. На заднем полюсе ооцита расположен центр организации микротрубочек (microtubule organizing center – МТОС), обогащенный минус-концами центриолей и микротрубочек (Mahowald, Strassheim, 1970; Theurkauf *et al.*, 1992). Микротрубочки расходятся от заднего полюса ооцита таким образом, что их плюс-концы оказываются в области переднего полюса вблизи круговых каналов клеток-кормилок. Такое расположение микротрубочек способствует транспорту компонентов из клеток-кормилок в ооцит с помощью минус-конца, направляемого цитоплазматическими моторами, такими, например, как динеин (Li *et al.*, 1994, Navarro *et al.*, 2004, Ferree *et al.*, 2005). Участие динеина в транспорте *Wolbachia* из клеток-кормилок в ооцит было подтверждено экспериментально с использованием линий, трансгетерозиготных по двум гипоморфным аллелям тяжелой цепи динеина. Взаимодействие *Wolbachia* и динеина опосредовано динактином, сверхэкспрессия которого разрушает связь динеина с переносимыми последним бактериями (Ferree *et al.*, 2005).

Дальнейшие события оогенеза происходят в вителлариуме овариол. Локализация *Wolbachia* изменяется в момент обширных перестроек цитоскелета ооцита в среднем оогенезе. В течение 6-ой стадии оогенеза происходит

поляризация ооцита, инициируемая сигнальными путями эпидермальных факторов роста (Neuman-Silberberg *et al.*, 1993; Gonzalez-Reyes *et al.*, 1995). Непосредственным результатом этого сигналинга становится резкая реорганизация сети микротрубочек ооцитов на стадии 7. Центр организации микротрубочек на заднем полюсе ооцита разбирается, и микротрубочки переориентируются, их минус концы ориентируются к переднему кортексу, а плюс-концы – к заднему полюсу ооцита (Brendza *et al.*, 2000, 2002; Clark *et al.*, 1994, 1997; Li, Kaufman, 1996; Pokrywka, Stephenson, 1995; Theurkauf *et al.*, 1992).

Во время этой реорганизации ядро ооцита мигрирует от заднего полюса к переднему (King, 1970; Navarro *et al.*, 2004). Параллельно с перестройкой и реорганизацией ооцита изменяется и локализация *Wolbachia*. На стадиях оогенеза 6-9 бактерии равномерно распределены в цитоплазме ооцита (Ferree *et al.*, 2005; Serbus, Sullivan, 2007). Асимметричное расположение *Wolbachia* во второй раз появляется уже в позднем оогенезе. У *D. melanogaster* бактерия концентрируется вблизи заднего полюса ооцита на поздних этапах стадии 9 и на стадии 10. Показано, что для правильного заднего расположения бактерии в ооците также необходимы микротрубочки, кинезин-1 и так называемая полярная плазма – oskar-seeded pole plasm (Serbus, Sullivan, 2007; Veneti *et al.*, 2004). По всей видимости, в процессе оогенеза происходит альтернативная замена денеина, обеспечивающего локализацию бактерии у заднего полюса ооцита в раннем оогенезе, на кинезин-1, выполняющего такую же транспортную функцию в период позднего оогенеза.

Задняя локализация *Wolbachia* в позднем оогенезе в конечном итоге способствует передаче бактерии в эмбрионах через зародышевую линию клеток. У *D. melanogaster* развитие ооцита завершается гибелью клеток-кормилок, увеличением объема ооцита, который заполняет всю яйцевую камеру и превращается в яйцо.

После оплодотворения яйца происходят 9 быстрых митозов, не сопровождающихся цитокинезом, в результате чего появляются ядра, лежащие в общей цитоплазме – синтиций (Ashburner, 1989). После седьмого митоза

начинается миграция ядер к периферии эмбриона, где они ассоциируются с кортексом. После девятого деления группа из приблизительно сорока ядер достигает заднего полюса яйца, где находится полярная плазма. Ядра, достигшие этой зоны, формируют клеточную структуру и дают начало клеткам-предшественникам зародышевого пути. В период завершения оогенеза и в раннем эмбриогенезе *Wolbachia* остается в области заднего кортекса (Hadfield, Axton, 1999; Kose, Karr, 1995; Serbus, Sullivan, 2007; Veneti *et al.*, 2004). Это положение бактерии в области будущего зародышевого пути до момента начала целлюляризации способствует последующему захвату *Wolbachia* клетками зародышевого пути.

Локализация *Wolbachia* в области заднего полюса в позднем оогенезе, наблюдаемая не только у *D. melanogaster*, но и у некоторых комаров и перепончатокрылых (Breeuwer, Werren, 1990; Dedeine *et al.*, 2001; Stouthamer *et al.*, 1993; Tram *et al.*, 2003; Xi *et al.*, 2005; Zchori-Fein *et al.*, 1998), дает основания полагать, что такое расположение является наиболее благоприятным для передачи бактерии. Однако, подобная концентрация *Wolbachia* не является универсальной (Veneti *et al.*, 2004). В связи с различиями, обнаруживаемыми при изучении локализации бактерии в позднем оогенезе, необходимо рассмотрение нескольких механизмов, потенциально обеспечивающих попадание симбионта в клетки зародышевого пути. К числу таких механизмов можно отнести альтернативный путь ассоциации *Wolbachia* с ядрами эмбриона (Callaini *et al.*, 1994; Kose, Karr, 1995; Tram *et al.*, 2003). Поскольку в раннем эмбриогенезе лишь небольшая часть ядер синцития достигает заднего полюса, связь *Wolbachia* тем или иным способом с этими ядрами обеспечивает ей интеграцию в клетки зародышевого пути. Представляется, что некоторые бактериальные линии, такие, например, как *wRi* реализуют именно этот путь для попадания в полярные клетки (Callaini *et al.*, 1994). Поскольку лишь небольшая часть ядер синцития – около 3% – попадает в область заднего полюса, лишь очень небольшая часть бактериальной популяции потенциально может попасть в клетки зародышевого пути. Возможно, именно поэтому титр *wRi* в эмбрионах *D. simulans* почти в шесть раз выше, чем в

эмбрионах *D. melanogaster* (Veneti *et al.*, 2004). Повышенную концентрацию бактерии можно рассматривать как своеобразный буфер, смягчающий последствия снижения бактериального титра вследствие неблагоприятных воздействий, таких как возраст хозяина, генетический фон хозяина и доступность корма.

1.3.8.2. Локализация, распределение и плотность *Wolbachia* в сперматогенезе

Сперматогенез *Drosophila* проходит в семенниках, представляющих собой длинную трубку с прямым апикальным и спиральным дистальным концом. В каждом семеннике в зародышевом пролиферативном центре на апикальном конце семенников находится небольшое число (16-18 у личинок, 5-9 у имаго) стволовых клеток зародышевой линии, располагающихся вокруг компактной группы специализированных соматических клеток – hub. Каждая стволовая клетка фланкирована парой соматических стволовых клеток, называемых клетками-предшественниками цист. Как и в оогенезе, деление стволовой клетки зародышевой линии приводит к появлению двух клеток, одна из которых остается стволовой и сохраняет связь с hub, а другая – гониабласт – приступает к дифференциации. Результатом деления соматической клетки-предшественника становится появление двух дочерних клеток, одна из которых остается связанной с hub, а другая дифференцируется в клетку цисты. Каждый гониабласт окружен двумя клетками цисты, которые далее не делятся, но дифференцируются вместе с зародышевой клеткой и ее митотическим и мейотическим потомством. Группа из двух клеток цисты и единственного гониабласта называется цистой, циста является основной единицей дифференциации в сперматогенезе. Гониабласт четырежды (у *D. melanogaster*) делится митотически, в результате чего образуются шестнадцать сперматогониев, располагающихся между двумя клетками цисты. Как и при оогенезе, четыре последовательных митоза

характеризуются незавершенным цитокинезом, поэтому зародышевые клетки остаются соединенными друг с другом цитоплазматическими мостиками – круговыми каналами. Структура и биогенез круговых каналов различаются у самцов и самок *D. melanogaster*. Разветвленная, богатая мембранами структура, называемая фузмой, проходит через круговые каналы к каждой зародышевой клетке цисты.

После четырех циклов митотических делений клетки синхронно вступают в премейотическую S-фазу, а затем в мейотическую профазу как первичные сперматоциты. Период первичного сперматоцита, занимающий около 3.5 дней, характеризуется интенсивным клеточным ростом и 25-кратным увеличением объема клетки, а также интенсивной генной экспрессией. В число генов, транскрибируемых на стадии первичного сперматоцита, входят гены, кодирующие белки, необходимые для сперматогенеза, а также гены, кодирующие специфические для мужской зародышевой линии клеток изоформы белков. В конце периода роста первичного сперматоцита уровень транскрипции резко снижается, и сперматоциты последовательно вступают в мейоз I и мейоз II. Результатом этих двух делений становится появление 64 гаплоидных сперматид. В постмейотический период в сперматиде происходят критические морфологические изменения, включающие слияние митохондрий, элонгацию базальной аксонемы и уменьшение объема ядра. Коровые гистоны сперматидной ДНК удаляются и замещаются протаминами, обеспечивающими более плотную упаковку ДНК в головке сперматозоида. Сферическая головка сперматозоида и ядро принимают вытянутую копьевидную форму. Кроме того, сперматиды подвергаются актин-зависимому процессу, называемому индивидуализацией, в ходе которой кольцевые каналы, цитоплазма, органеллы отделяются в пузырек на дистальном конце хвоста спермия и выбрасываются из созревшей мужской половой клетки (Tokuyasu *et al.*, 1972).

Исследование распределения и плотности *Wolbachia* в сперматогенезе *Drosophila* показало, что на стадии гониабластов *Wolbachia* представлена в них на очень низком уровне – 4-5 бактерии на клетку (Riparbelli *et al.*, 2007). По мере

того, как происходят гониальные деления, бактерия обособляется в сперматогониальных клетках. Механизм распределения *Wolbachia* между этими клетками до настоящего времени остается невыясненным. Бактерия не проявляет очевидной ассоциации с центромерами или микротрубочками, что способствовало бы ее равномерному распределению между делящимися клетками, не существует доказательств в поддержку транспорта *Wolbachia* между сперматогониями через круговые каналы. Сегрегация *Wolbachia* с дочерними клетками во время гониальных делений весьма несовершенна, поскольку цисты содержат как инфицированные, так и неинфицированные сперматогонии, а наблюдения полностью инфицированных цист свидетельствуют о значительной изменчивости бактериальной плотности в сперматогониях (Clark *et al.*, 2002, 2003; Riparbelli *et al.*, 2007). Уровень *Wolbachia* возрастает после превращения сперматогониев в сперматоциты. На стадии первичного сперматоцита плотность бактерии, вероятно, за счет ее репликации повышается до 30-50 на клетку; дополнительным источником *Wolbachia* могут быть и соседние соматические клетки (Serbus *et al.*, 2008). Общее число бактерий на цисту при мейотических делениях остается постоянным, в этот период бактерия проявляет тесную ассоциацию с микротрубочками делящихся сперматоцитов. В метафазе *Wolbachia* концентрируется на экваторе, где наиболее высока концентрация плюс-концов микротрубочек, а в период поздней анафазы скапливается у полюсов, что обеспечивает равномерное разделение бактерий между дочерними клетками. В телофазе *Wolbachia* концентрируется около центра организации микротрубочек, связанного с каждым дочерним ядром. Поскольку бактерия сохраняет тесную связь с микротрубочками на протяжении сперматогенеза и движется в направлении минус конца, то такое движение от экватора к полюсам может поддерживаться денеином. Плюс-концевые моторы, такие как кинезин, могут быть использованы для концентрации на экваторе во время метафазы.

Wolbachia удаляется из половой клетки при завершении сперматогенеза. В период индивидуализации бактерия попадает в цитоплазматический пузырек на дистальном конце сперматозоида и элиминируется.

Сперматозоиды, формирующиеся в инфицированных *Wolbachia* семенниках, характеризуются повышенной частотой морфологических нарушений по сравнению со сперматозоидами, образующимися у неинфицированных самцов. К числу таких нарушений относятся базальное положение ядра, слившиеся сперматозоиды, неправильное положение аксонемы, две аксонемы на сперматиду и неудачная индивидуализация. Эти нарушения объясняют снижение фертильности инфицированных самцов (de Crespigny *et al.*, 2006; Snook *et al.*, 2000).

1.3.9. Клеточные культуры насекомых, инфицированные *Wolbachia*

Исследования молекулярных механизмов взаимодействия геномов насекомых и *Wolbachia* длительное время сдерживалось из-за отсутствия упрощенной модели, в которой эффекты паразита и симбионта проявлялись бы в «чистом виде» и не маскировались нервно-гуморальной системой хозяина. Такой упрощенной моделью является клеточная культура, в которой клетки хозяина инфицированы симбиотической бактерией. Клеточная культура состоит из большого числа одинаковых клеток и в значительной степени открыта для экспериментальных манипуляций, что позволяет изучать индуцибельную экспрессию и сайленсинг генов как насекомых, так и бактерии. Кроме того, геном клеток хозяина в клеточной культуре нестабилен, ее формирование сопровождается полиплоидизацией и активизацией перемещений мобильных генетических элементов (Yoshioka *et al.*, 1992; Kim *et al.*, 1994; Andrianov *et al.*, 1999).

Первая пересеваемая клеточная культура насекомых была получена в 1962 году из клеток яичника *Antheraea eucalypti* – эвкалиптового шелкопряда (Grace, 1962). Сейчас охарактеризованные клеточные культуры получены более чем 70-ти видов насекомых (Lynn, 2001). Несмотря на значительный прогресс в этой области, получение культуры клеток остается до настоящего времени нетривиальной и весьма длительной процедурой, занимающей период времени от

нескольких недель до одного года. Чаще всего для получения клеточной культуры используются эмбрионы насекомых, поскольку яйца легко стерилизуются и дезагрегируются. Полученные культуры обычно содержат несколько типов клеток, и лишь очень немногие культуры были клонированы из единственной клетки (Echalier, 1997).

Необходимость культивирования *Wolbachia* в культуре клеток насекомых объясняется невозможностью длительного существования бактерии во внеклеточной среде (Rasgon *et al.*, 2006a).

Первая инфицированная *Wolbachia* пересеваемая клеточная культура насекомых получена в 1997 году из яиц комаров *Ae. albopictus* и названа Aa23 (O'Neil *et al.*, 1997). После обработки тетрациклином Aa23 была получена излеченная от *Wolbachia* культура клеток Aa23T. Показано, что в Aa23T стабильно поддерживаются различные линии *Wolbachia* из супергрупп А и В после инфицирования монослоя Aa23T методом центрифугирования (Dobson *et al.*, 2002).

С другой стороны, бактериальная линия может поддерживаться в различных клеточных культурах, например, wRi способна стабильно сохраняться в культурах клеток *D. melanogaster* (S2), *Ae. albopictus* (Aa23T) и *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) (SF9).

Wolbachia из клеточной культуры Aa23 легко переносится в клеточные культуры гемоцитоподобных клеток Sua5B *An. gambiae* – вида, для которого неизвестна естественная инфекция *Wolbachia* (Rasgon *et al.*, 2006b). Отклик транскриптома клеток пересеваемой клеточной линии Sua5B на заражение двумя штаммами *Wolbachia* (wAlbB) из *Aedes albopictus* и (wRi) из *D. simulans* не одинаков (Hughes *et al.*, 2011). Показано, что 389 генов ингибируются *Wolbachia* и 320 генов активируются, причем оба штамма *Wolbachia* влияют только на 104 гена, из которых у 11 генов транскрипция активируется, а у 74 генов – ингибируется. Здесь следует отметить, что, хотя пересеваемые клеточные культуры являются, несомненно, наиболее подходящим объектом для трактовки транскриптомных данных, поскольку они представлены одним типом клеток,

перенос закономерностей, выявленных на клеточных культурах, на уровень целого организма требует определенной осторожности.

Наиболее интересной с точки зрения исследования механизмов взаимодействия геномов хозяина и симбионта является линия *wMelPop*. Ранние попытки создания клеточной культуры Aa23T, инфицированной этой линией, заканчивались неудачей, поскольку после нескольких пассажей *wMelPop* терялась. Успешными оказались всего 2% из 68 независимых экспериментов. В одном из них после инфекции Aa23T штаммом *wMelPop* клетки пассировались два с половиной года (237 пассажей) перед тем, как *Wolbachia wMelPop* была перенесена в клетки *Ae. aegypti* RML-12 и *An. gambiae* MOS-55. Вторичное инфицирование *wMelPop* из Aa23 в RML-12 и MOS-55 прошло существенно успешнее, чем первичное. Инфекция прошла 60 пассажей перед тем, как была реинтродуцирована из RML-12 в своего нативного хозяина – *D. melanogaster w¹¹¹⁸* микроинъекцией яиц, полученных от предварительно вылеченных от *Wolbachia* тетрациклином самок *w¹¹¹⁸*. Инфицированные *Wolbachia* две изосамочные линии были названы *wMelPop-CLA1* и *wMelPop-CLA2* (McMeniman *et al.*, 2008). Свойства полученных линий описаны в разделе «плотность». После четырех лет культивирования *Wolbachia* в комаре был получен третий субклон патогенной *Wolbachia (wMelPop-PGYP)*.

На стабильность инфекции в клеточной культуре оказывает влияние генетический фон хозяина. Перенос *wMel* в клеточные линии Aa23 и C6/36 *Ae. albopictus* закончился потерей *Wolbachia* в линии Aa23 после 12-го пассажа и стабильной инфекцией с относительно высоким бактериальным титром в линии C6/36 (Voronin *et al.*, 2010).

Визуализация *Wolbachia* в клеточной культуре может быть осуществлена при окрашивании бактерии красителем SYTO11, либо при окрашивании по методу FISH. Оба метода одинаково эффективны (Venard *et al.*, 2011).

1.3.10 Перспективы использования *Wolbachia* для контроля численности насекомых и подавления способности к переносу вирусов и простейших

На протяжении длительного времени контроль численности насекомых, прежде всего вредителей сельскохозяйственных культур и переносчиков особо опасных инфекций человека, был основан на применении методов, позволяющих снижать численность популяций вредителей и переносчиков. Для целей снижения численности до настоящего времени активно применяются химические средства борьбы и различные биологические методы. В линейке биологических методов защиты значительное место отводится насекомым-паразитам вредителей, в том числе паразитическим осам родов *Muscidifurax* и *Trichogramma*, используемым для защиты от мух и различных чешуекрылых – вредителей сахарного тростника, кукурузы, хлопчатника, сахарной свеклы, виноградников, капусты, помидоров, риса, сливы, яблони, леса (Smith, 1996). Самки ос откладывают яйца в куколки или яйца вида-хозяина. Партеногенетические системы, которые формируются у некоторых представителей указанных родов под действием *Wolbachia*, представляются привлекательными, поскольку обеспечивают появление исключительно женского потомства у инфицированных матерей.

Другой подход к ограничению численности вредителей и переносчиков основан на эффекте цитоплазматической несовместимости, следствием которой является стерильность инфицированных *Wolbachia* самцов. Под эгидой Всемирной организации здравоохранения принципиальная возможность использования этого метода была успешно продемонстрирована почти пятьдесят лет назад при полевых испытаниях в Бирме на переносчиках филариозов человека комарах *C. quinquefasciatus* (Laven, 1967).

Развитие методологии контроля постепенно приводит к ориентации стратегий контроля на инновационные биологические методы, основанные на применении агентов, снижающих продолжительность жизни имаго и повышающих устойчивость переносчиков к возбудителям заболеваний. Эти подходы оказываются весьма эффективными для переносчиков особо опасных

инфекций, прежде всего малярии. При уменьшении продолжительности жизни имаго снижается вероятность передачи возбудителя заболевания человеку, либо такая передача полностью прерывается. С другой стороны, повышение устойчивости переносчиков к возбудителям заболеваний исключает саму возможность передачи инфекции человеку. С этих позиций *Wolbachia* рассматривается как перспективный агент контроля инфекционных заболеваний.

Методологически реализация второго направления может быть осуществлена после искусственного межвидового переноса бактерии, поскольку протективные антипаразитарные эффекты *Wolbachia* наблюдаются у реципиентов бактерии на новом для нее генетическом фоне. Эти эффекты в ряде случаев отличаются от эффектов донорной бактериальной линии у естественного хозяина. Исследования по межвидовому переносу в настоящее время особенно активно проводятся на комарах рода *Aedes* и рода *Anopheles*, которые являются переносчиками особо опасных инфекций человека – вируса Денге (DENV), вируса птичьего гриппа, желтой лихорадки, малярии. Подобные эксперименты с теоретической точки зрения представляют интерес для изучения поведения симбионта на необычном для него генетическом фоне и реакции хозяина на инфекцию. Практическое значение такого рода работ связано с перспективами использования *Wolbachia* в качестве агента контроля численности переносчиков.

До настоящего времени *Wolbachia* не была найдена ни у комаров *Ae. aegypti*, ни у комаров *Anopheles gambiae*, также, как и у других видов рода *Anopheles*. После переноса линии *wMelPop* комарам *Ae. aegypti* продолжительность жизни инфицированных насекомых сокращается наполовину, однако у зараженных особей ингибируется развитие паразитических для комаров филариальных нематод (Kambris *et al.*, 2009). Заражение *Ae. aegypti* линией *wMelPop-CLA* приводит к ингибированию инфицирования вирусами Денге, птичьего гриппа и простейшими *Plasmodium gallinaceum* (Moreira *et al.*, 2009). Снижение титра вируса Денге и полная блокировка потенциальной передачи вируса у 37.5% зараженных особей наблюдалась после заражения нового хозяина – *Ae. aegypti* линией *wAlbB* – естественным симбионтом *Ae. albopictus* (Bian *et al.*,

2010). Ранее было показано, что эта бактериальная линия стабильно поддерживается у *Ae. aegypti*, обнаруживает 100% материнское наследование и вызывает полную цитоплазматическую несовместимость (Xi *et al.*, 2005). Высокий уровень цитоплазматической несовместимости после инфицирования линией wAlbB наблюдается и у *An. stephensi* – основного переносчика малярии на Ближнем Востоке и Южной Азии, у которого wAlbB обеспечивает повышенную устойчивость к возбудителю тропической малярии человека *P. falciparum* (Bian *et al.*, 2013). Однако эта же линия *Wolbachia* wAlbB не обеспечивает защиту от *DENV* у своего естественного хозяина *Ae. albopictus* (Bian *et al.*, 2010). Заражение *An. gambiae* линией wMelPop так же, как и в случае с *Ae. aegypti*, приводит к очень высокой смертности инфицированных бактерией комаров, но и эта линия, и линия wAlbB обеспечивают снижение количества ооцитов *P. falciparum* в кишечнике зараженных особей *An. gambiae* (Hughes *et al.*, 2011, Kambris *et al.*, 2010).

Для объяснения механизмов блокирования патогенных для насекомого микроорганизмов сформулировано несколько гипотез. Высказано предположение, что симбионт, проникая в организм хозяина, активирует его иммунную систему для последующего взаимодействия с патогенами (Kambris *et al.*, 2009, Moreira *et al.*, 2009, Teixeira *et al.*, 2008, Pan *et al.*, 2012). Эта гипотеза нашла подтверждение в исследованиях экспрессии системы антибактериального ответа на окислительный стресс (Pan *et al.*, 2012). Вторая гипотеза связывает устойчивость к патогенам с конкуренцией за критические ресурсы между *Wolbachia*, имеющей редуцированный геном и зависящей от метаболизма хозяина, и паразитическими микроорганизмами (Caragata *et al.*, 2013, Wu *et al.*, 2004).

Исследования молекулярных механизмов противовирусного действия *Wolbachia* в отношении вируса Денге (*DENV*) у *Ae. aegypti* (Pan *et al.*, 2012) показали, что у комаров, инфицированных wAlbB, под влиянием бактерии происходит активация экспрессии НАДФ-оксидазы, фермента, катализирующего реакцию, приводящую в итоге к появлению супероксидного радикала. Под действием этой активной формы кислорода индуцируется экспрессия Toll сигнального пути, запускающего в свою очередь индукцию экспрессии генов

антиоксидантной системы защиты и антибактериальных пептидов – цекропинов (CERD) и дефенсинов (DEFC). Антибактериальные пептиды активно подавляют пролиферацию вируса Денге у *Ae. aegypti*, тогда как антиоксидантные пептиды включают комплекс защитных реакций клетки, направленных на нейтрализацию разрушительного действия кислородных радикалов. Заражение *Wolbachia* сопровождается подавлением экспрессии генов IMD сигнального пути, включенного в распознавание бактериальной инфекции.

Wolbachia способна защищать хозяина от паразитических простейших при коинфекции. Средняя продолжительность жизни комаров *Culex pipiens quinquefasciatus* из линий, соинфицированных *Wolbachia* и *Plasmodium relictum*, оказалась выше, чем продолжительность жизни *C. pipiens quinquefasciatus*, зараженных только *P. relictum* (Zélé et al., 2012). Это исследование ставит под вопросы перспективы использования бактерии для борьбы с переносчиками малярии. Здесь следует отметить, что для комаров *C. pipiens quinquefasciatus* бактериальная инфекция является естественной.

ГЛАВА 2. Материалы и методы

2.1.1. Насекомые

Линии *Drosophila melanogaster*. Исследование биологических эффектов, влияющих на адаптационные возможности насекомого-хозяина, в том числе продолжительность жизни, старение и гибель, конкурентоспособность, устойчивость к энтомопатогенам, предпочтение к субстратам при откладке яиц, а также предпочтения в скрещиваниях было проведено на лабораторной линии *Drosophila melanogaster* № 95, инфицированной *Wolbachia*, линиях 95/6, 95/8, вылеченных от *Wolbachia*, линиях дикого типа – Oregon-R (Or) и S1b (S). Генотип самок линии № 95 – C(1)RM, $y \nu f/Y^{bb-}$ (желтое тело и щетинки, алые глаза, сломанные щетинки), генотип самцов этой линии – $w sn/Y^{bb-}$ (белые глаза, завитые щетинки), у особей обоих полов в кариотипе представлена мутантная Y-хромосома с частичной делецией кластера рНК-генов – Y^{bb-} , у самок X-хромосомы сцеплены. Линия Or является линией дикого типа со стандартным генотипом, линия S1b была получена Александровым И.Д. (ОИЯИ) от линии дикого типа с Сейшельских островов, является высоко инбредной линией, прошедшей через почти 300 поколений близкородственных (брат×сестра) скрещиваний. Линии Oregon-R (Or) и S1b (S) были использованы в качестве контрольных в экспериментах по изучению продолжительности жизни, старения и гибели самок с различным инфекционным статусом.

Для изучения предпочтений самок и конкурентоспособности самцов была создана инфицированная *Wolbachia* линии мух с красными глазами – C(1)RM, $y \nu f/Y^{bb-}/w^{-}sn^{-}$, отличающаяся от 95 линии X-хромосомой самца и аутосомами. Для этого самок линии №95 скрестили с самцами дикого типа. После обработки сублиний этой линии тетрациклином по описанной ниже методике были получены неинфицированные сублинии с генотипом C(1)RM, $y \nu f/Y^{bb-}/w^{-}sn^{-}$.

Изучение сравнительной конкурентоспособности линий с *Wolbachia* и без нее были проведены на линиях 95, 95/6, 95/8 и тестерной линии. В качестве тестерной использована линия с генотипом C(2L) RM, dp ; C(2R) RM, px со

сцепленными левым и правым плечами хромосомы 2, маркированная рецессивными мутациями гена *dp* (*dumpy wings* – косо обрезанные крылья) и *px* (*plexus* – дополнительные жилки на крыльях) соответственно.

Для получения клеточной культуры *D. melanogaster*, инфицированной *Wolbachia*, были использованы инфицированные бактерией линия «Черноморка» (линия дикого типа) и лабораторная линия F32.

Линия *Drosophila simulans* – линия дикого типа, инфицированная *Wolbachia*.

Линии *D. virilis*. Линии *Drosophila* из группы *virilis* были тестированы на зараженность *W. pipientis*. Список линий приведен в таблице 2.1.1.

***H. axyridis*.** Сбор насекомых для изучения генетической структуры популяций по митохондриальным маркерам и инфицированности популяций симбиотическими бактериями был проведен в семи локалитетах нативного ареала, представляющих западную и восточную группы популяций *H. axyridis* (Блехман и др., 2010, Блехман, 2014) и шести локалитетах инвазивного ареала вида (Табл. 2.1.2, рис. 2.1.1). Сбор жуков из популяций Денвера, Берлина, Мюнхена, Парижа, Турина, Калининграда, Сочи, поселка Барабаш проводился в размножающихся колониях, из остальных популяций – во время осеннего лета на зимовку.

Для целей микросателлитного анализа использованы насекомые из популяций нативного и инвазивного ареала, а также биоконтрольные линии (таблица 2.1.3).

Таблица 2.1.1 – Изосамочные линии *D. virilis* из природных популяций и мутантная лабораторная линия 160, тестированные на наличие инфекции *Wolbachia*

Линия <i>D. virilis</i>	Происхождение и год получения линии
<i>D. virilis, 1</i>	Ереван, 1969
<i>D. virilis, 9</i>	Батуми, 1965
<i>D. virilis, 10</i>	Баку, 1965
<i>D. virilis, 13</i>	Краснодар, 1965
<i>D. virilis, 25</i>	Мцхети, 1967
<i>D. virilis, 40</i>	Магарач, 1968
<i>D. virilis, 42</i>	Ялта, 1971
<i>D. virilis, 59</i>	Сейшелы, 1984
<i>D. virilis, 101</i>	Япония, 1966
<i>D. virilis, 117</i>	Нью-Мексико, 1966
<i>D. virilis, 118</i>	Япония, 1993
<i>D. virilis, 160</i>	мутантная лабораторная линия
<i>D. virilis, 119</i>	Китай, 1993
<i>D. virilis, 121</i>	Чили, 1993
<i>D. virilis, 122</i>	Аргентина, 1993
<i>D. virilis, 124</i>	Калифорния, 1993
<i>D. virilis, Sa96</i>	Япония, 1996
<i>D. virilis, 123</i>	Пасадена, США 1993

Таблица 2.1.2 – Места сборов *H. axyridis* в нативном и инвазивном ареале

Статус популяции	Место сбора	Период сбора	Число самок
Инвазивные	Денвер (США)	Сентябрь 2004	35
	Турин (Италия)	Октябрь 2006	12
	Берлин (Германия)	Июль 2008	30
	Мюнхен (Германия)	Июль 2015	39
	Париж (Франция)	Июль 2015	13
	Прага (Чехия)	Ноябрь 2011	26
	Калининград (Россия)	Август 2010	34
	Сочи (Россия)	Май 2013	42
Нативные	Новосибирск (Россия)	Сентябрь 2006	26
	Горно-Алтайск (Россия)	Сентябрь 2005	20
	Саяны, 120 км от Абакана (Россия)	Октябрь 2011	23
	Биробиджан (Россия)	осень 2009	36
	Бухта Троицы, залив Петра Великого (Россия)	осень 2003	45
	Владивосток (Россия)	осень 2009 [□]	48
	Поселок Барабаш, Южное Приморье (Россия)	22-30 мая 2015	3
	Киото (Япония)	Май 2010	14

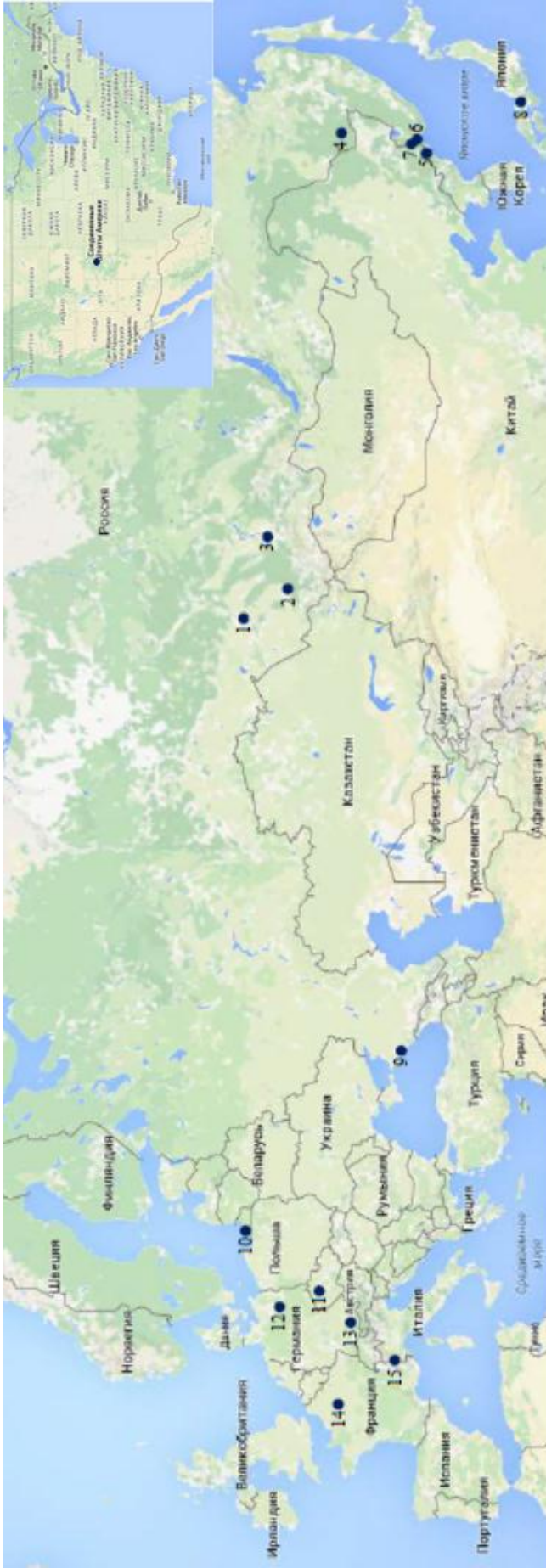


Рисунок 2.1.1 – Точки сборов *H. axyoidis* для изучения генетической структуры популяций по митохондриальным маркерам и инфицированности популяций симбиотическими бактериями. 1 – Новосибирск, 2 – Горно-Алтайск, 3 – Саяны, 4 – Birobidzhan, 5 – бухта Troitsy, 6 – Владивосток, 7 – поселок Barabash, 8 – Киото, 9 – Сочи, 10 – Калининград, 11 – Прага, 12 – Берлин, 13 – Мюнхен, 14 – Париж, 15 – Турин. Синий кружок на врезке – Денвер.

Таблица 2.1.3 – Нативные, биоконтрольные и инвазивные популяции *H. axyridis*, изученные с использованием STR-маркеров

Название и код популяции	Информация о происхождении и место сбора и	Число генотипированных особей
N-Russia1	Нативный ареал: Абакан, Россия	31
N-Russia2	Нативный ареал: Новосибирск, Россия	30
N-Kazak	Нативный ареал, Алматы, Казахстан	26
N-China1	Нативный ареал: Пекин, Китай	28
N-China2	Нативный ареал: Шилинь, Китай	35
N-China3	Нативный ареал: Чаньчунь, Китай	29
N-Japan1	Нативный ареал: Фучу, Япония	36
N-Japan2	Нативный ареал: Киото, Япония	26
N-Korea	Нативный ареал: Тэдон, Южная Корея	30
ЕВ-INRA87(*)	Европейская биоконтрольная: лаборатория INRA История – потомки жуков из популяции Китая, сбор 1982 г.	18
ЕВ-INRA06	Европейская биоконтрольная: лаборатория INRA История: потомки ЕВ-INRA87	27
ЕВ-Biotop	Европейская биоконтрольная: биофабрика «Biotop» История: линия, полученная «Biotop» от линии ЕВ-INRA87 в 1995	29
ЕВ-Koppert(*)	Европейская биоконтрольная: биофабрика «Koppert» История: линия получена «Koppert» от ЕВ-Biotop в 1997	20
ЕВ-Biobest(*)	Европейская биоконтрольная: лаборатория Гентского университета (получена от биофабрики «Biobest» в 2003) История: линия получена «Biobest» от ЕВ-Biotop 1997	27
UB-US(*)	Североамериканская биоконтрольная: Сбор насекомых выполнен USDA (http://www.ars-grin.gov/cgi-bin/nigrp/robo/f941s.pl.50902)	25
I-ENA	Инвазивный ареал: Джойс, США	34
I-WNA	Инвазивный ареал: Саннисайд, США	42
I-EU	Инвазивный ареал: Гент, Бельгия	32
I-SA	Инвазивный ареал, Куритиба, Бразилия	30
I-AF	Инвазивный ареал: Сомерсет, Южная Африка	31

Комары комплекса *An. maculipennis*. Комары комплекса *An. maculipennis* были собраны в 2004-2015 гг. в Кыргызстане, Узбекистане, Таджикистане, Туркменистане, Грузии, Армении, Азербайджане, России, Казахстане. Места и даты сбора насекомых приведены в Приложении А, Б, В.

Первичная идентификация насекомых на стадии личинок и имаго проводилась по морфологическим признакам (Гуцевич *и др.*, 1970; Званцов *и др.*, 2003).

2.1.2. Вылечивание линии №95 от *Wolbachia*

Для получения свободных от *Wolbachia* сублиний линии №95 в еще жидкую теплую стандартную среду для дрозофилы (пекарские дрожжи, манная крупа, изюм, сахар, агар, вода, пропионовая кислота как ингибитор плесени) добавлялся тетрациклин в концентрации 0,1 мг/мл среды, который предварительно был растворен в 50%-ном этаноле. В пробирки с 5 мл такой застывшей и смоченной дрожжевой суспензией среды помещалось 25-30 родительских пар линии №95; по истечении суток родителей удаляли. После завершения цикла развития мух (при 25⁰С) и начала вылета имаго был случайным образом проведен отбор самок F₁ с разным (2-е и 7-е сутки) сроком вылета. Отобранные самки были скрещены с самцами-сибсами для получения индивидуальных безбактериальных культур.

Контрольные линии Or и S обрабатывались тетрациклином по такому же протоколу.

2.1.3. Оценка продолжительности жизни имаго *D. melanogaster*

Оценка продолжительности жизни самок инфицированной *Wolbachia* линии №95 и безбактериальных сублиний 95/6 и 95/8 проводилась через 8-10 поколений после обработки мух антибиотиком для исключения влияния тетрациклина. Перед началом эксперимента проводилось тестирование линий на наличие и отсутствие инфекции. Из каждой линии дважды с перерывом в сутки были отобраны по 40

девственных самок, рассаженные по 10 особей в пробирки со стандартной средой, пробирки помещались в термостат при 25⁰С. Каждые двое суток пробирки просматривались, погибшие самки учитывались, жизнеспособные самки пересаживались в новые пробирки со свежей средой на протяжении всего периода наблюдения до того момента, пока не погибала последняя самка.

Повторный эксперимент с вышеназванными тремя линиями, а также с набором контрольных линий Or и S, как не обработанных, так и обработанных тетрациклином, был проведен через полгода после первого по аналогичному протоколу.

2.1.4. Оценка конкурентоспособности инфицированных и неинфицированных *Wolbachia* мух *D. melanogaster*

Для оценки конкурентоспособности инфицированных и неинфицированных *Wolbachia* мух *D. melanogaster* проводили сбор девственных самок и самцов одновременно из трех анализируемых линий (№ 95, 95/6 и 95/8) и тестер-линии на протяжении 5 дней. Далее в каждую пробирку со стандартной средой помещали на 7 суток по 10 пар родителей анализируемой линии и тестер-линии, которых на 8-е сутки пересаживали в новые пробирки со свежей стандартной средой на следующий 7-суточный период, после чего родителей удаляли. После завершения развития при 25⁰С и начала вылета F₁ в течение 9 суток проводили количественный учет выживших в условиях конкуренции особей анализируемой линии и тестер-линии, различаемых по фенотипу. Для количественной оценки конкурентоспособности (приспособленности) использовался индекс конкуренции, представляющий собой долю потомков анализируемой линии среди общего числа потомков F₁ (Jungen, Hartl, 1979; Haymer, Hartl, 1982).

Статистическую обработку данных проводили с помощью программы SAS (SAS Institute, Inc. 1988). Для вычисления средних значений 50% (Г50) и 90% (Г90) гибели самок в опытах по оценке продолжительности жизни имаго и

средних значений индекса конкуренции со стандартными ошибками использовали процедуру MEANS, а для попарного сравнения средних – процедуру TTEST.

2.1.5. Исследования сравнительной устойчивости Wb^+ и Wb^- сублиний *D. melanogaster* к энтомопатогенному грибу *Bauveria bassiana*

Для исследования сравнительной устойчивости Wb^+ и Wb^- сублиний *D. melanogaster* был использован штамм *B. bassiana* НС-СЛОЗ, полученный из коллекции энтомопатогенных аскомицетов ООО "Нива". Культура гриба поддерживалась на среде Сабуро. Для синхронного спороношения развитый мицелий охлаждался до 15⁰С на 24 ч. Конидии смывались струей дистиллированной воды с добавлением тритон Х-100 в концентрации 0,1%, трижды отмывались избытком дистиллированной воды. Концентрация конидий подсчитывалась в гемоцитометре. Предварительно наркотизированные одновозрастные молодые мухи из линии №95, инфицированной *Wolbachia*, и безбактериальных сублиний 95/6 и 95/8 погружались в приготовленную суспензию спор с концентрацией конидий 5×10^7 в 1 мл, затем помещались на чистую фильтровальную бумагу; живые особи после удаления избытка жидкости с поверхности тела переносились в пробирку с кормом. Пробирки с контрольной и опытной группой мух помещались во влажную камеру. Через 2 суток после прекращения случайной гибели, связанной с намоканием, мух извлекали из камеры, усыпляли эфиром и подсчитывали живых особей. После завершения периода массовой гибели в контрольной и опытной группах повторно производился подсчет выживших особей.

Оценка достоверности различий проводилась на основании критерия Стьюдента.

2.1.6. Оценка предпочтений Wb^+ и Wb^- сублиний мух *D. melanogaster* к субстратам при откладке яиц

Для оценки предпочтений Wb^+ и Wb^- сублиний мух *D. melanogaster* при откладке яиц был проведен тест, в котором мухам предлагалось два типа субстратов. Равное число родительских пар обеих сублиний, выращенных на стандартном корме на основе пшеничной крупы, помещали в камеры, в которых находилось два вида корма на основе пшеничной, либо овсяной крупы, приготовленного по общепринятой методике. Через 10 часов родителей удаляли, отложенные ими яйца подсчитывали и оставляли развиваться до вылупления имаго. Вылупившихся имаго подсчитывали.

Отношение числа отложенных яиц и/или число развившихся на обоих субстратах имаго использовали как меру предпочтения.

2.1.7. Оценка влияния *Wolbachia* на конкурентоспособность самок и самцов *D. melanogaster* в скрещиваниях

В исследованиях по оценке предпочтений в скрещиваниях и конкурентоспособности были использованы несколько лабораторных линий *D. melanogaster*. Базовой линией стала линия №95 – «белоглазая» линия, инфицированная *Wolbachia*; в настоящем эксперименте для удобства обсуждения эта линия обозначается как IW (infected white). Кроме линии №95 были использованы красноглазая инфицированная линия – IR (infected red) и вылеченные от бактерии сублинии линий IW и IR, обозначаемые в настоящем эксперименте 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.

Все линии содержались при температуре $25 \pm 0,5^\circ\text{C}$ в пробирках диаметром 25 мм, содержащих 5-7 мл стандартной среды. Для исключения влияния на

поведение мух избыточной плотности, в эксперименте были использованы *Drosophila* из культур с числом развившихся мух 50-80 на пробирку.

В тестах были использованы 6-8 дневные самцы и 8-10 дневные виргинные самки. Мухи были определены по полу и рассажены в первые 12 часов после вылупления. Отсаживание проводилось без эфира с использованием aspirатора. Тесты по оценке влияния *Wolbachia* на конкурентоспособность самок и самцов *D. melanogaster* в скрещиваниях проводились в стандартных пробирках диаметром 18 мм на стандартной среде (3 мл на пробирку). Самки и самцы пересаживались в экспериментальные пробирки с помощью aspirатора. Эксперимент начинался в 14⁰⁰ и продолжался в течение 5 часов.

2.1.7.1. Оценка предпочтений в скрещиваниях самок *D. melanogaster* с различным инфекционным статусом

Для оценки предпочтений самок *D. melanogaster* было проведено два типа экспериментов.

В первом были изучены предпочтения самок при скрещиваниях с самцами с различным инфекционным статусом и различными аллелями по локусу *white*. В пробирку помещались самка одной из двух линий – W^+ , либо W и два самца один с красными глазами (IR или CR), а другой с белыми глазами (IW либо CW). Наблюдение проводилось до успешной копуляции. Генотип копулирующих самцов определялся визуально, по цвету глаз.

В эксперименте второго типа были изучены предпочтения самок при скрещиваниях с самцами с различным инфекционным статусом, но с одинаковыми аллелями по локусу *white* и *singed*. Два самца с одинаковым цветом глаз, но с различным инфекционным статусом и самка из той же линии, что и один из двух самцов, помещались в пробирку. Наблюдение проводилось до успешной копуляции. Сразу же после начала копуляции неkopулирующий самец извлекался из пробирки для определения инфекционного статуса. Самцов

различали по проколу на крыле, сделанному в субмаргинальных ячейках. Проколы проводились под эфирным наркозом в первый день после вылупления, но не позднее, чем за 6 дней до тестирования. Метились правое крыло инфицированного самца и левое крыло неинфицированного самца. Такие проколы, сделанные под легким наркозом не менее, чем за три дня до эксперимента, не влияют на поведение самцов при скрещиваниях (Куликов, Митрофанов, 1990).

2.1.7.2. Оценка предпочтений самцов *D. melanogaster* с различным инфекционным статусом

Для оценки предпочтений самцов *D. melanogaster* двадцать виргинных самок из белоглазой (10 IW и 10 CW) (первая серия скрещиваний) или из красноглазой (10 IR и 10 CR) (вторая серия скрещиваний) линий и самец IW или CW в первой серии скрещиваний и IR или CR во второй серии скрещиваний, помещались в пробирку диаметром 24 мм, содержащую 6 мл среды. Через 24 часа самки переносились в индивидуальные пробирки с 5 мл среды. За самками наблюдали 5 дней. Отсутствие личинок на конец временного интервала указывало на то, что самка не была оплодотворена. Инфекционный статус оплодотворенных самок определялся методом ПЦР с праймерами *wsp81F/wsp691R*, гомологичными участку гена *wspA Wolbachia*.

Для сравнения наблюдаемого распределения с ожидаемым был использован критерий χ^2 , G-тест для сравнения двух наблюдаемых распределений и t-тест для сравнения среднего числа оплодотворенных самок из различных повторений в третьем эксперименте.

Точный тест Фишера был использован в небольшом числе случаев, когда число наблюдений оказывалось невелико. Для оценки различий в предпочтениях при скрещиваниях инфицированных и неинфицированных самцов в эксперименте 3 был использован U-критерий Манна-Уитни и критерий знаков для оценки различий.

2.1.8. Изучение передачи *Wolbachia* через гамету самца в межвидовых и внутривидовых скрещиваниях

Для изучения передачи *Wolbachia* через гамету самца девственные самки линии «Черноморка», выведенные от *Wolbachia*, скрещивались индивидуально с инфицированными самцами *D. simulans* дикого типа в межвидовых скрещиваниях, либо с изогенными самцами *D. melanogaster*, инфицированными *Wolbachia*, при внутривидовых скрещиваниях. Затем девственные самки F₁ скрещивались с самцами-братьями, родителей F₁ удаляли при появлении личинок F₂. Молекулярно-генетический анализ на *Wolbachia* по шести генам MLST был проведен для каждого самца и самки в поколении F₁. При получении положительного сигнала у самок F₁ и подтверждении специфичности маркерного фрагмента секвенированием, проводился анализ потомства F₂ *Wolbachia*-положительных самок.

2.1.9. Изучение плотности бактериальной популяции в F₁ и F₂ после передачи *Wolbachia* через гамету самца

Изучение плотности бактериальной популяции после передачи через гамету самца проведено во внутривидовых скрещиваниях *D. melanogaster* методом полуколичественной ПЦР с использованием в качестве маркера гена *coxA*. Оценка количества ДНК специфичного для *Wolbachia* ПЦР-фрагмента, полученного на контрольной ДНК в серии последовательных 10х разведений, позволило определить область концентраций, в которой возможна количественная оценка ДНК *Wolbachia* в образцах ДНК из индивидуальных мух.

2.1.10. Оценка уровня генетического груза в популяциях *H. axyridis*

Материалом для исследований служили три нативные и три инвазивные популяции *H. axyridis*. В каждой популяции в 2007-2008 гг. было собрано около

100 имаго (соотношение полов соответствовало 1:1). Величина селективно-нейтральной генетической изменчивости оценивалась по 18 микросателлитным локусам (Loiseau *et al.*, 2009) у особей поколения P (от 26 до 31 особи на популяцию) из каждой собранной популяции. Для характеристики генетической изменчивости был проведен расчет средней ожидаемой гетерозиготности H_e (Nei, 1987) и среднего числа аллелей с помощью пакета программ Genepop (Raymond, Rousset, 1995a). Оценка уровня межпопуляционной генетической изменчивости проведена с использованием Genepop pairwise F_{ST} (Weir, Cockerham, 1984).

Для каждой из шести популяций особи, собранные в природе – поколение P, были использованы для основания лабораторных популяций, которые поддерживались на протяжении двух поколений в строго контролируемых условиях, оптимальных для лабораторного культивирования данного вида: температуре 23°C, относительной влажности 65%, с фотопериодом L:D 14:10. Для каждой популяции из особей P-поколения было создано около 50 пар и получено поколение F₁. Затем были проведены случайные скрещивания 50 пар особей из поколения F₁ для получения поколения F₂. Сразу после вылупления самцы и самки поколения F₂ были разделены для предотвращения спариваний и содержались индивидуально в течение двух недель до достижения репродуктивной зрелости.

По три половозрелых самки-сестры поколения F₂ из десяти семей каждой популяции были случайным образом скрещены: 1 – с одним из неродственных самцов из той же популяции, 2 – с самцом из другой неродственной случайно выбранной популяции с тем же биогеографическим статусом (из инвазивной, либо нативной), 3 – с самцом из случайно выбранной популяции с противоположным биогеографическим статусом. От каждой пары были собраны по две кладки яиц (отбирались кладки с числом яиц не менее 20). В день вылупления (на четвертый день после откладки яиц) было отобрано по восемь личинок от каждой кладки. Личинки содержались индивидуально. Для яиц и личинок были определены: 1 – процент вылупления, 2 – число выживших личинок, и 3 – время развития как период развития от яйца до имаго. Подгруппа

особей, достигших половой зрелости, была использована для дополнительных исследований. Через десять дней после вылупления одна самка F_3 из каждой семьи подсаживалась к потенциальному партнеру. Каждую самку подсаживали к самцу на период в 24 часа. В течение недели одна и та же самка подсаживалась к трем различным самцам. Данная процедура исключала эффект конкуренции самцов. Самцы были случайным образом выбраны из колоний, полученных смешиванием особей из шести различных популяций для минимизации отклонений, связанных с идентичностью самцов. На спаривавшихся F_3 -самках была проведена оценка времени достижения половой зрелости (как число дней от вылупления из куколки до первой яйцекладки) и плодовитости (как число яиц, отложенных в первые восемь дней после начала откладки яиц. Полученные данные были использованы для формирования двух комбинированных характеристик, связанных с приспособленностью – времени поколения и эффективности жизненного цикла (Facon *et al.*, 2011).

2.2. Молекулярно-генетические методы

2.2.1. Выделение ДНК

Выделение тотальной ДНК из насекомых проводилось методом фенол-хлороформной экстракции (Маниатис *и др.*, 1984). Для выделения ДНК из комаров в некоторых случаях использовался набор для выделения ДНК D1AtomTM DNA Prep (Изоген, Россия). Выделение проводилось в соответствии с инструкцией фирмы-производителя.

Концентрация ДНК полученных образцов определялась на спектрофотометре NanoDrop 8000 (ThermoScientific, США).

2.2.2. ПЦР

Реакция амплификации проводилась в конечном объеме 25 мкл с использованием наборов для амплификации "EncycloPlus PCR kit" в соответствии с инструкцией фирмы производителя. Реакция амплификации для идентификации бактериальных линий при изучении рекомбинационных событий в клеточной культуре проводилась с использованием набора TersusPlus PCR kit (Евроген, Россия) с высокоточной полимеразой Tersus (кат.# PK121).

2.2.2.1. Идентификация и мультилокусное типирование *Wolbachia*

Идентификация *Wolbachia* в образцах ДНК лабораторных линий *D. melanogaster*, *D. simulans*, *D. virilis*, а также идентификация бактерии в образцах ДНК *H. axyridis* из популяций нативного и инвазивного ареала проводилась с праймерами, комплементарными внутреннему фрагменту гена *fbpA* *Wolbachia* (Baldo *et al.*, 2006).

Мультилокусное типирование проводилось по стандартной схеме, включающей 5 генов MLST – *coxA*, *fbpA*, *ftsZ*, *gatB*, *hcpA*, и описанным ранее условиям (Baldo *et al.*, 2006). Для мультилокусного типирования *Wolbachia* *D. melanogaster* и *D. simulans* праймеры были адаптированы для *wMel* и *wRi* (Таблица 2.2.1).

Для мультилокусного типирования *Wolbachia* *H. axyridis* использовались стандартные праймеры (Baldo *et al.*, 2006). Реакция амплификации проводилась в конечном объеме 25 мкл в следующих условиях: начальная денатурация – 1 цикл: – 4 мин 95⁰С, за которой следовали 5 циклов: денатурация – 30 сек при 95⁰С, отжиг – 40 сек при начальной t_1^{0} С с использованием функции автодельта (понижение температуры на 1⁰С в каждом цикле), полимеризация 40 сек при 72⁰С. Затем следовали 34 цикла: денатурация – 30 сек при 95⁰С, отжиг – 40 сек при t_2^{0} С и полимеризация – 40 сек при 72⁰С. Затем следовал цикл заключительной

полимеризации – 5 мин при 72⁰С. Температуры отжига t₁⁰С и t₂⁰С для каждой пары праймеров приведены в таблице 2.2.2.

При изучении ассортативности скрещиваний и идентификации *Wolbachia* в пересеваемой клеточной культуре *D. melanogaster*, идентификация бактерии проводилась по гену *wspA* (ген белка оболочки) с праймерами *wsp81F*: 5'–GTCCAATAAGTGATGAAGAAAC–3' и *wsp691R*: 5'–AAAAATTAAACGCTACTCCA–3', специфичными к участку гена *wsp* *Wolbachia* по ранее описанным условиям (Braig *et al.*, 1998). Дополнительное типирование *Wolbachia* у *H. axyridis* по гену *wspA* также было проведено с праймерами *wsp81F* и *wsp691R*.

Таблица 2.2.1 – Праймеры, использованные для мультилокусного типирования *Wolbachia D. melanogaster* и *D. simulans*

ген	праймеры	Tm ⁰ С	Размер MLST-фрагмента (пн.)
<i>gatB</i>	<i>gatB_F1</i> 5'-GATTTAAATCGTGCACGGGTT-3' <i>gatB_R1</i> 5'- TGGCAACTCGGGCAAAGATGA-3'	60	369
<i>coxA</i>	<i>coxA_F1</i> 5'-TTGGGGCGATCAACTTTATAG-3' <i>coxA_R1</i> 5'-CTAAAGACTTTTACACCAGT-3'	57	402
<i>hcpA</i>	<i>hcpA_F1</i> 5'-GAAATAACAGTTGCTGCAAA-3' <i>hcpA_R1</i> 5'-GAAAGACGAGCAAGTTCTG-3'	59	444
<i>ftsZ</i>	<i>ftsZ_F1</i> 5'-ATTATGGAGCATATAAAAGATAG-3' <i>ftsZ_R1</i> 5'-TCAAGGAATGGATTAGATAT-3'	57	435
<i>fbpA</i>	<i>fbpA_F1</i> 5'-GCTGCTCCACTTGGTATGAT-3' <i>fbpA_R1</i> 5'-CCACCAGAAAAACTACTATTC-3'	62	429
<i>wspA</i>	<i>wsp-F1</i> 5'-GTCCAATAAGTGATGAAGAAAC-3' <i>wsp-R1</i> 5'-CTGCACCAACAGTGCTGTAAC-3'	55	546

Таблица 2.2.2 – Праймеры для мультилокусного типирования (MLST) *Wolbachia H. axyridis*

ген	праймеры	t ₁ ⁰ C	t ₂ ⁰ C
<i>gatB</i>	F 5'–GAKTTAAA YCGYGCAGGBGTT–3' R 5'–TGGYAA YTCRGGYAAAGATGA–3'	60	57
<i>coxA</i>	F 5'–TTGGRGCRATYAACTTTATAG–3' R 5'–CTAAAGACTTTKACRCCAGT–3'	57	54
<i>hspA</i>	F 5'–GAAATARCAGTTGCTGCAAA–3' R 5'–GAAAGTYRAGCAAGYTCTG–3'	59	56
<i>ftsZ</i>	F 5'–ATYATGGARCATATAAARGATAG–3' R 5'–TCRAGYAATGGATTRGATAT–3'	57	54
<i>fbpA</i>	F 5'–GCTGCTCCRCCTTGGYWTGAT–3' R 5'–CCRCCAGARAAAAYYACTATTC–3'	62	58
<i>wspA</i>	F <i>wsp81</i> 5'–TGGTCCAATAAGTGATGAAGAAAC–3' R <i>wsp691</i> 5'–AAAAATTAAACGCTACTCCA–3'	55	52

2.2.2.2. Идентификация *Rickettsia* и *Spiroplasma*

Для выявления самок *H. axyridis*, инфицированных *Rickettsia*, были использованы разработанные нами праймеры RicF141 5'–TCGGTTCTCTTTCGGCATTTTA–3' и RicR548 5'–GCATATTTATCACCGCTTCATT–3', комплементарные фрагменту гена цитратсинтазы (*gltA*) *Rickettsia* – эндосимбионта *Adalia decempunctata* (GenBank ID: FJ666768). Условия амплификации: начальная денатурация – 4 минуты при 95⁰C, затем 36 циклов: денатурация 30 секунд при температуре 94⁰C, отжиг – 40 секунд при 60⁰C и полимеризация 30 секунд при 72⁰C. Реакция завершалась заключительной полимеризацией при 72⁰C в течение 5 минут.

Для выявления самок, инфицированных *Spiroplasma*, использовались праймеры SP-ITS-JO4 5'–GCCAGAAGTCAGTGTCCSTAACCG–3' и SP-ITS-N55 5'–ATTCCAAGCCATCCACCATACG–3' (Majerus *et al.*, 1999), гомологичные области ДНК, включающей фрагмент гена 16S рРНК, межгенного спейсера ITS1 и

фрагмент гена 23S рРНК. Условия амплификации: начальная денатурация – 4 минуты при 95⁰С, затем 38 циклов: денатурация 30 секунд при температуре 94⁰С, отжиг – 40 секунд при 59⁰С и полимеризация 30 секунд при 72⁰С. Реакция завершалась заключительной полимеризацией при 72⁰С в течение 5 минут.

2.2.2.3. Идентификация Y-хромосомы в клетках клеточной культуры

Идентификацию Y-хромосомы в клеточных клонах проводили с праймерами Dm-dy-f 5'-GCTGCAGGCGGTAATAGAAG-3' и Dm-dy-r 5'-TTGCATTTGCGGATCAATAA-3', гомологичными сцепленному с Y-хромосомой *Drosophila* фрагменту гена *kl-2* (*1-beta dynein heavy chain*) (Koerich *et al.*, 2008).

2.2.2.4. Амплификация фрагмента гена *coxI*

Амплификация фрагмента гена *coxI* *H. axyridis* и комаров комплекса *An. maculipennis* проводилась с праймерами LCO1490 5'-GGTCAACAААТСАТАААГАТАТТGG-3' HCO2198 5'-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAATCA-3' по описанным ранее условиям (Folmer *et al.*, 1994).

2.2.2.5. Идентификация комаров комплекса *An. maculipennis*

Идентификация комаров комплекса *An. maculipennis* выполнялась в несколько этапов. На первом этапе проводилась ПЦР с праймерами 5.8S 5'-TGTGAACTGCAGGACACATG-3' и 28S 5'-ATGCTTAAATTTAGGGGGTA-3', гомологичными области второго внутреннего транскрибируемого спейсера кластера рибосомных генов, фланкированной генами 5.8S и 28S рРНК (Porter, Collins, 1991). На втором этапе проводилась пошаговая рестрикция ПЦР-

продукта, позволяющая идентифицировать виды комплекса по специфическому паттерну рестрикции.

Обработка рестриктазой *CfoI* (Promega Corporation, USA) позволяет идентифицировать виды *An. atroparvus*, *An. maculipennis*, *An. sacharovi* (Nikolescu *et al.*, 2004). Идентификация других видов комплекса *An. messeae*, *An. daciae*, *An. melanoon*, *An. artemievi* проводилась последовательно с использованием соответствующих ферментов рестрикции. Схема и специфические паттерны рестрикции представлены на рисунках 2.2.1 А–В.

В тех случаях, когда требовалась дифференциация видов *An. maculipennis*, *An. artemievi* и *An. martinius*, проводился анализ ПДРФ с использованием эндонуклеазы *AluI*, позволяющий по паттерну рестрикции проводить одношаговую дифференциацию этих трех видов на основании размера наиболее крупного фрагмента рестрикции (Рис. 2.2.2.).

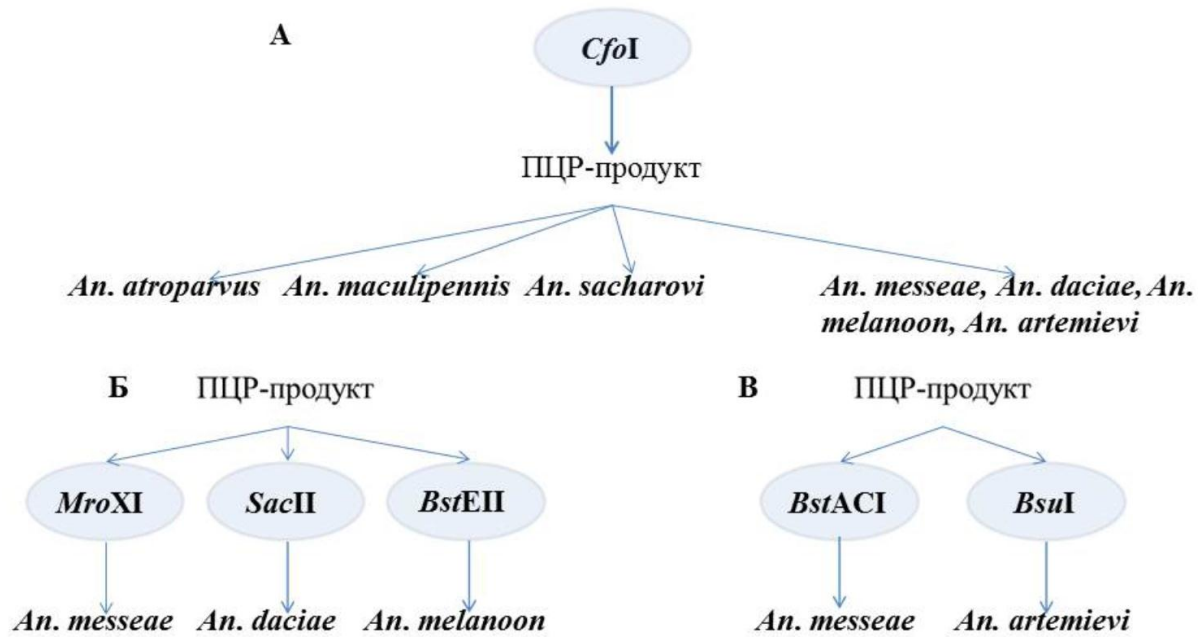


Рисунок 2.2.1 – Схема пошаговой рестрикции ПЦР-продуктов, полученных в результате амплификации ДНК видов комплекса *An. maculipennis* с праймерами 5.8S и 28S в целях идентификации видов комплекса. А – первый шаг - рестрикция с использованием эндонуклеазы *CfoI* позволяет идентифицировать три вида – *An. atroparvus*, *An. maculipennis*, *An. sacharovi*. Б – второй шаг – рестрикционный анализ с использованием специфических эндонуклеаз (*MroXI*, *SacII*, *BstEII*) позволяет дифференцировать виды *An. messeae*, *An. daciae*, *An. melanoon*. В – третий шаг – рестрикционный анализ с использованием специфических эндонуклеаз (*BstACI*, *BsuI*) позволяет дифференцировать виды *An. messeae* и *An. artemievi*.

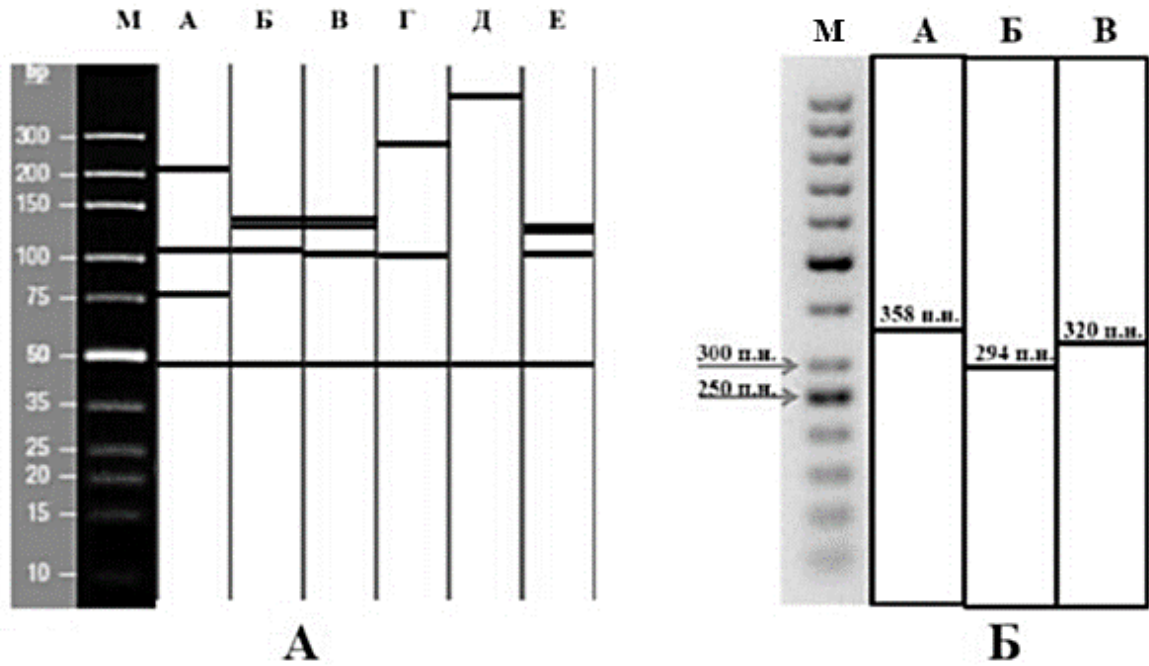


Рисунок 2.2.2 – А – Схема паттернов рестрикции после обработки рестриктазой *CfoI* ПЦР-продукта, полученного в результате амплификации ДНК комаров комплекса *An. maculipennis* с праймерами 5.8S и 28S. М – маркер молекулярного веса, столбец А – *An. sacharovi* (48, 78, 11, 207 п.н.), Б – *An. messeae* (48, 111, 135, 141 п.н.), В – *An. melanoon* (48, 108, 135, 141 п.н.), Г – *An. maculipennis* (48, 102, 272 п.н.), Д – *An. atroparvus* (48, 389 п.н.), Е – *An. artemievi* (48, 107, 129, 135 п.н.). Б – Схема паттернов рестрикции после обработки ПЦР-продукта полученного в результате амплификации ДНК комаров комплекса *An. maculipennis*. М – маркер молекулярного веса, А – *An. maculipennis*, Б – *An. artemievi*, В – *An. martinius*.

2.2.2.6. Микросателлитный анализ

Микросателлитный анализ образцов ДНК *H. axyridis* был проведен с использованием разработанных ранее (Loiseau *et al.*, 2009) 18 пар праймеров (Таблица 2.2.3).

Мультиплексная ПЦР проводилась с использованием двух мультилокусных наборов праймеров, включающих восемь и десять локусов соответственно (см. таблицу). Мультиплексная ПЦР проводилась с использованием QIAGEN Multiplex kit на термоциклере AB Veriti 96 well TC (Applied Biosystems) (США), 2 мкл геномной ДНК (≈ 10 нг) добавлялись к 8 мкл смеси, содержащей 1X QIAGEN-буфер, воду и праймеры в финальной концентрации 0.2 мкмоль за исключением праймеров для локусов HA282 (0,04 мкмоль), HA105, HA194b, HA223 (0.1 мкмоль).

ПЦР проводилась в следующих условиях – начальная денатурация при 94⁰С в течение 15 минут, за которой следовали 25 циклов – денатурации 94⁰С 30 с, отжиг – 57⁰С, 60 с и полимеризация 72⁰С, 2 мин; заключительная денатурация – 60⁰С в течение 30 мин. По 2 мкл разведенного ПЦР-продукта (1:10) смешивалось с 0.25 мкл 500 LIZ Size Standard (Applied Biosystems) и 8.75 мкл формамида (Applied Biosystems). Затем проводился электрофорез продукта на приборе для капиллярного гель-электрофореза ABI PRISM 3130 (Applied Biosystems).

Для визуализации продуктов амплификации проводился электрофорез в 1.5% агарозном геле.

2.2.3. Элюция продуктов амплификации

Фрагменты, полученные в результате амплификации, очищались в 1.5% агарозном геле. Элюция фрагментов из геля проводилась с использованием набора для элюции Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit (Zymo Research, USA) в соответствии с инструкцией фирмы-производителя.

Таблица 2.2.3 – Характеристика микросателлитных локусов и последовательностей праймеров для микросателлитного анализа *H. axyridis* (Loiseau *et al.*, 2008).

	Локус	Повторяющийся мотив	Последовательность праймера 5'-3'	Флуоресцентный краситель	Размер фрагмента
PCR 1	Ha-244	(TG) ₁₀ TC(TG) ₂	F: TGACGGACGCACGAAGAT R: ACAGCTGACCATAGAGGATCG	FAM	81–96
	Ha-201	(CA) ₈	F: CTTCGCCATCATCCACTAGG R: GTGCGGTCAATTAATTCAGGC	FAM	306–319
	Ha-555	(CA) ₁₀	F: GATGCGCCCTCTAGAAAAG R: CCCTATAACGCCAACAATG	VIC	75–85
	Ha-605	(GA) ₁₆	F: TCCGACGCACAGATAACAGA R: GTTACGTTGACCCGTCGC	VIC	134–167
	Ha-281	(TG) ₇	F: TTCGCACGTTCCATTGTTC R: GCCGTTTGCGGTATGTTC	NED	134–147
	Ha-627	(GA) ₁₁	F: CGTAACTTTAACGATCACTCAGC R: GAACATTGTCTTCGCGTGG	NED	227–254
	Ha-565	(GA) ₁₀	F: TCTGAACATTCGACCTACATAGT R: AATGCGTGATGAACGACC	NED	326–334
	Ha-234	(CA) ₈	F: GCTAAAACCAACGTCAGG R: CTCGCGCGATTATTGGAC	PET	128–138
PCR 2	Ha-267	(AC) ₈	F: AACCTGTAATTCGATTGTGGAAC R: CCGACCTGACSTTTCGTC	FAM	177–187
	Ha-005	(GA) ₅	F: AGGGTGTGTATGTAGAACAGAGG R: AACCGCAATAACTCGATTGG	FAM	275–279
	Ha-253	(CA) ₇	F: GATACATCGTCSTTTCAGTCCTC R: CCTGCAAACSTTCCAGACC	VIC	182–188
	Ha-105	(GA) ₅	F: CGCCTAACAAATAGGCATCAC R: AGGGTGGAGAATGGAATAACC	VIC	240–243
	Ha-194b	(GCA) ₄	F: ACCAGATTGCTGCTTGGATT R: ACAAATTGGGCGTGAGAAAC	NED	80–83
	Ha-215	(CA) ₇	F: CGAATCAATAACCCTAGGCG R: AGCGATCTCCTGTTCTACGG	NED	174–182
	Ha-223	(TG) ₆	F: TCGTTTAACCGTGATAGGAGAG R: ACGAATTCCGAAAGATGAGG	NED	229–233
	Ha-094	(TAGA) ₅	F: TTAGTCGGCGGGTCCATC R: GGGCCGATAAGTCAAACGAG	PET	350–359

2.2.4. Клонирование

При изучении процессов рекомбинации у *Wolbachia* клонирование продуктов ПЦР проводили в Т-вектор (pAL2-Т вектор, кат. #ТА002) (Евроген, Россия) в соответствии с рекомендациями фирмы-производителя.

Клонирование фрагментов амплификации гена 16S рНК, межгенного спейсера ITS1 и фрагмент гена 23S рНК *Spiroplasma* выполнялось с использованием плазмиды pGEM TEasy Vector (Promega, США) в соответствии с инструкцией фирмы производителя.

2.2.5. Секвенирование

Секвенирование продуктов амплификации проводилось с прямого и обратного праймеров на приборе ABI PRISM 3500 с использованием реагентов BigDye[®] Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, США) согласно рекомендациям фирмы-производителя. Последовательности выравнивались с помощью алгоритма Clustal W, реализованного в пакете программ MEGA 6.06 (Tamura *et al.*, 2011).

2.3. Оценка внутри- и межпопуляционной изменчивости в популяциях *H. axyridis*

Генетическая изменчивость в образцах оценивалась количественно путем вычисления средней ожидаемой гетерозиготности H_e (Nei, 1987) и среднего аллельного разнообразия (AR) с использованием метода rarefaction (Leberg, 2002) в программе FSTAT 2.9.3.2 (Goudet, 2002). Межпопуляционная генетическая изменчивость оценивалась путем вычисления попарных F_{st} (Weir, Cockerham, 1984) с использованием Genepop (Raymond, Rousset, 1995b). Точные тесты для определения генетической дифференциации популяций (Raymond, Rousset 1995a)

были проведены для всех пар популяций нативного ареала на том же программном обеспечении. Поскольку эти тесты включали неортогональные и множественные сравнения, уровни значимости были скорректированы с помощью метода Бенжамина-Хочберга (Benjamini, Hochberg, 1995). Для определения числа возможных популяций в границах нативного ареала *H. axyridis* был реализован кластерный подход с использованием STRUCTURE 2.3.3 (Pritchard *et al.*, 2000). Поскольку материал состоял из достаточно большого числа образцов собранных в немногочисленных дискретных удаленных друг от друга локалитетах, для анализа была выбрана модель, подразумевающая возможность миграционных потоков между популяциями (admixture) с коррелированными частотами аллелей (Schwartz, McKelvey, 2009). Информация о местах сборов оценивалась как наиболее важная (Hubisz *et al.*, 2009). Для остальных параметров программного обеспечения были использованы значения по умолчанию. Тестирование числа возможных популяций производилось с помощью 10^6 итераций Марковских Цепей Монте-Карло, с отбрасыванием первых 10^5 итераций. Тестировались величины K (вероятное число популяций) от 1 до 9 (число локальностей, в которых были собраны образцы). В целях сбора статистики по значениям и средней дисперсии логарифма значения функции правдоподобия для каждого числа K анализ повторялся 20 раз. Тестирование гипотезы об изоляции расстоянием проводилось для нативного ареала *H. axyridis*. Модель изоляции расстоянием предсказывает, что генетические расстояния между популяциями, измеряемые как попарные $F_{ST}/(1-F_{ST})$, возрастают приблизительно линейно с логарифмом пространственных расстояний (Rousset 1997). Уровень статистической значимости корреляции между натуральным логарифмом дистанций и попарным $F_{ST}/(1-F_{ST})$ был определен с использованием теста Мантеля с помощью 10000 пермутаций на коэффициент ранговой корреляции Спирмена в программе SPAGeDI (Hardy, Vekemans, 2002).

2.4. Филогенетический и статистический анализ

Идентификация аллельного профиля штаммов *Wolbachia* по результатам мультилокусного типирования проводилась на основе анализа контигов из 5 генов длиной 2079 пн. каждый. Фрагменты генов были включены в контиг в следующем порядке: *coxA*, *fbpA*, *ftsZ*, *gatB*, *hcrA*. Для филогенетического анализа использовались аналогичные последовательности 26 линий *Wolbachia* из базы данных Genbank (Таблица 2.4.1). Филогенетический анализ фрагмента гена *fbpA* длиной 428 пн проводился для тех линий, которые были типированы на основании структуры только этого фрагмента. Для филогенетического анализа использовались аналогичные последовательности 42 линий *Wolbachia* из базы данных Genbank (Таблица 2.4.2).

Для филогенетического анализа линий *Rickettsia* было использовано 17 гомологичных последовательностей из GenBank. Выравнивание было выполнено для последовательности длиной 391 пн. соответствующей 152-539 пн. референсной последовательности из GenBank ID: FJ666768. В качестве внешней группы была использована *Rickettsia* – эндосимбионт *Rhyzobius litura*.

Для филогенетического анализа линий *Spiroplasma* было использовано 13 наиболее близких гомологичных последовательностей из GenBank. Выравнивание было выполнено для последовательности длиной 257 пн., соответствующей 39-295 пн. референсной последовательности из GenBank ID: AB127932.1. В качестве внешней группы были использованы *Spiroplasma* – эндосимбионты *D. willistoni* и *D. melanogaster*.

Последовательности выравнивались с помощью алгоритма MUSCLE (Edgar, 2004), реализованного в пакете программ MEGA v.5.1 (Tamura *et al.*, 2011). Филогенетические реконструкции методом оценки обратных вероятностей были произведены в программе MrBayes v.3.2.1 (Ronquist *et al.*, 2012) с использованием модели молекулярной эволюции GTR+G+I. Выбор модели эволюции проводился в программе MEGA 7.0. Реконструкции проводились в 1 млн. поколений для комаров комплекса «*maculipennis*», 400 тыс. поколений для *Wolbachia* при

типировании по MLST и 7 млн. поколений при типировании только по *fbpA*, 2 млн. поколений для *Rickettsia*, 8 млн. поколений для *Spiroplasma* и завершались при стандартном отклонении разделенных частот в 0.002.

Для статистического анализа данных использован пакет программ для точного непараметрического анализа StatXact (<http://www.cytel.com/software/statxact>). Для построения точных доверительных интервалов для долей был использован метод Клоппера-Пирсона, точный метод Фишера применялся для проверки однородности в таблицах сопряженности 2x2 и его обобщение на случай таблиц RxC – критерий Фишера-Фримена-Холтона.

Построение медианной сети митохондриальных гаплотипов *H. axyridis* проведено в программе TCS (Clement *et al.*, 2000).

Таблица 2.4.1 – Штаммы *Wolbachia*, использованные для филогенетического анализа с использованием MLST

№	Название штамма <i>Wolbachia</i> на филограмме	Отряд	Полное видовое название вида-хозяина	Супергруппа <i>Wolbachia</i>
1	A. bipunctata-Moscow	Coleoptera	<i>Adalia bipunctata</i> (Linnaeus, 1758)	B
2	A. japonica	Hymenoptera	<i>Asobara japonica</i> (Belokobylskij, 1998)	A
3	B. malayi	Spirurida	<i>Brugia malayi</i> (Brug, 1927)	D
4	C. lectularius	Hemiptera	<i>Cimex lectularius</i> (Linnaeus, 1758)	F
5	C. p.pipiens	Diptera	<i>Culex pipiens</i> f. pipiens (Linnaeus, 1758)	B
6	C. pennsylvanicus	Hymenoptera	<i>Camponotus pennsylvanicus</i> (De Geer, 1773)	A
7	D. melanogaster-wMel	Diptera	<i>Drosophila melanogaster</i> (Meigen, 1830)	A
8	D. neotestacea	Diptera	<i>Drosophila neotestacea</i> (Grimaldi, Jaenike, 1992)	A
9	D. simulans-wAu	Diptera	<i>Drosophila simulans</i> (Sturtevant, 1919)	A
10	D. simulans-wMa	Diptera	<i>Drosophila simulans</i> (Sturtevant, 1919)	B
11	D. simulans-wNo	Diptera	<i>Drosophila simulans</i> (Sturtevant, 1919)	B
12	D. simulans-wRi	Diptera	<i>Drosophila simulans</i> (Sturtevant, 1919)	A
13	H. axyridis-Kaliningrad	Coleoptera	<i>Harmonia axyridis</i> (Pallas, 1773)	B
14	H. axyridis-Sayani	Coleoptera	<i>Harmonia axyridis</i> (Pallas, 1773)	B
15	H. axyridis-Troisa	Coleoptera	<i>Harmonia axyridis</i> (Pallas, 1773)	A
16	L. orizophilus-1	Coleoptera	<i>Lissorhoptrus oryzophilus</i> Kuschel, 1952	B
17	L. orizophilus-2	Coleoptera	<i>Lissorhoptrus oryzophilus</i> Kuschel, 1952	B
18	M. uniraptor	Hymenoptera	<i>Muscidifurax uniraptor</i> Kogan & Legner, 1970	A
19	N. cervinus	Coleoptera	<i>Naupactus cervinus</i> (Boheman, 1840)	B
20	N. giraulti	Hymenoptera	<i>Nasonia giraulti</i> (Darling, 1990)	A
21	N. vitripennis	Hymenoptera	<i>Nasonia vitripennis</i> (Walker 1836)	A
22	P. chalcographus	Coleoptera	<i>Pityogenes chalcographus</i> (Linnaeus, 1761)	B
23	T. deion	Hymenoptera	<i>Trichogramma deion</i> (Pinto, Oatman 1986)	B
24	T. pueraricola-ST290	Acariformes	<i>Tetranychus pueraricola</i> (Ehara, Gotoh, 1996)	B
25	T. truncatus-ST289	Acariformes	<i>Tetranychus truncatus</i> (Ehara, 1956)	B
26	T.urticae-ST280	Acariformes	<i>Tetranychus urticae</i> (Koch, 1836)	B

Таблица 2.4.2 – Штаммы *Wolbachia*, использованные для филогенетического анализа на основании первичной структуры фрагмента гена *fbpA*

№	Название штамма <i>Wolbachia</i> на филограмме	Супергруппа <i>Wolbachia</i>	ID	Полное видовое название хозяина	Отряд
1	<i>Adalia bipunctata</i>	B	KM288832	<i>Adalia bipunctata</i> (Linnaeus, 1758)	Arthropoda:Insecta: Coleoptera
2	<i>Aphis fabae</i>	M	JN384038	<i>Aphis fabae</i> (Scopoli, 1763)	Arthropoda:Insecta: Hemiptera
3	<i>Asobara japonica</i>	A	HM241185	<i>Asobara japonica</i> (Belokobylskij, 1998)	Arthropoda:Insecta: Hymenoptera
4	<i>Baizongia pistaciae</i>	N	JN384039	<i>Baizongia pistaciae</i> (Linnaeus, 1767)	Arthropoda:Insecta: Hemiptera
5	<i>Bemisia tabaci</i>	O	KF454746	<i>Bemisia tabaci</i> (Gennadius, 1889)	Arthropoda:Insecta: Hemiptera
6	<i>Brugia malayi</i>	D	DQ842347	<i>Brugia malayi</i> (Brug, 1927)	Nematoda:Spirurida :Spirurida
7	<i>Brugia pahangi</i>	D	KU255319	<i>Brugia pahangi</i> (Buckley and Edeson, 1956)	Nematoda:Spirurida : Spirurida
8	<i>Brugia timori</i>	D	KU255320	<i>Brugia timori</i> (Partono et al., 1977)	Nematoda:Spirurida : Spirurida
9	<i>Cinara cedri</i>	J	JN384037	<i>Cinara cedri</i> (Curtis, 1835)	Arthropoda:Insecta: Hemiptera
10	<i>Cimex lectularius</i>	F	DQ842349	<i>Cimex lectularius</i> (Linnaeus, 1758)	Arthropoda:Insecta: Hemiptera
11	<i>Cimex lectularius</i>	F	KU255321	<i>Cimex lectularius</i> (Linnaeus, 1758)	Arthropoda:Insecta: Hemiptera
12	<i>Culex pipiens</i>	B	DQ842351	<i>Culex pipiens</i> f. <i>pipiens</i> (Linnaeus, 1758)	Arthropoda:Insecta: Diptera
13	<i>Camponotus pennsylvanicus</i>	A	DQ842350	<i>Camponotus pennsylvanicus</i> (De Geer, 1773)	Arthropoda:Insecta: Hymenoptera
14	<i>Drosophila melanogaster_wMel</i>	A	DQ842378	<i>Drosophila melanogaster</i> (Meigen, 1830)	Arthropoda:Insecta: Diptera
15	<i>Drosophila neotestacea</i>	A	DQ842355	<i>Drosophila neotestacea</i> (Grimaldi, Jaenike, 1992)	Arthropoda:Insecta: Diptera
16	<i>Drosophila simulans_wAu</i>	A	KF987030	<i>Drosophila simulans</i> (Sturtevant, 1919)	Arthropoda:Insecta: Diptera
17	<i>Drosophila simulans_wMa</i>	B	KF987033	<i>Drosophila simulans</i> (Sturtevant, 1919)	Arthropoda:Insecta: Diptera
18	<i>Drosophila simulans_wNo</i>	B	CP003883	<i>Drosophila simulans</i> (Sturtevant, 1919)	Arthropoda:Insecta: Diptera
19	<i>Drosophila simulans_wRi</i>	A	CP001391	<i>Drosophila simulans</i> (Sturtevant, 1919)	Arthropoda:Insecta: Diptera
20	<i>Folsomia candida</i>	E	KU255331	<i>Folsomia candida</i> (Willem 1902)	Arthropoda: Entognatha: Collembola
21	<i>Harmonia axyridis_1_2_1</i>	B		<i>Harmonia axyridis</i> (Pallas, 1773)	Arthropoda:Insecta: Coleoptera
22	<i>Harmonia axyridis_2_2_2</i>	B		<i>Harmonia axyridis</i> (Pallas, 1773)	Arthropoda:Insecta: Coleoptera

23	Harmonia_axyridis_3_2_3	B		<i>Harmonia axyridis</i> (Pallas, 1773)	Arthropoda:Insecta: Coleoptera
24	Harmonia_axyridis_3_2_4	B		<i>Harmonia axyridis</i> (Pallas, 1773)	Arthropoda:Insecta: Coleoptera
25	Harmonia_axyridis_GM_3_22	B		<i>Harmonia axyridis</i> (Pallas, 1773)	Arthropoda:Insecta: Coleoptera
26	Harmonia_axyridis_Kaliningrad	B		<i>Harmonia axyridis</i> (Pallas, 1773)	Arthropoda:Insecta: Coleoptera
27	Harmonia_axyridis_KP_2_6	N		<i>Harmonia axyridis</i> (Pallas, 1773)	Arthropoda:Insecta: Coleoptera
28	Harmonia_axyridis_M_14_15	E		<i>Harmonia axyridis</i> (Pallas, 1773)	Arthropoda:Insecta: Coleoptera
29	Harmonia_axyridis_P_1_3_9	A		<i>Harmonia axyridis</i> (Pallas, 1773)	Arthropoda:Insecta: Coleoptera
30	Harmonia_axyridis_Sayani	B		<i>Harmonia axyridis</i> (Pallas, 1773)	Arthropoda:Insecta: Coleoptera
31	Harmonia_axyridis_Troisa	A		<i>Harmonia axyridis</i> (Pallas, 1773)	Arthropoda:Insecta: Coleoptera
32	Hylaeus_variegatus	A	KP183278	<i>Hylaeus variegatus</i> (Fabricius, 1798)	Arthropoda:Insecta: Hymenoptera
33	Hyposoter_horticola	B	KF722988	<i>Hyposoter horticola</i> (Gravenhorst, 1829)	Arthropoda:Insecta: Hymenoptera
34	Leptopilina_clavipes	B	HM999654	<i>Leptopilina clavipes</i> (Förster, 1862)	Arthropoda:Insecta: Hymenoptera
35	Lissorhoptrus_orizophilus_1	B	GU478337	<i>Lissorhoptrus oryzophilus</i> (Kuschel, 1952)	Arthropoda:Insecta: Coleoptera
36	Lissorhoptrus_orizophilus_2	B	GU478336	<i>Lissorhoptrus oryzophilus</i> Kuschel, 1952	Arthropoda:Insecta: Coleoptera
37	Mansonella_perforata	F	KU255337	<i>Mansonella perforata</i> (Uni, Bain & Takaoka, 2004)	Nematoda:Secernentea: Spirurida
38	Muscidifurax_uniraptor	A	DQ842367	<i>Muscidifurax uniraptor</i> Kogan & Legner, 1970	Arthropoda:Insecta: Hymenoptera
39	Naupactus_cervinus	B	GU079632	<i>Naupactus cervinus</i> (Boheman, 1840)	Arthropoda:Insecta: Coleoptera
40	Nasonia_giraulti	A	DQ842368	<i>Nasonia giraulti</i> (Darling, 1990)	Arthropoda:Insecta: Hymenoptera
41	Nasonia_vitripennis	A	DQ842370	<i>Nasonia vitripennis</i> (Walker 1836)	Arthropoda:Insecta: Hymenoptera
42	Odontotermes_horni	F	GQ422848	<i>Odontotermes horni</i> (Wasmann, 1902)	Arthropoda:Insecta: Blattodea
43	Odontotermes_sp.	F	GQ422846	-	Arthropoda:Insecta: Blattodea
44	Onchocerca_cervipedis_1	C	JX075225	<i>Onchocerca cervipedis</i> (Wehr & Dikmans, 1935)	Nematoda: Secernentea: Spirurida
45	Onchocerca_cervipedis_2	C	JX075224	<i>Onchocerca cervipedis</i> (Wehr & Dikmans, 1935)	Nematoda: Secernentea: Spirurida
46	Onchocerca_ochengi	C	KU255342	<i>Onchocerca ochengi</i> (Bwangomoi, 1969)	Nematoda: Secernentea: Spirurida
47	Onchocerca_skrjabini	C	KU255343	<i>Onchocerca skrjabini</i> (Ruchljadew, 1961)	Nematoda: Secernentea: Spirurida
48	Pityogenes_chalcographus	B	FJ444857	<i>Pityogenes chalcographus</i> (Linnaeus, 1761)	Arthropoda:Insecta: Coleoptera

49	<i>Tetranychus_pueraricola</i>	B	JX094399	<i>Tetranychus pueraricola</i> (Ehara, Gotoh, 1996)	Acariformes
50	<i>Tetranychus_truncatus</i>	B	JX094397	<i>Tetranychus truncatus</i> (Ehara, 1956)	Acariformes
51	<i>Tetranychus_urticae</i>	B	JX094394	<i>Tetranychus urticae</i> (Koch, 1836)	Acariformes
52	<i>Toxoptera_citricida</i>	N	JN384040	<i>Toxoptera citricida</i> (Kirkaldy, 1907)	Arthropoda:Insecta: Hemiptera
53	<i>Trichogramma_deion</i>	B	DQ842376	<i>Trichogramma deion</i> (Pinto, Oatman 1986)	Arthropoda:Insecta: Hymenoptera

2.5. Получение клеточной линии *D. melanogaster*, инфицированной *Wolbachia*

Для получения клеточной культуры был модифицирован описанный ранее протокол (Echalier, 1997). Взрослые мухи помещались в пробирки со свежим кормом, откуда удалялись сразу же после откладки яиц. Пробирки с яйцами заливались щелочным раствором 2.5%-ного гипохлорита натрия для дехорионизации. Плавающие на поверхностной пленке дехорионизированные эмбрионы в стерильных условиях собирались и переносились иглой на поверхностную пленку аптечного препарата «Иодиол». К собранным в пробирку с иодиолом эмбрионам добавлялось три объема 70%-ного этанола. Эмбрионы осаждали при 800 g в течение 1 мин, затем промывали в том же режиме средой С46 с добавлением 20%-ной инактивированной сыворотки. После отмывки эмбрионы механически гомогенизировались и суспендировались в той же среде до концентрации примерно 2×10^6 мкл/мл, после чего клеточная суспензия высевалась в чашку Петри и культивировалась при 26°C. Рост первичной культуры отмечался через двое суток, а трансформация культуры в пересеваемую происходила в течение двух-шести месяцев.

2.6. Флуоресцентная гибридизация *in situ* *W. pipientis* в культуре клеток *D. melanogaster*

Визуализацию *Wolbachia* в клеточной культуре *D. melanogaster* проводилась методом флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH). Для приготовления фиксированных препаратов клеток суспензия 5-дневной культуры Dm2008Wb1 раскапывалась на чистые предметные стекла в концентрации 3 млн/мл и объеме 200 мкл. После осаждения клеток на стекло среда осторожно удалялась, а остатки среды высушивались в ламинарном шкафу в потоке воздуха. Клетки фиксировались на стекле добавлением 4% формальдегида в свежеприготовленном PBS-буфере при комнатной температуре в течение десяти минут. После фиксации

клеток стекла промывались сначала проточной, а затем дистиллированной водой и подсушивались в вертикальном положении на воздухе.

Прегибридизация препаратов проводилась в течение 1,5-2 часов при комнатной температуре в смеси 50% формамида, 0,3% DMSO, 0,5xSSC, 5xSSPE, 0,02% ДНК спермы лосося, 10mM DTT. Затем проводилась гибридизация с зондами W1 5'– (TAMRA)AATCCGGCCGARCCGACCC–3' и W2 5'– (TAMRA)СТТСТGTGAGTACCGTCATTATC–3', гомологичными 16S рДНК *Wolbachia*, мечеными родамином по 5'-концам. Буфер для гибридизации готовился из буфера для прегибридизации добавлением по 0.01 мкг каждого зонда на 2мл буфера. Гибридизация проводилась во влажной камере в течение 18 часов при 37°C.

По окончании гибридизации препараты отмывались дважды в 1xSSC – 10 mM DTT и дважды в 0.5xSSC -10mM DTT при 55°C по 15 минут, а затем в 1xPBS при комнатной температуре в течение 15 минут и в деионизованной воде.

Непосредственно перед наблюдением в флюоресцентном инвертированном микроскопе препараты окрашивались в капле 0.03% DAPI в течение 15 минут при комнатной температуре и отмывались в воде.

Визуализация *Wolbachia* проводилась при 1000x увеличении с фильтрами U-M536.

2.7. Инфицирование *W. pipentis* клеточных культур насекомых

Для заражения бактерией были использованы клеточные культуры *D. melanogaster* S2 (Shneider, 1972), *D. virilis* 79f7Dv3g, черного таракана *Blattella germanica* BGE1 и BGE2, комара *Ae. aegypti* C6. Для процедуры инфицирования полученную клеточную культуру Dm2008Wb1 выращивали до плотности 4×10^6 мкл/мл и снимали с поверхности культуральной чашки пипетированием. Бактерии отделяли от клеток фильтрованием через бумажный фильтр. В первых экспериментах клетки предварительно разрушали встряхиванием со стеклянными шариками, но впоследствии оказалось, что *Wolbachia* присутствует и в среде

интактной культуры, что позволило опустить этот этап выделения. Отсутствие клеток дрозодилы в фильтрованной среде контролировали микроскопически.

Для заражения выделенными бактериями культуры S2 (Shneider, 1972), в которой *Wolbachia* не обнаружена, клетки отделяли от среды центрифугированием в центрифужную пробирку, в которой находилась фильтрованная среда с *Wolbachia*. Инфицирование проводили по описанной ранее методике (Dobson *et al.*, 2002), совместным центрифугированием клеток *D. melanogaster* и *Wolbachia* при 2500g и 15⁰C в течение одного часа. После центрифугирования клетки суспендировались в среде C46 с 10% инактивированной сыворотки до концентрации 2×10^6 мкл/мл и переносились в чашку Петри для пассирования.

Тестирование культуры на заражение *Wolbachia* проводилось через два последовательных пассажа с разведением 1:5. В качестве контроля были использованы клетки с инактивированными бактериями, для чего среду с *Wolbachia* до опыта выдерживали при 56⁰C в течение 30 минут.

2.8. Приготовление препаратов политенных хромосом слюнных желез личинок IV возраста комаров рода *Anopheles*

Препараты политенных хромосом готовились по описанной ранее лактоацеторсеиновой методике (Кабанова *и др.*, 1972) из слюнных желез фиксированных сразу после сбора в спирт-уксусной смеси (3:1) личинок IV возраста комаров рода *Anopheles*. Препараты были использованы для цитодиагностики видов и изучения кариотипов. Рисунки дисков политенных хромосом исследуемых видов сравнивались с фотокартами хромосом известных видов комплекса "maculipennis" (Стегний, 1991).

ГЛАВА 3. Результаты

3.1 Генетическая идентификация видов малярийных комаров комплекса

An. maculipennis

Малярия – одно из наиболее распространенных и опасных заболеваний, от которого в мире в 2000 году по оценке Всемирной организации здравоохранения умерло 653–1100 тысячи человек. Масштабные миграции населения, осложнение политической обстановки и социально-экономических условий привели в 1995–1999 годах к ухудшению ситуации по малярии в Российской Федерации в связи с завозом малярии из Азербайджана и Таджикистана, где возникли эпидемии трехдневной малярии.

Переносчиками возбудителей этого заболевания – паразитических простейших рода *Plasmodium* – являются комары рода *Anopheles*. Глобальное потепление и хозяйственная деятельность человека ведут к изменению ареалов видов рода, в том числе и видов – основных переносчиков малярии. Для контроля численности видов-переносчиков требовалось уточнение видового состава представителей рода как на территории Российской Федерации, так и сопредельных государств.

Изучение комаров комплекса *An. maculipennis* было предпринято нами с целью разрешения выявленного конфликта между морфологическими и цитогенетическими характеристиками представителей комплекса. Комары, обнаруженные в 2003 году в Ферганской долине Кыргызстана, совмещали морфологические признаки *An. sacharovi* и цитогенетические признаки *An. maculipennis* и по совокупности названных признаков не могли быть отнесены ни к одному из известных видов. Результатом проведенных исследований стало описание нового в комплексе *An. maculipennis* вида – *Anopheles artemievi* Gordeev et al.

Второй принципиальной проблемой исследования стала оценка достоверности идентификации нового вида – *An. daciae*, выделенного из *An. messeae*.

Работа выполнена совместно с А.Б Званцовым (ВОЗ), М.И. Гордеевым (МГОУ), Е.В. Шайкевич (ИОГен РАН).

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. При изучении личинок *An. artemievi* морфологических различий, позволивших бы отличать новый вид, выявлено не было. Для определения особенностей яиц *An. artemievi* в общей сложности было изучено 100 яйцекладок, полученных от выловленных в природе самок из шести популяций Кыргызстана (поселок Алга, поселок Жизген Лейлекского района Баткенской области, поселок Ак-Калпак Кадамжайского района Ошской области, поселок Кызыл-Шарк Кара-Суйского района Суйской области, г. Майлуу-Суу и поселок Достук Сузакского района Желалабатской области) и одной популяции Таджикистана (Исфаринский район, близ города Исфара Согдийской области). Все яйца в этих яйцекладках оказались однотипными – одноцветными, без полос и пятен, лишенными воздушных камер, с оторочкой (рисунок 3.1.1).

3.1.1.2 Цитогенетическая идентификация

Цитогенетический анализ показал, что вид *An. artemievi* является гомосеквентным с видом *Anopheles maculipennis*. Политенные хромосомы

слюнных желез личинок состоят из пяти плеч, рисунок дисков политенных хромосом идентичен таковому у *An. maculipennis* (рисунок 3.1.2) и отличается от *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.

3.1.1.3 Молекулярно-генетическая идентификация

Для формирования молекулярно-генетической характеристики предполагаемого нового вида был 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, собранных в Джалалабадской и Ошской областях Кыргызстана. В результате реакции амплификации ITS2, фланкированного фрагментами генов 5.8S и 28S РНК, были получены продукты одного размера для всех изученных образцов. На первом этапе были секвенированы ПЦР-продукты пяти образцов, и консенсусная последовательность размещена в GenBank под номером AJ849885. Длина ITS2, фланкированного участками генов 5.S и 28S РНК, у *An. artemievi* составляет 449 пн. (AJ849886), длина аналогичного фрагмента *An. maculipennis* равна 422 пн. (AY238435). Размер этой области комаров *An. martinius* из г. Нукуса Каракалпакского района Узбекистана составил – 447 пн. (AJ849885).

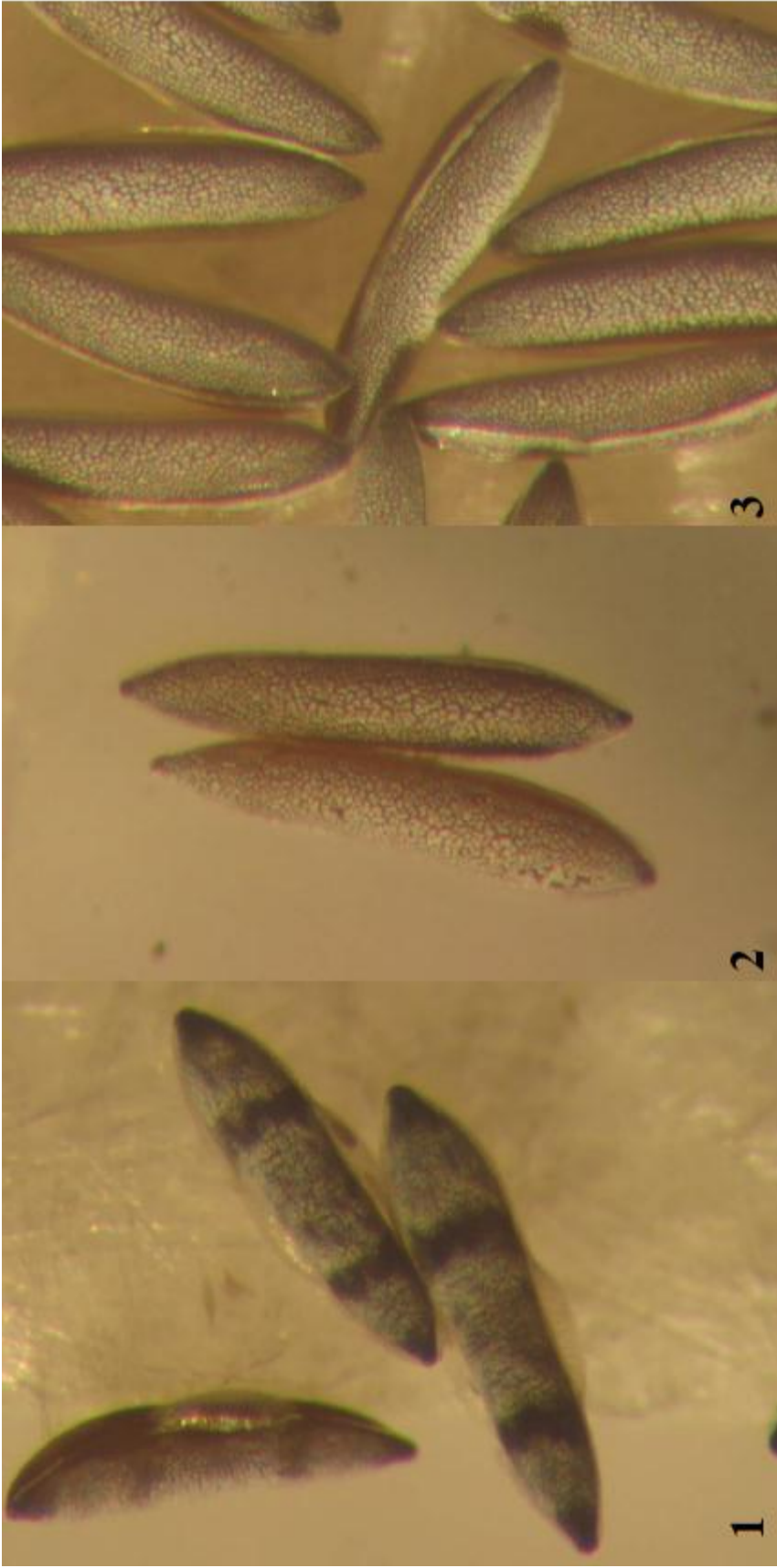


Рисунок 3.1.1 – Внешний вид яиц комаров комплекса *An. maculipennis*. 1 – *An. maculipennis*, 2 – *An. artemievi*, 3 – *An. sacharovi*

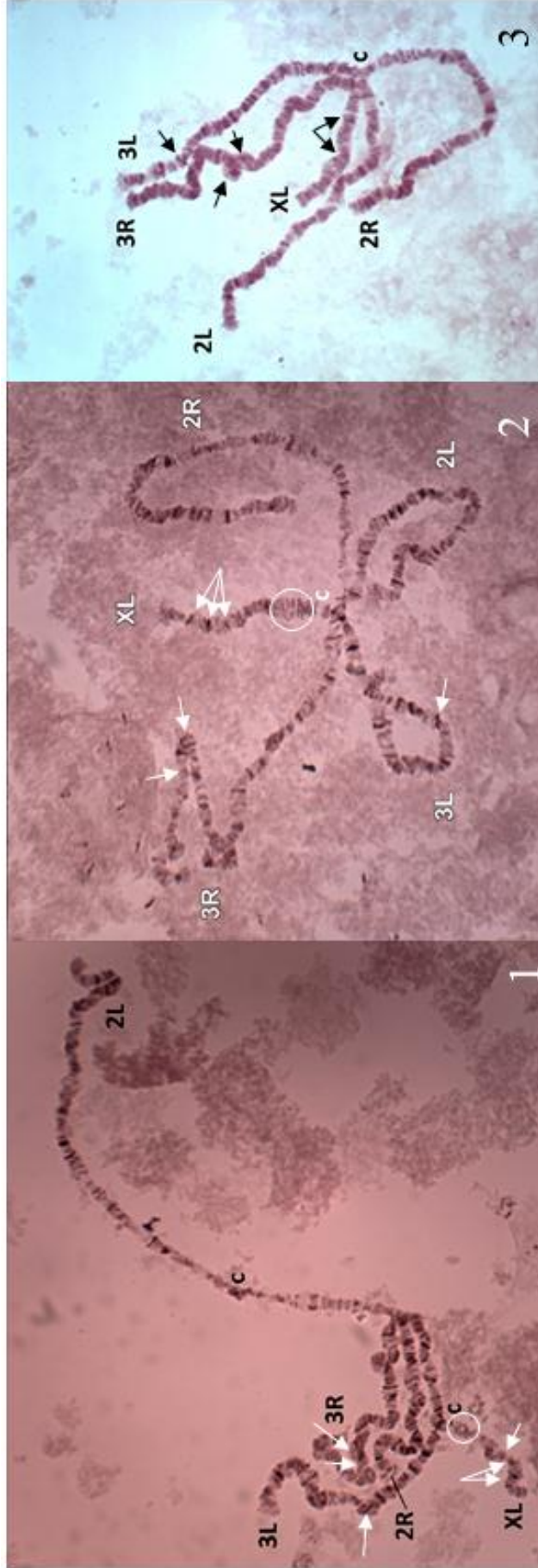


Рисунок 3.1.2 – Политенные хромосомы слюнных желез личинок IV-го возраста. 1 – *An. maculipennis*, 2 – *An. artemievi*, 3 – *An. sacharovi*. Стрелками и кружками обозначены диагностические области хромосом.

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). Последовательности *An. artemievi* и *An. martinius* различаются 14 инделами и 40 однонуклеотидными заменами. 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. Первичная структура последовательности ITS2 *An. artemievi* отличается от таковой *An. maculipennis* 4 инделами и 18 точечными заменами.

В результате реакции амплификации образцов с праймерами, гомологичными фрагменту гена цитохромоксидазы 1, продукты амплификации были получены для 10 образцов *An. artemievi* из поселка Алга. Нуклеотидная последовательность фрагмента *cox1* размещена в GenBank под номером KU950428.

Последовательность фрагмента *An. martinius* из Каракалпакии размещена в GenBank под номером KU950429.

Попарное сравнение структуры *cox1* *An. artemievi*, *An. martinius* и *An. maculipennis* выявило различия на уровне 6% между *An. artemievi* и *An. martinius*, соответствующие 40 синонимичным заменам, 5% различия между видами *An. artemievi*–*An. maculipennis* и *An. martinius*–*An. maculipennis*, определяемые 32- и 34 синонимичными заменами соответственно. 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*, выделяются два крупных кластера, соответствующих таксономическим группам на уровне этих подродов. Представители комплекса «*maculipennis*»

демонстрируют монофилетическую обособленность от представителей других комплексов видов подрода *Anopheles* – комплекса ориентальных видов «hircanus» и комплекса «claviger», также, как и от вида *An. plumbeus*, систематическое положение которого до настоящего времени остается предметом дискуссий. На рисунке 3.1.4 представлена дендрограмма, визуализирующая филогенетические отношения видов в комплексе «maculipennis». Вид *An. beklemishevi*, представляющий подгруппу неарктических североамериканских видов, обособлен от кластера палеарктических видов. Достоверность выделения *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*.

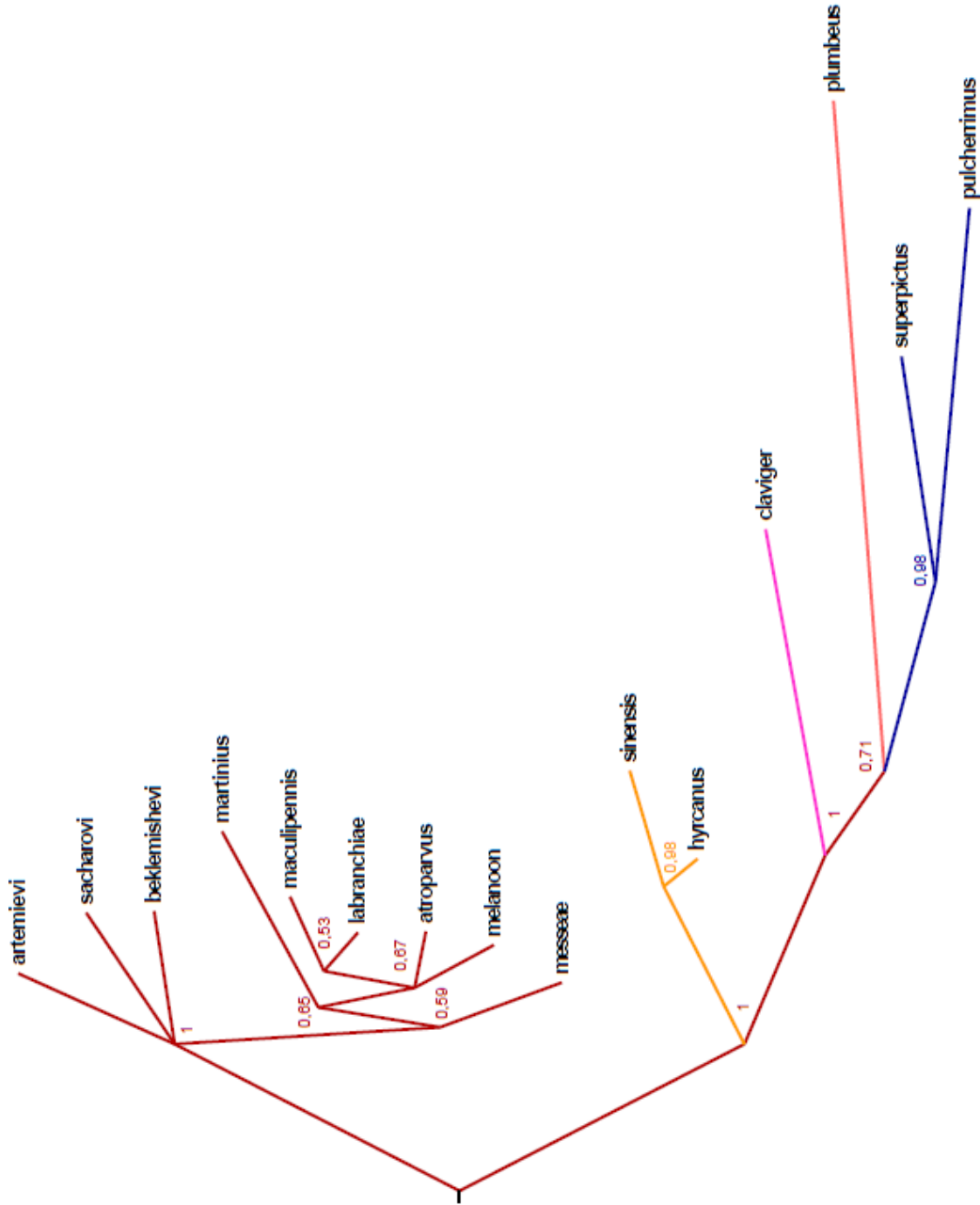


Рисунок 3.1.3 – Байесовская дендрограмма, визуализирующая филогенетические взаимоотношения представителей подрода *Anopheles* и подрода *Muzomyia* по результатам анализа митохондриального фрагмента гена *cox1*. В узлах указаны апостериорные вероятности. Цветами обозначены: синим – подрод *Muzomyia*,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

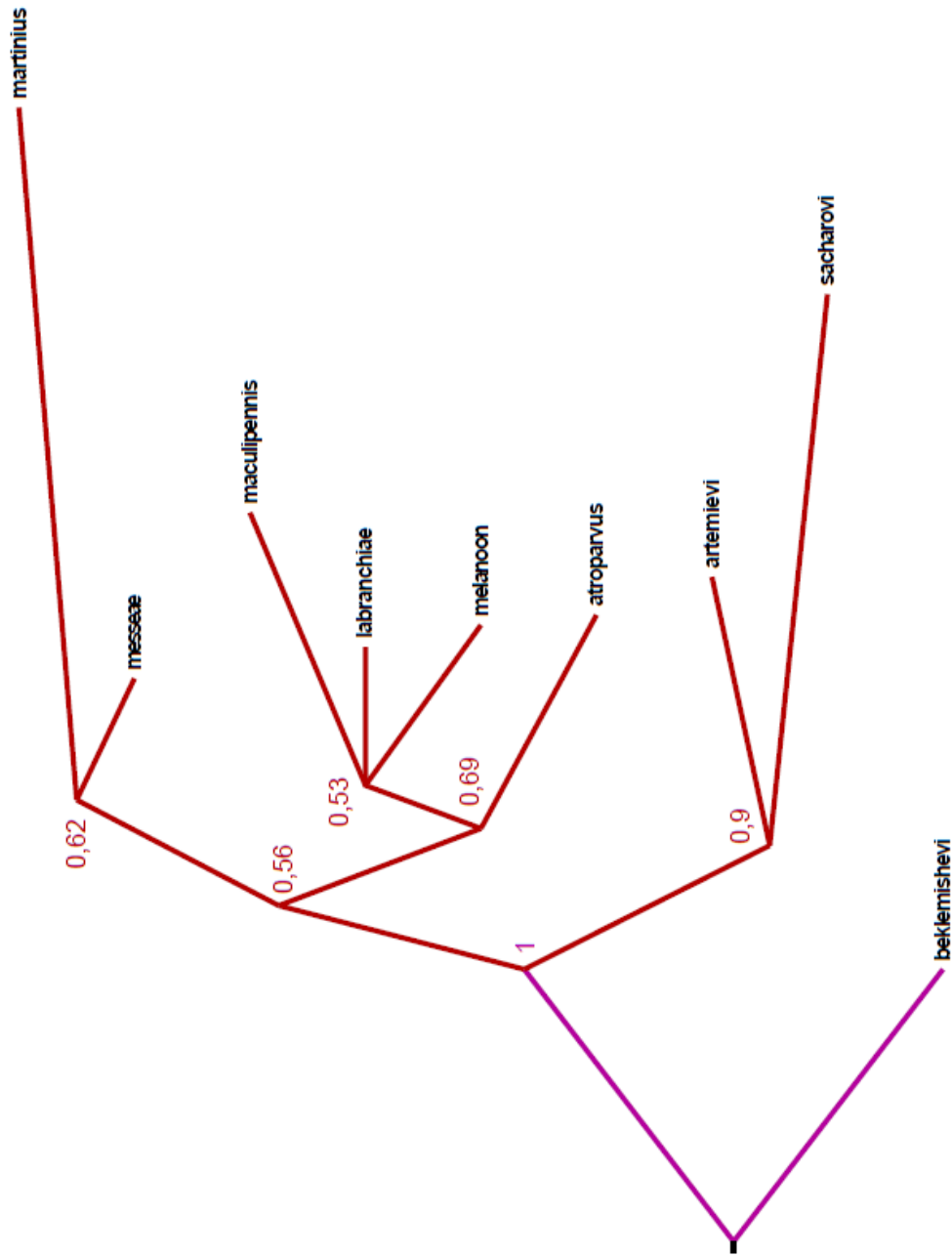


Рисунок 3.1.4 – Байесовская дендрограмма, визуализирующая филогенетические взаимоотношения представителей комплекса «*maculipennis*» по результатам анализа митохондриального фрагмента гена *cox1*. В узлах указаны апостериорные вероятности. Цветами обозначены: фиолетовым – неарктический вид, темно-красным – палеарктические виды.

3.1.2 Генетическая верификация достоверности таксономического статуса *An. daciae*

Как было сказано выше, 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* оказалась идентична соответствующей 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 *An. daciae* 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 проанализированные 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* (рисунок 3.1.4). Во всех указанных образцах после обработки эндонуклеазой рестрикции *MroXI* на электрофореграмме визуализировались как фрагменты длиной 275 пн. и 152 пн., характерные для *An. messeae*, так и нерестрицированный продукт амплификации длиной 427 пн., специфический для *An. daciae*. Аналогичные результаты были получены и при обработке продуктов амплификации образцов второй группы эндонуклеазой *BseGI* (рисунок 3.1.5).

Было проведено прямое секвенирование образцов первой и второй групп. Анализ хроматограмм 7 образцов первой группы, имеющих паттерны рестрикции, характерные для *An. messeae*, и представляющих географически удаленные популяции юга России и Западной Сибири, показал, что в изученных последовательностях обнаруживается единственный сигнал по сайтам 161, 165, 167, 362, 382 (AM409762–AM409764, AM409783, AM409784, AM409775,

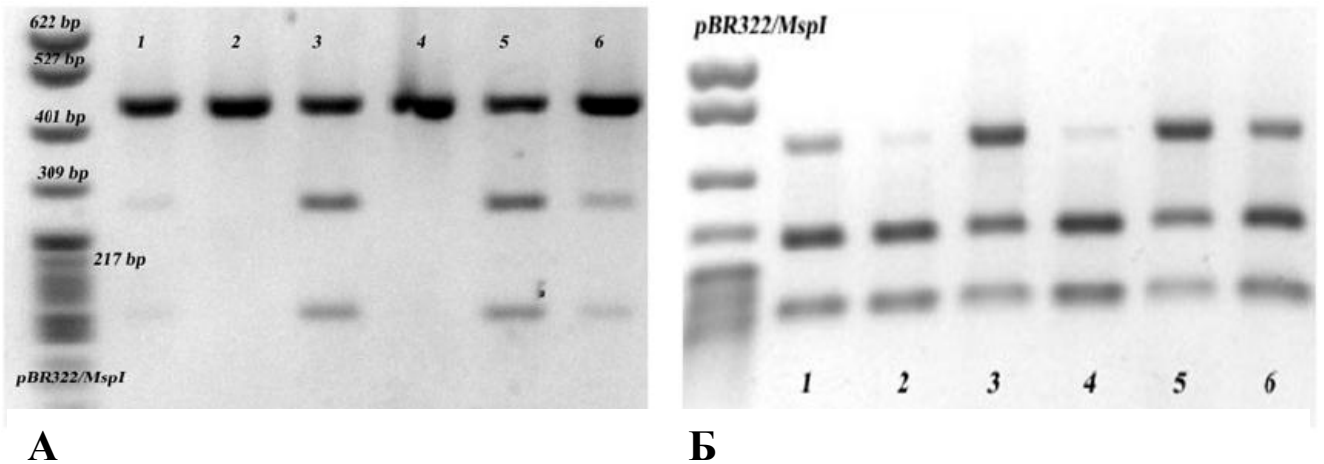


Рисунок 3.1.5 – Электрофореграмма рестрикции продуктов амплификации комаров *An. messeae s.l.* А – Маркер молекулярного веса – *pBR322/MspI*, дорожки 1–6 результаты ПЦР-ПДРФ анализа образцов ДНК комаров *An. messeae s.l.* из Калмыкии после обработки эндонуклеазой *MroXI*. Б – Маркер молекулярного веса – *pBR322/MspI*, дорожки 1–6 – результаты ПЦР-ПДРФ анализа образцов ДНК комаров *An. messeae s.l.* из Калмыкии после обработки эндонуклеазой *BseGI*.

AM409776). В указанных сайтах располагаются две комбинации нуклеотидов – TTC и GG соответственно. В хроматограммах образцов второй группы обнаруживался двойной сигнал в указанных выше сайтах.

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. Результатом секвенирования клонов стало обнаружение всех пяти молекулярных вариантов, а также дополнительных, являющихся сочетанием двух исходных вариантов. В число обнаруженных после клонирования и секвенирования комбинаций нуклеотидов входила комбинация AAT AC, характерная для *An. daciae*. Выявленные варианты молекулярных форм ITS2 представлены в таблице 3.1.1. Помимо указанных вариантов замен в структуре спейсера были обнаружены еще 17 варибельных сайтов, которые определяют его внутривидовую изменчивость в пределах 2.3% (Приложение Г).

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 внутригеномным полиморфизмом первичной структуры изученного фрагмента – второго внутреннего транскрибируемого спейсера кластера рибосомных генов. Поскольку комбинация варианта нуклеотидной последовательности спейсера AAT AC, характерная для *An. daciae*, выявлялась

повсеместно в образцах из центра ареала и в большинстве случаев встречалась вместе с другими комбинациями, можно было предполагать, что появление варианта «*daciae*» в «чистом» виде по краю ареала является 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*. Этот молекулярный полиморфизм мог быть следствием как многокопийности спесера, так и следствием гибридизации различных молекулярных форм. Для оценки этих двух гипотез был выполнен анализ первичной структуры фрагмента митохондриального гена *cox1 An. messeae sensu lato*.

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 базы данных GenBank. Медианная сеть гаплотипов *An. messeae sensu lato*, в том числе и гаплотипов *An. daciae*, представлена на рисунке 3.1.6.

В анализ были включены гомологичные последовательности близкородственных видов комплекса – *An. atroparvus*, *An. maculipennis* и *An. sacharovi*, использованных в качестве внешней группы. Анализ медианной сети выявляет чёткую дифференциацию видов *An. atroparvus*, *An. messeae*, *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 *An. messeae sensu lato* вполне вероятно.

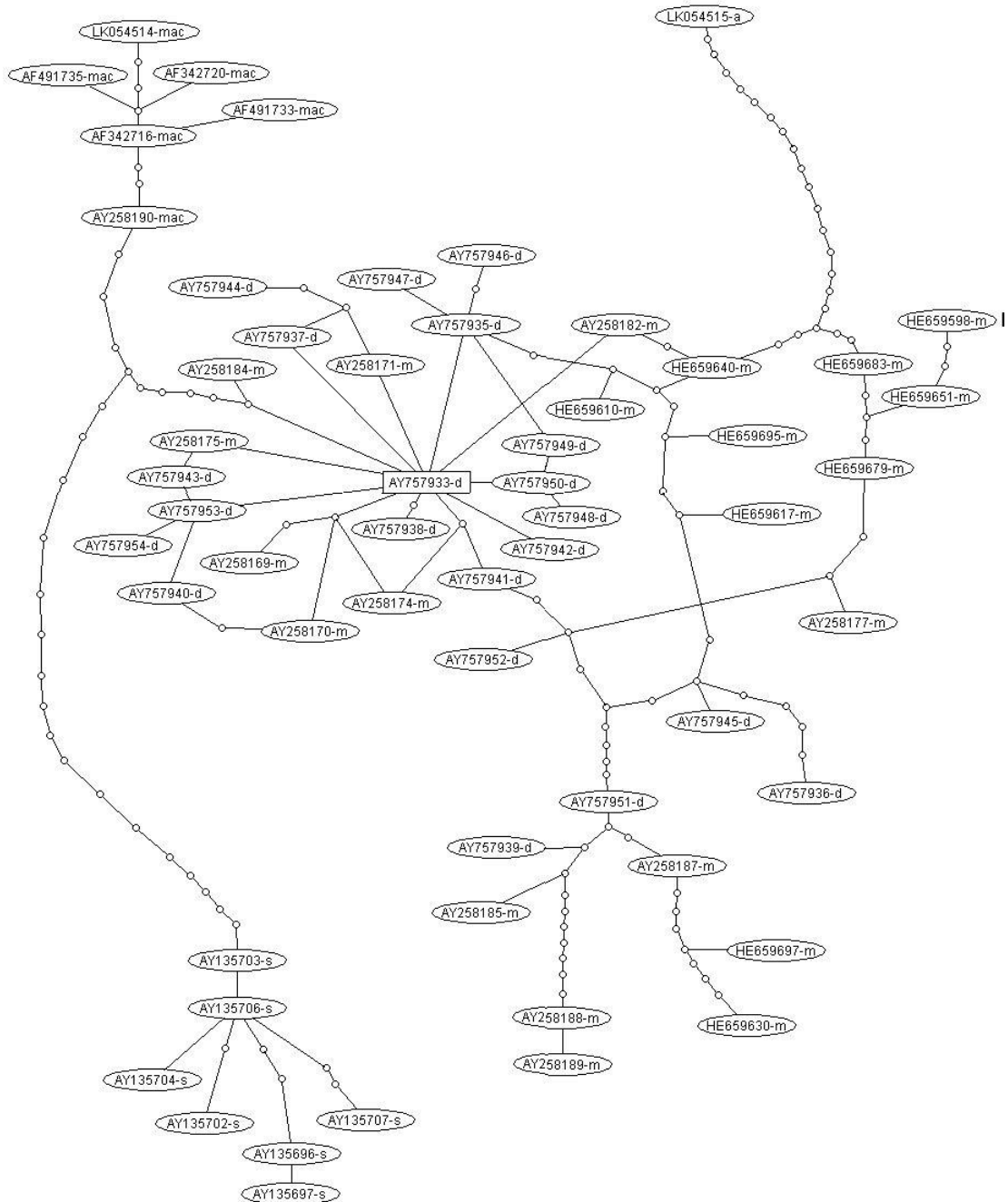


Рисунок 3.1.6 – Медианная сеть митохондриальных гаплотипов *An. daciae* и близкородственных видов комаров комплекса *An. maculipennis*. Реконструкция проведена в программе TCS на основе анализа полиморфизма фрагмента последовательности митохондриального гена *cox1*. Гаплотипы соединены ломаными линиями. 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*.

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*. Данные о распространении комаров комплекса в государствах Средней Азии и Закавказья представлены на рисунке 3.1.7, 3.1.8.

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.

An. sacharovi распространен в Восточной Грузии, где обитает в достаточно засушливых низинах Иверийской впадины. В Армении вид найден в Араратской долине. В Азербайджане *An. sacharovi* встречается в низменностях в сухих и теплых равнинах.

An. maculipennis распространен по всей территории Грузии, Республике Абхазия, в Армении и Азербайджане, где тяготеет к горным районам. В Грузии и Абхазии *An. maculipennis* найден как в западных приморских районах, и также в более сухой Восточной Грузии, в Армении вид обнаружен в Араратской долине и на склонах Армянского нагорья. В Азербайджане *An. maculipennis* обитает в

северной части Азербайджана в Самур-Дивичинской низменности, в предгорьях Большого Кавказа и Прикаспийской низменности, на юге отмечен в предгорьях Талыша. На юге России *An. maculipennis* идентифицирован в горных районах черноморского побережья Краснодарского края, Республиках Карачаево-Черкессия, Адыгея, Калмыкия, Ставропольском крае, Астраханской, Ростовской, Волгоградской, Пензенской, Московской областях. В Средней Азии не обнаружен.

An. atroparvus идентифицирован в приморской части Ростовской области и севера Краснодарского края; вид доходит на восток вплоть до Волгоградской области, и на юг – до Черкесска и Гудаутского района Абхазии.

An. melanoon идентифицирован в приморских районах с влажным субтропическим климатом Западной Грузии и Абхазии. Вопрос о распространении вида на юге России до настоящего времени не решен.

An. persiensis обнаружен в Ленкоранской низменности Азербайджана. Это первая находка вида на территории бывшего Советского Союза. Эпидемиологическое значение *An. persiensis* как переносчика малярии остается невыясненным.

An. messeae является самым распространенным видом в Палеарктике, он 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.

Идентификация и картирование *An. beklemishevi* не являлось специальной задачей настоящего исследования, тем не менее, вид был идентифицирован на территории Алтайского края.

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

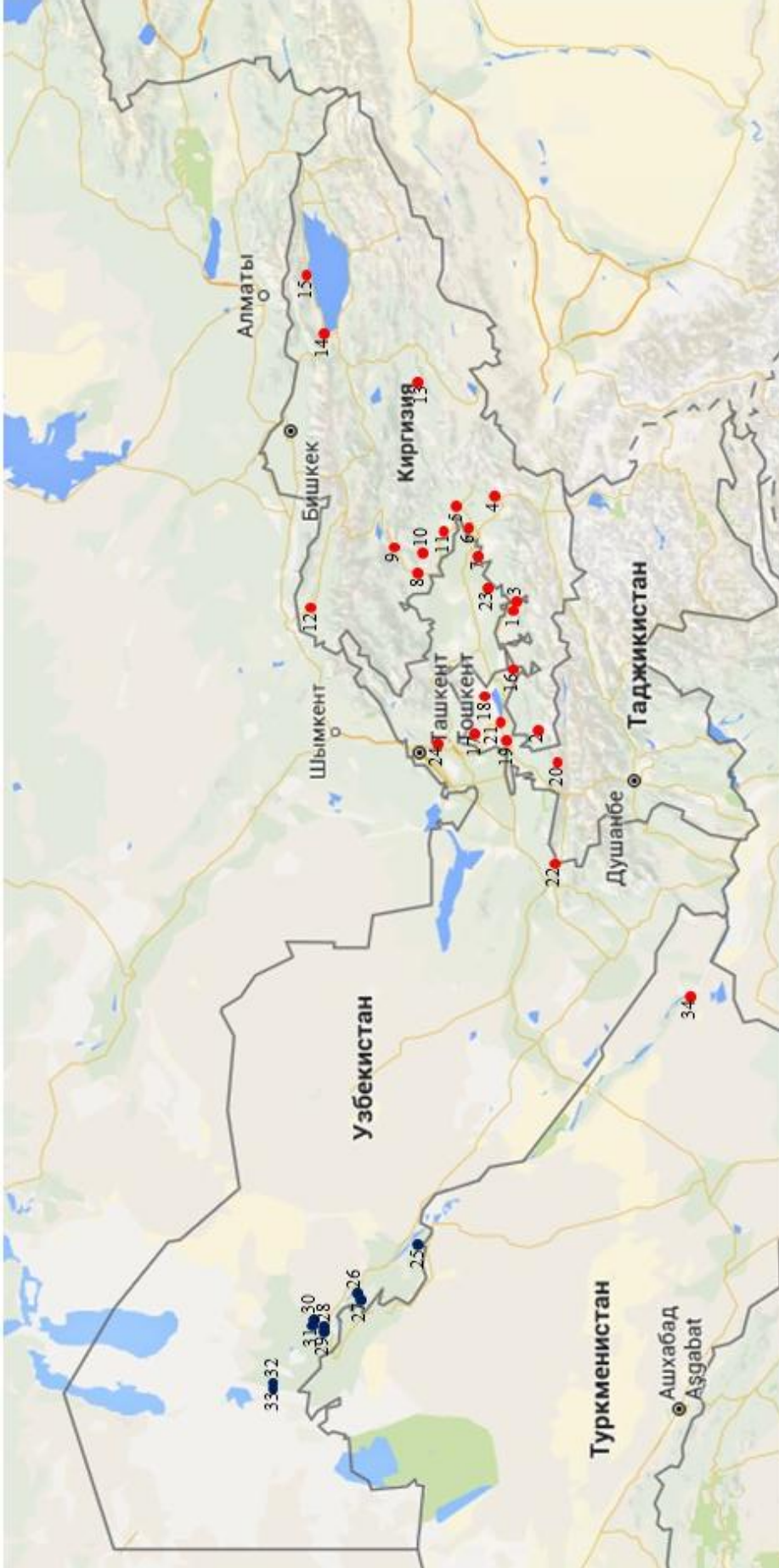


Рисунок 3.1.7 – Распространение комаров *An. artemievi* и *An. martinius* в Средней Азии. ● – *An. artemievi*, ● – *An. martinius*. Номера и названия точек сборов указаны в приложении А.

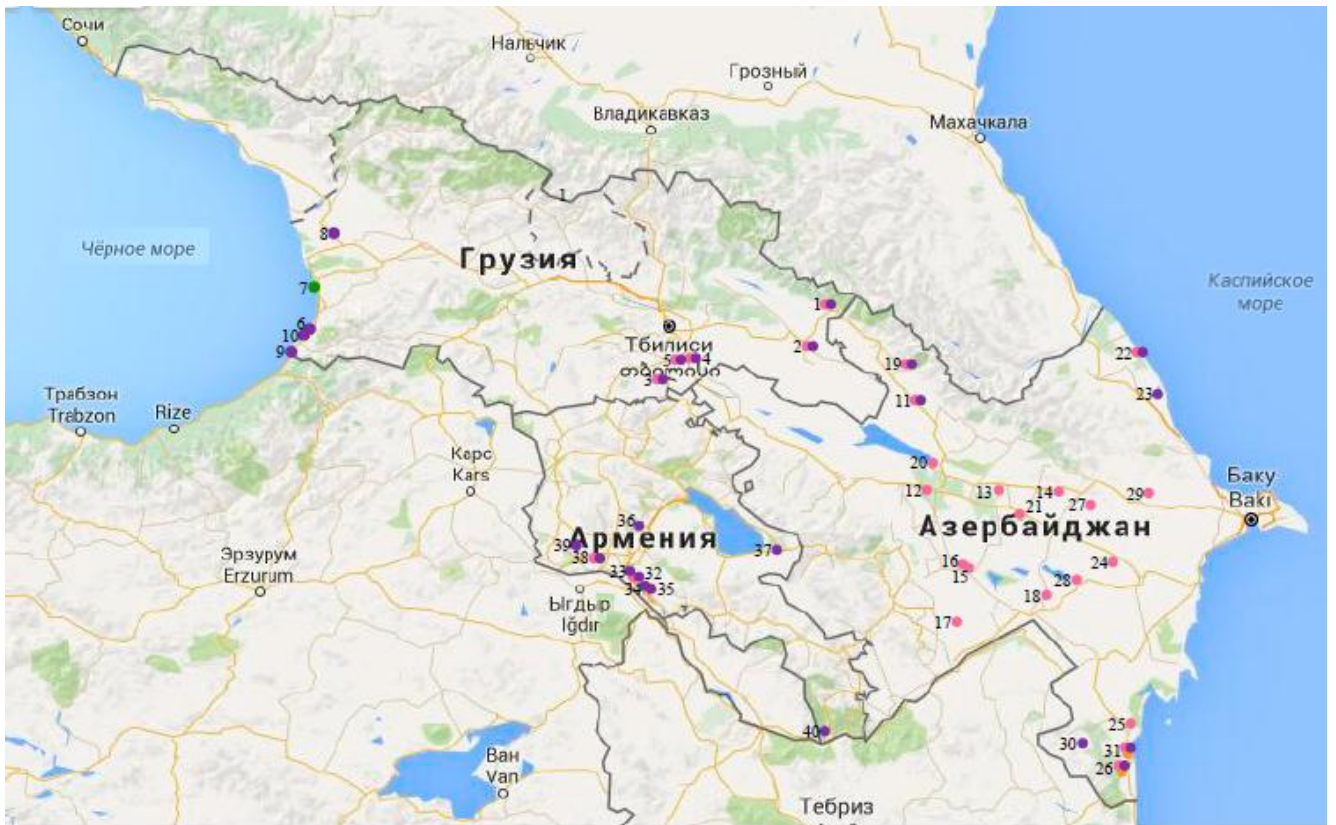


Рисунок 3.1.8 – Распространение комаров комплекса *An. maculipennis* в Закавказье. ● – *An. maculipennis*, ● – *An. atroparvus*, ● – *An. melanoon*. Номера и названия точек сборов указаны в приложении

3.1.4 Обсуждение

В последние несколько лет интенсивно развиваются исследования, имеющие своей конечной целью разработку фундаментальных подходов контроля численности комаров рода *Anopheles*. Этот род занимает особое место среди насекомых, поскольку имеет большое эпидемиологическое значение и образован значительным числом комплексов и сибсовых видов. Дискриминация и идентификация представителей рода являются первым шагом в направлении разработки контроля численности и стратегии борьбы с переносчиками малярии.

Теоретические вопросы и проблемы дискриминации и идентификации, также как и генетические аспекты систематики, филогении и видообразования в трудных таксономических группах двукрылых блестяще изложены в работе В.Н. Стегния (Стегний, 1991). В этом же исследовании указывается на необходимость и целесообразность применения комплексного анализа для поиска видоспецифических признаков, а также предлагаются подходы к изучению гомосеквентных видов. Использование такого анализа позволило автору описать новый вид – *An. beklemishevi* и восстановить валидность другого вида – *An. martinius*.

В представленной работе описан новый вид *An. artemievi* палеарктического комплекса *An. maculipennis*. Делимитация данного вида от известных видов комплекса проведена по совокупности морфологических, цитогенетических и молекулярно-генетических признаков. Необходимо отметить, что на этапе описания *An. artemievi* морфологический критерий не имел решающего значения, поскольку представители нового вида характеризовались общими для комплекса *maculiennis* морфологическими признаками имаго и личинок и общей для видов группы *An. sacharovi* структурой экзохориона яйца. Позже специалистами Научно-исследовательского института биологии и биофизики ТГУ (Андреева и др., 2007; Шабанова, Сибатаев, 2007) было показано, что новый вид имеет несколько морфологических признаков, на основании которых его можно четко дифференцировать от вида *An. messeae*, а также специфические цитогенетические

характеристики. Как уже указывалось, *An. artemievi* входит в группу гомосеквентных видов *An. maculipennis*–*An. melanoon*–*An. artemievi*, не различаемых на основании линейной структуры политенных хромосом слюнных желез личинок. Анализ трехмерной архитектуры политенных хромосом трофоцитов яичников взрослых самок подтвердил наличие инвариантных признаков хромосом *An. artemievi*. Хромосома 2 *An. artemievi* прикреплена к оболочке ядра центромерными локусами плеч 2R и 2L, а хромосома 3L имеет крупный блок гетерохроматина в локусе 33a/b (Стегний, Русакова, 2007; Андреева и др., 2007). Специфический комплекс морфологических и цитогенетических особенностей *An. artemievi* дополнен молекулярно-генетическим анализом маркерных областей генома вида. Здесь следует отметить, что проведенное исследование выполнено в русле современных тенденций мультилокусного молекулярно-генетического анализа, позволяющего дифференцировать сложные комплексы (Bourke *et al.*, 2013; Foster *et al.*, 2013).

Филогенетический анализ подтверждает достоверность выделения вида *An. artemievi*. Некоторый конфликт обнаруживается при сопоставлении данных филогенетического анализа и более ранних данных цитогенетических исследований (Стегний, 1991). В соответствии с полученными в настоящей работе результатами по структуре фрагмента гена цитохромоксидазы 1 *An. sacharovi* и *An. martinius* входят в различные подкластеры кластера *maculipennis*, где генетическая дифференциация *An. sacharovi* поддерживается высокими значениями апостериорных вероятностей, тогда как *An. martinius* входит в слабо дифференцированный кластер, образуемый остальными представителями комплекса. В соответствии с цитогенетическими данными *An. sacharovi* и *An. martinius* являются близкородственными видами: *An. martinius* отличается от *An. sacharovi* двумя гомозиготными инверсиями – в XL-хромосоме и хромосоме 3L. Хотя исследование причинно-следственных связей такого конфликта не является предметом настоящей работы, можно отметить, что инверсионный полиморфизм и структура митохондриальных маркеров являются независимыми признаками с двуродительским и материнским наследованием соответственно. Эти различия, по

всей видимости, и определяют некоторое несовпадение результатов молекулярно-генетического и цитогенетического анализа в комплексе «*maculipennis*».

В работе была проведена генетическая верификация достоверности таксономического статуса *An. daciae* и показана преждевременность выделения нового вида из *An. messeae*. К сожалению, авторы описавшие *An. daciae*, опирались на единственный молекулярно-генетический маркер, представленный в геноме множественными копиями, хотя полиморфизм структуры является особенностью многокопийных областей генома эукариот. Уже в 90-е годы прошлого века была обнаружена внутригеномная изменчивость структуры ITS2 у таких филогенетически далеких групп членистоногих как иксодовые клещи (Rich *et al.*, 1997) и комары рода *Aedes* (Wesson *et al.*, 1992). Копийность рибосомального кластера у *An. messeae* не изучалась, однако у *An. gambiae* он включает около 700 копий на диплоидный геном (Collins *et al.*, 1989). В роде *Anopheles* внутригеномная изменчивость ITS2 была известна задолго до выделения *An. daciae*. Шесть вариантов спейсерных последовательностей были описаны для одной особи бразильского вида *An. nuneztovari* (Onyabe, Conn, 1999), до тринадцати вариантов ITS2 отмечались для вида азиатско-тихоокеанского региона – *An. farauti* s.s (Beebe *et al.*, 2000).

Уровень внутригеномных различий по структуре ITS2 у *An. messeae* составляет 2.3%. Пул митохондриальных гаплотипов *An. messeae*–*An. daciae* демонстрирует единство и обособлен от митохондриальных гаплотипов филогенетически близких видов *An. atroparvus*, *An. messeae*, *An. maculipennis* и *An. sacharovi*. Полученные результаты сопоставимы и поддерживаются результатами объемного исследования фрагмента *cox1*, выполненного Ваулиным и Новиковым (Ваулин, Новиков, 2010; 2012). Авторы, описавшие две молекулярные формы А и В *An. messeae*, которые они считают видами, полагают, что отсутствие выраженной межвидовой дифференциации и высокая изменчивость *cox1* являются следствием предкового полиморфизма, сформировавшегося до дивергенции предкового вида. Уровень полиморфизма *cox1* не позволяет дискриминировать криптические виды А и В *An. messeae*, а изменчивость *cox1* не

имеет географической упорядоченности. В работе Ваулина и Новикова (2012) подтверждены наши данные о внутригеномном полиморфизме последовательностей ITS2 и существовании комбинативной изменчивости указанных последовательностей, хотя авторы расценивают два основных паттерна ITS2 как доказательство существования криптических видов А и В *An. messeae*. Однако в целом наши позиции совпадают. Обнаруженная кластеризация митотипов и вариантов ITS2 свидетельствуют и подразделенности популяций полиморфного обитающего на огромном ареале от Британских островов до Зейско-Буреинской низменности и от Северного полярного круга до Ирана и Северного Китая (Беклемишев, Желоховцев, 1945) *An. messeae*. Наличие генетической подразделенности является характерным признаком природных популяций насекомых. Для многих видов насекомых подробное изучение генетической структуры природных популяций выявляет наличие двух или более симпатрически обитающих и частично изолированных репродуктивно форм (Dobzhansky *et al.*, 1964; Андрианов *и др.*, 2008). Весьма вероятно, что такая подразделённость природных популяций препятствует потере изменчивости и повышает их устойчивость в длительной временной перспективе (Алтухов, 2003). Кроме того, следует учитывать, что «чистые» варианты ITS2 описаны по краю ареала *An. messeae*, где в силу жестких, экологически и климатически напряженных условий периферии ареала (Стегний, 1991) согласованным отбором может поддерживаться только один вариант ITS2, либо некоторый мономорфизм структуры спейсера следует связывать с элементами эффекта основателя.

Подводя итог выполненному исследованию можно утверждать, что разделение на виды *An. messeae*–*An. daciae* не поддерживается данными молекулярно-генетического анализа. Морфологические различия являются количественными, перекрывающимися, обнаружены только для структуры экзохориона яйца (Nicolescu *et al.*, 2004) и не подтверждены ни для одной другой стадии жизненного цикла. Совокупность молекулярно-генетических и морфологических данных не позволяет разделять *An. daciae* и *An. messeae* на самостоятельные виды.

3.2 Изучение влияния цитоплазматических репродуктивных симбиотических бактерий на формирование инвазивных популяций *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.

Работа по изучению генетической структуры популяций по микросателлитным локусам и изучению демографических особенностей популяций *H. axyridis* выполнена совместно с E. Lombaert и T. Guillemaud (Университет Ниццы – Софии Антиполис (Universite' de Nice Sophia Antipolis) (Франция), C. E. Thomas и L. J. Lawson Handley (группа эволюционной биологии Университета Халла, Великобритания), J. Li (Колледж охраны окружающей среды и защиты растений Хайнаньского Университета, Китай), S. Wang (группа по идентификации и управлению инвазивными видами Института Зоологии Академии наук Китая, Китай), H. Pang (Школа естественных наук Государственной лаборатории биоуправления Университета Сунь Ятсена, Китай), E. Joussetin, A. Estoup, A. Tayeh, B. Facon, A. Migeon, V. Ravigne (Биологический центр управления популяциями, Франция), R.L. Poland (Клифтон Колледж, Великобритания), J. van Lenteren (Лаборатория энтомологии, Вагенингенский университет, Нидерланды), P. De Clercq, N. Berkvens (Отдел защиты растений, Гентский Университет, Бельгия), W. Jones (Национальная лаборатория биологического контроля, США), R.A. Hufbauer (Отдел биологических и сельскохозяйственных наук и борьбы с вредителями, Университет Колорадо), исследования по изучению бактериальных симбионтов и изучению генетической

структуры популяций по фрагменту гена *cox1* проводилась совместно с А.В. Блехман, Б.В. Андриановым, И.А. Захаровым-Гезехусом, А.В. Суворовым.

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 было исследовано 162 последовательности, размещенные в базе данных GenBank (HM594302-HM594420 и HQ593064-HQ593106). Среди изученных последовательностей 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. В нативных популяциях восточной группы популяций и в инвазивных популяциях указанный гаплотип является доминирующим и встречается с частотой 75.0% – 97.1%. В популяции Горно-Алтайска, представляющей западную группу популяций вида, доминирует гаплотип H5, обнаруживаемый у 53.8% особей, тогда как гаплотип H1 встречается с частотой лишь 34.6%. Гаплотип H5 отличается от гаплотипа H1 двумя синонимичными заменами по сайтам 258 и 489 изученного фрагмента.

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	16										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

Гаплотипы H6, H7 и H10 и гаплотипы H2, H3, H4, H9, H11, H12 и H13 отличаются от гаплотипов H5 и H1 соответственно единичными синонимичными заменами.

На медианной сети, представленной на рисунке 3.2.1, обнаруживаются два кластера. Первый объединяет последовательности, встречающиеся у особей из популяций как восточной и так западной группы, а также у особей из инвазивных популяций. Второй кластер образован митохондриальными гаплотипами, найденными только у особей западной группы популяций. Последнее позволяет предполагать, что специфические «западные» гаплотипы возникли после распада некогда единого ареала вида на рефугиумы в период последнего оледенения. А доминирующий на западе гаплотип H5, возможно определяющий какие-то селективные преимущества его носителей, постепенно вытесняет гаплотип H1. 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. Представленная на рисунке 3.2.1 медианная сеть относится к типу “star-like”, характерному для видов, пережившим 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.

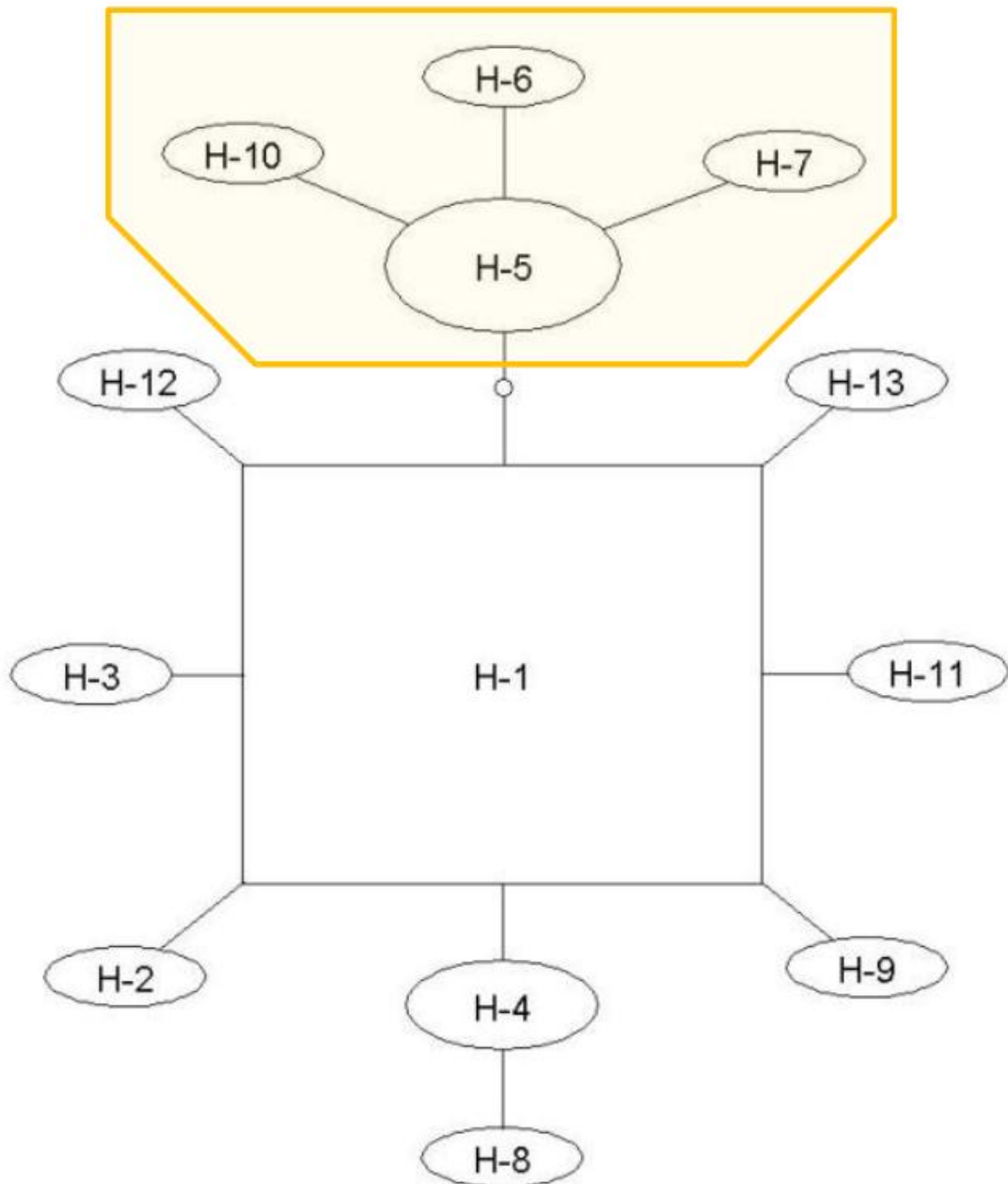


Рисунок 3.2.1 – Филогенетическая реконструкция митохондриальных гаплотипов *H. axyridis* по гену *cox1*. Желтой трапецией выделены «западные» варианты гаплотипов.

Сравнение «инвазивных» гаплотипов указывает на то, что их генный пул 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 была генотипирована 271 особь в девяти популяциях нативного ареала, 260 особей восьми популяций инвазивного ареала и 146 особей из биоконтрольных популяций.

Попарное сравнение популяций нативного ареала выявило их незначительную генетическую дифференциацию (Приложение Е). Несмотря на большие 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 подтверждает подразделение популяций на две группы; среднее значение логарифма функции правдоподобия повышалось от значения $K=1$ до $K=2$, для которого оказалось максимальным. Первый кластер представлен 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.). 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 (Приложение Е) по отношению ко всем изученным популяциям восточной группы, что, вероятно, связано с её длительной географической изоляцией на Корейском полуострове.

Была обнаружена значительная корреляция между значениями генетической дифференциации и географическими дистанциями внутри нативного ареала ($r^2=0.304$; $P<10^{-2}$; угол (slope)=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 локусом, 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, полученных для инвазивных популяций с использованием микросателлитных локусов. 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 локусом 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 (таблица 3.2.2). 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 характерного для вида уровня полиморфизма оказывается критическим и определяет невозможность самоподдержания биоконтрольных популяций в природе.

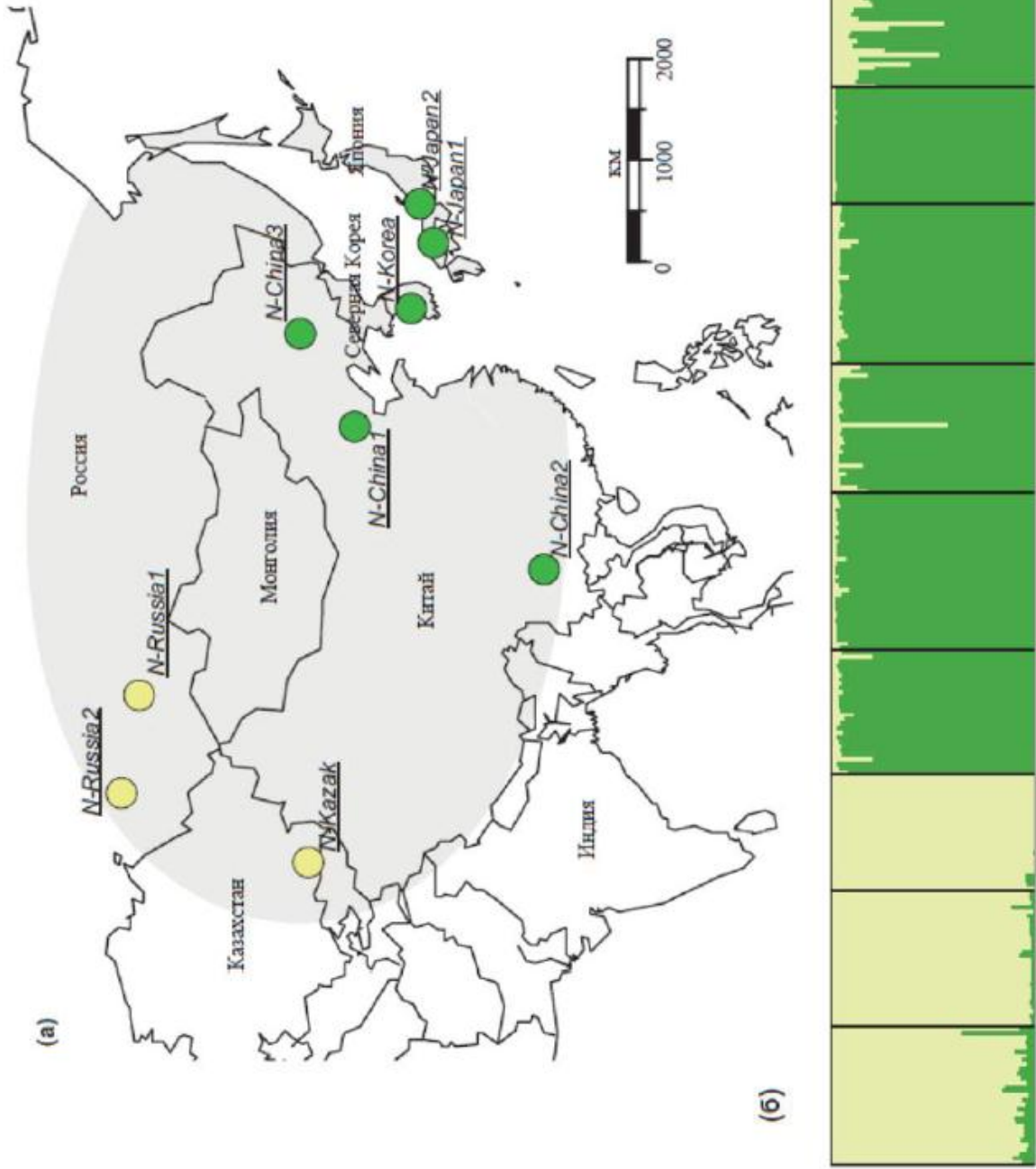


Рисунок 3.2.2 – а) Географическое происхождение и кластеризация нативных популяций *H. axyridis*. б) Кластеризация популяций *H. axyridis* по данным микросателлитного анализа. Зелёным цветом выделен восточный кластер, салатовым выделен западный кластер.

Таблица 3.2.2 – Генетическое разнообразие популяций *H. axyridis*2

Код популяции	Происхождение и биогеографический статус	Число генотипированных особей	Среднее число аллелей	Ожидаемая гетерозиготность (He)
Fra	Инвазивная популяция: Круа, Франция	30	6.16	0.581
DAK	Инвазивная популяция: Брукинг, США	30	5.44	0.567
SAF	Инвазивная популяция: Вифлеем, Южная Африка	31	5.11	0.555
ABA	Нативная популяция: Абакан, Россия	31	6.39	0.570
Nov	Нативная популяция, Новосибирск, Россия	30	6.19	0.555
KYO	Нативная популяция: Киото, Япония	26	6.94	0.587

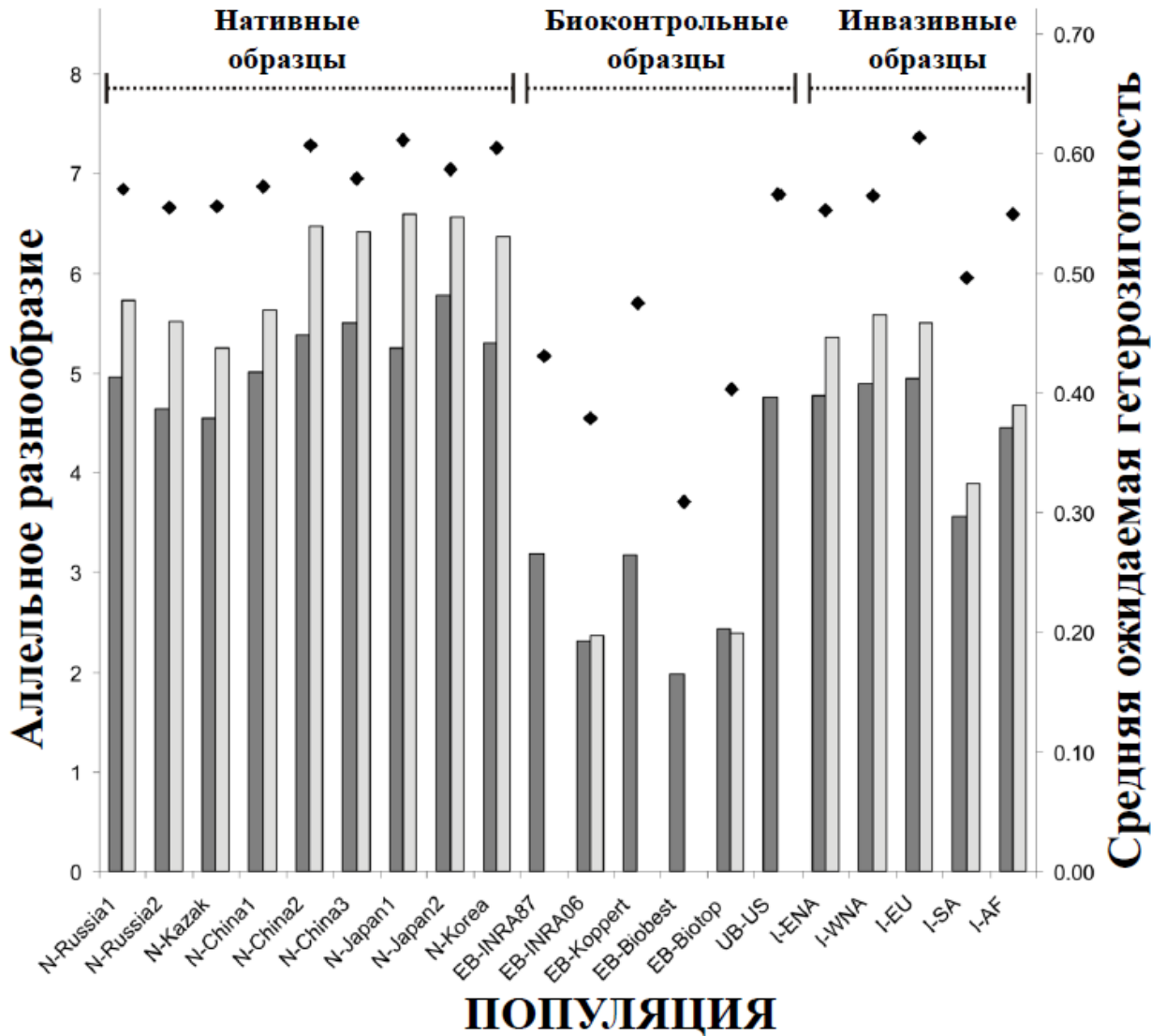


Рисунок 3.2.3 – Генетическое разнообразие в нативных, биоконтрольных и инвазивных популяциях *H. axyridis*. Ожидаемая гетерозиготность – H_e ; черные квадраты) среднее генетическое разнообразие по 18 (светло-серые столбцы) или 10 (темно-серые столбцы) микросателлитным локусам).

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 на параметр плодовитости самок. Плодовитость самок оценивали по числу отложенных яиц в первые восемь дней яйцекладки. Результаты представлены на рисунке 3.2.4. Всего проанализировано 7000 яиц, 1440 личинок и 180 самок в поколении F_3 .

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 ($P=0.0169$). 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.

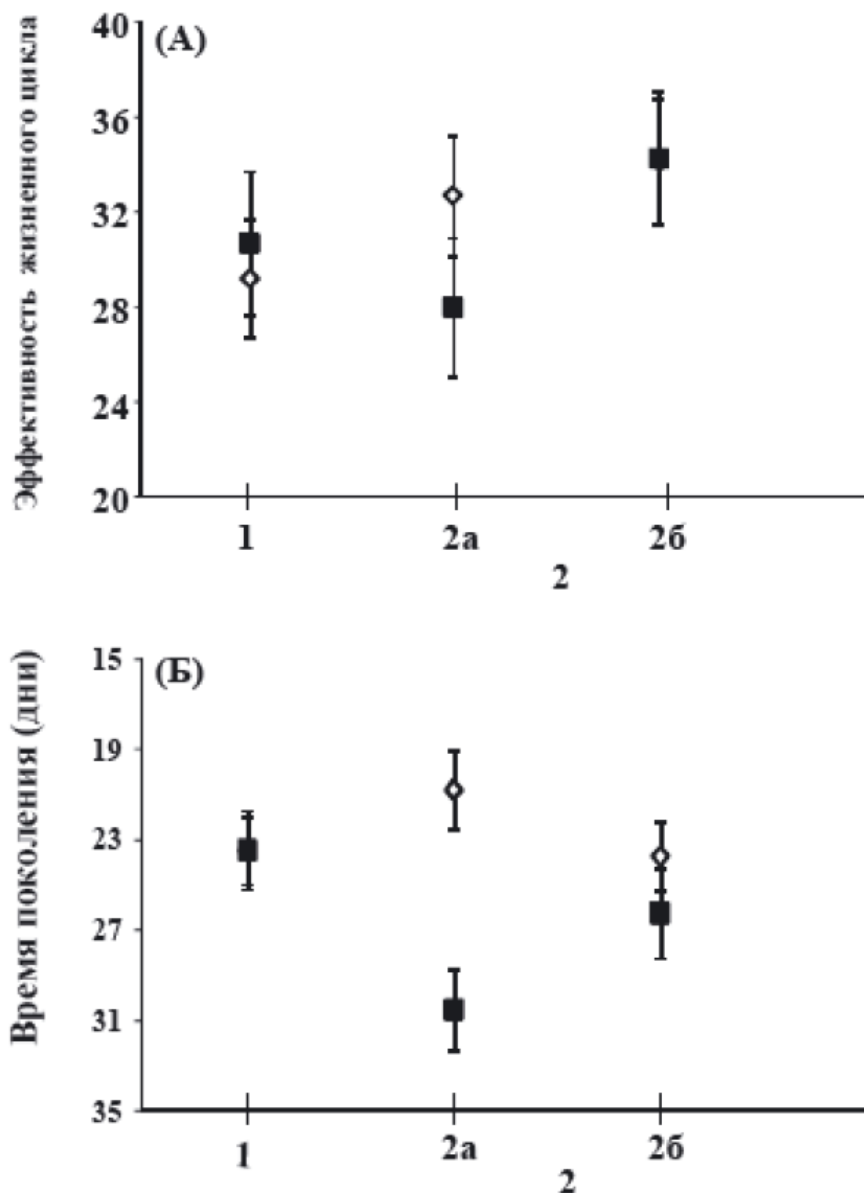


Рисунок 3.2.4 – Средние оценки времени жизни (А) и времени поколения (Б) в нативных (черные квадраты) и инвазивных (белые ромбы) популяциях для всех типов скрещиваний

1. – скрещивания с неродственным самцом из той же популяции, 2 – межпопуляционные скрещивания: 2а – 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.

3.2.2 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.

На предварительном этапе исследования проводился контроль качества выделения ДНК, для чего все 446 образцов были амплифицированы с праймерами, гомологичными гену *cox1*. Поскольку положительный сигнал был получен во всех изученных образцах, они были использованы затем для исследования зараженности *H. axyridis*.

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

При амплификации всех 430 образцов тотальной ДНК самок *H. axyridis* с праймерами, специфичными к фрагменту гена *fbpA*, обнаружено двенадцать *Wolbachia*-положительных образцов – по одному в выборках *H. axyridis* из популяций бухты Троицы, Саянских гор нативного ареала и инвазивных популяций Калининграда и Праги и по четыре в выборках Парижа и Мюнхена инвазивного ареала. Для идентификации аллельного профиля обнаруженных линий *Wolbachia* было выполнено мультилокусное типирование трех образцов – бухты Троицы, Саянских гор, Калининграда. Для *Wolbachia*-положительных

образцов из бухты Троица, Саянских гор и Калининграда получены фрагменты специфического размера всех пяти генов, используемых при MLST. Образец из Праги не удалось типировать по всем генам, поэтому он был исключен из дальнейшего MLST-анализа. Также были проанализированы последовательности фрагментов пяти MLST-генов *Wolbachia* – эндосимбионта *A. bipunctata*, использовавшегося в качестве положительного контроля. Все 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 мультилокусное типирование не проводилось, а был изучен фрагмент одного из наиболее изменчивых из пяти генов MLST – гена *fbpA*. Последовательности секвенированных фрагментов этого гена размещены в GenBank под регистрационными номерами ID:

Для филогенетического анализа по результатам MLST были использованы аналогичные последовательности 22 линий *Wolbachia* из базы данных GenBank. В число этих линий вошли *Wolbachia* – эндосимбионты Coleoptera, эндосимбионты паразитирующих на Coleoptera насекомых и клещей, эндосимбионты модельных объектов – *D. melanogaster*, *D. simulans*, *C. pipiens* и представляющие внешнюю группу эндосимбионты *Brugia malayi* и *C. lectularius*. Все штаммы *Wolbachia*, использованные для филогенетического анализа, указаны в табл. 2.6.1.

Результаты филогенетического анализа 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. Для этих линий дополнительно была проанализирована первичная структура фрагмента гена *wsp* длиной 584 пн., полученные последовательности также оказались идентичны. 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).

Более интересными оказались результаты филогенетического анализа по фрагменту гена *fbpA* длиной 428 пн. (Рисунок 3.2.6). Оказалось, что *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 Е. Кластеризация поддерживается высокими значениями апостериорных вероятностей. Линии, включенные в супергруппу В и А неидентичны, хотя и различаются лишь единичными синонимичными заменами (не более чем тремя при попарном сравнении в рамках своей супергруппы). Линия, обнаруженная у самки М_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 КР_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.

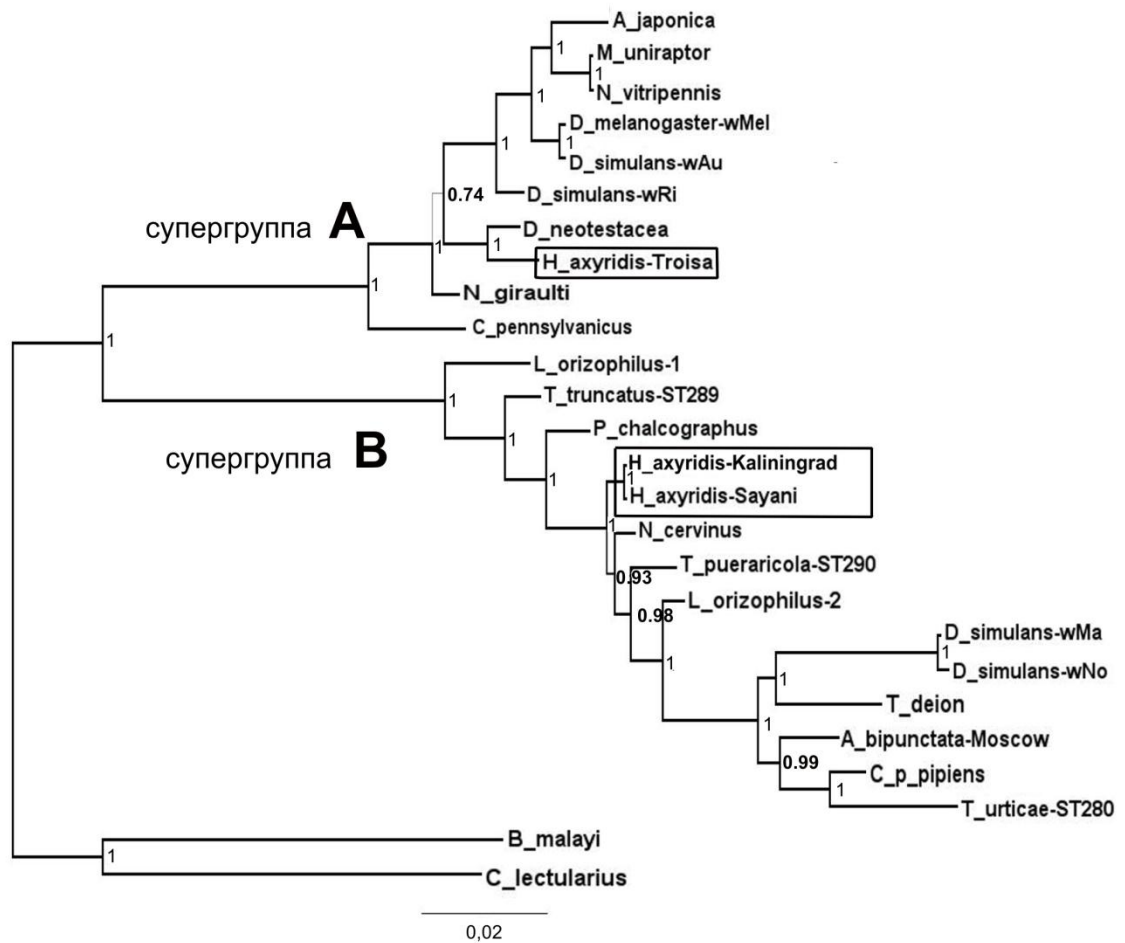


Рисунок 3.2.5 – Филогенетическая реконструкция 26 изолятов *Wolbachia* на основе анализа контигов из 5 генов, используемых для мультилокусного типирования (2079 пн). Порядок включения последовательностей генов в контиги: *coxA* – 402 нп., *fbpA* – 429 нп., *ftsZ* – 435 нп., *gatB* – 369 пн, *hcpA* – 444 пн. Имена трёх новых изолятов *Wolbachia* обведены рамкой. Полные видовые названия насекомых хозяев и принадлежность штаммов *Wolbachia* к супергруппам приведены в Таблице 3. 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.

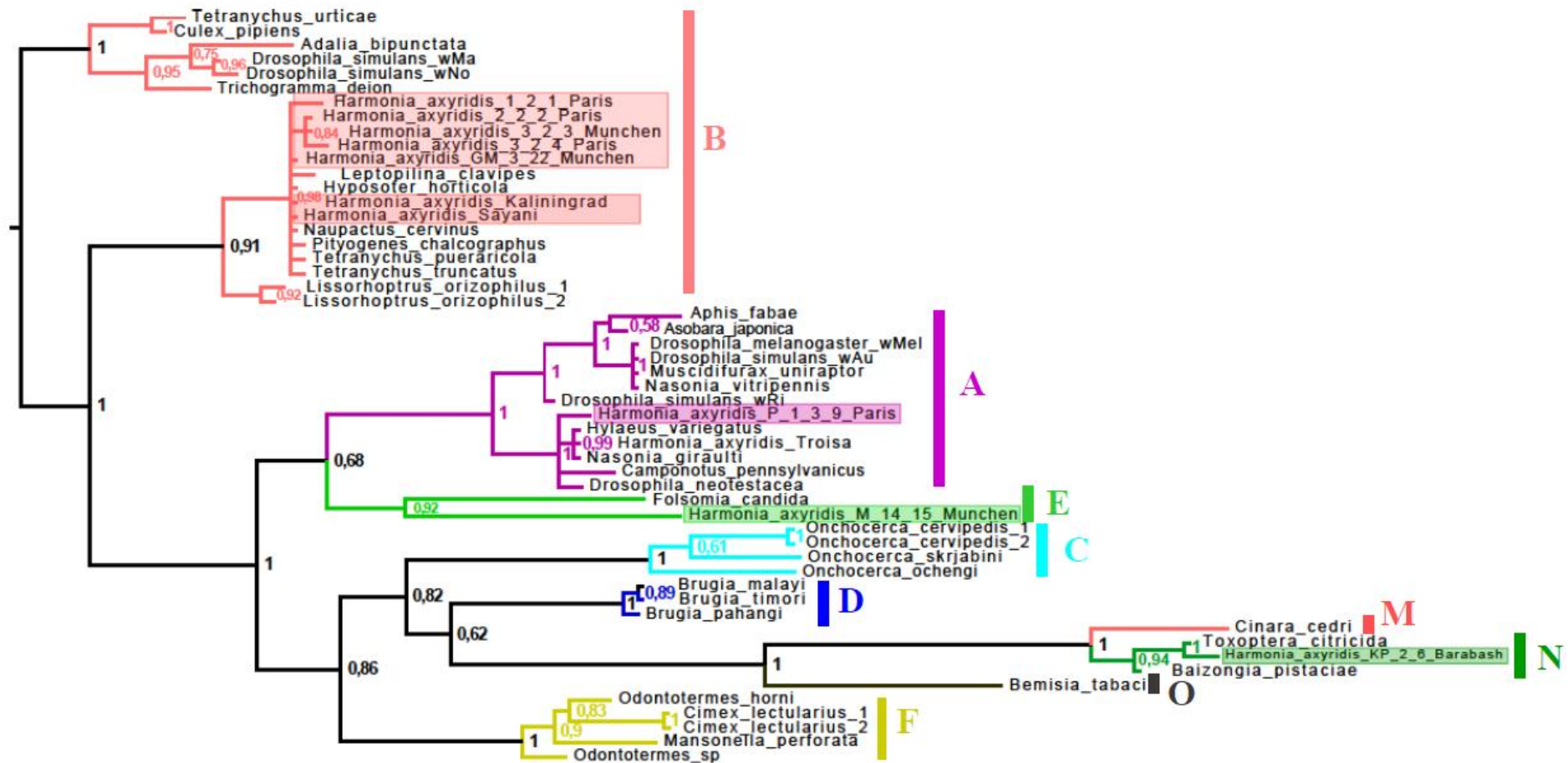


Рисунок 3.2.6 – Филогенетическая реконструкция 53 изолятов *Wolbachia* на основе анализа фрагмента гена *fbpA* (428 пн). Имена изолятов *Wolbachia* обведены рамкой. Полные видовые названия насекомых хозяев и принадлежность штаммов *Wolbachia* к супергруппам приведены в Таблице 2.4.2. Нуклеотидные последовательности фрагментов гена *fbpA* *H. axyridis*, использованные для построения филограммы, 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.

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

Для изучения влияния *Wolbachia* на детерминацию пола у *H. axyridis* от инфицированных самок 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 (рисунок 3.2.7). Результаты позволяют утверждать, что *Wolbachia* не оказывает андрогидного действия на *H. axyridis*.

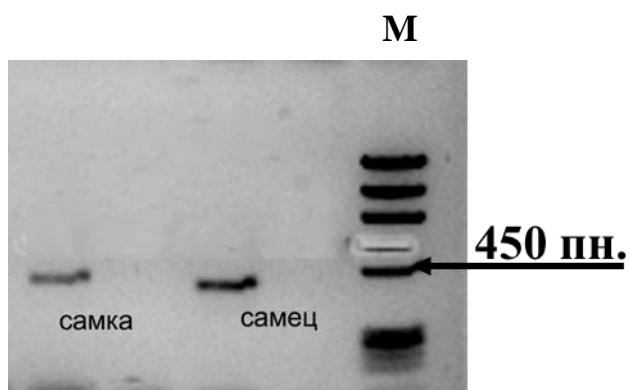


Рисунок 3.2.7 – Электрофореграмма продуктов амплификации образцов ДНК F₁ от самок, инфицированных *Wolbachia* (линия КП_2). М – маркер молекулярного веса

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

Rickettsia была обнаружена лишь 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 гена цитратсинтазы (*gltA*). 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 кокцинелл, которые относятся к группе *Rickettsia AB* (Weinert *et al.*, 2007).

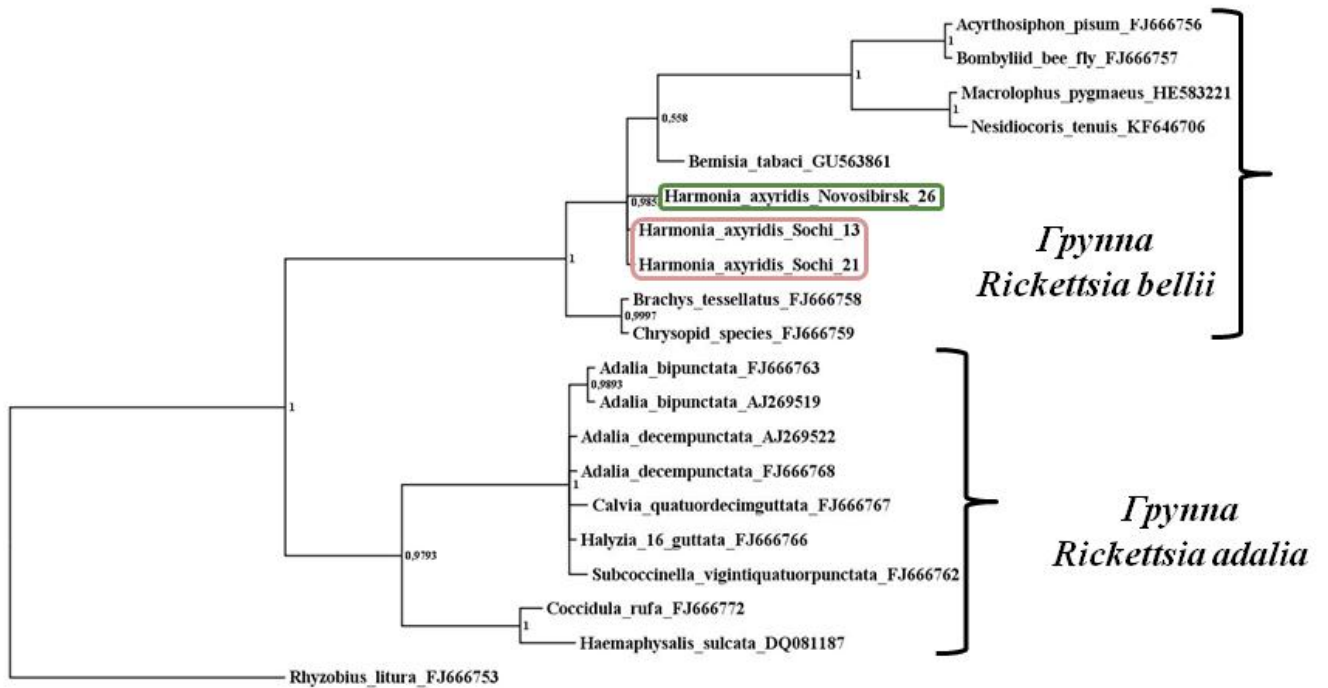


Рисунок 3.2.8 – Филогенетическая реконструкция 22 изолятов *Rickettsia* на основе анализа фрагмента гена цитратсинтазы *gltA* (367 пн). Имена трех новых изолятов *Wolbachia* обведены рамкой. Нуклеотидные последовательности фрагментов гена, полученные в данной работе и использованные для построения филограммы,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

3.2.2.3 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 области, включающей 3'-конец гена 16S рРНК, межгенный спейсер ITS1 и 5'-конец гена 23S рРНК, полученных на матрице суммарной ДНК 14 инфицированных жуков, были получены последовательности длиной 301 пн. Данные по выявленной нуклеотидной изменчивости этих фрагментов представлены в таблице 3.2.5. 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). Эти 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, оказалась идентичны ранее описанному штамму из Японии HARFUKU2 (GenBank ID: AB127933) (Nakamura *et al.*, 2005). Данные таблицы 3.2.5 указывают на то, что большинство инфицированных самок

H. axyridis из Горно-Алтайска, Биробиджана, Бухты Троица, Владивостока, и Киото инфицировано несколькими штаммами *Spiroplasma*, что подтверждается присутствием нескольких нуклеотидов «С» и «Т» (Y), «А» и «G» (R), «А» или «С» (M) и «С» и «Т» (Y) (обозначения Y, R, M приводятся по нуклеотидному коду IUPAC) по сайтам 84, 147, 185 и 260 изученной последовательности соответственно. Для идентификации отдельных штаммов ПЦР-фрагменты были клонированы, и ряд индивидуальных клонов, представляющих каждый из клонированных фрагментов, были секвенированы. Результаты идентификации штаммов *Spiroplasma* из самок с множественной инфекцией представлены в таблице 3.2.6. Двойное инфицирование штаммами HARFUKU1 и HARFUKU2 выявлено в образцах западной (Горно-Алтайск) и восточной групп популяций. Эти штаммы найдены во всех пяти проанализированных локалитетах. 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: Vi10 – GenBank ID: KR363166, штамм Vi22 – GenBank ID: KR363167, штамм: Vi24 – GenBank ID: KR363168.

О количественном соотношении штаммов *Spiroplasma* в случае множественного инфицирования можно судить по соотношению независимо полученных плазмидных клонов (таблица 3.2.6). Всего получено 73 клон, соответствующих штамму HARFUKU2, и 32 клон, соответствующих штамму HARFUKU1. 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

копийности 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 линий спироплазма представлены на рисунке 3.2.9. Анализ показывает, что *Spiroplasma*, обнаруженная у *H. axyridis*, является 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 на рисунке 3.2.10.

Таблица 3.2.5 – Нуклеотидная изменчивость фрагмента размером 301 пн области ITS штаммов эндосимбиотической бактерии *Spiroplasma* из *H. axyridis*.

Места сбора и номера инфицированных самок <i>H. axyridis</i>	Номера изменчивых нуклеотидов приведены по последовательности штамма <i>Spiroplasma</i> - HARFUKU1 (GenBank ID: AB127932)														
	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»).

Таблица 3.2.6 – «Гаплотипы» *Spiroplasma* в индивидуальных самках из разных локальностей нативного ареала *H. axyridis*

Место сбора и номер самки <i>H. axyridis</i>	Выявленные гаплотипы <i>Spiroplasma</i> . Число клонов с соответствующим гаплотипом указано в скобках
Биробиджан № 29	(11) HARFUKU2
	(3) HARFUKU1
	(1) Bi24
	(1) Bi22
Биробиджан № 16	(14) HARFUKU2
	(2) HARFUKU1
	(1) Bi24
	(1) Bi10
Горно-Алтайск № 16	(5) HARFUKU2
	(1) HARFUKU1
Киото № 11	(12) HARFUKU2
	(2) HARFUKU1
Киото № 15	(9) HARFUKU2
	(5) HARFUKU1
Бухта Троица № 5	(6) HARFUKU2
	(6) HARFUKU1
	(4) Bi22
Бухта Троица № 21	(10) HARFUKU2
	(6) HARFUKU1
Владивосток № 37	(6) HARFUKU2
	(7) HARFUKU1

Примечание: числа в скобках указывают на число независимых плазмидных клонов с данным типом фрагмента

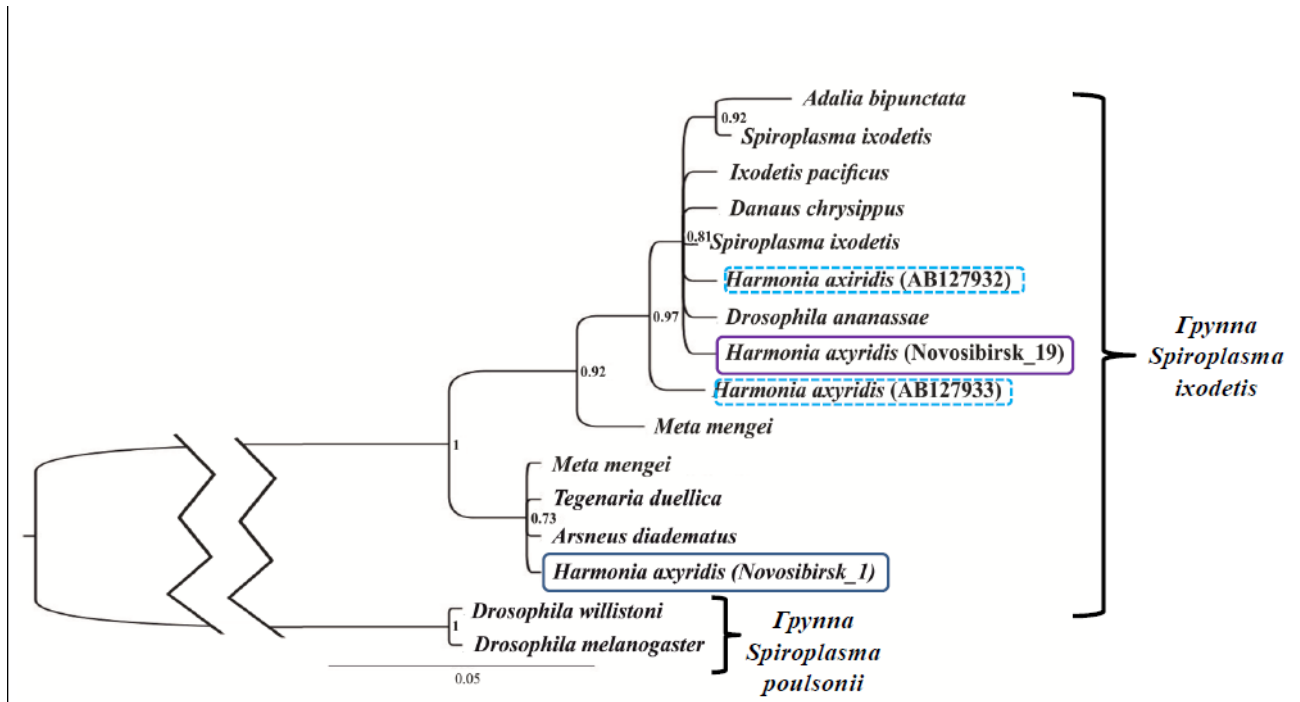


Рисунок 3.2.9 – Филогенетическая реконструкция штаммов *Spiroplasma* – эндосимбионта *H. axyridis*, построенная на основе анализа последовательности фрагмента ITS1 (301 пн.), включающей фрагмент гена 16S rRNA, межгенный спейсер ITS1 и фрагмент гена 23S rRNA. Величины байесовской вероятности приведены рядом с узлами филограммы. Рамками с прерывистой линией обозначены описанные ранее (Nakamura *et al.*, 2005) штаммы *Spiroplasma*; рамками со сплошной линией обозначены впервые найденные штаммы

Таблица 3.2.4 – 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			3.84	
	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*.



Рисунок 3.2.10 – Распространение симбиотических бактерий *Wolbachia*, *Rickettsia* и *Spiroplasma* в нативных и инвазивных популяциях *H. axyridis*. Локальности: 1 – Новосибирск, 2 – Горно-Алтайск, 3 – Саяны, 4 – Биробиджан, 5 – бухта Троицы, 6 – - Владивосток, 7 – поселок Барабаш, 8 – - Киото, 9 – Сочи, 10 – Калининград, 11 – Прага, 12 – Мюнхен, 13 – Париж.

3.2.3 Обсуждение

Два независимых процесса – развитие методов биологической защиты сельскохозяйственных культур от вредителей и развитие транспортного сообщения, повлекшее увеличение интенсивности и объемов перевозок, привели к быстрому росту числа инвазий. Инвазивные виды растений и животных рассматриваются в настоящее время как важный компонент глобальных изменений окружающей среды (Vitousek *et al.*, 1996). Вселенцы негативно влияют на экосистемы, снижая уровень биоразнообразия на захваченных территориях и нарушая пищевые цепи и структуру сообществ; экономические потери от инвазий оцениваются суммами от миллионов до миллиардов долларов ежегодно (Pimentel *et al.*, 2000). В некоторых случаях доля инвазивных видов по отношению к видам-аборигенам достигает значений, приближающихся к 50%. Среди насекомых инвазии отмечены как для вредителей сельскохозяйственных культур, так и для видов, используемых для борьбы с вредителями.

Одним из центральных вопросов при обсуждении инвазий вне зависимости от таксономической принадлежности инвайдера остается вопрос о биологических основах и причинах возникновения инвазивности. Считается, что для успешного захвата новых территорий необходимо быстрое нарастание численности популяций вселенцев, которое может быть обеспечено за счет их специфических особенностей, таких как короткое время поколения, высокая плодовитость, высокая скорость развития, дополняющиеся агрессивным поведением, высокой конкурентоспособностью, способностью к выживанию в необычных и нестабильных условиях окружающей среды. В последние годы при обсуждении инвазий все большее внимание начинает уделяться генетическим процессам, протекающим при натурализации, в период лаг-фазы и колонизации, и определяющим впоследствии высокую жизнеспособность и быстрое распространение колониста по новым территориям. Эти процессы определяются в том числе особенностями генетической структуры популяции-источника,

являющейся носителем преадаптаций, способствующих впоследствии формированию у вида предрасположенности и способности к инвазии.

Для выяснения происхождения инвазивных популяций и определения популяции – источника в настоящее время, как правило, используются молекулярно-генетические маркеры митохондриального и ядерного генома. Исследования мт-генома не ограничиваются какой-либо одной областью, продуктивным оказывается изучение полиморфизма различных фрагментов мтДНК – гена *cox1*, контрольного региона мтДНК, области генов 12S и 16S рНК, области, включающей гены *ND2*, тРНК^{Три} и тРНК^{Ала}. В некоторых случаях результаты анализа мтДНК дополняются данными микросателлитного анализа, в ряде работ опора делается только на микросателлитный анализ. Описанные молекулярно-генетические подходы оказались эффективными для определения происхождения инвазивных популяций животных из разных таксономических групп – улитки *Melanoides tuberculata* (Facon *et al.*, 2003), двустворчатого моллюска *Gemma gemma* (Totte, 1834) (Hoos *et al.*, 2010), краба *Carcinus maenas* (Darling *et al.*, 2008), мухи *Ceratitis capitata* (Davies *et al.*, 1999), комара *Culex quinquefasciatus* (Fonseca *et al.*, 2000), западной длинноусой блошки *Diabrotica virgifera virgifera* (Miller *et al.*, 2005, Ciosi *et al.*, 2008), рыб – гуппи *Poecilia reticulata* (Lindholm *et al.*, 2005) и радужной форели *Oncorhynchus mykiss* (Thibault *et al.*, 2009), ящерицы *Anolis sagrei* (Kolbe *et al.*, 2004).

В представленной работе для выяснения происхождения инвазивных популяций *H. axyridis* было проведено типирование по фрагменту митохондриального гена *cox1* и микросателлитным маркерам ядерного генома имаго, представляющих западную и восточную группы популяций нативного ареала и европейские и американскую инвазивные популяции.

Распределение и структура гаплотипов в выборках из Горно-Алтайска и Владивостока и Киото, а также уровень межпопуляционной изменчивости нативных популяций, определенный с использованием микросателлитных маркеров, свидетельствуют о генетической дифференциации вида и двух географических кластерах в границах нативного ареала, существование которых

подтверждается ранее полученными данными по комплексу морфологических признаков *H. axyridis* – рисунку элитр, рисунку пронотума и наличию элитрального гребня (Dobzhansky, 1933; Блехман *и др.*, 2010). Популяции Западной Сибири, в которую входит горно-алтайская популяция, полностью образованы морфологической формой *axyridis*, редко встречающейся в популяциях Дальнего Востока.

Картина географической изменчивости в нативных популяциях *H. axyridis* с учетом данных морфологического анализа говорит о том, что в эволюционном прошлом единый ареал вида распался 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.

Сходство генного пула «инвазивных» гаплотипов 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. Происхождение инвазивных популяций от популяций восточной группы, скорее всего популяций северо-востока Китая, поддерживается низкими – 0.008-0.046 – значениями F_{st} , полученными в результате микросателлитного анализа. Наши данные нашли подтверждение в работах французских исследователей, показавших, что популяцией-источником явилась единственная популяция нативного ареала, а плацдармной популяцией, выходцы из которой колонизируют Европу, Южную Америку и южную Африку стала инвазивная популяция *H. axyridis*, вселившаяся на восточное побережье Соединенных Штатов (Lombaert *et al.*, 2010).

Специальным вопросом теории инвазий, напрямую связанным с инвазивным успехом, представляется вопрос об уровне генетической изменчивости вселенцев. Сохранение генетической изменчивости является критическим элементом при инвазии, поскольку именно изменчивость обеспечивает адаптацию и эволюцию вида в новой для него среде. Любой вид, попадающий на новую территорию и местообитание, в той или иной степени переживает эффект основателя и проходит через "бутылочное горлышко", неизбежно сопровождающееся потерей генетической изменчивости. Обобщенные данные результатов исследований 80 видов животных, растений и грибов, указывают на снижение внутривидовой молекулярно-генетической изменчивости по этим показателям в интродуцированных популяциях по сравнению с популяциями, явившимися источником инвазии (Dlugosch, Parker, 2008). Для характеристики генетического разнообразия в большинстве этих исследований используются показатели гетерозиготности и аллельного разнообразия. Средняя по видам статистически значимая потеря гетерозиготности для 80 изученных видов составляет 18.7%, а потеря аллельного разнообразия оказывается на 5% выше, чем потеря гетерозиготности. Потеря изменчивости, регистрируемая на основании данных анализа нейтральных молекулярно-генетических маркеров, таких как микросателлитные локусы, может быть существенно выше, чем потеря наследуемой изменчивости по адаптивным признакам, определяющей ответ популяции на естественный отбор (Dlugosch, Parker, 2008; Suarez, Tsutsui, 2008; Салменкова, 2008). В некоторых случаях в популяциях вселенцев происходит увеличение аддитивной генетической варiances после прохождения популяции через бутылочное горлышко (Lindholm *et al.*, 2005). Кроме того, следствием генетического дрейфа может стать случайная фиксация неких «благоприятных» для вселенцев в новой для них среде обитания аллелей.

В случае с *H. axyridis* драматического снижения уровня генетической изменчивости в инвазивных популяциях по сравнению с популяциями нативного ареала по нейтральным генетическим маркерам не наблюдается. Значение средней ожидаемой гетерозиготности (H_e) по 18 микросателлитным локусом для выборки

особей из популяций нативной части ареала равно 0.571 ± 0.060 , что достоверно не отличается от средней ожидаемой гетерозиготности *H. axyridis* из инвазивной части ареала, которая составляет величину 0.568 ± 0.062 , при 95% пороге вероятности безошибочных прогнозов. В локальных выборках инвазивного ареала отмечается уровень аллельного разнообразия (5.57 ± 1.10 аллеля на локус), сопоставимый с уровнем аллельного разнообразия популяций нативного ареала (6.51 ± 1.11 аллеля на локус) и достоверно отличающийся от уровня аллельного разнообразия в не способных к самоподдержанию биоконтрольных популяциях (2.4 ± 0.65 аллеля на локус). Полученные в исследовании результаты позволяют предполагать исключительно «удачную» генетическую структуру популяции первых колонистов, основавших плацдарм, обеспечившую сохранение необходимого для вида *H. axyridis* уровня изменчивости.

С вопросом генетического разнообразия плацдармных популяций непосредственно связаны проблемы инбредной депрессии и гетерозиса. Хорошо известно, что гетерозис может являться результатом перевода вредных рецессивных мутаций в гетерозиготное состояние. Рецессивные мутации фиксированы в гомозиготном состоянии в родительских популяциях и переходят в гетерозиготное состояние при межпопуляционных скрещиваниях. Отсутствие гетерозиса указывает на низкую частоту фиксированных вредных мутаций в изученных нативных и инвазивных популяциях *H. axyridis*. Поскольку ранее внутри нативной области ареала для *H. axyridis* была показана сильная инбредная депрессия (Facon *et al.*, 2011), становится очевидным, что нативные популяции вида генетически дифференцированы и различаются по величине генетического груза. Низкая частота фиксированных вредных мутаций, высокий уровень гетерозиготности, обнаруженный при анализе микросателлитных маркеров ($H_e = 0.57$; Таблица 3.2.3), и низкий наблюдаемый уровень генетической дифференциации среди популяций нативного ареала, наблюдаемый на тех же маркерах ($F_{ST} < 0.023$ между парами нативных популяций), указывают на то, что нативные популяции *H. axyridis* характеризуются большим эффективным

размером. Такие демогенетические особенности находятся в соответствии с низкой частотой фиксированных вредных мутаций внутри популяций.

Аутбредная депрессия была отмечена по признаку времени поколения только среди нативных популяций. Аутбредная депрессия может быть результатом разрушения локальных адаптаций или генетической несовместимости. Поскольку эксперимент был проведен в строго контролируемых лабораторных условиях, обнаружить какие-либо эффекты приспособленности, являющиеся результатом действия генов, участвующих в локальных адаптациях, не удалось. Наблюдаемое ухудшение приспособленности в нативных внутрипопуляционных скрещиваниях, следовательно, наиболее вероятно является результатом генетической несовместимости, т.е. наличия аллелей, комплементирующих друг друга в одной популяции, но не имеющих такого благоприятного эффекта при ассоциациях с аллелями из других популяций (то есть коадаптивных генных комплексов). В отличие от нативных популяций, интродуцированные популяции *H. axyridis* не страдают от аутбредной депрессии. Приспособленность особей по признаку время поколения выше в межпопуляционных скрещиваниях по сравнению с внутрипопуляционными. Поскольку инвазивные популяции имеют общее происхождение, весьма возможно, что коадаптированные генные комплексы сходны в инвазивных популяциях. Более того, инвазивные популяции *H. axyridis* прошли через одно, или несколько событий бутылочных горлышек умеренной интенсивности. Такие демографические события, объясняющие изменчивость генетической структуры, наблюдались при анализе микросателлитных локусов инвазивных популяций, также, как и среди инвазивных и нативных популяций (Таблица 3.2.3, Lombaert *et al.*, 2010, 2011). Ранее было показано (Facon *et al.*, 2011), что инвазивные популяции не страдают от инбредной депрессии и имеют более высокую среднюю приспособленность по сравнению с нативными популяциями. Поэтому отсутствие гетерозиса, наблюдаемое в настоящем исследовании, свидетельствует о том, что вредные мутации были утеряны в интродуцированных популяциях.

Полученные результаты подтверждают, что генетическое смешивание вряд ли значительно повлияло на успешную инвазию *H. axyridis*. Настоящее заключение представляется неожиданным, поскольку в литературе по ауткроссингу между аллопатрическими популяциями у инвазивных видов сообщается о значительном числе случаев, где смешивание оказывало значительное влияние на процесс инвазии (Ellstrand, Schierenbeck, 2000; Kolbe *et al.*, 2007; Lavergne, Molofsky, 2007; Keller, Taylor, 2010; Chapple *et al.*, 2013). В частности, на основании исследований инвазивного вида *Silene latifolia* (Verhoeven *et al.*, 2011) показано, что для популяций, которые пережили недавнее бутылочное горлышко или которые столкнулись с новым давлением отбора, преимущество от смешивания может быть достаточно высоким. Результаты работы позволяют обсуждать потенциальное значение генетического смешивания при биологической инвазии по крайней мере с двух аспектов. Во-первых, становится возможной оценка эффекта при сравнении приспособленности аутбредного потомства в пределах данной популяции относительно аутбредного потомства между различными субпопуляциями данной популяции в том случае, если ожидаемым эффектом смешивания является гетерозис. Инбредная депрессия, которая определяется как более низкая относительная приспособленность инбредного потомства относительно аутбредного потомства внутри одной популяции (Charlesworth, Charlesworth, 1999), должна оцениваться как особый феномен. Оба явления являются следствием различий в структуре генетического груза. Если гетерозис связан с мутациями, фиксированными в родительской популяции, то инбредная депрессия вызывается мутациями, сегрегированными в родительской популяции (Escobar *et al.*, 2008). Во-вторых, как ожидалось, смешивание поддерживает среднюю приспособленность особей в инвазивных популяциях, когда распространяющиеся группы, которые вступают в контакт и скрещиваются, имеют различные наборы фиксированных вредных мутаций. Подобное может случиться, если нативные популяции страдают от высокого генетического груза с большим количеством фиксированных вредных мутаций, либо в случаях,

интенсивного дрейфа генов во время интродукции в формирующихся инвазивных популяциях (Pujol *et al.*, 2009).

Оценка роли репродуктивных симбиотических бактерий в формировании преадаптаций к инвазии, вероятно, входит в круг принципиально новых направлений исследований, призванных выявить причины и механизмы успешного проникновения насекомых за пределы их исторического ареала даже с учетом того, что цитоплазматическими репродуктивными симбионтами инфицированы, по всей видимости, десятки, а может быть и сотни тысяч видов насекомых. В представленной работе сделан первый шаг в изучении возможного влияния репродуктивных симбионтов на способность к инвазии – определены видовой состав, изменчивость и распространение в популяциях нативного и инвазивного ареала *H. axyridis* трех репродуктивных цитоплазматических бактерий – *Rickettsia*, *Wolbachia* и *Spiroplasma*.

Rickettsia выявлена у *H. axyridis* впервые. Обе обнаруженные молекулярные формы относятся к группе *R. bellii*, тогда как *Rickettsia*-эндосимбионты большинства других видов кокциnellид относятся к группе *Rickettsia* АВ (АВ – *A. bipunctata*) (Weinert *et al.*, 2007). Сопоставление филогенетического древа семейства Coccinellidae (Magro *et al.*, 2010) с филограммой *Rickettsia* приводит к любопытной гипотезе. Род *Harmonia* филогенетически существенно ближе роду *Adalia*, с которым образует общую кладу, чем роды *Coccinella*, *Halyzia* и *Calvia*. В то же время, *Rickettsia* – эндосимбионты представителей родов *Coccinella*, *Halyzia* и *Calvia* объединяются в одну кладу с линиями *Rickettsia*, инфицирующими *A. bipunctata* и *A. decempunctata* (рисунок 3.2.8). Сходство эндосимбионтов клады *Rickettsia* АВ свидетельствует о древности заражения риккетсией представителей подсемейства Coccinellinae, очевидно, произошедшем до его дивергенции на современные виды. Положение на филограмме молекулярных форм *Rickettsia*, выявленных в представленной работе, позволяет предположить, что в процессе эволюции *H. axyridis* утратила предковый, общий для других представителей подсемейства вариант бактерии, либо он не был обнаружен нами из-за недостаточного размера выборки. Молекулярные формы *Rickketsia*, найденные у

H. axyridis, могли быть приобретены хозяином в результате другого, возможно, более позднего события инфицирования. Филогенетическая близость молекулярных форм *Rickettsia* – эндосимбионта *H. axyridis* с *Rickettsia* – эндосимбионтом *B. tabaci* не исключает инфицирования *H. axyridis* в результате горизонтального переноса через жертву, либо эктопаразитов. Такая горизонтальная передача эндосимбиотических бактерий известна для ассоциаций хозяин-паразит (Noda *et al.*, 2001; Vavre *et al.*, 1999; Pattabhiramaiah *et al.*, 2011), где высокое сходство последовательностей бактерий хозяина и его паразита расценивается как косвенное свидетельство горизонтальной передачи. Другим путем приобретения эндосимбиотических бактерий могут быть ассоциации хищник-жертва. Поскольку на стадиях личинки и имаго *H. axyridis* поедает яйца *B. tabaci* (Khan, Wan, 2015), а линии *Rickettsia*, инфицирующие оба вида филогенетически близки, предположение о возможности инфицирования *H. axyridis* от *B. tabaci* не лишено оснований. Однако цепь, через которую была приобретена бактерия, может быть значительно сложнее и включать каких-то общих для обоих видов насекомых эктопаразитов, например, клещей.

Известно, что *Rickettsia* – эндосимбионт инвазивного биотипа В *B. tabaci* не вызывает андроцид, но оказывает явное влияние на репродукцию хозяина (Himler *et al.*, 2011). На протяжении жизни инфицированные риккетсией самки *B. tabaci* производят почти в два раза больше взрослого потомства, чем неинфицированные ($P < 0.0001$), при том, что доля потомков, доживающих до состояния имаго, у инфицированных бабочек также оказывается выше, чем у неинфицированных ($P < 0.0001$). *Rickettsia* определяет сдвиг в соотношение полов в потомстве инфицированных матерей в сторону самок. Совокупность указанных последствий инфекции обеспечила быстрое – менее, чем за 80 поколений, распространение симбионта в инвазивных популяциях *B. tabaci* юго-запада Соединенных Штатов с 1% в 2000 году до 97% в 2006 году, что сопоставимо с распространением *Wolbachia* в популяциях *D. simulans* в Калифорнии (Turelli, Hoffmann, 1991). Помимо влияния на репродукцию *Rickettsia* повышает устойчивость

инфицированных бабочек к свободноживущим бактериям (Hendry, Hunter, Baltrus, 2014).

Влияние *Rickettsia* на *H. axyridis* до настоящего времени неизвестно. Однако если эффекты бактерии у *B. tabaci* и *H. axyridis* сопоставимы, следует ожидать взрыва зараженности в инвазивных популяциях божьей коровки.

Полученные результаты существенно дополняют имеющиеся сведения об инфицированности *H. axyridis* эндосимбионтом *Wolbachia*. Из данных литературы известно, что *Wolbachia*, входящая по результатам анализа фрагмента гена *ftsZ* (EU627750.1, EU627751.1) в супергруппу В, ранее была обнаружена в двух нативных популяциях *H. axyridis* из южного Китая (Ahmed *et al.*, 2010). Сравнение «китайских» вариантов последовательностей с последовательностями исследованных образцов ДНК имаго из Саян, Калининграда и Праги выявило однонуклеотидные замены по пяти сайтам. Вероятно, *Wolbachia* из популяций Китая и линия, обнаруженная в одной из нативных и в инвазивных популяциях, относятся к разным молекулярным формам *Wolbachia* одной супергруппы (В). Зараженность *H. axyridis* линиями *Wolbachia*, которые относятся к супергруппам А и N, показана впервые. Можно предполагать, что линия M_14_15 представляет новую, ранее не описанную супергруппу. Как и в случае с *Rickettsia*, сходство последовательностей фрагментов генома *Wolbachia*, инфицирующей хищника – *H. axyridis*, и *Wolbachia*, инфицирующей возможную жертву – тлей *T. citricida*, позволяет говорить о горизонтальном переносе симбионтов в являющихся общим путем обмена цитоплазматическими элементами ассоциациях хищник-жертва.

Поскольку в популяциях сосуществуют различные молекулярные формы *Wolbachia*, представляется вполне возможным попытаться в последующих исследованиях выявить связь молекулярных форм бактерии с географическим статусом популяции хозяина. В любом случае выявление разнообразия генотипов *Wolbachia* у *H. axyridis* открывает перспективы использования симбиотических бактерий как дополнительного маркера при выяснении происхождения инвазивных популяций *H. axyridis*.

Зараженность *Wolbachia* инвазивных популяций *H. axyridis* показана нами впервые, аналогичные данные по инвазивным и биоконтрольным популяциям *H. axyridis* не найдены. Уровень заражения *H. axyridis* в некоторых локальностях инвазивного ареала в Европе оказался выше, чем в популяциях нативного ареала, причем это повышение уровня инфекции сопровождалось увеличением разнообразия бактериальных линий. Последнее, несомненно, стало следствием множественных событий интродукции.

Популяционно-генетические последствия зараженности могут обсуждаться в связи с инфекцией особей обоих полов. Зараженность самцов и самок в совокупности с многообразием линий, инфицирующих *H. axyridis*, позволяет предполагать цитоплазматическую несовместимость, в наибольшей степени влияющей на генетическую структуру зараженных популяций. Следствием ЦН ближайшем будущем может оказаться распространение по инвазивному ареалу некоторых молекулярных вариантов *Wolbachia*. Экспансия таких молекулярных вариантов, определяющих ЦН, будет поддержана давлением отбора в том случае, если эти варианты обеспечивают ее носителям преимущества в приспособленности при сравнении с носителями других молекулярных вариантов, либо с неинфицированными насекомыми.

Spiroplasma была обнаружена только в границах нативного ареала *H. axyridis*, особенностью изученных инвазивных популяций стало отсутствие в них этой бактерии. Можно предполагать, что потеря *Spiroplasma* происходила при прохождении вселенцев через «бутылочное горлышко». Однако маловероятно, что случайное событие – потеря этого, наиболее распространенного симбионта – многократно повторялось. Скорее, отсутствие *Spiroplasma* в инвазивных популяциях может объясняться тем, что родительские линии, давшие начало инвазивным, были свободны от *Spiroplasma*. С другой стороны, обсуждая популяционно-генетические аспекты зараженности спироплазмой, нельзя не учитывать андроцидный эффект бактерии. Инвазивные популяции *H. axyridis* устойчивы к инбридингу (Tayeh *et al.*, 2013), а особи в этих популяциях «очищены» от летальных генетических факторов, что достигается за счет

инбридинга. Присутствие в популяции андроцидных бактерий препятствует инбридингу, поскольку в потомстве инфицированных самок присутствуют только дочери, не имеющие возможности спариваться с сибсами. Отсутствие *Spiroplasma* в группе особей, ставших основателями инвазивной плацдармной популяции, повышает вероятность освобождения популяции от генетического груза в результате инбридинга. Кроме того, нельзя исключать, что *Spiroplasma* может оказывать неизвестный до настоящего времени негативный эффект на жизнеспособность и приспособленность инфицированных самок в новых для них условиях обитания. В таком случае элиминация из популяции инфицированных *Spiroplasma* самок будет поддерживаться отбором.

Существование рекомбинантных форм *Spiroplasma* в индивидуальных образцах может свидетельствовать в пользу древности заражения бактерией хозяина – *H. axyridis*.

Полученные в настоящей работе данные говорят о неоднократных событиях инфицирования *H. axyridis* всеми тремя репродуктивными симбиотическими бактериями – *Spiroplasma*, *Rickettsia* и *Wolbachia*. Обнаруженный уровень инфицированности популяций *H. axyridis* *Spiroplasma* и *Rickettsia* соответствует уровню заражения этими эндосимбионтами, описанному ранее в популяциях как *H. axyridis*, так других видов кокцинелл (Majerus *et al.*, 1999; Nakamura *et al.*, 2005; Weinert *et al.*, 2007).

Отсутствие в инвазивных популяциях *Spiroplasma*, достаточно широко распространенной в нативной части ареала – до 49% (Majerus *et al.*, 1998), позволяет предполагать наличие отрицательной связи этого эндосимбионта с формированием способности к инвазии у *H. axyridis*, а также говорит о том, что эта бактерия является более функционально значимым симбионтом для хозяина, чем *Rickettsia* и *Wolbachia*. Самки, инфицированные *Rickettsia* и *Wolbachia*, обнаружены и в нативных, и в инвазивных популяциях *H. axyridis*. Поскольку *Rickettsia* во всех изученных локальностях в настоящее время встречается с низкой частотой (Таблица 3.2.4), её влияние на формирование высокой инвазивности *H. axyridis* может оцениваться как незначительное.

Неравномерность распределения *Wolbachia* в популяциях западноевропейской части инвазивного ареала требует дальнейших исследований с целью выяснения характера и специфических особенностей симбиотических отношений *Wolbachia* ее хозяина *H. axyridis*.

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

Работа выполнена совместно с И.Д. Александровым (ОИЯИ РАН), М.В. Александровой (ОИЯИ РАН), Н.В. Рошиной (ИМГ РАН), Е.В. Шайкевич (ИОГен РАН), А.М. Куликовым (ИБР РАН), О.Е. Лазебным (ИБР РАН), А.В. Марковым (РИН РАН), Б.В. Андриановым (ИОГен РАН), Т.В. Гореловой (ИОГен РАН).

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

Для выяснения биологических эффектов *Wolbachia* на насекомое-хозяина, понимания специфики симбиотических взаимоотношений и поиска механизмов, обеспечивающих стабильное поддержание бактерии в популяциях насекомых, выполнены исследования по изучению влияния инфекционного статуса насекомого на продолжительность жизни, скорость старения, пищевые предпочтения, устойчивость к энтомопатогенам и предпочтения в межлинейных скрещиваниях на модельном объекте – *D. melanogaster*.

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 была обработана тетрациклином в соответствии с приведенной выше методикой, 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 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).

Для оценки возможного влияния тетрациклина на показатели продолжительности жизни и скорости старения проведено изучение жизнеспособности самок F_1 из двух диких лабораторных линий Or и S без *Wolbachia* от родителей, выросших на среде с тетрациклином и без него. Полученные данные свидетельствуют о том, что свойственная данной линии мух продолжительность жизни (рисунок 3.3.1, б и в) и интенсивность процессов старения (рисунок 3.3.1, д и е) практически не изменяются под действием тетрациклина, а наблюдаемые слабые эффекты имеют противоположную направленность для двух линий. На уровне T_{50} , где эти эффекты более заметны, обработка родителей тетрациклином несколько увеличивает продолжительность жизни самок из линии Or (30 суток), но снижает таковую у самок из линии S (34 суток) по сравнению с показателями T_{50} , характерными для указанных линий в отсутствии воздействия антибиотика (26 и 38 суток, соответственно, для Or и S линий). Разница в обоих случаях статистически не достоверна ($P=0.3\div 0.5$).

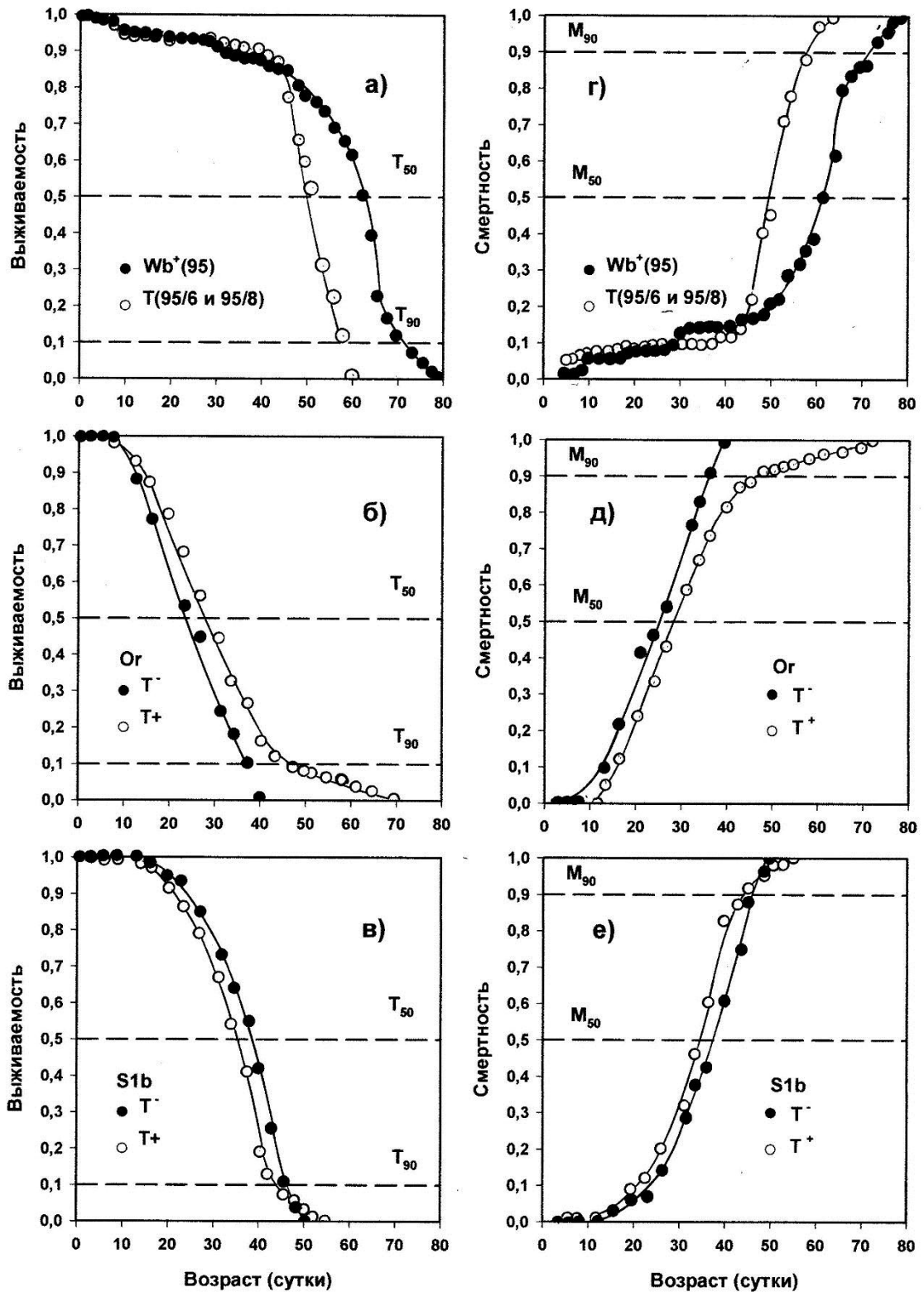


Рисунок 3.3.1 – Выживаемость (а-в) и смертность (г-е) в зависимости от возраста самок *D. melanogaster* с *Wolbachia* (-•-) и без нее как результат тетрациклиновой терапии (-o-) (а, г), а также потомство интактных (-•-) и обработанных антибиотиком (-o-) самок из не инфицированных *Wolbachia* диких лабораторных линий Oregon-R (б, д) и Sib (в, е).

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

	Wb^-	Wb^+
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	
Wb^+	143	132
Wb^-	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 $\nu=1$. 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 $\nu=1$).

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. Для того чтобы исключить возможность нарушения вкусовой/обонятельной чувствительности, был проведен еще один эксперимент. Самок каждой из линий помещали в камеру, где находились стаканчики со стандартным кормом и кормом, смоченным для большей привлекательности яблочным соком («улучшенный» корм). Через 10 часов самок удаляли и подсчитывали число отложенных яиц (таблица 3.3.3).

Таблица 3.3.3 – Чувствительность к особенностям субстрата инфицированных *Wolbachia* и неинфицированных мух *D. melanogaster*

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

Для линии, неинфицированной *Wolbachia* – Wb^+ , $\chi^2 = 113.28$, что больше $\chi^2_{st} = \{3.84; 6.64; 10.83\}$ при числе степеней свободы $\nu=1$. Для Wb^- $\chi^2 = 63,66$, что больше $\chi^2_{st} = \{3.84; 6.64; 10.83\}$ при числе степеней свободы $\nu=1$. Согласно критерию χ^2 , наблюдается достоверное предпочтение улучшенного корма мухами обеих линий, что свидетельствует о сохранении у зараженной сублинии вкусовой и/или обонятельной чувствительности.

Таким образом, в ходе эксперимента было показано, что 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.

Подводя предварительный итог представленной части работы хотелось бы акцентировать внимание на том, что 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. Анализ был проведен на основании данных количественного учета выживших в условиях конкуренции особей анализируемой линии и тестер-линии, различаемых по фенотипу. Результаты эксперимента представлены в таблице 3.3.4. 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).

Таблица 3.3.4 – Доля потомков (индекс конкуренции) от анализируемых линий с *Wolbachia* (№ 95) и без неё (95/6) среди общего числа потомков, выживающих при смешанных скрещиваниях анализируемых линий с тестер-линией

Анализируемая линия	Число потомков анализируемой линии	Общее число потомков	Индекс конкуренции (%)	P
95 ^{Wb+}	1419	2265	63.7±2.2	
95/6 ^{Wb-}	869	1623	53.5±2.5	0.0047
95/8 ^{Wb-}	906	2286	39.6±2.6	0.0001

Wolbachia повышает конкурентоспособность личинок инфицированных мух в смешанных популяциях. Хотя сублинии 95/6 и 95/8 достоверно отличаются

между собой ($P=0.0003$) по индексу конкуренции, обе они оказываются менее конкурентоспособными по сравнению с инфицированной линией. 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 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. По той же причине –

отсутствие значимых различий, были объединены результаты, полученные с использованием линий CR1, CR2.

Результаты повторенных тестов не отличались значительно от предварительных результатов. В таблице 3.3.5 представлены объединенные данные весенних и осенних тестов.

Wolbachia по разному влияла на избирательность скрещиваний (предпочтения в скрещиваниях) у самок (Таблица 3.3.5). Необходимо отметить, что 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

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

♀	♂1 (*R)	♂2 (*W)	N _r	N _w	N _r (%)
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 – N_r – число тестов, в которых самка копулировала с красноглазыми (*R) самцами; N_w – число тестов, в которых самка копулировала с белоглазыми самцами; $N_r(\%) = (N_r / (N_r + N_w)) \times 100$. IW – инфицированные белогазые, CW – неинфицированные (вылеченные – «cured») белоглазые, IR – инфицированные красноглазые, CR – неинфицированные (вылеченные – «cured») красноглазые.

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) ($P<0.001$).

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 отсутствии этих факторов у мух проявляется тенденция к предпочтению «чужих» (партнеров с отличным генотипом, и/или инфекционным статусом).

А) Белоглазые самки предпочитают самцов с тем же инфекционным статусом, белоглазые инфицированные IW-самки предпочитают белоглазых самцов с тем же инфекционным статусом;

Б) Красноглазые самки делают выбор в пользу самцов с отличным от собственного инфекционным статусом, а неинфицированные красноглазые самки предпочитают партнеров как с отличным от собственного инфекционным статусом, так и с отличным от собственного генотипом.

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: $\chi_1^2 = 6.76$, $P = 0.009$; вылеченные самки: $\chi_1^2 = 7.22$, $P = 0.007$) (Таблица 3.3.6).

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 инфекционным статусом и $58 + 70 = 138$ 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: $Z=1.02$, $P=0.307$).

Таблица 3.3.6 – Результаты скрещиваний в группах одна самка-два самца линий, различающихся по инфекционному статусу (*Wolbachia*⁺/*Wolbachia*⁻)

♀	♂1 (*I)	♂2 (*C)	N <i>wolb</i> ⁺	N <i>wolb</i> ⁻	χ_1^2	P
IW	IW	CW	63	37	6.76	0.009
CW	IW	CW	64	37	7.22	0.007
IR	IR	CR	53	49	0.16	0.692
CR	IR	CR	26	32	0.62	0.431

Примечание – N*wolb*⁺ – число тестов, в которых самки скрещивались с инфицированными (I*) самцами; N*wolb*⁻ – число тестов, в которых самки скрещивались с неинфицированными самцами.

Красноглазые самцы оплодотворили 50+76=126 самок с идентичным собственному инфекционным статусом и 68+89=157 самок с отличающимся от собственного инфекционным статусом ($\chi_1^2 = 3.40$, $P = 0.065$) (таблица 3.3.7).

Экспериментальные данные по оценке индивидуальных предпочтений самцов представлены в колонке $q_{\varphi I}$ таблицы 3.1.7. 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 ($t_{35}= -1.451$, $P=0.156$).

Таблица 3.3.7 – Результаты скрещиваний групп из 20 самок (по десять самок из каждой линии, различающихся инфекционным статусом) с самцом

♂	♀1(*I)	♀2(*C)	N_{wob+}	N_{wob-}	$N_{wob?}$	χ^2	P	$N(N_i, N_c, N_e, N_{st})$	q/I	N_f	SDN_f
IW	IW	CW	100	70	18	6.76	0.021	21(13;5;3;4)	0.600	8.95	3.01
CW	IW	CW	58	82	10	5.29	0.043	21(4;14;3;2)	0.438	7.14	3.07
IR	IR	CR	76	89	2	1.04	0.312	17(4;9;4;3)	0.418	10.44	3.08
CR	IR	CR	68	50	4	25.75	0.098	13(6;5;2;0)	0.567	9.38	2.02

N_{wob+} - число оплодотворенных инфицированных самок; N_{wob-} - число оплодотворенных неинфицированных самок; $N_{wob?}$ – число самок с неизвестным статусом; N – число тестов, в которых, по крайней мере, одна самка была оплодотворена; N_i – число тестов, в которых инфицированных самок было оплодотворено больше, чем неинфицированных; N_c – число тестов, в которых неинфицированных самок было оплодотворено больше, чем инфицированных; N_e – число тестов, в которых было равное число оплодотворенных и неоплодотворенных самок; N_{st} – число тестов, в которых не было оплодотворенных самок (самец был стерил); q/I – отношение инфицированных оплодотворенных самок, N_f – среднее число самок, оплодотворенное одним самцом (исключая стерильных самцов); SDN_f – стандартное отклонение N_f χ^2 и значения P соответствуют отношению N_{wob+}/N_{wob-} .

3.3.2.3 Изучение передачи *Wolbachia* через гамету самца

Для изучения передачи *Wolbachia* через гамету самца были проведены межвидовые скрещивания мух *D. melanogaster* и *D. simulans* и три серии внутрилинейных скрещиваний *D. melanogaster* (в сентябре 2009, октябре 2010 и марте-апреле 2012 гг.).

3.3.2.3.1. Изучение передачи *Wolbachia* в межвидовых скрещиваниях

Анализ передачи бактерии через гамету 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 F_2 , полученного от *Wolbachia*-положительных самцов F_1 из 580 проанализированных линий, *Wolbachia* положительными оказались только четыре и, так же как в F_1 , с очень низкой плотностью бактерии. Таким образом, частота передачи бактерии составила 17.3% в поколении F_1 и 0.7% в поколении F_2 .

Результаты эксперимента указывают на то, что частота вертикальной передачи *Wolbachia* через гамету 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 F_1 и F_2 после передачи *Wolbachia* через гаметы самца

После успешной передачи *Wolbachia* через гаметы поколению F_1 , либо поколению F_2 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 F_1 и F_2 обнаруживается высокая индивидуальная изменчивость бактериальной плотности *Wolbachia*.

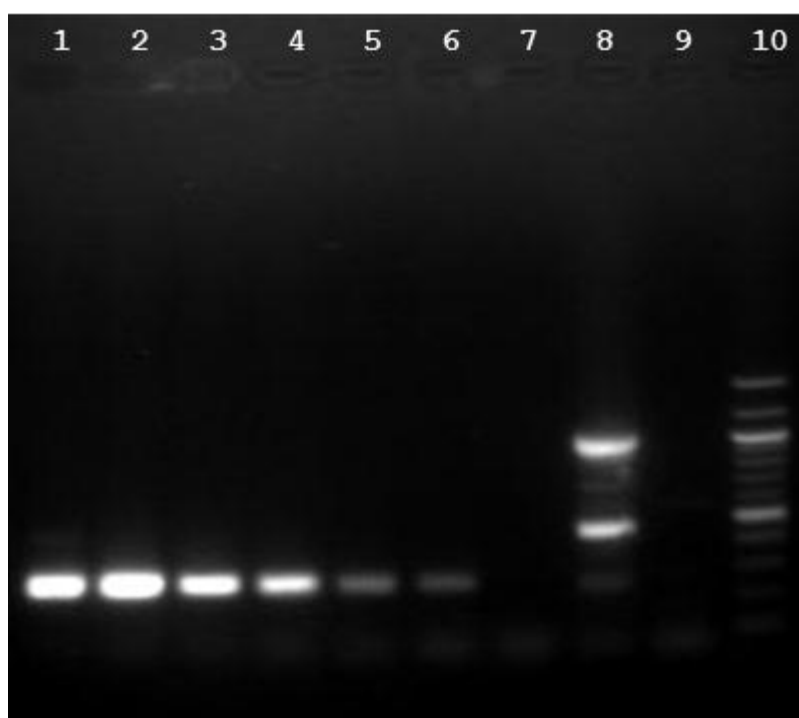


Рисунок 3.3.2 – Электрофореграмма ПЦР-продуктов гена *soxA* *Wolbachia*, полученных в результате амплификации ДНК из имаго линии Черноморка после последовательных пятикратных разбавлений – дорожки 1–7. Препарат ДНК имаго из линии мух F_1 после самцовой передачи без разбавления – дорожка 8. Отрицательный 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 F_1 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 бактерия. Потеря *Wolbachia* в поколении F_2 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. 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 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.

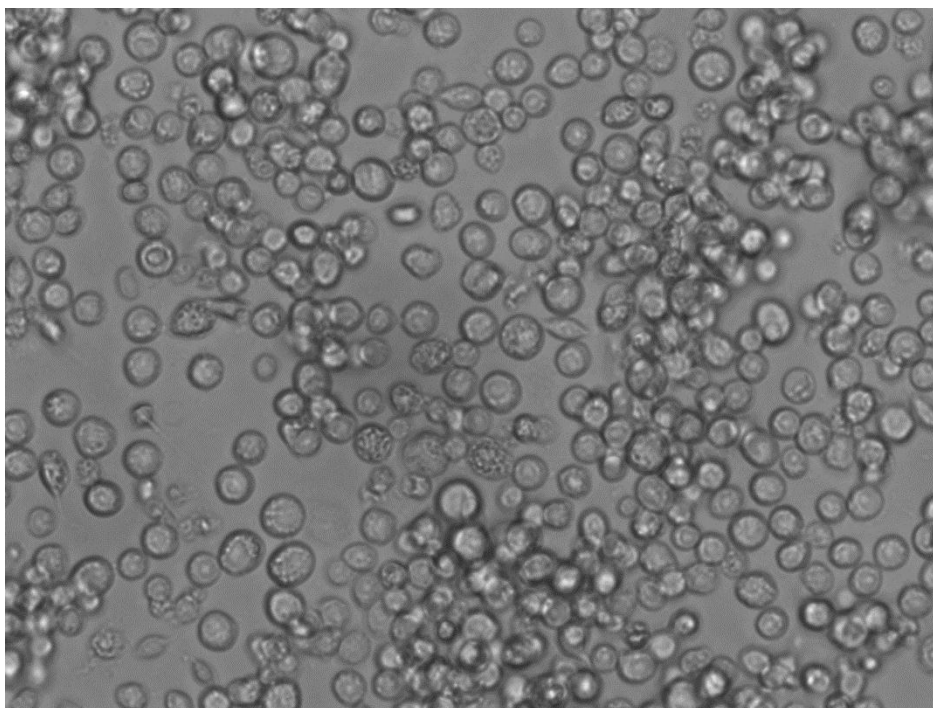


Рисунок 3.3.3 – Клеточная культура Dm2008Wb1, сублиния Dm Wb -22 (Wb⁺)

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 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 вариабельным признаком, что вероятно связано с характерной для клеточных культур насекомых несинхронностью деления клеток.

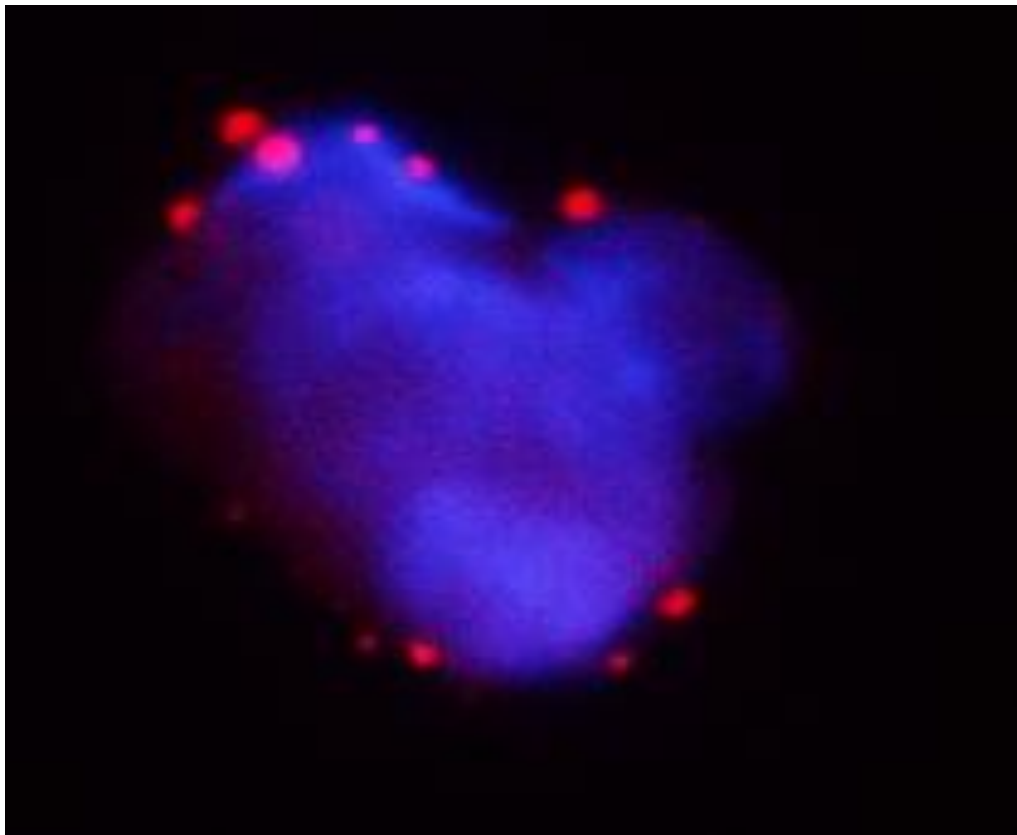


Рисунок 3.3.4 – FISH-гибридизация клеток Dm2008Wb1 (инфицированная вольбахией сублиния № 22) с W1 и W2 зондами на *Wolbachia*. Ядро клетки Dm2008Wb1 окрашено DAPI в синий цвет. Бактерии вольбахия видны как красные точки по гибридации с W1 и W2 зондами на ген вольбахии 16S rDNA.

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. Схема субклонирования клеточной линии Dm2008Wb1 приведена на рисунке 3.3.5.

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 определен 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. Не

содержащие *Wolbachia* клоны, или содержащие её с очень низкой копийностью относятся к типу Dm-13b, содержащие *Wolbachia* клоны относятся к типу Dm-22-at (Рисунок 3.3.5). В субклонах типа Dm-13b произошла спонтанная потеря Y-хромосомы, в субклонах типа Dm-22-at Y-хромосома сохраняется до настоящего времени.

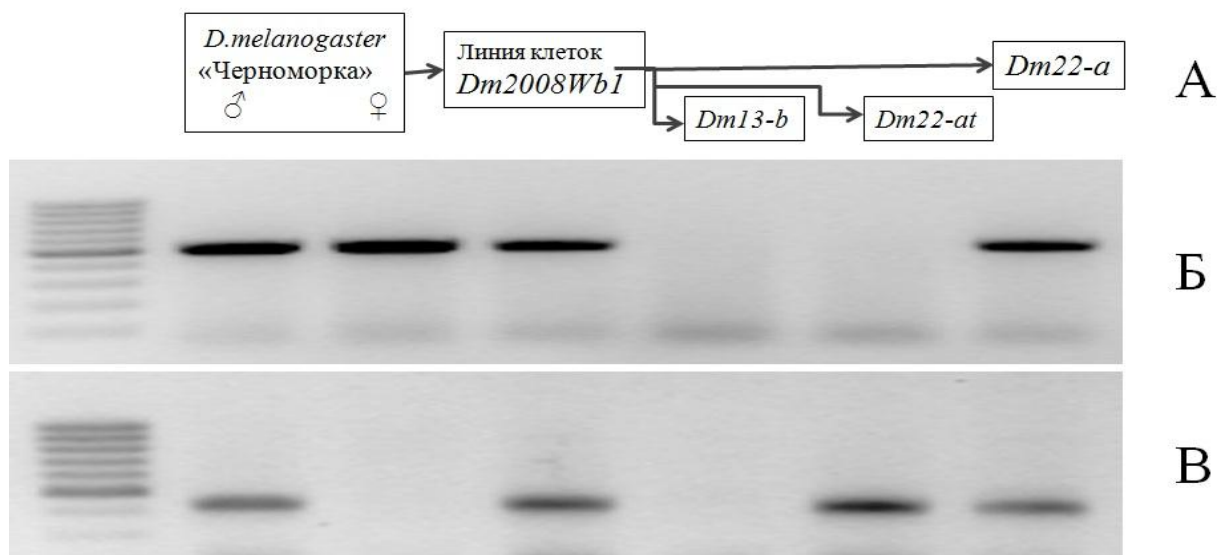


Рисунок 3.3.5 Панель «А». Субклонирование и характеристика субклонов пересеваемой клеточной культуры *Dm2008Wb*.

Панель «Б». Идентификация *Wolbachia* в субклонах клеточной культуры из панели «А». Для идентификации использован фрагмент гена *fbpA*.

Панель «В». Идентификация Y-хромосомы в субклонах клеточной культуры из панели «А». Для идентификации использован фрагмент гена *kl-2*, локализованный на Y-хромосоме *D. melanogaster*.

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 плазмидах, и индивидуальные клоны секвенированы для идентификации принадлежности к штаммам *wMel* и *wRi*. В случае генов *coxA*, *ftsZ*, *gatB* и *hspA* 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 (Рисунок 3.3.6). Внутригенная рекомбинация могла произойти как в момент инфицирования культуры, так и в ходе пассирования культуры с двойной инфекцией на протяжении двух лет.

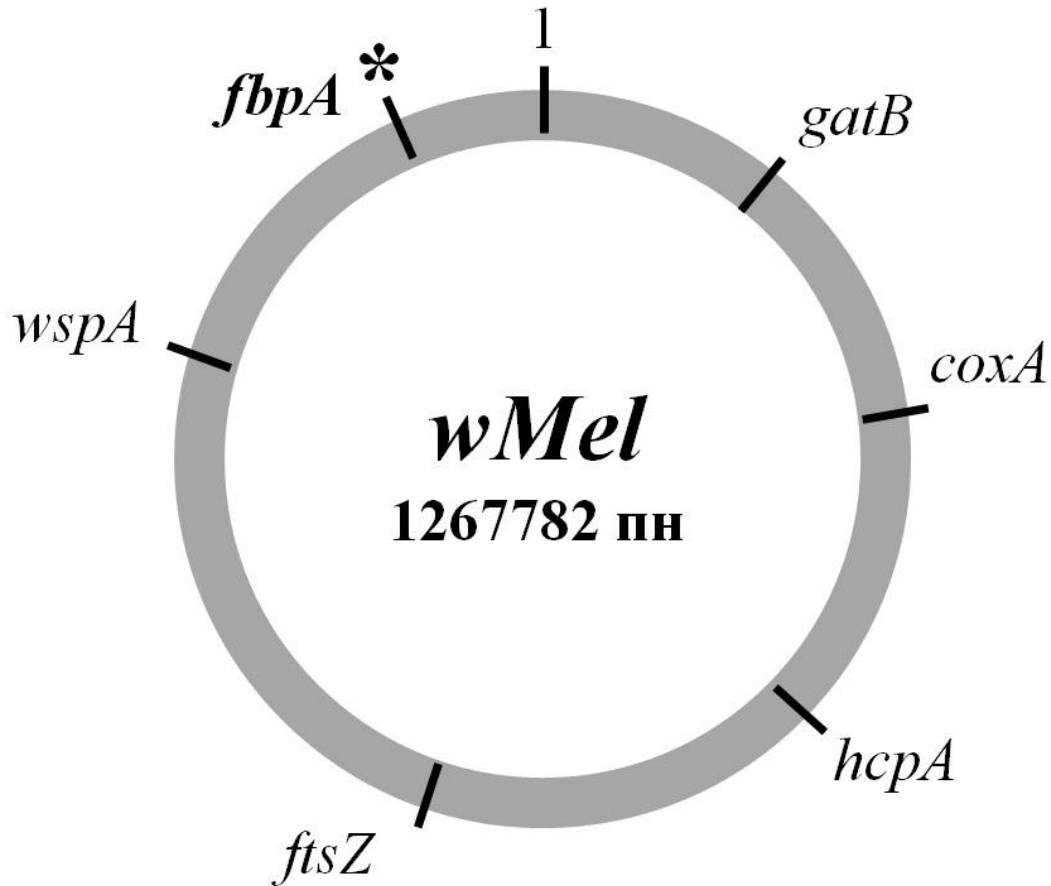


Рисунок 3.3.6 - Кольцевая карта генома *Wolbachia* по данным (Wu *et al.*, 2004) с обозначением MLST генов, проанализированных на принадлежность к штаммам *wMel* и *wRi* в клеточном клоне Dm-22-at4 с двойной инфекцией *Wolbachia*. Звёздочкой отмечен ген *fbpA*, в котором выявлена внутригенная рекомбинация.

Таблица 3.1.8 – 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 отсеквенировать только после процедуры клонирования ДНК ПЦР-фрагментов в плазмидях.

Обсуждение

Жизнь и эволюция насекомых, как и большинства эукариотических организмов, неразрывно связана с бактериями. Одним из последствий такого совместного существования становится образование симбиотических ассоциаций разного уровня устойчивости – от случайного проникновения бактерии в организм насекомого с ее последующей потерей до облигатного симбиоза. Вне зависимости от характера возникающих между насекомыми и бактериями симбиозов последние представляют собой мощные эволюционные факторы генетической реорганизации и адаптивных возможностей обоих партнеров.

Эндосимбиотические бактерии насекомых традиционно подразделяются на облигатных и факультативных эндосимбионтов. Облигатные эндосимбионты необходимы хозяину для выживания и репродукции, возраст таких ассоциаций оценивается в 30-250 миллионов лет (Bauman, 2005). Для симбиозов этого типа характерно единичное событие инфицирования, отражением которого становится конгруэнтность филогенетических деревьев хозяина и бактерии на внутривидовом и внутривидовом уровнях (Munson *et al.*, 1991; Jousset *et al.*, 2009), и «точное» вертикальное наследование.

Факультативные симбиозы формируются неоднократно на протяжении эволюционной истории видов насекомых, в том числе и в настоящее время. Возраст факультативных симбиозов не превышает 150 млн. лет. Факультативные эндосимбионты наследуются вертикально, однако для них известен и горизонтальный инфекционный перенос. Филогения факультативных эндосимбиотических бактерий часто не конгруэнтна филогении их хозяев; неродственные бактериальные линии могут сосуществовать в одном хозяине, так же как бактерии родственных бактериальных линий могут инфицировать насекомых из неродственных таксономических групп. Спектр эффектов факультативных эндосимбионтов варьирует от паразитизма до истинного мутуализма.

Факультативные симбиозы распространены шире облигатных. Граница между первыми и вторыми весьма подвижна, и в литературе описаны случаи приобретения факультативными симбионтами статуса облигатных, что не удивительно, если учитывать их исключительно внутриклеточный образ жизни.

В процессе эволюции организмы, перешедшие к паразитическому образу жизни или специализированному питанию, часто теряют биохимические пути синтеза важных соединений. Бактерии, обеспечивающие зараженного эукариотического хозяина жизненно необходимыми компонентами, открывают широкие возможности адаптивной эволюции для симбиотической системы и возможность выхода вида-хозяина из эволюционного тупика, в который он неизбежно попал бы без симбионта. Насекомые не являются исключением из общего правила, как и другие эукариоты, в условиях паразитического существования или узко специализированного питания они теряют гены, в том числе включенные в биосинтез аминокислот и витаминов. У постельного клопа *C. lectularius* потеряны гены синтеза биотина. *Wolbachia* wCle способна компенсировать потерю своим хозяином этих генов за счет функционирования собственного биотинового оперона, приобретенного предком современной линии (Nikoh *et al.*, 2014). Утрата защиты от токсичных концентраций двухвалентного железа детерминирует облигатную зависимость репродукции паразитической осы *A. tabida* от wAtab3 (Pannebakker *et al.*, 2007). Способность *Wolbachia* защищать хозяина от избыточного железа, так же, как и повышать устойчивость насекомых к низким концентрациям железа, востребована, вероятно, и при факультативных симбиозах.

Обзор изученных ранее и представленных в настоящей работе данных позволяет утверждать, что подавляющее большинство факультативных симбиотических систем насекомых и *Wolbachia* не являются нейтральными. К числу таких «не нейтральных» симбиозов относится симбиотическая система *D. melanogaster-Wolbachia*. Полученные в настоящем исследовании данные указывают на мутуалистические отношения партнеров. Эти мутуалистические отношения выражаются в повышении приспособленности зараженного хозяина:

бактерия увеличивает продолжительность жизни имаго, повышает конкурентоспособность инфицированных личинок *D. melanogaster*, снижает избирательность выбора самками субстрата для откладки яиц, повышает устойчивость имаго к энтомопатогенному грибу *B. bassiana*. Повышение приспособленности реализуется за счет смещения стратегии поведения, используемой зараженными вольбахией мухами, от К- к r-типу. Насекомые, реализующие К-стратегию, тонко адаптированы к своей экологической нише, что повышает их резистентность в условиях относительно стабильной окружающей среды и жесткой конкуренции с викарирующими видами, но одновременно создает существенные трудности при освоении новых ресурсов. К-стратегии придерживаются незараженные мухи. Зараженные вольбахией *D. melanogaster* реализуют r-стратегию. Неспецифическое поведение инфицированных самок, выразившееся в условиях эксперимента в снижении специфичности при выборе субстрата и повышении выживаемости, существенно облегчает смену поколений и позволяет инфицированным мухам быстро осваивать новые ресурсы. У *Drosophila*, как, вероятно, и у большинства других насекомых, освоение субстрата происходит в два этапа. На первом – наиболее длительном – осуществляется опознание и оценка субстрата с позиций его пригодности для откладки яиц. Как правило, самки останавливают выбор на том типе субстрата, на котором осуществлялось их развитие. На втором этапе субстрат осваивается как данной особью, так и другими особями этого же вида, опознающими специфические аттрактанты, выделяющиеся развивающимися личинками. Критическое преимущество получают личинки, начавшие развитие первыми. Заражение *Wolbachia* приводит к существенному снижению специфичности выбора субстрата самками и определяет возможность освоения новых типов субстрата, обеспечивая преимущество инфицированных *Wolbachia* особей перед неинфицированными при недостатке привычного корма и необходимости освоения нового для выживания популяции. Легко видеть, что такие условия складываются в синантропных местообитаниях, где *D. melanogaster* приходится постоянно осваивать новые типы субстратов.

Увеличение продолжительности жизни инфицированных *Wolbachia* имаго *D. melanogaster* показано впервые. Повышение продолжительности жизни однозначно может рассматриваться как адаптивно значимый признак, поскольку позволяет инфицированным мухам переживать кратковременные неблагоприятные условия окружающей среды. Положительное влияние бактерии на продолжительность жизни *D. melanogaster*, вероятно, связано с модулированием инсулинового сигнального пути (Richard *et al.*, 2005; Clark *et al.*, 2005). Совокупность двух признаков – повышенная продолжительность жизни и повышенная плодовитость (Fast *et al.*, 2011; Toomey *et al.*, 2013) – представляет один из механизмов, обеспечивающих устойчивое сохранение *Wolbachia* в ряду поколений на популяционном уровне. К числу признаков, обеспечивающих сохранение эндосимбионта в популяции, относится также и продемонстрированная впервые повышенная устойчивость инфицированных *D. melanogaster* к энтомопатогенному грибу *B. bassiana*. Повышение устойчивости насекомых к грибковым патогенам под влиянием бактериальных симбионтов описано для различных симбиотических систем, а само усиление противомикробной и противогрибковой защиты под влиянием симбиотических бактерий, несомненно, является общим путем развития симбиотических отношений. Однако механизмы реализации этой защиты весьма различны. В ряде случаев бактерии обеспечивают защиту хозяина от грибковых инфекций, синтезируя противогрибковые вещества. Показано, в частности, что один из видов симбиотических бактерий *Streptomyces* вовлечен в защиту от грибных инфекций личинок одиночных хищных ос – европейского пчелиного волка *Philanthus triangulum* Fabr. (Kaltenpoth *et al.*, 2005). Высокая концентрация бактерий наблюдается в коконах, образуемых личинками ос из пчел, на ранних этапах развития личинок; концентрация бактерий снижается незадолго до вылупления имаго. У клопа *Blissus insularis* Barber (Heteroptera: Blissidae) в криптах кишечника обнаружены представленные с высокой плотностью бактерии *Burkholderia*, способные вырабатывать мощные противогрибковые соединения. Эти соединения, по всей видимости, обеспечивают повышенную устойчивость

клопов к энтомопатогенным грибам (Boucias *et al.*, 2012). Несколько видов муравьев культивируют актинобактерии, вырабатывающие сильнодействующие антимикробные вещества, которые потенциально способны защищать тлей – источник питания муравьев – от грибковых инфекций (Folgarait *et al.*, 2011; Little *et al.*, 2006). В случае с *Wolbachia* механизм защиты, вероятно, иной, чем в приведенных выше примерах и может быть связан с активизацией под влиянием бактерии иммунной системы хозяина.

Как уже указывалось, комплекс выявленных бактериальных эффектов следует рассматривать с позиции расширения адаптационного потенциала вида-хозяина, обеспечивающего этому виду выживание при экстремальных условиях окружающей среды. Однако список биологических последствий заражения должен быть расширен в силу изменения под влиянием *Wolbachia* репродуктивного поведения *D. melanogaster*. Проведенные эксперименты выявили сложную систему ассортативных скрещиваний у *D. melanogaster*, зависящую от генотипа и инфекционного статуса линии. Наиболее очевидным для объяснения представляется снижение ассортативности выбора партнера белоглазыми инфицированными самками. Отсутствие избирательности в данном случае может происходить из-за нарушения оценки каких-то тонких элементов поведения самцов вследствие изменения функционирования, либо сигналинга нервной системы инфицированных самок. Такое изменение функционального состояния нервной системы не должно исключаться, поскольку хорошо известно, что бактерия обнаруживается в нервных клетках инфицированных мух (Min, Benzer, 1997). Снижение избирательности спариваний повышает вероятность появления потомства у инфицированных самок, что одновременно повышает вероятность передачи бактерии следующему поколению.

Для объяснения других экспериментальных данных может быть привлечена недавно сформулированная гипотеза Маркова-Куликова, в соответствии с которой перед скрещиваниями происходит тестирование возможного партнера по скрещиванию по принципу «свой»-«чужой» (Марков, Куликов, 2006). В этом случае корректная интерпретация результатов возможна лишь с учетом

генетических различий между красноглазыми и белоглазыми линиями. Первая линия является менее инбредной, поскольку при ее создании использовались скрещивания с мухами дикого типа, что привело к отсутствию вредных мутаций *white* и *singed* у красноглазых самцов и появлению у этих линий снижающих гомозиготность аутосомных аллелей.

Гипотеза Маркова-Куликова предполагает, что в стрессированной популяции, подвергающейся воздействию неблагоприятных условий окружающей среды и/или жесткому направленному отбору, может происходить смещение предпочтений в скрещиваниях в сторону «своих», поскольку такая репродуктивная стратегия уменьшает вероятность размывания благоприятных качеств, которые повышают выживание в критических условиях. Принимая во внимание особенности белоглазых линий, описанных выше, эти линии можно рассматривать как модельный аналог популяций, находящихся под действием стресса и существующих в условиях жесткого отбора. Красноглазые линии, т.е. линии дикого типа, могут расцениваться как аналог популяций, существующих в нормальных условиях. В этом контексте *Wolbachia* может являться дополнительным стрессовым фактором, который смещает выбор при скрещиваниях в сторону «своих». Линия IW, которая, вероятно, испытывала сильный стресс, показала значительно более высокий процент скрещиваний с *W-мухами («своими» с точки зрения генотипа), по сравнению с линией CW. В экспериментах с белоглазыми линиями не было получено подтверждения предпочтения «своих» по отношению к инфекционному статусу.

Значимый результат, полученный в третьем эксперименте, вероятно, является следствием того, что в этом эксперименте единственный самец имел возможность выбирать среди множества самок. CW-самцы были способны демонстрировать более высокое предпочтение своих (т.е. самок с тем же инфекционным статусом). В первом эксперименте основными факторами, влияющими на результаты, были чувствительность/восприимчивость самок и, вероятно, локомоторная активность самцов. В третьем эксперименте предпочтения самцов имели первостепенное значение, их локомоторная

активность не имела принципиального значения. Противоположная модель поведения – предпочтение «чужих», наблюдалась у красноглазых линий. В этих линиях в качестве партнеров при скрещиваниях предпочитались мухи с противоположным инфекционным статусом: инфицированные мухи предпочитали неинфицированных партнеров и наоборот. Наименее стрессированная линия CR по сравнению с линией IR имела самые высокие показатели скрещиваний с мухами из белоглазых линий как с партнерами, имеющими «чужой» генетический статус. *Wolbachia*-инфекция, очевидно, переключала предпочтения в скрещиваниях мух между «чужими» и «своими». Необходимо отметить, что в соответствии с этой гипотезой, паттерны ассоциативных скрещиваний не обязательно являются адаптивными в каждом отдельном случае. Гипотеза предполагает, что тестирование партнеров по принципу «свой-чужой», предшествующее скрещиванию, является основной и широко распространенной моделью поведения. Вероятность скрещивания зависит от результатов сравнения биохимических и генетических характеристик потенциального партнера с соответствующими параметрами особи, которая проводит тестирование. Существует оптимальный уровень сходства, при котором привлекательность партнера является наивысшей; очень высокое и очень низкое сходство уменьшает привлекательность. Как отмечалось выше, положение оптимума предположительно может смещаться в сторону «своих» под действием стресса. Если существует механизм, поддерживающий этот сдвиг, то такой механизм запускается автоматически, даже если стресс-фактор является новым и неизвестным. С другой стороны, любое изменение биохимического статуса животного, например, инфекция *Wolbachia*, может влиять на его индивидуальный запах, что автоматически изменяет уровень биохимического сходства инфицированного индивидуума с другими особями и, как следствие, может разрушить сексуальную привлекательность инфицированного индивидуума. Важно, что такие изменения в привлекательности происходят мгновенно, автоматически, без множества поколений отбора на предпочтение особенностей партнера и являются адаптивными, но только в целом. Они способствуют

адаптации к неблагоприятным, стрессовым условиям окружающей среды, уменьшая аутбридинг. Однако, такие автоматические изменения во взаимной привлекательности партнеров при скрещиваниях, вызванные изменением их биохимического и генетического статуса, не обязательно являются адаптивными в каждой конкретной ситуации.

Для *D. melanogaster* положительная ассортативность спариваний под влиянием бактерий, при которой выбор партнера делается в пользу «своего», была продемонстрирована для представителей рода *Lactobacillus* микрофлоры кишечника мух (Sharon *et al.*, 2010). Детерминируемые симбионтами изменения поведения известны и для позвоночных животных. Пожалуй, самым изученным случаем является изменение поведения крыс – промежуточного хозяина токсоплазмы, теряющими отрицательный таксис к моче кошек – постоянному хозяину токсоплазмы, что многократно увеличивает вероятность поедания зараженной крысы кошкой (Zimmer, 2000; Vyas *et al.*, 2007; Webster *et al.*, 1994).

Совокупность описанных эффектов, весьма различных и, вероятно, весьма сложных по механизму реализации, позволяет восполнять потерю бактерии в случае ее непопадания в яйцеклетку. Компенсаторный вклад в поддержание симбионта вносит также наследование *Wolbachia* через гаметы самца. Низкий уровень наследования по мужской линии может объясняться случайным непопаданием бактерии в клетки зародышевого пути из-за ее слишком низкой концентрации в зиготе при передаче по мужской линии. Отсутствие значимого увеличения частоты наследования через гаметы самца в поколении F₂ свидетельствует об отсутствии сформировавшейся после единичного акта наследования специфической генетической детерминанты.

Тонкие механизмы взаимодействия партнеров в симбиозе были изучены на модельной симбиотической системе – *D. melanogaster*-*Wolbachia*. Принципиально важным вопросом в этой связи оказался вопрос поддержания стабильности генома *Wolbachia* в условиях облигатного внутриклеточного существования. Стабильность могла бы поддерживаться за счет процессов рекомбинации, в

отсутствие которой можно было бы ожидать деградацию бактериального генома с постепенной утратой им функций.

Вопрос о гомологичной рекомбинации как источнике новых генов и комбинаций генов в структуре бактериального генома изучен недостаточно полно. Это связано, прежде всего, со сложностью выявления «чужой» последовательности в геноме реципиента вследствие сходства рекомбинирующих последовательностей и из-за многочисленных мутаций, которые маскируют рекомбинационные события. Между тем, гомологичная рекомбинация вносит значительный вклад в эволюцию и адаптацию бактериальных геномов за счет ортологичных замен и создания новых рекомбинантных аллелей (Feavers *et al.*, 1992; Maiden, 1993; Holmes *et al.*, 1999). Успешная рекомбинация наиболее вероятна между сходными последовательностями, поскольку в этом случае высока вероятность уклонения рекомбинантов от исправления ошибок системами репарации. Данные мультилокусного типирования (Maiden *et al.*, 1998) указывают на то, что у некоторых бактерий рекомбинация между изолятами может быть очень высокой (Holmes *et al.*, 1999). События рекомбинации документированы для патогенов позвоночных – бактерий родов *Neisseria* (Gibbs *et al.*, 1989; Holmes *et al.*, 1999; Howell-Adams, Seifert, 2000), *Anaplasma* (Brayton *et al.*, 2002; Meeus *et al.*, 2003), *Leptospira* (Haake *et al.*, 2004), и *Borrelia* (Cadavid *et al.*, 1994; Rich *et al.*, 2001). Для этих бактерий было показано, что рекомбинация затрагивает как гены домашнего хозяйства, так и быстро эволюционирующие гены, такие, например, как гены поверхностных белков. Значение рекомбинации для генов поверхностных белков патогенных бактерий трудно переоценить, поскольку рекомбинационные процессы обеспечивают появление новых аллельных вариантов, необходимых для адаптации паразита в организме хозяина.

У некоторых наследуемых вертикально внутриклеточных бактерий рекомбинация отсутствует, либо очень редка (Moran, 1996; Tamas *et al.*, 2002). Это может быть связано как с постоянством окружающей среды, следствием которого является снижение давления отбора, так и с потерей генов, необходимых для рекомбинации (Andersson, Andersson 1999; Moran, Wernegreen, 2000; Wernegreen,

2002; Dale *et al.*, 2003). Высокую стабильность демонстрируют геномы *Buchnera aphidicola* и *Blochmannia* – мутуалистические симбионты тлей, а также геном мутуалиста мухи цеце – бактерии *Wigglesworthia glossinidia brevipalpis* (Shigenobu *et al.*, 2000; Tamas *et al.*, 2002; Akman *et al.*, 2002; Gil *et al.*, 2003; Van Ham *et al.*, 2003; Degan *et al.*, 2005). В геноме первичного облигатного симбионта *B. aphidicola*, например, не зафиксировано приобретение новых генов, инверсий и транслокаций в последние 50-70 миллионов лет эволюции в организме тлей.

Процессы рекомбинации, предполагающиеся на основании данных анализа разных линий *Wolbachia* с использованием биоинформационных подходов, ранее никогда не были показаны экспериментально. Между тем, целостность генома этой бактерии, сохраняющаяся на протяжении десятков миллионов лет, предполагает существование горизонтального переноса *Wolbachia* между разными видами насекомых и наличие генетической рекомбинации. Сравнение нуклеотидных последовательностей ортологичных генов разных штаммов *Wolbachia* и полных геномов *Wolbachia* позволяет сделать однозначный вывод о наличии у этой бактерии как межгенной, так и внутригенной рекомбинации (Baldo *et al.*, 2006; Malloch *et al.*, 2005; Yang *et al.*, 2013). Молекулярные механизмы рекомбинации у *Wolbachia* остаются малоизученными. Наличие в геноме *Wolbachia* фагов и IS элементов (Wu *et al.*, 2004), позволяет предполагать их участие в процессах рекомбинации, но наиболее вероятным механизмом, объясняющим наблюдаемую нуклеотидную изменчивость, является несимметричная гомологичная рекомбинация по типу генной конверсии (Baldo *et al.*, 2006). В данной работе была проведена экспериментальная проверка возможности рекомбинации двух штаммов *Wolbachia*: *wMel* и *wRi*, относящихся к одной супергруппе А. Получены субклоны клеточной культуры Dm2008Wb1, инфицированные обоими штаммами *Wolbachia*, или только штаммом *wMel*. Копийность *Wolbachia* в субклонах данной клеточной линии сильно различается. Высокая копияность *Wolbachia* и стабильное поддержание инфекции при пассировании культуры наблюдается только в клонах с наличием Y-хромосомы, что возможно связано с особенностями клеток пересеваемой культуры. Показана

внутригенная рекомбинация по гену *fbpA*. Наличие рекомбинантных форм подтверждает реальность двойного инфицирования клеток. В области предполагаемого сайта рекомбинации не обнаружены IS элементы или последовательности фагов. Этот результат указывает на гомологичную рекомбинацию как на наиболее вероятный молекулярный механизм рекомбинации *Wolbachia* у *D. melanogaster*.

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 данные о преждевременности разделения *An. daciae* и *An. messeae* оказываются важными в свете их научно-практического применения. 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 AB*, 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. ixodetis*. 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 внутригенотипный 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.

БЛАГОДАРНОСТИ

Я благодарю своего учителя, научного консультанта, научного руководителя члена-корреспондента РАН, профессора Илью Артемьевича Захарова-Гезехуса за постоянную многолетнюю поддержку моих исследований, советы, терпение и снисходительность. Благодарю дирекцию и администрацию Института за настойчивость, содействие и постоянство требований к сотрудникам, позволивших мне начать и закончить работу над диссертацией. Благодарю своих коллег и друзей – д.б.н. Б.В. Андрианова, д.б.н. А.М. Куликова, д.б.н. М.И. Гордеева, к.б.н. О.Е. Лазебного, к.б.н. А.В. Блехман за многолетнюю помощь в работе, советы и поддержку. Благодарю сотрудников лаборатории генетики насекомых д.б.н. Е.В. Шайкевич, к.б.н. Д.А. Романова и Т.В. Горелову за помощь в исследованиях. Я признательна сотрудникам лаборатории сравнительной генетики животных за содействие и техническую помощь при выполнении работы. Я искренне сожалею, что не могу поблагодарить свою коллегу к.б.н. Оксану Безжонову, с которой мы так много работали, и которая безвременно ушла из жизни.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Андреева, Ю.В. Морфо-цитогенетическая характеристика малярийного комара *Anopheles artemievi* (Diptera: Culicidae) комплекса *maculipennis* / Ю.В. Андреева, А.К. Сибатаев, А.М. Русакова, В.Н. Стегний // Паразитология. – 2007. – Вып. 5. – С. 348–363.
2. Андрианов, Б.В. Популяционная динамика митохондриального полиморфизма в природной популяции *Drosophila littoralis* / Б.В. Андрианов, С.Ю. Сорокина, Н.С. Мюге, Н.Л. Резник, В.Г. Митрофанов // Генетика. – 2008. – Т. 44. – № 2. – С. 195–201.
3. Балужева, Е.Н. Фенотипическая изменчивость кокциnellиды *Harmonia axyridis* Pall. по рисунку надкрылий и наличию элитрального гребня / Е.Н. Балужева // Естественные науки. – 2009. – № 3. – С. 8–14.
4. Беклемишев, В.Н. Ареалы некоторых видов *Anopheles* в СССР и причины, их обуславливающие / В.Н. Беклемишев, А.Н. Желоховцев // Бюл. МоИП, отд. биологии. – 1945. – Т. 50. – № 1/2. – С. 56–63.
5. Блехман, А.В. Изменчивость рисунка пронотума у божьей коровки *Harmonia axyridis* Pallas (Coleoptera, Coccinellidae) / А.В. Блехман // Экологическая генетика. – 2007. – Т. 5. – № 2. – С. 25–36.
6. Блехман, А.В. Популяционная изменчивость встречаемости элитрального гребня у божьей коровки *Harmonia axyridis* Pallas / А.В. Блехман // Генетика. – 2008. – Т. 44. – № 11. – С. 1553–1557.
7. Блехман, А.В. Внутрипопуляционная и географическая изменчивость широкоареального вида *Harmonia axyridis* Pall. по комплексу полиморфных признаков: дис. ...канд. биол. наук: 03.00.15 / Блехман Алла Вениаминовна. – М., 2009. – 137 с.
8. Блехман, А.В. Современная структура широкоареального вида божьих коровок *Harmonia axyridis* (Coleoptera, Coccinellidae) и возможные причины ее формирования / А.В. Блехман // Зоологический журнал. – 2014. – Т. 93. – № 7. – С. 857–867.

9. Блехман, А.В. Внутривидовая дифференциация *Harmonia axyridis* Pall. По комплексу морфологических признаков и изменчивости гена COI / А.В. Блехман, И.А. Захаров, И.И. Горячева // Вестник Московского университета. Серия 16: Биология. – 2010. – № 4. – С. 50–53.
10. Богданов, Л.В. Внутривидовая изменчивость азиатской божьей коровки *Harmonia axyridis* Pall. в районе Владивостока / Л.В. Богданов, Н.Г. Гагальчий // Экология. – 1986. – № 2. – С. 56–62.
11. Ваулин, О.В. Географическая изменчивость ITS2 рДНК и COI мтДНК и криптические виды малярийного комаров *Anopheles messeae* Fall. (DIPTERA: CULICIDAE) / О.В. Ваулин, Ю.М. Новиков // Вестник ВОГиС. – 2010. – Т. 14. – № 3. – С. 546–557.
12. Ваулин, О.В. Полиморфизм и межвидовая изменчивость нуклеотидной последовательности гена субъединицы I цитохромоксидазы (COI) у видов-двойников А и В *Anopheles messeae* и *An. beklemishevi* (DIPTERA: CULICIDAE) / О.В. Ваулин, Ю.М. Новиков // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2012. – Т. 16. – № 2. – С. 358–368.
13. Воронцов, Н.Н. Феногеография и геногеография окраскинадкрылий в популяциях восточноазиатской коровки *Harmonia (Lais) axyridis* Pall. (Coleoptera, Coccinellidae) / Н.Н.Воронцов, А.В. Блехман // ДАН СССР. – 1986. – Т. 286. – № 1. – С. 205–208.
14. Воронцов, Н.Н. Ареал и внутривидовая структура божьей коровки *Harmonia axyridis* Pall., 1773 (Coleoptera, Coccinellidae). / Н.Н. Воронцов, А.В. Блехман // В сб.: "Эволюция, экология, биоразнообразие. Материалы конференции памяти Николая Николаевича Воронцова (1934-2000), – Москва, – 26-27 декабря 2000 г." М.: Издат. отдел УНЦ ДО, 2001. – С. 150–156.
15. Гуцевич, А.М. Насекомые двукрылые. Комары / А.М. Гуцевич, А.С. Мончадский, А.А. Штакельберг. – Л.: Наука, 1970. – Т. 3. – Вып. 4. – 384 с.
16. Дудкина, Н.В. Структурная организация и распределение симбиотических бактерий *Wolbachia* в ранних эмбрионах и яичниках *Drosophila melanogaster*

- и *D. simulans* / Н.В. Дудкина, Д.А. Воронин, Е.В. Киселева // Цитология. – 2004. – Т. 46. – № 3. – С. 208–220.
17. Захаров, И.А. Цитоплазматически наследуемая бессамцовость в киргизской популяции *Adalia bipunctata turanica*, вызываемая бактерией рода *Rickettsia* / И.А. Захаров, И.И. Горячева, Е.Б. Рыдкина, В. Ру, Д. Рауль // Генетика. – 1998. – Т. 34. – № 2. – С. 235–239.
 18. Захаров, И.А. *Wolbachia* – новая бактерия, вызывающая сдвиг в соотношении полов у двуточечной божьей коровки *Adalia bipunctata* L. / И.А. Захаров, И.И. Горячева, Е.В. Шайкевич, Х. Шуленбург, Е.Н. Мажерес // Генетика. – 2000. – Т. 36. – № 4. – С. 482–486.
 19. Захаров, И.А. Соотношение полов и явление бессамцовости в сибирских популяциях *Harmonia axyridis* (Pall.) / И.А. Захаров, И.И. Горячева, Е.В. Шайкевич, Х. Шуленбург, Е.Н. Мажерес // Генетика. – 1999. – Т. 35. – № 6. – С. 771–776.
 20. Захаров, И.А. Бактерии рода *Spiroplasma* инфицируют двуточечную божью коровку (*Adalia bipunctata* L.) в России / И.А. Захаров, Е.В. Шайкевич, И.И. Горячева // ДАН. – 1998. – Т. 362. – № 4. – С. 570–573.
 21. Званцов, А.Б. Переносчики малярии Содружества Независимых Государств / А.Б. Званцов, М.Н. Ежов, М.М. Артемьев – Копенгаген: ВОЗ, 2003. – 170 с.
 22. Кабанова, В.М. Кариологические исследования природных популяций малярийного комара в Среднем Приобье. Сообщение I: Характеристика кариотипа *Anopheles maculipennis messeae* / В.М. Кабанова, Н.Н. Карташова, В.Н. Стегний // Цитология. – 1972. – № 5. – С. 630–636.
 23. Корсун, О.В. Полиморфизм в природных популяциях божьей коровки *Harmonia axyridis* Pall. (Insecta: Coleoptera, Coccinellidae) Восточного Забайкалья / О.В. Корсун // Проблемы экологии и рационального использования природных ресурсов в Дальневосточном регионе: Материалы региональной научно-практической конференции, 21-23 декабря 2004 г. Т. 1. Благовещенск: Изд-во БГПУ. – С. 195–199.

24. Кузнецов, В.Н. Фауна и распределение кокциnellид (Coleoptera, Coccinellidae) на Дальнем Востоке России / В.Н. Кузнецов // Тр. Русского энтомологического общества. – 2006. – Т. 77. – С. 192–199.
25. Куликов, А.М. Особенности брачного поведения самцов *Drosophila melanogaster*, гетерозиготных по доминантной температурочувствительной летальной мутации / А.М. Куликов, В.Г. Митрофанов // Генетика. – 1990. – Т. 26. – № 2. – С. 232–240.
26. Лус, Я.Я. Некоторые закономерности размножения популяций *Adalia bipunctata* L. Бессамцовые семьи в популяциях / Я.Я. Лус // ДАН СССР. – 1947. – Т. 57. – № 9. – С. 951–954.
27. Маниатис, Т. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование / Т. Маниатис, Э. Фрич, Дж. Сэмбрук – М.: Мир, 1984. – 479 с.
28. Марков, А.В. Гипотеза иммунологического тестирования партнеров – согласованность развития адаптаций и смены половых предпочтений / А.В. Марков, А.М. Куликов // Известия Российской академии наук. – 2006. – № 3. – С. 261–274.
29. Москаев, А.В. Экологическая специализация видов-двойников малярийных комаров Европейской части России: дис.... канд. биол. наук: 03.02.08/ Москаев Антон Вечеславович. – М., 2012. – 149 с.
30. Новиков, Ю.М. О молекулярно-генетической дивергенции криптических видов таксона *Anopheles messeae* (Diptera: Culicidae) и филогении комплекса *maculipennis* / Ю.М. Новиков, А.И. Шевченко, О.В. Ваулин // Вестник Томского государственного университета. – 2004. – № 10. – С. 69–77.
31. Салменкова, Е.А. Популяционно-генетические процессы при интродукции рыб / Е.А. Салменкова // Генетика. – 2008. – Т. 44. – № 7. – С. 874–884.
32. Сергиев, В.П. Первые данные о наличии размножающейся популяции комаров *Aedes aegypti* в районе Большого Сочи и в отдельных городах Абхазии / В.П. Сергиев, Т.М. Гузеева, Н.Я. Маркович, Л.А. Ганушкина, Т.Е. Рябова, Ю.В. Юничева, Л.Е. Василенко, В.Б. Семенов, О.В. Безжонова, Г.А.

- Тархов, Т.В. Шеверева // Медицинская паразитология и паразитарные болезни. – 2008. – № 3. – С.40–43.
33. Сидляревич, В.И. Опыт использования гармонии в теплицах / В.И. Сидляревич, К.Е. Воронин // Защита растений. – 1973. – № 6. – С. 24.
34. Стегний, В.Н. Выявление хромосомных рас у малярийного комара *Anopheles sacharovi* / В.Н. Стегний // Цитология. – 1976. – Т. 18. – № 8. – С. 1039–1041.
35. Стегний, В.Н. Репродуктивные взаимоотношения малярийных комаров комплекса *maculipennis* / В.Н. Стегний // Зоологический журнал. – 1980. – Т. 59. – № 10. – С. 1469–1475.
36. Стегний, В.Н. Реорганизация структуры интерфазных ядер в онто- и филогенезе малярийных комаров / В.Н. Стегний // ДАН – 1979. – Т. 249. – № 5. – С. 1231–1234.
37. Стегний, В.Н. Генетические основы эволюции малярийных комаров. Сообщение I: Хромосомные филогенетические связи / В.Н. Стегний // Зоологический журнал. – 1981. – Т. 60. – Вып. 1. – С. 69–77.
38. Стегний, В.Н. Системная реорганизация архитектоники политенных хромосом в онто- и филогенезе малярийных комаров. Сообщение II: Видоспецифичность в характере взаимоотношений хромосом с ядерной оболочкой в питательных клетках яичников / В.Н. Стегний // Генетика. – 1987. – Т. 23. – № 7. – С. 1194–1202.
39. Стегний, В.Н. Популяционная генетика и эволюция малярийных комаров / В.Н. Стегний – Томск: Изд-во Томского университета, 1991. – 136 с.
40. Стегний, В.Н. Архитектоника генома, системные мутации и эволюция / В.Н. Стегний – Новосибирск: изд-во Новосибирского университета, 1993. – 110 с.
41. Стегний, В.Н. Цитоэкологическое изучение природных популяций малярийного комара на территории СССР. Сообщение 1: Выделение нового вида *Anopheles* в комплексе «*maculipennis*» цитогенетическим методом / В.Н. Стегний, В.М. Кабанова // Медицинская паразитология и паразитарные болезни. – 1976. – № 2. – С. 192–198.

42. Стегний, В.Н. Цитогенетический анализ и распространение малярийного комара *Anopheles beklemishevi* / В.Н. Стегний, Ю.М. Новиков, В.М. Кабанова // Зоологический журнал. – 1978. – Т. 57. – № 6. – С. 873–876.
43. Стегний, В.Н. Генетическая диагностика малярийных комаров палеарктического комплекса «*maculipennis*». В «Научно-практическое руководство по малярии (эпидемиология, систематика, генетика) / В.Н. Стегний, А.М. Русакова / Научн. Ред. Стегний В.Н. – Томск: Изд-во Томского университета, – 2007. – С. 229–236.
44. Стегний, В.Н. Пространственно-временные изменения хромосомных инверсий по ареалу малярийного комара *Anopheles messeae* Fall. (Culicidae) за 40-летний период мониторинга / В.Н. Стегний, А.О. Пищелко, А.К. Сибатаев, Г. Абылкасымова // Генетика. – 2012. – Т. 52. – №6. – С. 664–671.
45. Струнов, А.А. Влияние повышенной температуры на выживаемость *Drosophila melanogaster*, инфицированных патогенным штаммом бактерий *Wolbachia* / А.А. Струнов, Ю.Ю. Илинский, И.К. Захаров, Е.В. Киселева // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2013. – Т. 17. – № 2. – С. 265–276.
46. Украинский, Ф.С. Азиатская божья коровка *Harmonia axyridis* Pall. (Coleoptera, Coccinellidae) на Северном Кавказе / Ф.С. Украинский // Евразиатский энтомологический журнал. – 2013. – Т. 12. – Вып. 1. – С. 35–38.
47. Холин, С.К. Стабильность генетического полиморфизма по окраске надкрылий *Harmonia axyridis* Pall. (Coccinellidae, Coleoptera) в Приморском крае / С.К. Холин // Генетика. – 1990. – Т. 26. – № 12. – С. 2207–2214.
48. Чубкова, А.И. К вопросу о подвидах *Anopheles maculipennis* в Армении / А.И. Чубкова // Медицинская паразитология. – 1948. – Т. 17. – Вып. 4. – С. 365–368.
49. Шабанова, Ю.В. Изменчивость морфологии класпет гипопигиев самцов малярийных комаров комплекса *Anopheles maculipennis* / Ю.В. Шабанова,

- А.К. Сибатаев // Вестник Томского государственного университета. – 2007. – № 300 (II). – С. 252–256.
50. Шайкевич, Е.В. Полиморфизм митохондриальной ДНК и распространение цитоплазматических симбионтов в популяциях двуточечной божьей коровки *Adalia bipunctata* / Е.В. Шайкевич, Е.В. Ившина, И.А. Захаров // Генетика. – 2012. – Т. 48. № 5. – С. 666–671.
51. Шарахова, М.В. Пространственная организация политенных хромосом в ядрах трофоцитов яичников малярийного комара *Anopheles labranchiae* Fall. / М.В. Шарахова, О.П. Брагинец, В.Н. Стегний // Цитология. – 1999. – Т. 41. – № 3–4. – С. 226–227.
52. Широкова, М.В. Пространственная организация политенных хромосом в ядрах трофоцитов яичников малярийного комара *Anopheles labranchiae* Fall. / М.В. Широкова, О.М. Брагинец, В.Н. Стегний // Цитология. – 1999. – Т. 41. – № 3–4. – С. 226–227.
53. Adriaens, T. The multicoloured Asian ladybird *Harmonia axyridis* Pallas (Coleoptera: Coccinellidae), a threat for native aphid predators in Belgium? / T. Adriaens, E. Branquart, D. Maes // Belg. J. Zool. – 2003. – Т. 133. – P. 195–196.
54. Ahmed, M.Z. Prevalence of *Wolbachia* supergroups A and B in *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) and some of its natural enemies / M.Z. Ahmed, S.-X. Ren, N.S. Mandour, J.M. Greeff, B.L. Qiu // Journal of Economic Entomology. – 2010. – Т. 103. – № 5. – С. 1848–1859.
55. Akman, L. Genome sequence of the endocellular obligate symbiont of tsetse flies, *Wigglesworthia glossinidia* / L. Akman, A. Yamashita, H. Watanabe, K. Oshima., T. Shiba, M. Hattori, S. Aksoy // Nat. Genet. – 2002. – Т. 32. – С. 402–407.
56. Allendorf, F.W. Introduction: population biology, evolution, and control of invasive species / F.W. Allendorf, L.L. Lundquist // Conservation Biol. – 2003. – Т. 17. – № 1. – С. 24–30.
57. Andersson, J.O. Insights into the evolutionary process of genome degradation / J.O. Andersson, S.G.E. Andersson // Curr. Opin. Genet. Dev. – 1999. – Т. 9. – С. 664–671.

58. Andrianov, B.V. *Gypsy* group retrotransposon Tv1 from *Drosophila virilis* / B.V. Andrianov, V.M. Zakharyev, N.L. Reznik, T.V. Gorelova, M.V. Evgen'ev // GENE. – 1999. – Т. 239. – С. 193–199.
59. Arakaki, N. *Wolbachia*-mediated parthenogenesis in the predatory thrips *Franklinothrips vespiformis* (Thysanoptera: Insecta) / N. Arakaki, T. Miyoshi, H. Noda // Proc. R. Soc. Lond. B. – 2001. – Т. 268. – Вып. 1471. – С. 1011–1016.
60. Arruda Filho, G.P. Occurrence of *Harmonia axyridis* (Pallas) (Coleoptera, Coccinellidae) in the state of Sao Paulo, Brazil / G.P. Arruda Filho, E. Berti Filho, R.A. Pereira // Revista de Agricultura (Piracicaba). – 2009. – Т. 84. – С. 145–148.
61. Asgharian, H. *Wolbachia* is not all about sex: male-feminizing *Wolbachia* alters the leafhopper *Zyginidia pullula* transcriptome in a mainly sex-independent manner / H. Asgharian, L. Chang, P.J. Mazzoglio, I. Negri // Frontiers in Microbiology. – 2014. – Т. 5. – Ст. 430.
62. Ashburner, M. *Drosophila*, a Laboratory Handbook / M. Ashburner – NY: Cold Spring Harbor Lab. Press., 1989. – 1331 с.
63. Augustinos, A.A. Detection and characterization of *Wolbachia* infections in natural populations of aphids: is the hidden diversity fully unraveled? / A.A. Augustinos, D. Santos-Garcia, E. Dionyssopoulou, M. Moreira, A. Papapanagiotou, M. Scarvelakis, V. Doudoumis, S. Ramos, A.F. Aguiar, P.A.V. Borges, M. Khadem, A. Latorre, G. Tsiamis, K. Bourtzis // PLoS ONE. – 2011. – Т. 6. – Вып. 12. – С. e28695.
64. Baldo, L. Widespread recombination throughout *Wolbachia* genomes / L. Baldo, S. Bordenstein, J.J. Wernegreen, J.H. Werren // Mol. Biol. Evol. – 2006. – Т. 23. – № 2. – С. 437–449.
65. Baldo, L. Multilocus sequence typing system for the endosymbiont *Wolbachia pipientis* / L. Baldo, J.C.D. Hotopp, K.A. Jolley, S.A. Biber, R.R. Choudhury, C. Hayashi, M.C. Maiden, H. Tettelin, J.H. Werren // Applied and Environmental Microbiology. – 2006. – Т. 72. – № 11. – С. 7098–7110.

66. Baldo, L. Revisiting *Wolbachia* supergroup typing based on WSP: spurious lineages and discordance with MLST / L. Baldo, J.H. Werren // *Curr Microbiol.* – 2007. – 55. – Вып. 1. – С. 81–87.
67. Bandi, C. Phylogeny of *Wolbachia* in filarial nematodes / C. Bandi, T.J. Anderson, C. Genchi, M.L. Blaxter // *Proc. R. Soc. Lond. B* – 1998. – Т. 265(1413). – С. 1240–1243.
68. Bandi, C. *Wolbachia* in filarial nematodes: evolutionary aspects and implications for the pathogenesis and treatment of filarial diseases / C. Bandi, A.J. Trees., N.W. Brattig // *Parasitology.* – 2001. – Т. 98: – С. 215– 238.
69. Barševskis, A. Multicoloured Asian lady beetle (*Harmonia axyridis* (Pallas, 1773)) (Coleoptera: Coccinellidae) for the first time in the fauna of Latvia / A. Barševskis // *Baltic J. Coleopterol.* – 2009. – Т. 9. – С. 135–138.
70. Baumann, P. Biology of bacteriocyte-associated endosymbionts of plant sap-sucking insects / P. Baumann // *Annu. Rev. Microbiol.* – 2005. – Т. 59. – С. 155–189.
71. Beebe, N.W. Populations of the south-west Pacific malaria vector *Anopheles farauti* s.s. revealed by ribosomal DNA transcribed spacer polymorphisms / N.W. Beebe, R.D. Cooper, D.H. Foley, J.T. Ellis // *Heredity* – 2000. – Т. 84. – С. 244–253.
72. Benjamini, Y. Controlling the false discovery rate – a practical and powerful approach to multiple testing / Y. Benjamini, Y. Hochberg // *Journal of the Royal Statistical Society Series B – Methodological.* – 1995. – Т. 57. – С. 289–300.
73. Bentley, J.K. The pathology of embryo death caused by the male-killing *Spiroplasma* bacterium in *Drosophila nebulosa* / J.K. Bentley, Z. Veneti, J. Heraty, G.D.D. Hurst // *BMC Biol.* – 2007. – Т. 15. – С. 5-9.
74. Berkvens, N. Pollen as an alternative food for *Harmonia axyridis* / N. Berkvens, J. Bonte, D. Berkvens, K. Deforce, L. Tirry, P. De Clercq // *Biocontrol.* – 2008. – Т. 53. – С. 201–210.

75. Berkvens, N. Cold tolerance of the harlequin ladybird *Harmonia axyridis* in Europe / N. Berkvens, J.S. Bale, D. Berkvens, L. Tirry, P. De Clercq // Journal of Insect Physiology. – 2010. – T. 56. – C. 438–444.
76. Bhat, S.A. Microsporidiosis of silkworm, *Bombyx mori* L. (Lepidoptera-Bombycidae): A review / S.A. Bhat, I. Bashir, A.S. Kamili // African Journal of Agricultural Research. – 2009. – T. 4. – C. 1519–1523.
77. Bian, G. The endosymbiotic bacterium *Wolbachia* induces resistance to dengue virus in *Aedes aegypti* / G. Bian, Y. Xu, P. Lu, Y. Xie, Z. Xi // PLoS Pathog. – 2010. – T. 6. – C. e1000833.
78. Bian, G. *Wolbachia* invades *Anopheles stephensi* populations and induces refractoriness to *Plasmodium* infection / G. Bian, D. Joshi, Y. Dong, P. Lu, G. Zhou, X. Pan, Y. Xu, G. Dimopoulos, Z. Xi // Science. – 2013. – T. 340. – C. 748–751.
79. Bing, X.-L. Diversity and evolution of the *Wolbachia* endosymbionts of *Bemisia* (Hemiptera: Aleyrodidae) whiteflies / X.-L. Bing, W.-Q. Xia, J.-D. Gui, G.-H. Yan, X.-W. Wang, S.-S. Liu // Ecol. Evol. – 2014. – T. 4. – C. 2714–2737.
80. Bjørnson, S. Ultrastructure and molecular characterization of a microsporidium, *Tubulinosema hippodamiae*, from the convergent lady beetle, *Hippodamia convergens* Guérin-Méneville / S. Bjørnson, J. Le, T. Saito, H. Wang // J. Invertebr. Pathol. – 2011. – T. 106. – C. 280–288.
81. Blanc, M. Host defense against viral infection involves interferon mediated down-regulation of sterol biosynthesis / M. Blanc, W.Y. Hsieh, K.A. Robertson, S. Watterson, G.H. Shui, P. Lacaze, M. Khondoker, P. Dickinson, G. Sing, S. Rodríguez-Martín, P. Phelan, T. Forster, B. Strobl, M. Müller, R. Riemersma, T. Osborne, M.R. Wenk, A. Angulo, P. Ghazal // PloS Biology. – 2011. – T. 9. – Вып. 3. – C. e1000598.
82. Bordenstein, S.R. Host genotype determines cytoplasmic incompatibility type in the haplodiploid genus *Nasonia* / S.R. Bordenstein, J.J. Uy, J.H. Werren // Genetics. – 2003. – T. 164. – C. 223–233.

83. Bordenstein, S. Discovery of a novel *Wolbachia* supergroup in isoptera / S. Bordenstein, R.B. Rosengaus // *Curr. Microbiol.* – 2005. – T. 51. – C. 393–398.
84. Boucias, D.G. Detection and characterization of bacterial symbionts in the Heteropteran, *Blissus insularis* / D.G. Boucias, A. Garcia-Maruniak, R. Cherry, H.J. Lu, J.E. Maruniak, V.U. Lietze // *FEMS Microbiol. Ecol.* – 2012. – T. 82. – C. 629–641.
85. Bourke, B.P. A multi-locus approach to barcoding in the *Anopheles strodei* subgroup (Diptera: Culicidae) / B.P. Bourke, T.P. Oliveira, L. Suesdek, E.S. Bergo, M.A. Sallum // *Parasites & Vectors.* – 2013. – T. 6: – C. 111.
86. Bourtzis, K. *Wolbachia* infection and cytoplasmic incompatibility in *Drosophila* species / K. Bourtzis, A. Nigrianaki, G. Markakis, C. Savakis // *Genetics.* – 1996. – T. 144. – C. 1063–1073.
87. Bouzat, J.L. Conservation genetics of population bottlenecks: The role of chance, selection, and history / J.L. Bouzat // *Conserv. Genet.* – 2010. – T. 11. – C. 463–478.
88. Boyle, L. Interspecific and intraspecific horizontal transfer of *Wolbachia* in *Drosophila* / L. Boyle, S.L. O'Neill, H.M. Robertson, T.L. Karrt // *Science.* – 1993. – T. 260. – C. 1796–1799.
89. Braig, H.R. Cloning and characterization of a gene encoding the major surface protein of the bacterial endosymbiont *Wolbachia pipientis* / H.R. Braig, W. Zhou, S.L. Dobson, S.L. O'Neill // *J. Bacteriol.* – 1998. – T. 180. – № 9. – C. 2373–2378.
90. Bravničar, D. Tujerodne vrste v Sloveniji [Электронный ресурс] / D. Bravničar, N. Jogan, V. Knapič, J.K. Veenvliet, B. Ogorelec, P. Skoberne, B. Tavzes, T. Bačič, B. Frajman, Veenvliet P. // – 2009. Режим доступа: http://www.tujerodnevrste.info/publikacije/zbornik_posvet_tujerodne_vrste.pdf.
91. Brayton, K.A. Antigenic variation of *Anaplasma marginale msp2* occurs by combinatorial gene conversion / K.A. Brayton, G.H. Palmer, A. Lundgren, J. Yi, A.F. Barbet // *Mol. Microbiol.* – 2002. – T. 43. – C. 1151–1159.

92. Breeuwer, J.A. Microorganisms associated with chromosome destruction and reproductive isolation between insect species / J.A. Breeuwer, J.H. Werren // *Nature*. – 1990. – T. 346. – C. 558–560.
93. Brendza, R.P. A function for kinesin I in the posterior transport of oskar mRNA and Staufien protein / R.P. Brendza, L.R. Serbus, J.B. Duffy, W.M. Saxton // *Science*. – 2000. – T. 289. – C. 2120–2122.
94. Brendza, R.P. Posterior localization of dynein and dorsal-ventral axis formation depend on kinesin in *Drosophila* oocytes / R.P. Brendza, L.R. Serbus, J.B. Duffy, W.M. Saxton // *Curr. Biol.* – 2002. – T. 12. – C. 1541–1545.
95. Bressac, C. The reproductive incompatibility system in *Drosophila simulans*: DAPI-staining analysis of the *Wolbachia* symbionts in sperm cysts / C. Bressac, F. Rousset // *J. Invertebr. Pathol.* – 1993. – T. 61. – C. 226–230.
96. Brown, P.M.J. *Harmonia axyridis* in Europe: spread and distribution of a non-native coccinellid / P.M.J. Brown, T. Adriaens, H. Bathon, J. Cuppen, A. Goldarazena, T. Hägg, M. Kenis, B.E.M. Klausnitzer, I. Kovář, A.J.M. Loomans, M.E.N. Majerus, O. Nedved, J. Pedersen, W. Rabitsch, H.E. Roy, V. Ternois, I.A. Zakharov, D.B. Roy // *BioControl*. – 2008. – T. 53. – C. 5–21.
97. Brown, P.M.J. The global spread of *Harmonia axyridis* (Coleoptera: Coccinellidae): distribution, dispersal and routes of invasion / P.M.J. Brown, C.E. Thomas, E. Lombaert, D.L. Jeffries, A. Estoup, L.-J. Lawson Handley // *BioControl*. – 2011. – T. 56. – C. 623–641.
98. Brownlie, J.C. Evidence for metabolic provisioning by a common invertebrate endosymbiont, *Wolbachia pipientis*, during periods of nutritional stress / J.C. Brownlie, B.N. Cass, M. Riegler, J.J. Witsenburg, I. Iturbe-Ormaetxe, E.A. McGraw, S.L. O'Neill // *PLoS Pathogens*. – 2009. – T. 5. – Вып. 4. – e1000368.
99. Cadavid, D. Variability of a bacterial surface protein and disease expression in a possible mouse model of systemic Lyme borreliosis / D. Cadavid, D.D. Thomas, R. Crawley, A.G. Barbour // *J. Exp. Med.* – 1994. – T. 179. – C. 631–642.
100. Cali, A. The biology and life history of *Nosema tracheophila* sp. n. (Protozoa: Cnidospora: Microsporidea) found in *Coccinella septempunctata* Linnaeus

- (Coleoptera: Coccinellidae) / A. Cali, J.D. Briggs // J. Invertebr. Pathol. – 1967. – T. 9. – C. 515–522.
101. Callaini, G. *Wolbachia*-induced delay of paternal chromatin condensation does not prevent maternal chromosomes from entering anaphase in incompatible crosses of *Drosophila simulans* / G. Callaini, R. Dallai, M.G. Riparbelli // J. Cell Sci. – 1997. – T. 110. – Ч. 2. – C. 271–280.
 102. Callaini, G. The distribution of cytoplasmic bacteria in the early *Drosophila* embryo is mediated by astral microtubules / G. Callaini, M.G. Riparbelli, R. Dallai // J. Cell Sci. – 1994. – T. 107. – Ч. 3. – C. 673–682.
 103. Calvitti, M. Characterization of a new *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae)–*Wolbachia pipientis* (Rickettsiales: Rickettsiaceae) symbiotic association generated by artificial transfer of the wPip strain from *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) / M. Calvitti, R. Moretti, E. Lampazzi, R. Bellini, S.L. Dobson // J. Med. Entomol. – 2010. – T. 47. – № 2. – C. 179–187.
 104. Calvitti, M. Effects on the male fitness of removing *Wolbachia* infections from the mosquito *Aedes albopictus* / M. Calvitti, R. Moretti, D. Poretta, R. Bellini, S. Urbanelli // Medical and Veterinary Entomology. – 2009. – T. 23. – C. 132–140.
 105. Capella-Gutiérrez, S. Phylogenomics supports microsporidia as the earliest diverging clade of sequenced fungi / S. Capella-Gutiérrez, M. Marcet-Houben, T. Gabaldón // BMC Biology. – 2012. – T. 10. – C. 47.
 106. Caragata, E.P. Dietary cholesterol modulates pathogen blocking by *Wolbachia* / E.P. Caragata, E. Rancè, M. Lauren, L.M. Hedges, A.W. Gofton, K.N. Johnson, S.L. O'Neill, E.A. McGraw // PLoS Pathogens. – 2013. – T. 9. – Вып. 6. – C. e1003459.
 107. Casiraghi, M. Phylogeny of *Wolbachia pipientis* based on *gltA*, *groEL* and *ftsZ* gene sequences: clustering of arthropod and nematode symbionts in the F supergroup, and evidence for further diversity in the *Wolbachia* tree / M. Casiraghi, S.R. Bordenstein, L. Baldo, N. Lo, T. Beninati, J.J. Wernegreen, J.H. Werren, C. Bandi // Microbiology. – 2005. – T. 151(12). – C. 4015–4022.

108. Chapin, J.B. *Harmonia axyridis* (Pallas), the 3rd species of the genus to be found in the United States (Coleoptera, Coccinellidae) / J.B. Chapin, V.A. Brou // Proc. Entomol. Soc. Wash. – 1991. – Т. 93. – С. 630–635.
109. Charlesworth, B. The genetic basis of inbreeding depression / B. Charlesworth, D. Charlesworth // Genet. Res. – 1999. – Т. 74. – С. 329–340.
110. Cho, K.-O. *Wolbachia* bacteria reside in host golgi-related vesicles whose position is regulated by polarity proteins / K.-O. Cho, G.-W. Kim, O.-K. Lee // PLoS One. – 2011. – Т. 6. – Вып. 7. – С. e22703.
111. Charlat, S. On the mod resc model and the evolution of *Wolbachia* compatibility types / S. Charlat, C. Calmet, H. Mercot // Genetics. – 2001. – Т. 159. – С. 1415–1422.
112. Ciosi, M. Invasion of Europe by the western corn rootworm, *Diabrotica virgifera virgifera*: multiple transatlantic introductions with various reductions of genetic diversity / S. Charlat, C. Calmet, H. Mercot // Mol. Ecol. – 2008. – Т. 17. – Вып. 16. – С. 3614–3627.
113. Chapple, D.G. Divergent introduction histories among invasive populations of the delicate skink (*Lampropholis delicata*): has the importance of genetic admixture in the success of biological invasions been overemphasized? / D.G. Chapple, K.A. Miller, F. Kraus, M.B. Thompson // Div. Distrib. – 2013. – Т. 19. – С. 134–146.
114. Chrostek, E. *Wolbachia* variants induce differential protection to viruses in *Drosophila melanogaster*: a phenotypic and phylogenomic analysis / E. Chrostek, M.S.P. Marialva, S.S. Esteves, L.A. Weinert, J. Martinez, F.M. Jiggins, L. Teixeira // PLoS Genetics. – 2013. – Т. 9. – Вып. 12. – С. e1003896.
115. Chrostek, E., Teixeira L. Mutualism breakdown by amplification of *Wolbachia* genes // PLoS Biology. – 2015. – Т. 13. – Вып. 2. – С. e1002065.
116. Clark, M.E. A Calibrated quantitative PCR based assay for measuring *Wolbachia* infection rates / M.E. Clark // The First International *Wolbachia* Conference 2000: Conference Program and Abstracts. International Symbiosis Society. Boston. – 2000. – С. 132.

117. Clark, M.E. Widespread prevalence of *Wolbachia* in laboratory stocks and the implications for *Drosophila* research / M.E. Clark, C.L. Anderson, J. Cande, T.L. Karr // *Genetics*. – 2005. – T. 170. – C. 1667–1675.
118. Clark, I. Transient posterior localization of a kinesin fusion protein reflects anteroposterior polarity of the *Drosophila* oocyte / I. Clark, E. Giniger, H. Ruohola-Baker, L.Y. Jan, Y.N. Jan // *Curr. Biol.* – 1994. – T. 4. – C. 289–300.
119. Clark, I.E. Reciprocal localization of Nod and kinesin fusion proteins indicates microtubule polarity in the *Drosophila* oocyte, epithelium, neuron and muscle / I.E. Clark, L.Y. Jan, Y.N. Jan // *Development*. – 1997. – T. 124. – C. 461–470.
120. Clark, M.E. The distribution and proliferation of the intracellular bacteria *Wolbachia* during spermatogenesis in *Drosophila* / M.E. Clark, Z. Veneti, K. Bourtzis, T.L. Karr // *Mech. Dev.* – 2002. – T.111. – C. 3–15.
121. Clark, M.E. *Wolbachia* distribution and cytoplasmic incompatibility during sperm development: the cyst as the basic cellular unit of CI expression / M.E. Clark, Z. Veneti, K. Bourtzis, T.L. Karr // *Mech. Dev.* – 2003. – T. 120. – C. 185–198.
122. Clement, M. TCS: a computer program to estimate gene genealogies / M. Clement, D. Posada, K.A. Crandall // *Mol. Ecol.* – 2000. – T. 9. – P. 1657–1659.
123. Cole, L.C. The population consequences of life history phenomena / L.C. Cole // *Q. Rev. Biol.* – 1954. – T. 29. – P. 103–137.
124. Collins, F.H. Ribosomal RNA genes of the *Anopheles gambiae* species complex / F.H. Collins, S.M. Paskewitz, V. Finnerty, под ред. K.E. Harris. – В «Advances in Disease Vector Research». – NY.: Springer New York, 1989. – T. 6. – C. 1–28.
125. Collins, F.H. Comparison of rDNA and mtDNA in the sibling species *Anopheles freeborni* and *An. hermsi* / F.H. Collins, C.H. Porter, S.E. Cope // *Am. J. Trop. Med. Hyg.* – 1990. – T. 42. – C. 417–423.
126. Cornel, A.J. Polymerase chain reaction species diagnostic assay for *Anopheles quadrimaculatus* cryptic species (Diptera: Culicidae) based on ribosomal DNA ITS2 sequences / A.J. Cornel, C.H. Porter, F.H. Collins // *J. Med. Entomol.* – 1996. – T. 33. – C. 109–116.

127. Corradi, N. Microsporidia: a journey through radical taxonomical revisions / N. Corradi, P.J. Keeling // *Fungal Biol. Rev.* – 2009. – T. 23. – C. 1–8.
128. Cottrell, T.E. Susceptibility of endemic and exotic North American ladybirds (Coleoptera: Coccinellidae) to endemic fungal entomopathogens / T.E. Cottrell, D.I. Shapiro-Ilan // *European Journal of Entomology.* – 2008. – T. 105. – C. 455–460.
129. Coutanceau, J. *Harmonia axyridis* (Pallas, 1773): une coccinelle asiatique introduite, acclimatée et en extension en France / J. Coutanceau // *Bull. Soc. Entomol. France.* – 2006. – T. 111. – C. 395–401.
130. Cruz, J. Functions of the ecdysone receptor isoform-A in the hemimetabolous insect *Blattella germanica* revealed by systemic RNAi in vivo / J. Cruz, D. Mané Padròs, X. Belleés, D. Martín // *Dev. Biol.* – 2006. – T. 297. – C. 158–171.
131. Czarnetzki, A.B. Detection and phylogenetic analysis of *Wolbachia* in Collembola / A.B. Czarnetzki, C.C. Tebbe // *Environ. Microbiol.* – 2004. – T. 6(1). – C. 35–44.
132. Dale, C. Loss of DNA recombinational repair enzymes in the initial stages of genome degeneration / C. Dale, B. Wang, N. Moran, H. Ochman // *Mol. Biol. Evol.* – 2003. – T. 20. – C. 1188–1194.
133. Dansereau, D.A. The development of germline stem cells in *Drosophila* / D.A. Dansereau, P. Lasko // *Methods Mol. Biol.* – 2008. – T. 450. – C. 3–26.
134. Darling, J.A. Genetic patterns across multiple introductions of the globally invasive crab genus *Carcinus* / J.A. Darling, M.J. Bagley, J. Roman, C.K. Tepolt, J.B. Geller // *Mol. Ecol.* – 2008. – T. 23. – C. 4992–5007.
135. Davies, N. Bioinvasions of the medfly *Ceratitis capitata*: source estimation using DNA sequences at multiple intron loci / N. Davies, F.X. Villablanca, G.K. Roderick // *Genetics.* – 1999. – T. 153. – C. 351–360.
136. Davis, M.B. Phenotypic analysis of EcR-A mutants suggests that EcR isoforms have unique functions during *Drosophila* development / M.B. Davis, G.E. Carney, A.E. Robertson, M. Bender // *Dev. Biol.* – 2005. – T. 282. – C. 385–396.

137. Day, W.H. The known distribution of the predator *Propylea quatuordecimpunctata* (Coleoptera: Coccinellidae) in the United States, and thoughts on the origin of this species and five other exotic lady beetles in eastern North America / W.H. Day, D.R. Prokrym, D.R. Ellis, R.J. Chianese // Entomol. News. – 1994. – T. 105. – C. 224–256.
138. de Almeida, L.M. First record of *Harmonia axyridis* (Pallas) (Coleoptera, Coccinellidae): a lady beetle native to the Palaearctic region / L.M. de Almeida, V.B. da Silva // Rev. Bras. Zool. – 2002. – T. 19. – C. 941–944.
139. De Barro, P.J. Antibiotic curing of parthenogenesis in *Eretmocerus mundus* (Australian parthenogenic form) / P.J. De Barro, P.J. Hart // Entomologia Experimentalis et Applicata. – 2001. – T. 99. – C. 225–230.
140. de Crespigny, F.E. Increased male mating rate in *Drosophila* is associated with *Wolbachia* infection / F.E. de Crespigny, T.D. Pitt, N. Wedell // J. Evol. Biol. – 2006. – T. 19. – C. 1964–1972.
141. Dedeine, F. Removing symbiotic *Wolbachia* bacteria specifically inhibits oogenesis in a parasitic wasp / F. Dedeine, F. Vavre, F. Fleury, B. Loppin, M.E. Hochberg, M. Boulétreau // PNAS. – 2001. – T. 9. – № 11. – C. 6247–6252.
142. Dedeine, F. Intra-individual coexistence of a *Wolbachia* strain required for host oogenesis with two strains inducing cytoplasmic incompatibility in the wasp *Asobara tabida* / F. Dedeine, F. Vavre, D.D. Shoemaker, M. Boulétreau // Evolution. – 2004. – T. 58. – № 10. – C. 2167–2174.
143. Dedeine, F. *Wolbachia* requirement for oogenesis: occurrence within the genus *Asobara* (Hymenoptera, Braconidae) and evidence for intraspecific variation in *A. tabida* / F. Dedeine, M. Boulétreau, F. Vavre // Heredity. – 2005. – T. 95. – C. 394–400.
144. Degnan, P.H. Genome sequence of *Blochmannia pennsylvanicus* indicates parallel evolutionary trends among bacterial mutualists of insects / P.H. Degnan, A.B. Lazarus, J.J. Wernegreen // Genome Res. – 2005. – T. 15. – C. 1023–1033.

145. de Jong, P.W. Comment on «Invasive harlequin ladybird carries biological weapons against native competitors» / P.W. de Jong, J.C. van Lenteren, C.L. Raak-van den Berg // *Science*. – 2013. – T. 341. – № 6152. – C. 1342.
146. Di Luca, M. Intrapopulation polymorphism in *Anopheles messeae* (*An. maculipennis* complex) inferred by molecular analysis / M. Di Luca, D. Boccolini, M. Marinucci, R. Romi // *J. Med. Entomol.* – 2004. – T. 41. – № 4. – C. 582–586.
147. Dlugosch, K.M. Founding events in species invasions: genetic variation, adaptive evolution, and role of multiple introductions / K.M. Dlugosch, I.M. Parker // *Mol. Ecol.* – 2008. – T. 17. – C. 431–449.
148. Dobrzansky, Th. Die geographische und individuelle Variabilität von *Harmonia axyridis* in Pall. in ihren Wechselbeziehungen / Th. Dobrzansky // *Biologischen Zentralblatt*. – 1924. – T. 44. – № 8. – C. 401–421.
149. Dobzhansky, Th. The geographical variation in lady-beetles / Th. Dobzhansky // *Amer. Natur.* – 1933. – T. 67. – № 709. – C. 97–126.
150. Dobzhansky, Th. Genetics and the origin of species. / Th. Dobzhansky – 1-е изд. – NY.: Columbia Univ. Press, 1937. – 364 с.
151. Dobzhansky, Th. Genetics of natural populations. A progress report on genetic changes in populations of *Drosophila pseudoobscura* in the American south-west / Th. Dobzhansky, W.W. Anderson, O. Pavlovsky, B. Spassky, C.J. Will // *Evolution*. – 1964. – T. 18. – C. 164–176.
152. Dobson, S.L. Fitness advantage and cytoplasmic incompatibility in *Wolbachia* single- and superinfected *Aedes albopictus* / S.L. Dobson, W. Rattanadechakul, E.J. Marsland // *Heredity*. – 2004. – T. 93. – C. 135–142.
153. Dobson, S.L. Mutualistic *Wolbachia* infection in *Aedes albopictus*: accelerating cytoplasmic drive / S.L. Dobson, E.J. Marsland, W. Rattanadechakul // *Genetics*. – 2002. – T. 160. – C. 1087–1094.
154. Dobson, S.L. Characterization of *Wolbachia* host cell range via the *in vitro* establishment of infections / S.L. Dobson, E.J. Marsland, Z. Veneti, K. Bourtzis, S.L. O'Neill // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2002. – T. 68. – № 2. – C. 656–660.

155. Dostert, C. The Jak-STAT signaling pathway is required but not sufficient for the antiviral response of drosophila / C. Dostert, E. Jouanguy, P. Irving, L. Troxler, D. Galiana-Arnoux, C. Hetru, J.A. Hoffmann, J.L. Imler // *Nat. Immunol.* – 2005. – Т. 6. – № 9. – С. 946–953.
156. Dunbar, H.E. Aphid thermal tolerance is governed by a point mutation in bacterial symbionts / H.E. Dunbar, A.C.C. Wilson, N.R. Ferguson, N.A. Moran // *PLoS Biol.* – 2007. – Т. 5. – Вып. 5. – С. e96.
157. Duron, O. The diversity of reproductive parasites among arthropods: *Wolbachia* do not walk alone / O. Duron, D. Bouchon, S. Boutin, L. Bellamy, L. Zhou, J. Engelstädter, G.D. Hurst // *BMC Biol.* – 2008. – Т. 6. – С. 27.
158. Dyson, E.A. Persistence of an extreme sex-ratio bias in a natural population / E.A. Dyson, D.D.G. Hurst // *PNAS.* – 2004. – Т. 101. – № 17. – С. 6520–6523.
159. Early, A.M. Monophyly of *Wolbachia pipientis* genomes within *Drosophila melanogaster*: geographic structuring, titre variation and host effects across five populations / A.M. Early, A.G. Clark // *Mol. Ecol.* – 2013. – Т. 22. – Вып. 23. – С. 5765–5778.
160. Echalier, G. *Drosophila* cells in culture / G. Echalier – NY: Academic press. 1997. – 702 с.
161. Edgar, R.S. MUSCLE: Multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput / R.S. Edgar // *Nucleic Acids Reseach.* – 2004. – Т. 32. – С. 1792–1797.
162. Ellstrand, N.C. Hybridization as a stimulus for the evolution of invasiveness in plants? / N.C. Ellstrand, K. A. Schierenbeck // *PNAS.* – 2000. – Т. 97. – С. 7043–7050.
163. Elnagdy, S., Messing S., Majerus M.E.N. Two strains of male-killing *Wolbachia* in a ladybird, *Coccinella undecimpunctata*, from a hot climate / S. Elnagdy, S. Messing, M.E.N. Majerus // *PLoS ONE.* – 2013. – Т. 8. – Вып. 1. – С. e54218.
164. Ephrussi, A. Oskar organizes the germ plasm and directs localization of the posterior determinant nanos / S. Elnagdy, S. Messing, M.E.N. Majerus // *Cell.* – 1991. – Т. 66. – С. 37–50.

165. EPPO (2014) EPPO plant quarantine data retrieval system. Version 5.3.1 [Электронный ресурс]. – 2014. – Режим доступа: <http://www.eppo.int/DATA/BASES/pqr/pqr.htm>
166. Escobar, J.S. The different sources of variation in inbreeding depression, heterosis and outbreeding depression in a metapopulation of *Physa acuta* / J.S. Escobar, A. Nicot, P. David // *Genetics*. – 2008. – Т. 180. – С. 1593–1608.
167. Facon, B. Inbreeding depression is purged in the invasive insect *Harmonia axyridis* / B. Facon, R.A. Hufbauer, A. Tayeh, A. Loiseau, E. Lombaert, R. Vitalis, T. Guillemaud, J. Lundgren, A. Estoup // *Current Biology*. – 2011. – Т. 21. – С. 424–427.
168. Facon, B. A molecular phylogeography approach to biological invasions of the New World by parthenogenetic Thiarid snails / B. Facon, J.P. Pointier, M. Glaubrecht, C. Poux, P. Jarne, P. David // *Mol. Ecol.* – 2003. – Т. 12. – Вып. 11. – С. 3027–3039.
169. Facon, B. Inbreeding depression is purged in the invasive insect *Harmonia axyridis* / B. Facon, R.A. Hufbauer, A. Tayeh, A. Loiseau, E. Lombaert, R. Vitalis, T. Guillemaud, J.G. Lundgren, A. Estoup // *Curr. Biol.* – 2011. – Т. 21. – Вып. 5. – С. 424–427.
170. Fast, E. *Wolbachia* enhance *Drosophila* stem cell proliferation and target the germline stem cell niche / E. Fast, M. Toomey, K. Panaram, D. Desjardins, E. Kolaczyk, H.M. Frydman // *Science*. – 2011. – Т. 334. – С. 990–992.
171. Feavers, I.M. Role of horizontal genetic exchange in the antigenic variation of the class 1 outer membrane protein of *Neisseria meningitidis* / I.M. Feavers, A.B. Heath, J.A. Bygraves, M.C. Maiden // *Mol. Microbiol.* – 1992. – Т. 6. – С. 489–495.
172. Félix, S. Intraguild predation between the aphidophagous ladybird beetles *Harmonia axyridis* and *Coccinella undecimpunctata* (Coleoptera: Coccinellidae): the role of body weight / S. Félix, A.O. Soares // *European Journal of Entomology*. – 2004. – Т. 101. – С. 237–242.

173. Ferran, A. Introduction and release of the coccinellid *Harmonia axyridis* Pallas for controlling *Aphis craccivora* Koch on faba beans in Egypt / A. Ferran, S.A. El-Arnaouty, V. Beyssat-Arnaouty, H. Galal / A. Ferran // Egypt J. Biol. Pest. Control. – 2000. – T. 10. – C. 129–136.
174. Ferree, P.M. *Wolbachia* utilizes host microtubules and dynein for anterior localization in the *Drosophila* oocyte / P.M. Ferree, H.M. Frydman, J.M. Li, J. Cao, E. Wieschaus, W. Sullivan // PLoS Pathog. – 2005. – T. 1. – C. e14.
175. Fleury, F. Physiological cost induced by the maternally-transmitted endosymbiont *Wolbachia* in *Drosophila* parasitoid *Leptopilina heterotoma* / Fleury F., Vavre F., Ris N., Foullet P., Boulétreau M. // Parasitology. – 2000. – T. 121. – Вып. 05. – C. 493–500.
176. Folgarait, P. Preliminary in vitro insights into the use of natural fungal pathogens of leaf-cutting ants as biocontrol agents / P. Folgarait, N. Gorosito, M. Poulsen, C.R. Currie // Curr. Microbiol. – 2011. – T. 63. – C. 250–258.
177. Folmer, O. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates / O. Folmer, M. Black, W. Hoeh, R. Lutz, R. Vrijenhoek // Molecular Marine Biology and Biotechnology. – 1994. – T. 3. – C. 294–299.
178. Fonseca, D.M. Bottlenecks and multiple introductions: population genetics of the vector of avian malaria in Hawaii / D.M. Fonseca, D.A. LaPointe, R.C. Fleischer // Mol. Ecol. – 2000. – T. 9. – Вып. 11. – C. 1803–1814.
179. Frizzi, G. Salivary gland chromosomes of *Anopheles* / G. Frizzi // Nature. – 1947. – T. 160. – C. 226–229.
180. Frydman, H.M. Somatic stem cell niche tropism in *Wolbachia* / H.M. Frydman, J.M. Li, D.N. Robson, E. Wieschaus // Nature. – 2006. – T. 441. – C. 509–512.
181. Fujii, Y. Transfection of *Wolbachia* in Lepidoptera: the feminizer of the adzuki bean borer *Ostrina scapulalis* causes male killing in the mediterranean flour moth *Ephestia kuehniella* / Y. Fujii, D. Kageyama, S. Hoshizaki, Y. Ishikawa, T. Sasaki // Proc. R. Soc. Lond. B. – 2001. – T. 268. – C. 855–859.

182. Fuller, M.T. Genetic control of cell proliferation and differentiation in *Drosophila* spermatogenesis / M.T. Fuller // *Semin. Cell Dev. Biol.* – 1998. – Т. 9. – С. 433–444.
183. Galiana-Arnoux, D. Essential function in vivo for Dicer-2 in host defense against RNA viruses in drosophila / D. Galiana-Arnoux, C. Dostert, A. Schneemann, J.A. Hoffmann, J.L. Imler // *Nat. Immunol.* – 2006. – Т. 7. – С. 590–597.
184. Ganter, G.K. Increased male-male courtship in ecdysone receptor deficient adult flies / G.K. Ganter, K.L. Walton, J.O. Merriman, M.V. Salmon, K.M. Brooks, S. Maddula, E.A. Kravitz // *Behav. Genet.* – 2007. – Т. 37. – С. 507–512.
185. Gaziova, I. Cell-autonomous roles of the ecdysoneless gene in *Drosophila* development and oogenesis / I. Gaziova, P.C. Bonnette, V.C. Henrich, M. Jindra // *Development.* – 2004. – Т. 131. – С. 2715–2725.
186. Gibbs, C.P. Reassortment of pilin genes in *Neisseria gonorrhoeae* occurs by two distinct mechanisms / C.P. Gibbs, B.Y. Reimann, E. Schultz, A. Kaufmann, R. Haas, T.F. Meyer // *Nature.* – 1989. – Т. 338. – С. 651–652.
187. Gil, R. The genome sequence of *Blochmannia floridanus*: comparative analysis of reduced genomes / R. Gil, F.J. Silva, E. Zientz, F. Delmotte, F. González-Candelas, A. Latorre, C. Rausell, J. Kamerbeek, J. Gadau, B. Hölldobler, R.C. van Ham, R. Gross, A. Moya // *PNAS.* – 2003. – Т. 100. – С. 9388–9393.
188. Gill A.C. Iron necessity: the secret of *Wolbachia*'s success? / A.C. Gill, A.C. Darby, B.L. Makepeace // *PLoS Neglected Tropical Diseases.* – 2014. – Т. 8. – Вып. 10. – С. e3224.
189. Glaser, R.L. The native *Wolbachia* endosymbionts of *Drosophila melanogaster* and *Culex quinquefasciatus* increase host resistance to West Nile Virus infection / R.L. Glaser, M.A. Meola // *PLoS ONE.* – 2010. – Т. 5. – Вып. 8. – С. e11977.
190. Glémin, S. How are deleterious mutations purged? Drift versus nonrandom mating / S. Glémin // *Evolution.* – 2003. – Т. 57. – С. 2678–2687.
191. Glowska, E. New *Wolbachia* supergroups detected in quill mites (Acari: Symbionidae) / E. Glowska, A. Dragun-Damian, M. Dabert, M. Gerth // *Infect. Genet. Evol.* – 2015. – Т. 30. – С. 140–146.

192. Goodnight, C.J. Epistatic genetic variance and the effect of founder events on the additive genetic variance / C.J. Goodnight // *Evolution*. – 1988. – Т. 42. – С. 441–454.
193. Gonzalez-Reyes, A. Polarization of both major body axes in *Drosophila* by gurken-torpedo signalling / A. Gonzalez-Reyes, H. Elliott, D. St. Johnston // *Nature*. – 1995. – Т. 375. – С. 654–658.
194. Gordon, R.D. The Coccinellidae (Coleoptera) of America North of Mexico // *J. New York Entomol. Soc.* – 1985. – Т. 93. – Вып. 1. – С. 1–912.
195. Goswami, G. PCR-RFLP of mitochondrial cytochrome oxidase subunit II and ITS2 of ribosomal DNA: markers for the identification of members of the *Anopheles culicifacies* complex (Diptera: Culicidae) / G. Goswami, K. Raghavendra, N. Nanda, S.K. Gakhar, S.K. Subbarao // *Acta Trop.* – 2005. – Т. 95. – P. 92–99.
196. Goudet, J. FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9.3.2). Updated from Goudet (1995) / J. Goudet // – 2002. Режим доступа: <http://www2.unil.ch/popgen/softwares/fstat.htm>.
197. Grace, T.D.C. Establishment of four strain of cells from insects tВыпs grown in vitro / T.D.C. Grace // *Nature*. – 1962. – Т. 195. – С. 788–789.
198. Graham, R.I. Male-killing *Wolbachia* and mitochondrial selective sweep in a migratory African insect / R.I. Graham, K. Wilson // *BMC Evolutionary Biology*. – 2012. – Т.12. – С. 204.
199. Graur, D. Gene diversity in Hymenoptera / D. Graur // *Evolution*. – 1985. – Т. 39. – С. 190–199.
200. Greenstone, M.H. Barcode haplotype variation in north American agroecosystem lady beetles (Coleoptera: Coccinellidae) / M.H. Greenstone, N.J. Vandenberg, J.H. Hu // *Molecular Ecology Resources*. – 2011. – Т. 11. – С. 629–637.
201. Grez, A. *Harmonia axyridis* in Chile: a new threat / A. Grez, T. Zaviezo, G. Gonzalez, S. Rothmann // *Cien. Inv. Agr.* – 2010. – Т. 37. – С. 145–149.
202. Haake, D.A., Suchard M.A., Kelley M.M., Dundoo M., Alt D.P., Zuerner R.L. Molecular evolution and mosaicism of leptospiral outer membrane proteins

- involves horizontal DNA transfer / D.A. Haake, M.A. Suchard, M.M. Kelley, M. Dundoo, D.P. Alt., R.L. Zuerner // *J. Bacteriol.* – 2004. – T. 186. – C. 2818–2828.
203. Hadfield, S.J. Germ cells colonized by endosymbiotic bacteria / S.J. Hadfield, J.M. Axton // *Nature.* – 1999. – T. 402. – C. 482.
204. Haine, E.R. Symbiont-mediated protection / E.R. Haine // *Proc. Biol. Sci.* – 2008. – T. 275. – C. 353–361.
205. Harbach, R.E. Genus *ANOPHELES* Meigen, 1818. Mosquito Taxonomic Inventory / Harbach R.E. – 2011. Режим доступа <http://mosquito-taxonomic-inven-tory.info>.
206. Hardy, O.J. SPAGEDi: a versatile computer program to analyze spatial genetic structure at the individual or population levels / O.J. Hardy, X. Vekemans // *Molecular Ecology Notes.* – 2002. – T. 2. – C. 618–620.
207. Harris, H.L. Sperm chromatin remodelling and *Wolbachia*-induced cytoplasmic incompatibility in *Drosophila* / H.L. Harris, H.R. Braig // *Biochem. Cell Biol.* – 2003. – T. 81. – C. 229–240.
208. Harris, H.L. Bacterial symbionts in insects: balancing life and death / H.L. Harris, L.J. Brennan, B.A. Keddie, H.R. Braig // *Symbiosis.* – 2010. – T. 51. – C. 37–53.
209. Haymer, D.S. The experimental assessment of fitness in *Drosophila*. 1. Comparative measures of competitive reproductive success / D.S. Haymer, D.L. Hartl // *Genetics.* – 1982. – T. 102. – C. 455–466.
210. Hedges, L.M. *Wolbachia* and virus protection in insects / L.M. Hedges, J.C. Brownlie, S.L. O'Neill, K.N. Johnson // *Science.* – 2008. – T. 322. – C. 702.
211. Hemptinne, J.-L. Body size and the rate of spread of invasive ladybird beetles in North America / J.-L. Hemptinne, A. Magro, E.W. Evans, A.F.G. Dixon // *Biological Invasions.* – 2012. – T. 14. – № 3. – C. 595–605.
212. Hendry, T.A. The facultative symbiont *Rickettsia* protects an invasive whitefly against entomopathogenic *Pseudomonas syringae* strains / T.A. Hendry, M.S. Hunter, D.A. Baltrus // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2014. – T. 80. – C. 7161–7168.

213. Hertig, M. The rickettsia, *Wolbachia pipientis* (gen. et sp. n.) and associated inclusions of the mosquito, *Culex pipiens* / M. Hertig // Parasitology. – 1936. – T. 28. – C. 453–486.
214. Hicks, B. *Harmonia axyridis* (Pallas) (Coleoptera: Coccinellidae) found in Newfoundland / B. Hicks, C.G. Majka, S.P. Moores // The Coleopterists Bulletin. – 2010. – T. 64. – № 1. – C. 50.
215. Himler, A.G. Rapid spread of a bacterial symbiont in an invasive whitefly is driven by fitness benefits and female bias / A.G. Himler, T. Adachi-Hagimori, J.E. Bergen, A. Kozuch, S.E. Kelly, B.E. Tabashnik, E. Chiel, V.E. Duckworth, T.J. Dennehy, E. Zchori-Fein, M.S. Hunter // Science. – 2011. – T. 332. – C. 254–256.
216. Hiroki, M. Feminization of genetic males by a symbiotic bacterium in a butterfly, *Eurema hecabe* (Lepidoptera: Pieridae) / M. Hiroki, Y. Kato, T. Kamito, K. Miura // Naturwissenschaften. – 2002. – T. 89. – C. 167–170.
217. Hoffmann, A.A. Population dynamics of the *Wolbachia* infection causing cytoplasmic incompatibility in *Drosophila melanogaster* / A.A. Hoffmann, M. Hercus, H. Dagher // Genetics. – 1998. – T. 148. – C. 221–231.
218. Hoffmann, A.A. Cytoplasmic incompatibility in Australian populations of *Drosophila melanogaster* / A.A. Hoffmann, D.J. Clancy, E. Merton // Genetics. – 1994. – T. 136. – C. 993–999.
219. Hoffmann, A.A. Factors affecting the distribution of cytoplasmic incompatibility in *Drosophila simulans* / A.A. Hoffmann, M. Turelli, L.G. Harshman // Genetics. – 1990. – T. 126. – C. 933–948.
220. Holmes, E.C. The influence of recombination on the population structure and evolution of the human pathogen *Neisseria meningitides* / E.C. Holmes, R. Urwin, M.C. Maiden // Mol. Biol. Evol. – 1999. – T. 16. – C. 741–749.
221. Hoos, P.M. Genetic and historical evidence disagree on likely sources of the Atlantic amethyst gem clam *Gemma gemma* (Totten, 1834) in California / P.M. Hoos, A. Whitman Miller, G.M. Ruiz, R.C. Vrijenhoek, J.B. Geller // Diversity and Distributions. – 2010. – T. 16. – C. 582–592.

222. Hornett, E.A. Evolution of male-killer suppression in a natural population / E.A. Hornett, S. Charlat, A.M.R. Duplouy, N. Davies, G.K. Roderick, N. Wedell, G.D.D. Hurst // *PLoS Biology*. – 2006. – Т. 4. – Вып. 9. – С. e283.
223. Hornett, E.A. The evolution of sex ratio distorter suppression affects a 25 cM genomic region in the butterfly *Hypolimnas bolina* / E.A. Hornett, B. Moran, L.A. Reynolds, S. Charlat, S. Tazzyman, N. Wedell, C.D. Jiggins, G.D.D. Hurst // *PLoS Genet*. – 2014. – Т. 10. – Вып. 12. – С. e1004822.
224. Hosokawa, T. *Wolbachia* as a bacteriocyte-associated nutritional mutualist / T. Hosokawa, R. Koga, Y. Kikuchi, X.-Y. Meng, T. Fukatsu // *PNAS*. – 2010. – Т. 107. – № 2. – С. 769–774.
225. Howell-Adams, B. Molecular models accounting for the gene conversion reactions mediating gonococcal pilin antigenic variation / B. Howell-Adams, H.S. Seifert // *Mol. Microbiol*. – 2000. – Т. 37. – С. 1146–1158.
226. Hubisz, M.J. Inferring weak population structure with the assistance of sample group information / M.J. Hubisz, D. Falush, M. Stephens, J.K. Pritchard // *Molecular Ecology Resources*. – 2009. – Т. 9. – С. 1322–1332.
227. Hughes, G.L. *Wolbachia* infections are virulent and inhibit the human malaria parasite *Plasmodium falciparum* in *Anopheles gambiae* / G.L. Hughes, R. Koga, P. Xue, T. Fukatsu, J. Rasgon // *PLoS Pathog*. – 2011. – Т. 7. – С. e1002043.
228. Hurst, G.D.D. *Adonia variegata* (Coleoptera: Coccinellidae) bears maternally inherited Flavobacteria that kill males only / G.D.D. Hurst, C. Bandi, L. Sacchi, A. Cochrane, D. Bertrand, I. Karaca, M.E.N Majerus // *Parasitology*. – 1999a. – Т. 118. – С. 125–134.
229. Hurst, G.D.D. The diversity of inherited parasites of insects: the male-killing agent of the ladybird beetle *Coleomegilla maculata* is a member of the Flavobacteria / G.D.D. Hurst, T.C. Hammarton, C. Bandi, T.M.O. Majerus, D. Bertrand, M.E.N. Majerus // *Genet. Res*. – 1997. – Т. 70. – С. 1–6.
230. Hurst, G.D.D. Male-killing *Wolbachia* in two species of insect / G.D.D. Hurst, F.M. Jiggins, J.H.G. von der Schulenburg, D. Bertrand, S.A. West, I.I.

- Goriacheva, I.A. Zakharov, J.H. Werren, R. Stouthamer, M.E.N. Majerus // Proc. R. Soc. Lond. B. – 1999. – T. 266. – C. 735–740.
231. Hurst, G.D.D. Male-killing *Wolbachia* in *Drosophila*: A temperature-sensitive trait with a threshold bacterial density / G.D.D. Hurst, A.P. Johnson, H.J.G. Schulenburg, Y. Fuyama // Genetics. – 2000. – T. 156. – C. 699–709.
232. Hurst, G.D.D. Cytoplasmic male killing elements in *Adalia bipunctata* (Linnaeus) (Coleoptera: Coccinellidae) / G.D.D. Hurst, M.E.N. Majerus, L.E. Walker // Heredity. – 1992. – T. 69. – C. 84–91.
233. Hussain, M. *Wolbachia* uses host microRNAs to manipulate host gene expression and facilitate colonization of the dengue vector *Aedes aegypti* / M. Hussain, F.D. Frentiu, L.A. Moreira, S.L. O'Neill, S. Asgari // PNAS. – 2011. – T. 108. – № 22. – C. 9250–9255.
234. Ikeda, T. Regulation of *Wolbachia* density in the Mediterranean flour moth, *Ephesia kuehniella*, and the almond moth, *Cadra cautella* / T. Ikeda, H. Ishikawa, T. Sasaki // Zoological Science. – 2003. – T. 20. – № 2. – C.153–157.
235. Ikeya, T. The endosymbiont *Wolbachia* increases insulin/IGF-like signaling in *Drosophila* / T. Ikeya, S. Broughton, N. Alic, R. Grandison, L. Partridge // Proc. Biol. Sci. – 2009. – T. 276. – C. 3799–3807.
236. Izumi, N. Effects of bisphenol A on the development, growth and sex ratio of the housefly *Musca domestica* / N. Izumi, R. Yanagibori, S. Shigeno, J. Sajiki // Environ Toxicol. Chem. – 2008. – T. 27. – C. 1343–1353.
237. Jaenike, J. Population genetics of beneficial heritable symbionts / J. Jaenike // Trends Ecol. Evol. – 2012. – T. 27. – C. 226–232.
238. Jaenike, J. Adaptation via symbiosis: recent spread of a *Drosophila* defensive symbiont / J. Jaenike, R. Unckless, S.N. Cockburn, L.M. Boelio, S.J. Perlman // Science. – 2010. – T. 329. – C. 212–215.
239. Jiggins, F.M. Sex ratio distortion in *Acraea encedon* (Lepidoptera: Nymphalidae) is caused by a male-killing bacterium / F.M. Jiggins, G.D.D. Hurst, M.E.N. Majerus // Heredity. – 1998. – T. 81. – C. 87–91.

240. Jiggins, F.M. Sex-ratio-distorting *Wolbachia* causes sex-role reversal in its butterfly host / F.M. Jiggins, G.D.D. Hurst, M.E.N. Majerus // Proc. R. Soc. Lond. B. – 2000. – T. 267. – C. 69–73.
241. Joudrey, P. Effects of an unidentified microsporidium on the convergent lady beetle, *Hippodamia convergens* Guérin-Méneville (Coleoptera: Coccinellidae), used for biological control / P. Joudrey, S. Bjørnson // J. Invertebr. Pathol. – 2007. – T. 94. – C. 140–143.
242. Jouselin, E. Fine-scale cospeciation between *Brachycaudus* and *Buchnera aphidicola*: bacterial genome helps define species and evolutionary relationships in aphids / E. Jouselin, Y. Desdevises, A. Coeurd'acier // Proc. Biol. Sci. – 2009. – T. 276. – C. 187–196.
243. Jungen, H. Average fitness of populations of *Drosophila melanogaster* as estimated using compound autosome strain / H. Jungen, D.L. Hartl // Evolution. – 1979. – T. 33. – C. 359–370.
244. Kageyama, D. Female-biased sex ratio in the Asian corn borer, *Ostrinia furnacalis*: evidence for the occurrence of feminizing bacteria in an insect / D. Kageyama, S. Hoshizaki, Y. Ishikawa // Heredity. – 1998. – T. 81. – C. 311–316.
245. Kageyama, D. Feminizing *Wolbachia* in an insect, *Ostrinia furnacalis* (Lepidoptera: Crambidae) / D. Kageyama, G. Nishimura, S. Hoshizaki, Y. Ishikawa // Heredity. – 2002. – T. 88. – C. 444–449.
246. Kageyama, D. Two kinds of sex ratio distorters in a moth, *Ostrinia scapulalis* / D. Kageyama, G. Nishimura, S. Hoshizaki, Y. Ishikawa // Genome. – 2003. – T. 46. – C. 974–982.
247. Kageyama, D. Opposite sex-specific effects of *Wolbachia* and interference with sex determination of its host *Ostrinia scapulalis* / D. Kageyama, W. Traut // Proc. R. Soc. Lond. B. – 2004. Biol. Sci. – T. 271. – C. 251–258.
248. Kaltenpoth, M. Symbiotic bacteria protect wasp larvae from fungal infestation / M. Kaltenpoth, W. Gottler, G. Herzner, E. Strohm // Curr. Biol. – 2005. – T. 15. – C. 475–479.

249. Kambris, Z. Immune activation by life-shortening *Wolbachia* and reduced filarial competence in mosquitoes / Z. Kambris, P.E. Cook, H.K. Phuc, S.P. Sinkins // Science. – 2009. – Т. 326. – С. 134–136.
250. Kambris, Z. *Wolbachia* stimulates immune gene expression and inhibits plasmodium development in *Anopheles gambiae* / Z. Kambris, A.M. Blagborough., S.B. Pinto, M.S. Blagrove, H.C. Godfray, R.E. Sinden, S.P. Sinkins // PLoS Pathog. – 2010. – Т. 6. – Вып. 10. – С. e1001143.
251. Kampen, H. Integration of *Anopheles beklemishevi* (Diptera: Culicidae) in a PCR assay diagnostic for palearctic *Anopheles maculipennis* sibling species / H. Kampen // Parasitol. Res. – 2005a. – Т. 97. – С. 113–117.
252. Kampen, H. The ITS2 ribosomal DNA of *Anopheles beklemishevi* and further remarks on the phylogenetic relationships within the *Anopheles maculipennis* group of species (Diptera: Culicidae) / H. Kampen // Parasitol. Res. – 2005b. – Т. 97. С. – 118–128.
253. Katsoyannos, P. Establishment of *Harmonia axyridis* on citrus and some data on its phenology in Greece / P. Katsoyannos, D.C. Kontodimas, G.J. Stathas, C.T. Tsartsalis // Phytoparasitica. – 1997. – Т. 25. – С.183–191.
254. Keller, S.R. Genomic admixture increases fitness during a biological invasion / S.R. Keller, D.R. Taylor // J. Evol. Biol. – 2010. – Т. 23. – С. 1720–1731.
255. Khan, I.A. Prey consumption by *Harmonia axyridis* of unparasitized and *Encarsia formosa* parasitized *Bemisia tabaci* biotype B prey / I.A. Khan, F.-H. Wan // Journal of Entomology and Zoology Studies. – 2015. – Т. 3. – Вып. 3. – С. 122–127.
256. Kim, A.I. Retroviruses in invertebrates: the gypsy retrotransposon is apparently an infectious retrovirus of *Drosophila melanogaster* / A.I. Kim, C. Terzian, P. Santamaria, A. Pelisson, N. Prud'homme, A. Bucheton // PNAS. – 1994. – Т. 91. – С. 1285–1289.
257. King, R.C. Ovarian development in *Drosophila melanogaster* / R.C. King. – NY.: Academic, 1970. – 227 с.

258. Kitzmiller, J.B. Evolution and speciation within the *Maculipennis* complex of the genus *Anopheles* / J.B. Kitzmiller, G. Frizzi, R. Baker – B «Genetics of Insect Vectors of Disease». Amsterdam: Elsevier Publ. Co., 1967. – T. 5. – P. 210-315.
259. Koch, R.L. Invasions by *Harmonia axyridis* (Pallas) (Coleoptera: Coccinellidae) in the Western Hemisphere: implications for South America / R.L. Koch, R.C. Venette, W.D. Hutchison // Neotrop. Entomol. – 2006. – T. 35. – C. 421–434.
260. Koerich, L.B. Low conservation of gene content in the *Drosophila* Y chromosome / L.B. Koerich, X. Wang, A.G. Clark, A.B. Carvalho // Nature. – 2008. – T. 456. – № 7224. – C. 949–951.
261. Kolbe, J.J. Genetic variation increases during biological invasion by a Cuban lizard / J.J. Kolbe, R.E. Glor, L. Rodríguez Schettino, A.C. Lara, A. Larson, J.B. Losos // Nature. – 2004. – T. 431. – C. 177–181.
262. Kolbe, J.J. Differential admixture shapes morphological variation among invasive populations of the lizard *Anolis sagrei* / J.J. Kolbe, A. Larson, J.B. Losos // Mol. Ecol. – 2007. – T. 16. – C. 1579–1591.
263. Komai, T. Genetics of ladybeetles / T. Komai // Advances in genetics. – 1956. – T. 8. – C. 155–188.
264. Komai, T. Observations on geographic and temporal variations in the ladybeetle, *Harmonia axyridis* / T. Komai, H. Chino // Proc. Japan Acad. – 1969. – T. 45. – C. 284–292.
265. Komai, T. Contribution to the evolutionary genetics of the lady-beetle, *Harmonia axyridis*. I. Geographic and temporal variations in the elytral pattern types and in the frequency of elytral rige / T. Komai, H. Chino, Y. Hosino // Genetics. – 1950. – T. 35. – C. 589-601.
266. Kondo, N. Infection density of *Wolbachia* endosymbiont affected by co-infection and host genotype / N. Kondo, M. Shimada, T. Fukatsu // Biol. Lett. – 2005. – T. 1. – Вып. 4. – C. 488–491.
267. Kose, H. Organization of *Wolbachia pipientis* in the *Drosophila* fertilized egg and embryo revealed by an anti*Wolbachia* monoclonal antibody / H. Kose, T.L. Karr // Mech. Dev. – 1995. – T. 51. – C. 275–288.

268. Kozlova, T. Essential roles for ecdysone signaling during *Drosophila* mid-embryonic development / T. Kozlova, C.S. Thummel // *Science*. – 2003. – Т. 301. – С. 1911–1914.
269. Krasfur, E.S. Gene flow in the exotic colonizing ladybeetle *Harmonia axyridis* in North America / E.S. Krasfur, T.J. Kring, J.C. Miller, P. Nariboli, J.J. Obrycki, J.R. Ruberson, P.W. Schaefer // *Biological Control*. – 1997. – № 8. – С. 207–214.
270. Krasfur, E.S. Gene flow in *Coccinella septempunctata* / E.S. Krasfur, J.J. Obrycki, R.V. Flanders // *J. Hered.* – 1992. – Т. 83. – С. 440–444.
271. Krasfur, E.S. Genetic heterozygosity and gene flow in *Coleomegilla maculate* De Geer (Coleoptera: Coccinellidae) / E.S. Krasfur, J.J. Obrycki, P.W. Schaefer // *Biol. Control*. – 1995. – Т. 5. – С. 104–111.
272. Kremer, N. interferes with ferritin expression and iron metabolism in insects / N. Kremer, D. Voronin, D. Charif, P. Mavingui, B. Mollereau, F. Vavre // *PLoS Pathogens*. – 2009. – Т. 5. – Вып. 10. – С. e1000630.
273. Kulijer, D. First record of invasive species *Harmonia axyridis* (Pallas, 1773) (Coleoptera: Coccinellidae) in Bosnia and Herzegovina / D. Kulijer // *Acta Entomol. Serbica*. – 2010. – Т. 15. – С. 141–143.
274. Labrie, G. Can developmental and behavioral characteristics of the multicolored Asian lady beetle *Harmonia axyridis* explain its invasive success? / G. Labrie, É. Lucas, D. Coderre // *Biological Invasions*. – 2006. – Т. 8. – С. 743–754.
275. Lassy, C.W. Cytological analysis of fertilization and early embryonic development in incompatible crosses of *Drosophila simulans* / C.W. Lassy, T.L. Karr // *Mech. Dev.* – 1996. – Т. 57. – С. 47–58.
276. Landmann, F. Asymmetric *Wolbachia* segregation during early brugia malayi embryogenesis determines its distribution in adult host / F. Landmann, J.M. Foster, B. Slatko, W. Sullivan // *PLoS Negl. Trop. Dis.* – 2010. – Т. 4. – Вып. 7. – С. e758.
277. Laven, H. Speciation and evolution in *Culex pipiens* / H. Laven – В «Genetics of insect vectors of disease, под ред. J. Wrigh, R. Pal. – Amsterdam: Elsevier, 1967. – С. 251–275.

278. Lavergne, S. Increased genetic variation and evolutionary potential drive the success of an invasive grass / S. Lavergne, J. Molofsky // PNAS. – 2007. – T. 104. – C. 3883–3888.
279. Lee, R.E. Jr. Aggregation of lady beetles on the shores of lakes (Coleoptera: Coccinellidae) / R.E. Lee Jr. // Am. Midland Nat. – 1980. – T. 104. C. – 295–304.
280. Lee, Y.-H. Sex change in the protandrous black porgy, *Acanthopagrus schlegeli*: a review in gonadal development, estradiol, estrogen receptor, aromatase activity and gonadotropin / Y.-H. Lee, J.-L. Du, W.-S. Yuen, B.-Y. Lin, J.-D. Huang, C.-Y. Lee, M.-F. Lee, E.-L. Lau, F.-Y. Lee, C. Morrey, Y. Nagahama, C.-F. Chang // J. Exp. Zool. – 2001. – T. 290. – C. 715–726.
281. Leberg, P.L. Estimating allelic richness: effects of sample size and bottlenecks / P.L. Leberg // Mol. Ecol. – 2002. – T. 11. – C. 2445–2449.
282. Li, K. The homeotic target gene centrosomin encodes an essential centrosomal component / K. Li, T.C. Kaufman // Cell. – 1996. – T. 85. – C. 585–596.
283. Li, M. *Drosophila* cytoplasmic dynein, a microtubule motor that is asymmetrically localized in the oocyte / M. Li, M. McGrail, M. Serr, T.S. Hays // J. Cell Biol. – 1994. – T. 126. – C. 1475–1494.
284. Lin, M.Q. *Ehrlichia chaffeensis* and *Anaplasma phagocytophilum* lack genes for lipid biosynthesis and incorporate cholesterol for their survival / M.Q. Lin, Y. Rikihisa // Infection and Immunity. – 2003. – T. 71. – C 5324–5331.
285. Lindholm, A.K. Invasion success and genetic diversity of introduced populations of guppies *Poecilia reticulata* in Australia / A.K. Lindholm, F. Breden, H.J. Alexander, W.K. Chan, S.G. Thakurta, R. Brooks // Mol. Ecol. – 2005. – T. 14. – Вып. 12. – C. 3671–3682.
286. Linton, Y.-M. New occurrence records for *Anopheles maculipennis* and *An. messeae* in northern Greece based on DNA sequence data / Y.-M. Linton, A. Samanidou-Voyadjoglou, L. Smith, R.E. Harbach // Europ. Mosq. Bull. – 2001. – № 11. – C. 31–36.

287. Linton, Y.-M. Observations on the taxonomic status of *Anopheles subalpinus* Hackett et Lewis and *An. melanoon* Hackett / Y.-M. Linton, L. Smith, R.E. Harbach // Europ. Mosq. Bull. – 2002. – № 13. – C. 1–7.
288. Lipa, J.J. *Nosema coccinellae* sp. n., a new microsporidian parasite of *Coccinella septempunctata*, *Hippodamia tredecimpunctata* and *Myrrha octodecimguttata* / J.J. Lipa // Acta Parasitol. Polon. – 1968. – T. 5. – C. 369–376.
289. Lipa, J.J. The parasites and survival of the lady bird beetles (Coccinellidae) during winter / J.J. Lipa, S. Pruszynski, J. Bartkowski // Acta Parasitol. Polon. – 1975. – T. 23. – № 41. – C. 453–461.
290. Lipa, J.J. *Nosema hippodamiae* n. sp., a microsporidian parasite of *Hippodamia convergens* Guérin (Coleoptera, Coccinellidae) / J.J. Lipa, E.A. Steinhaus // J. Insect Pathol. – 1959. – T. 1. – C. 304–308.
291. Little, A.E.F. Defending against parasites: fungus growing ants combine specialized behaviours and microbial symbionts to protect their fungus gardens / A.E.F. Little, T. Murakami, U.G. Mueller, C.R. Currie // Biol. Lett. – 2006. – T. 2(1). – C. 12–16.
292. Lo, N. How many Wolbachia supergroups exist? / N. Lo, M. Casiraghi, E. Salati, C. Bazzocchi, C. Bandi // Mol. Biol. Evol. – 2002. – T. 19. – C. 341–346.
293. Lo, N. Taxonomic status of the intracellular bacterium *Wolbachia pipientis* / N. Lo, C. Paraskevopoulos, K. Bourtzis, S. L. O'Neill, J. H. Werren., S. R. Bordenstein, C. Bandi // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. – 2007. – T. 57. – C. 654–657.
294. Lobbia, S. Female-specific wing degeneration caused by ecdysteroid in the tussock moth, *Orgyia recens*: hormonal and developmental regulation of sexual dimorphism / S. Lobbia, S. Niitsu, H. Fujiwara // J. Insect Sci. – 2003. – T. 3. – C. 1–7.
295. Loiseau, A. Isolation and characterization of microsatellites in the harlequin ladybird, *Harmonia axyridis* (Coleoptera, Coccinellidae), and cross-species amplification within the family Coccinellidae / A. Loiseau, T. Malausa, E.

- Lombaert, J.F. Martin, A. Estoup // *Molecular Ecology Resources*. – 2009. – T. 9. – C. 934–937.
296. Lombaert, E. Biologie évolutive d'une espèce envahissante, la coccinelle asiatique *Harmonia axyridis* / E. Lombaert // Thèse pour obtenir le grade de docteur de l'Université Montpellier II. – 2011. – 295 p.
297. Lombaert, E. Rapid increase in dispersal during range expansion in the invasive ladybird *Harmonia axyridis* / E. Lombaert, A. Estoup, B. Facon, B. Joubard, J.C. Grégoire, A. Jannin, A. Blin, T. Guillemaud // *J. Evol. Biol.* – 2014. – T. 27. – № 3. – C. 508–517.
298. Lombaert, E. Bridgehead effect in the worldwide invasion of the biocontrol harlequin ladybird / E. Lombaert, T. Guillemaud, J.-M. Cornuet, T. Malausa, B. Facon, A. Estoup // *PLoS ONE*. – 2010. – T. 5. – Вып. 3. – C. e9743.
299. Louis, C. Ultrastructural evidence of *Wolbachia* Rickettsiales in *Drosophila simulans* and their relationships with unidirectional cross-incompatibility / C. Louis, L. Nigro // *Journal of Invertebrate Pathology*. – 1989. – T. 54. – C. 39–44.
300. Lu, P. *Wolbachia* induces density-dependent inhibition to dengue virus in mosquito cells / P. Lu, G. Bian, X. Pan, Z. Xi // *PLoS. Negl. Trop. Dis.* – 2012. – T. 6. – Вып. 7. – C. e1754.
301. Lynn, D.E. Novel techniques to establish new insect cell lines / D.E. Lynn // *In Vitro Cell. Dev. Biol. Animal*. – 2001. – T. 37. – C. 319–321.
302. Magro, A. Phylogeny of ladybirds (Coleoptera: Coccinellidae): are the subfamilies monophyletic? / A. Magro, E. Lecompte, F. Magne, J.L. Hemptinne, B. Crouau-Roy // *Mol. Phylogenet. Evol.* – 2010. – T. 54. – C. 833–848.
303. Mahowald, A.P. Intercellular migration of centrioles in the germarium of *Drosophila melanogaster*. An electron microscopic study / A.P. Mahowald, J.M. Strassheim // *J. Cell Biol.* – 1970. – T. 45. – C. 306–320.
304. Maiden, M.C. Population genetics of a transformable bacterium: the influence of horizontal genetic exchange on the biology of *Neisseria meningitidis* / M.C. Maiden // *FEMS Microbiol. Lett.* – 1993. – T. 112. – C. 243–250.

305. Maiden, M.C. Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms / M.C. Maiden, J.A. Bygraves, E. Feil, G. Morelli, J.E. Russell, R. Urwin, Q. Zhang, J. Zhou, K. Zurth, D.A. Caugant, I.M. Feavers, M. Achtman, B.G. Spratt // PNAS. USA. – 1998. – T. 95. – C. 3140–3145.
306. Majerus, T.M.O. Extreme variation in the prevalence of inherited male-killing microorganisms between three populations of *Harmonia axyridis* (Coleoptera: Coccinellidae) / T.M.O. Majerus, M.E.N. Majerus, B. Knowles, J. Wheeler, D. Bertrand, V. Kuznetsov, H. Ueno, G.D.D. Hurst // Heredity. – 1998. – T. 81. – C. 683–691.
307. Majerus, T.M.O. identification of a male-killing agent in the ladybird *Harmonia axyridis* (Pallas) (Coleoptera: Coccinellidae) / T.M.O. Majerus, H. von der Schulenberg, M.E.N. Majerus, G.D.D. Hurst // Insect Molecular Biology. – 1999. – T. 8. – C. 551–555.
308. Majerus, M.E.N. Multiple causes of male-killing in a single sample of the two-spot ladybird, *Adalia bipunctata* (Coleoptera: Coccinellidae) from Moscow / M.E.N. Majerus, G.V.D. Schulenburg, I.A. Zakharov // Heredity. – 2000. – T. 84. – № 5. – C. 605–609.
309. Majerus, M. The potential impacts of the arrival of the harlequin ladybird, *Harmonia axyridis* (Pallas) (Coleoptera: Coccinellidae), in Britain / M. Majerus, V. Strawson, H. Roy // Ecological Entomology. – 2006. – T. 31. – C. 207–215.
310. Majka, C.G. The Coccinellidae (Coleoptera) of the maritime provinces of Canada: new records, biogeographic notes, and conservation concerns / C.G. Majka, D.B. McCorquodale // Zootaxa. – 2006. – T. 1154. – C. 49–68.
311. Malloch ,G. Super-infections of *Wolbachia* in byturid beetles and evidence for genetic transfer between A and B super-groups of *Wolbachia* / G. Malloch, B. Fenton // Mol. Ecol. – 2005. – T. 14. – C. 627–637.
312. Marko, V. Spread of harlequin ladybird (*Harmonia axyridis* Pallas, 1773) (Coleoptera, Coccinellidae) in Hungary, and the first records from Romania and

- Ukraine / V. Marko, G. Pozsgai // *Növényvédelem*. – 2009. – T. 45. – Ч. 9. – С. 481–490.
313. Martin, F. Characterization of a thermosensitive *Escherichia coli* aspartyl-tRNA synthetase mutant / F. Martin, G.J. Sharples, R.G. Lloyd, S. Eiler, D. Moras, J. Gangloff, G. Eriani // *J. Bacteriol.* – 1997. – T. 179. – С. 3691–3696.
314. Martinez, J. Symbionts commonly provide broad spectrum resistance to viruses in insects: a comparative analysis of *Wolbachia* strains / J. Martinez, B. Longdon, S. Bauer, Y.-S. Chan, W.J. Miller, K. Bourtzis, L. Teixeira, F.M. Jiggins // *PLoS Pathogens*. – 2014. – T. 10. – Вып. 9. – С. e1004369.
315. Martins, C.B.C. *Harmonia axyridis*: a threat to Brazilian Coccinellidae? / J. Martinez, B. Longdon, S. Bauer, Y.-S. Chan, W.J. Miller, K. Bourtzis, L. Teixeira, F.M. Jiggins // *Rev. Bras. Entomol.* – 2009. – T. 53. – № 4. – С. 663–671.
316. Matsuka, M. Abnormal sex-ratio found in the lady beetle, *Harmonia axyridis* Pallas (Coleoptera: Coccinellidae) / M. Matsuka, H. Hashi, I. Okada // *Appl. Entomol. Zool.* – 1975. – T. – № 2. – С. 84–89.
317. McGraw, E. A. *Wolbachia* density and virulence attenuation after transfer into a novel host / E.A. McGraw, D.J. Merritt, J.N. Droller, S.L. O’Neil // *PNAS*. – 2002. – T. 99. – № 5. – С. 2918–2923.
318. McGraw, E.A. Evolution of *Wolbachia pipientis* transmission dynamics in insects / E.A. McGraw, S.L. O’Neill // *Trends Microbiol.* – 1999. – T. 7. – С. 297–302.
319. McMeniman, C.J. Host adaptation of a *Wolbachia* strain after long-term serial passage in mosquito cell lines / C.J. McMeniman, A.M. Lane, A.W.C. Fong, D.A. Voronin, I. Iturbe-Ormaetxe, R. Yamada, E.A. McGraw, S.L. O’Neil // *Applied and Environmental Microbiology*. – 2008. – T. 74. – № 22. – С. 6963–6969.
320. Meeus, P.F.M. Conservation of a gene conversion mechanism in two distantly related paralogues of *Anaplasma marginale* / P.F.M Meeus., K.A. Brayton, G.H. Palmer, A.F. Barbet // *Mol. Microbiol.* – 2003. – T. 47. – С. 633–643.
321. Merkl, O. First record of the harlequin ladybird (*Harmonia axyridis* Pallas) in Hungary (Coleoptera: Coccinellidae) / O. Merkl // *Növényvédelem*. – 2008. – T. 44. – С. 239–242.

322. Michaud, J.P. Invasion of the Florida citrus ecosystem by *Harmonia axyridis* (Coleoptera: Coccinellidae) and asymmetric competition with a native species, *Cycloneda sanguine* / J.P. Michaud // Environ. Entomol. – 2002. – Т. 31. – С. 827–835.
323. Michaud, J.P. A comparative study of larval cannibalism in three species of ladybird / J.P. Michaud // Ecological Entomology. – 2003. – Т. 28. – С. 92–101.
324. Miller, N. Multiple transatlantic introductions of the western corn rootworm / N. Miller, A. Estoup, S. Toepfer, D. Bourguet, L. Lapchin, S. Derridj, K.S. Kim, Ph. Reynaud, L. Furlan, T. Guillemaud // Science. – 2005. – Т. 310. – Вып. 5750. – С. 992.
325. Min, K.-T. *Wolbachia*, normally a symbiont of *Drosophila*, can be virulent, causing degeneration and early death / K.-T. Min, S. Benzer // PNAS. – 1997. – Т. 94. – № 20. – С. 10792–10796.
326. Montero, G. Un Coccinélido exótico (*Harmonia axyridis*) invade los agroecosistemas del sudeste de Santa Fe [Электронный ресурс] / G. Montero, L. Vignaroli // G. Montero – В «Publicación cuatrimestral de la Facultad de Ciencias Agrarias UNR Distribución gratuita» – 2008. Режим доступа: <http://www.fcagr.unr.edu.ar/Extension/Agromensajes/26/1AM26.htm>.
327. Moran, N.A. Accelerated evolution and Muller's ratchet in endosymbiotic bacteria / N.A. Moran // PNAS. – 1996. – Т. 93. – С. 2873–2878.
328. Moran, N.A. Lifestyle evolution in symbiotic bacteria: insights from genomics / N.A. Moran, J.J. Wernegreen // Trends Ecol. Evol. – 2000. – Т. 15. – С. 321–326.
329. Moreira, L.A. A *Wolbachia* symbiont in *Aedes aegypti* limits infection with dengue, Chikungunya, and *Plasmodium* / L.A. Moreira, I. Iturbe-Ormaetxe, J.A. Jeffery, G. Lu, A.T. Pyke, L.M. Hedges, B.C. Rocha, S. Hall-Mendelin, A. Day, M. Riegler, L.E. Hugo, K.N. Johnson, B.H. Kay, E.A. McGraw, A.F. van den Hurk, P.A. Ryan, S.L. O'Neill // Cell. – 2009. – Т. 139. – С. 1268–1278.
330. Moritz, C. Conservation units and translocations: strategies for conserving evolutionary processes / C. Moritz // Hereditas. – 1999. – Т. 130. – С. 217–228.

331. Mouton, L. Virulence, multiple infections and regulation of symbiotic population in the *Wolbachia-Asobara tabida* symbiosis / L. Mouton, F. Dedeine, H. Henri, M. Boulétreau, N. Profizi, F. Vavre // *Genetics*. – 2004. – Т. 168. – С. 181–189.
332. Mouton, L. Strain-specific regulation of intracellular *Wolbachia* density in multiply infected insects / L. Mouton, H. Henri, M. Bouletreau, F. Vavre // *Molecular Ecology*. – 2003. – Т. 12. – Вып. 12. – С. 3459–3465.
333. Mouton, L.H. Effect of temperature on *Wolbachia* density and impact on cytoplasmic incompatibility / L.H. Mouton, H. Henri, M. Boulétreau, F. Vavre // *Parasitology*. – 2006. – Т. 132. – С. 49–56.
334. Mouton, L.H. Interaction between host genotype and environmental conditions affects bacterial density in *Wolbachia* symbiosis / L.H. Mouton, H. Henri, D. Charif, M. Boulétreau, F. Vavre // *Biol. Lett.* – 2007. – Т. 3. – Вып. 2. – С. 210–213.
335. Munson, M.A. Evidence for the establishment of aphid-eubacterium endosymbiosis in an ancestor of four aphid families / M.A. Munson, P. Baumann, M.A. Clark, L. Baumann, N.A. Moran, D.J. Voegtlin, B.C. Campbell // *J. Bacteriol.* – 1991. – Т. 173. – № 20. – С. 6321–6324.
336. Nakamura, K. Prevalence of inherited male-killing microorganisms in Japanese population of ladybird beetle *Harmonia axyridis* (Coleoptera: Coccinellidae) / K. Nakamura, H. Ueno, K. Miura // *Ann. Entomol. Soc. Am.* – 2005. – Т. 98(1). – С. 96–99.
337. Narita, S. Unexpected mechanism of symbiont-induced reversal of insect sex: feminizing *Wolbachia* continuously acts on the butterfly *Eurema hecabe* during larval development / S. Narita, D. Kageyama, M. Nomura, T. Fukatsu // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2007. – Т. 73. – № 13. – С. 4332–4341.
338. Narita, S. Naturally occurring single and double infection with *Wolbachia* strains in the butterfly *Eurema hecabe*: transmission efficiencies and population density dynamics of each *Wolbachia* strain / S. Narita, M. Nomura, D. Kageyama // *FEMS Microbiol. Ecol.* – 2007. – Т. 61. – С. 235–245.

339. Navarro, C. Egalitarian binds dynein light chain to establish oocyte polarity and maintain oocyte fate / C. Navarro, H. Puthalakath, J.M. Adams, A. Strasser, R. Lehmann // *Nat. Cell Biol.* – 2004. – T. 6. – C. 427–435.
340. Nedvěd, O. *Harmonia axyridis*: six-legged alligator or lethal fugu? / O. Nedvěd, P. Kalushkov, X. Fois, D. Ungerová, A. Rozsypalová // *IOBC/WPRS Bulletin.* – 2010. – T. 58. – C. 65–68.
341. Nedvěd, O. Record of the ladybird *Harmonia axyridis* (Coleoptera: Coccinellidae) from Uruguay / O. Nedvěd, S. Krejčík // *Klapalekiana.* – 2010. – T. 46. – P. 1–2.
342. Negri, I. *Wolbachia* as an «infectious» extrinsic factor manipulating host signaling pathways / I. Negri // *Frontiers in endocrinology.* – 2012. – T. 2. – Ст. 115.
343. Negri, I. Unravelling the *Wolbachia* evolutionary role: the reprogramming of the host genomic imprinting / I. Negri, A. Franchini, E. Gonella, D. Daffonchio, P.J. Mazzoglio, M. Mandrioli, A. Alma // *Proc. R. Soc. Lond. B. Biological Sciences.* – 2009. – T. 76. – C. 2485–2491.
344. Negri, I. The gonads of *Zyginidia pullula* males feminized by *Wolbachia pipientis* / I. Negri, A. Franchini, M. Mandrioli, P.J. Mazzoglio, A. Alma // *Bulletin of Insectology.* – 2008. – T. 61. – № 1. – C. 213–214.
345. Negri, I. Sex and stripping. The key to the intimate relationship between *Wolbachia* and host? / I. Negri, M. Pellecchia, P. Grève, D. Daffonchio, C. Bandi, A. Alma // *Communicative & Integrative Biology.* – 2010. – T. 3. – Вып. 2. – C. 110–115.
346. Negri, I., Pellecchia M., Mazzoglio P. J., Patetta A., Alma A. Feminizing *Wolbachia* in *Zyginidia pullula* (Insecta, Hemiptera), a leafhopper with an XX/X0 sex determination system / I. Negri, M. Pellecchia, P.J. Mazzoglio, A. Patetta, A. Alma // *Proc. R. Soc. Lond. B.* – 2006. – T. 273. – C. 2409–2416.
347. Nei, M. *Molecular evolutionary genetics* / M. Nei. – NY: Columbia University Press, 1987. – 512 c.

348. Neuman-Silberberg, F.S. The *Drosophila* dorsoventral patterning gene *gurken* produces a dorsally localized RNA and encodes a TGF alpha-like protein / F.S. Neuman-Silberberg, T. Schupbach // *Cell*. – 1993. – T. 75. – C. 165–174.
349. Nicolescu, G. Mosquitoes of the *Anopheles maculipennis* group (Diptera: Culicidae) in Romania, with the discovery and formal recognition of a new species based on molecular and morphological evidence / G. Nicolescu, Y.-M. Linton, A. Vladimirescu, T.M. Howard, R.E. Harbach // *Bull. Entomol. Research*. – 2004. – T. 94. – C. 525–535.
350. Nikoh, N. Evolutionary origin of insect–*Wolbachia* nutritional mutualism / N. Nikoh, T. Hosokawa, M. Moriyama, K. Oshima, M. Hattori, T. Fukatsu // *PNAS*. – 2014. – T. 111. – № 28. – C. 10257–10262.
351. Noda, H. *Wolbachia* infection shared among planthoppers (Homoptera: Delphacidae) and their endoparasite (Strepsiptera: Elenchidae): a probable case of interspecies transmission / H. Noda, T. Miyoshi, Q. Zhang // *Molecular Ecology*. 2001. – T. 10. – C. 2101–2106.
352. Oliver, K.M. Facultative bacterial symbionts in aphids confer resistance to parasitic wasps / K.M. Oliver., J.A. Russell, N.A. Moran, M.S. Hunter // *PNAS*. – 2003. – T. 100. – C. 1803–1807.
353. Onyabe, D.Y. Intragenomic heterogeneity of a ribosomal DNA spacer (ITS2) varies regionally in the neotropical malaria vector *Anopheles nuneztovary* (Diptera: Culicidae) / D.Y. Onyabe, J.E. Conn // *Insect Mol. Biol.* – 1999. – T. 8. – № 4. – C.435–442.
354. O'Neill, S.L. In vitro cultivation of *Wolbachia pipientis* in an *Aedes albopictus* cell line / S.L. O'Neill, M. Pettigrew, S.P. Sinkins, H.R. Braig, T.G. Andreadis, R.B. Tesh // *Insect Mol. Biol.* – 1997. – T. 6. – C. 33–39.
355. O'Neill, S.L. 16S ribosomal-RNA phylogenetic analysis of the bacterial endosymbionts associated with cytoplasmic incompatibility in insects / S.L. O'Neill, R. Giordano, A.M.E. Colbert, T.L. Karr, H.M. Robertson // *PNAS*. – 1992. – T. 89: – C. 2699–2702.

356. Osborne, S.E. Variation in antiviral protection mediated by different *Wolbachia* strains in *Drosophila simulans* / S.E. Osborne, Y.S. Leong, S.L. O'Neill, K.N. Johnson // PLoS Pathog. – 2009. – Т. 5. – Вып. 11. – С. e1000656.
357. Osei-Amo, S. *Wolbachia*-induced aae-miR-12 miRNA negatively regulates the expression of MCT1 and MCM6 genes in *Wolbachia*-infected mosquito cell line / S. Osei-Amo, M. Hussain, S.L. O'Neill, S. Asgari // PLoS One. – 2012. – Т. 7. – Вып. 11. – С. e50049.
358. Pan, X. *Wolbachia* induces reactive oxygen species (ROS)-dependent activation of the Toll pathway to control dengue virus in the mosquito *Aedes aegypti* / X. Pan, G. Zhou, J. Wu, G. Bian, P. Lu, A.S. Raikhel, Z. Xi // PNAS. – 2012. – Т. 109. – № 1. – С. E23–E31.
359. Pannebakker, B.A. Parasitic inhibition of cell death facilitates symbiosis / B.A. Pannebakker, B. Loppin, C.P. Elemans, L. Humblot, F. Vavre // PNAS. – 2007. – Т. 104. – С. 213–215.
360. Paraskevopoulos, C. Towards a *Wolbachia* multilocus sequence typing system: discrimination of *Wolbachia* strains present in *Drosophila* species / C. Paraskevopoulos, S. Bordenstein, J.J. Wernergreen, J. Werren, K. Bourtzis // Curr. Microbiol. – 2006. – Т. 53. – С. 388–395.
361. Pattabhiramaiah, M. Horizontal transmission of *Wolbachia* in the honeybee subspecies *Apis mellifera carnica* and its ectoparasite *Varroa destructor* / M. Pattabhiramaiah, D. Brückner, M.S. Reddy // International Journal of Environmental Sciences. – 2011. – Т. 2(2). – С. 526–535.
362. Pimentel, D. Biological control of invading species / D. Pimentel // Science. – 2000. – Т. 289. – № 5481. – С. 869.
363. Poinso, D. *Wolbachia* transfer from *Drosophila melanogaster* into *D. simulans*: Host effect and cytoplasmic incompatibility relationships / D. Poinso, K. Bourtzis, G. Markakis, C. Savakis, H. Merçot // Genetics. – 1998. – Т. 150. – № 1. – С. 227–237.

364. Poinso, D. On the mechanism of *Wolbachia*-induced cytoplasmic incompatibility: confronting the models with the facts / D. Poinso, S. Charlat, H. Mercot // *BioEssays*. – 2003. – T. 25. – C. 259–265.
365. Pokrywka, N.J. Microtubules are a general component of mRNA localization systems in *Drosophila* oocytes / N.J. Pokrywka, E.C. Stephenson // *Dev. Biol.* – 1995. – T. 167. – C. 363–370.
366. Porter, C.H. Species-diagnostic differences in a ribosomal DNA internal transcribed spacer from the sibling species *Anopheles freeborni* and *Anopheles hermsi* (Diptera: Culicidae) / C.H. Porter, F.H. Collins // *Am. J. Trop. Med. Hyg.* – 1991. – T. 45. – C. 271–279.
367. Poutsma, J. Predicting the potential geographical distribution of the harlequin ladybird, *Harmonia axyridis*, using the CLIMEX model / J. Poutsma, A.J.M. Loomans, B. Aukema, T. Heijerman // *BioControl*. – 2008. – T. 53. – C. 103–125.
368. Presgraves, D.C. A genetic test of the mechanism of *Wolbachia*-induced cytoplasmic incompatibility in *Drosophila* / D.C. Presgraves // *Genetics*. – 2000. – T. 154. – C. 771–776.
369. Pritchard, J.K. Inference of population structure using multilocus genotype data / J.K. Pritchard, M. Stephens, P. Donnelly // *Genetics*. – 2000. – T. 155. – C. 945–959.
370. Proft, J. Identification of six sibling species of the *Anopheles maculipennis* complex (Diptera: Culicidae) by a polymerase chain reaction assay / J. Proft, W.A. Maier, H. Kampen // *Parasitol. Res.* – 1999. – T. 85. – C. 837–843.
371. Przewozny, M. *Harmonia axyridis* (PALLAS, 1773) (Coleoptera: Coccinellidae) new species of ladybird beetle for Polish fauna / M. Przewozny, T. Barłozek, M. Bunalski // *Pol. J. Entomol.* – 2007. – T. 76. – C. 177–182.
372. Pujol, B. Reduced inbreeding depression after species range expansion / B. Pujol, S.R. Zhou, J.S. Vilas, J.R. Pannell // *PNAS*. – 2009. – T. 106. – C. 15379–15383.
373. Raquin, V. Native *Wolbachia* from *Aedes albopictus* blocks chikungunya virus infection in cellulo / V. Raquin, C.V. Moro, Y. Saucereau, F.-H. Tran, P. Potier, P. Mavingui // *PLoS ONE*. – 2015. – T. 10. – Вып. 4. – C. e0125066.

374. Rasgon, J.L. Survival of *Wolbachia pipientis* in cell-free medium / J.L. Rasgon, C.E. Gamston, X. Ren // Appl. Environ. Microbiol. – 2006a. – T. 11. – C. 6934–6937.
375. Rasgon, J.L. Can *Anopheles gambiae* be infected with *Wolbachia pipientis*? Insights from an in vitro system / J.L. Rasgon, X. Ren, M. Petridis // Appl. Environ. Microbiol. – 2006b. – V. 72. – C. 7718–7722.
376. Rasgon, J.L. Phylogenetic characterization of Wolbachia symbionts infecting *Cimex lectularius* L. and *Oeciacus vicarius* Horvath (Hemiptera: Cimicidae) / J.L. Rasgon, T.W. Scott // J. Med. Entomol. – 2004. – T. 41(6). – C. 1175–1178.
377. Raymond, M. An exact test for population differentiation / M. Raymond, F. Rousset // Evolution. – 1995a. – T. 49. – C. 1280–1283.
378. Raymond, M. Genepop (version 1.2), a population genetics software for exact tests and ecumenicism / M. Raymond, F. Rousset // J. Hered. – 1995b. – T. 86. – C. 248–249.
379. Reed, K.M. Induction of paternal genome loss by the paternal-sex-ratio chromosome and cytoplasmic incompatibility bacteria (*Wolbachia*): a comparative study of early embryonic events / K.M. Reed, J.H. Werren // Mol. Reprod. Dev. – 1995. – T. 40. – C. 408–418.
380. Reuter, M. High levels of multiple *Wolbachia* infection and recombination in the ant *Formica exsecta* / M. Reuter, L. Keller // Mol. Biol. Evol. – 2003. – T. 20. – C. 748–753.
381. Rezende, M.Q. Coleoptera, Coccinellidae, *Harmonia axyridis* (Pallas, 1773): new record in Minas Gerais, southeastern Brazil / M.Q. Rezende, J.L.A. Campos, L.M.B Coelho., D.L.Q. Santana // Check List. – 2010. – T. 6. – C. 465–466.
382. Rice, J.B. The varieties of *Anopheles maculipennis* in a region of Greek Macedonia / J.B. Rice, M.A. Barber // Bull. Entomol. Research. – 1937. – T. 28. Вып. 03. – C. 489–497.
383. Rich, S.M. Antigen polymorphism in *Borrelia hermsii*, a clonal pathogenic bacterium / S.M. Rich, S.A. Sawyer, A.G. Barbour // PNAS. – 2001. – T. 98. – C. 15038–15043.

384. Rich, S.M. Heterogeneity of the internal transcribed spacer (ITS-2) region within individual deer ticks / S.M. Rich, B.M. Rosenthal, S.R. Telford 3rd, A. Spielman, D.L. Hartl, F.J. Ayala // *Insect Mol. Biol.* – 1997. – Т. 6. – № 2. – С. 123–129.
385. Richardson, M.F. Population genomics of the *Wolbachia* endosymbiont in *Drosophila melanogaster* / M.F. Richardson, L.A. Weinert, J.J. Welch, R.S. Linheiro, M.M. Magwire, F.M. Jiggins, C.M. Bergman // *PLoS Genet.* – 2012. – Т. 8. – Вып. 12. – С. e1003129.
386. Moran, N.A. Accelerated evolution and Muller's ratchet in endosymbiotic bacteria / N.A. Moran // *PNAS.* – 1996. – Т. 93. – С. 2873–2878.
387. Richard, D.S. Insulin signaling is necessary for vitellogenesis in *Drosophila melanogaster* independent of the roles of juvenile hormone and ecdysteroids: female sterility of the chico1 insulin signaling mutation is autonomous to the ovary / D.S. Richard, R. Rybczynski, T.G. Wilson, Y. Wang, M.L. Wayne, Y. Zhou, L. Partridge, L.G. Harshman // *J. Insect Physiol.* – 2005. – Т. 51. – С. 455–464.
388. Richardson, M.F. Population genomics of the *Wolbachia* endosymbiont in *Drosophila melanogaster* / M.F. Richardson, L.A. Weinert, J.J. Welch, R.S. Linheiro, M.M. Magwire, F.M. Jiggins, C.M. Bergman // *PLoS Genet.* – 2012. – Т. 8. – Вып. 12. – С.: e1003129.
389. Riegler, M. Evidence for a global *Wolbachia* replacement in *Drosophila melanogaster* / M. Riegler, M. Sidhu, W.J. Miller, S.L. O'Neill // *Curr Biol.* – 2005. – Т. 15. – Вып. 15. – С. 1428–1433.
390. Riegler, M. Tandem repeat markers as novel diagnostic tools for high resolution fingerprinting of *Wolbachia* / M. Riegler, I. Iturbe-Ormaetxe, M. Woolfit, W.J. Miller, S.L. O'Neill // *BMC Microbiol.* – 2012. – Т. 12. – Прил. 1. – С. S12.
391. Riparbelli, M.G. Effects of *Wolbachia* on sperm maturation and architecture in *Drosophila simulans* Riverside / M.G. Riparbelli, R. Giordano, G. Callaini // *Mech. Dev.* – 2007. – Т. 124. – С. 699–714.

392. Riparbelli, M.G. *Wolbachia*-mediated male killing is associated with defective chromatin remodeling / M.G. Riparbelli, R. Giordano, M. Ueyama, G. Callaini // PLoS ONE. – 2012. – Т. 7. – Вып. 1. – С. e30045.
393. Robinson, J.T. Cytoplasmic dynein is required for the nuclear attachment and migration of centrosomes during mitosis in *Drosophila* / J.T. Robinson, E.J. Wojcik, M.A. Sanders., M. McGrail, T.S. Hays // J. Cell Biol. – 1999. – Т. 146. – С. 597–608.
394. Ronquist, F. MrBayes 3.2: Efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space / F. Ronquist, M. Teslenko, P. van der Mark, D.L. Ayres, A. Darling, S. Höhna, B. Larget, L. Liu, M.A. Suchard, J.P. Huelsenbeck // Systematic Biology. – 2012. – Т. 61. – № 3. – С. 539–542.
395. Ros, V.I.D. Diversity and recombination in *Wolbachia* and *Cardinium* from *Bryobia* spider mites / V.I.D. Ros, V.M. Fleming, E.J. Feil, J.A.J. Breeuwer // BMC Microbiology. – 2012. – Т. 12. – Прил. 1. – С. S13.
396. Ros, V.I.D. How diverse is the genus *Wolbachia*? Multiple-gene sequencing reveals a putatively new *Wolbachia* supergroup recovered from spider mites (Acari: Tetranychidae) / V.I.D. Ros, V.M. Fleming, E.J. Feil, J.A.J. Breeuwer // Appl. Environ. Microbiol. – 2009. – Т. 75. – С. 1036–1043.
397. Rouhier, N. Glutaredoxins: roles in iron homeostasis / N. Rouhier, J. Couturier, M.K. Johnson, J.P. Jacquot // Trends Biochem. Sci. – 2010. – Т. 35. – С. 43–52.
398. Rousset, F. Genetic differentiation and estimation of gene flow from F-statistics under isolation by distance / F. Rousset // Genetics. – 1997. – Т. 145. – Вып. 4. – С. 1219–1228.
399. Rousset, F. *Wolbachia* endosymbionts responsible for various alterations of sexuality in arthropods / F. Rousset, D. Bouchon, B. Pintureau, P. Juchault, M. Solignac // Proc. R. Soc. Lond. B. – 1992. – Т. 250. – Вып. 1328. – С. 91–98.
400. Rowley, S.M. *Wolbachia pipientis* in Australian spiders / S.M. Rowley, R.J. Raven, E.A. McGraw // Curr. Microbiol. – 2004. – Т. 49(3). – С. 208–214.
401. Roy, H. *Harmonia axyridis*: a successful biocontrol agent or an invasive threat? / H. Roy, P. Brown, M. Majerus // An Ecological and Societal Approach to

- Biological Control / Под ред. H.M.T. Hokkanen – Dordrecht: Springer, 2006. – 295–309 с.
402. Roy, H.E. From biological control to invasion: the ladybird *Harmonia axyridis* as a model species / H.E. Roy, E. Wajnberg. – Dordrecht: Springer, 2008. – 290 с.
403. Rowley, S.M. *Wolbachia pipientis* in Australian spiders / S.M. Rowley, R.J. Raven, E.A. McGraw // Curr. Microbiol. – 2004. – T. 49(3). – С. 208–214.
404. Saethre, M.G. The history of *Harmonia axyridis* (Pallas 1773) in Norway / M.G. Saethre, A. Staverloekk, T. Hofsvang // IOBC/WPRS Bull. – 2010. – T. 58. – С. 97–104.
405. Saini, E.D. Presencia de *Harmonia axyridis* (Pallas) (Coleoptera: Coccinelidae) en la provincia de Buenos Aires: Aspectos biológicos y morfológicos / E.D. Saini // RIA. – 2004. – T. 33. – С. 151–160.
406. Sakamoto, H. Sex-specific death in the Asian corn borer moth (*Ostrinia furnacalis*) infected with *Wolbachia* occurs across larval development / H. Sakamoto, D. Kageyama, S. Hoshizaki, Y. Ishikawa // Genome. – 2007. – T. 50. – № 7. – С. 645–652.
407. Scarborough, C.L. Aphid protected from pathogen by endosymbiont / C.L. Scarborough, J. Ferrari, H.C.J. Godfray // Science. – 2005. – T. 310. – С. 1781.
408. Schneider, D.S. Two ways to survive infection: what resistance and tolerance can teach us about treating infectious diseases / D.S. Schneider, J.S. Ayres // Nat. Rev. Immunol. – 2008. – T. 8. – С. 889–895.
409. Schwartz, M.K. Why sampling scheme matters: the effect of sampling scheme on landscape genetic results / M.K. Schwartz, K.S. McKelvey // Conservation Genetics. – 2009. – T. 10. – С. 441–452.
410. Sedaghat, M.M. The *Anopheles maculipennis* complex (Diptera: Culicidae) in Iran: molecular characterization and recognition of a new species / M.M. Sedaghat, Y.-M. Linton, M.A. Oshaghi, H. Vatandoost, R.E. Harbach // Bull. Entomol. Research. – 2003. – T. 93. – С. 527–535.

411. Serbus, L.R. The genetics and cell biology of *Wolbachia*-host interactions / L.R. Serbus, C. Casper-Lindley, F. Landmann, W. Sullivan // *Annu. Rev. Genet.* – 2008. – Т. 42. – С. 683–707.
412. Serbus, L.R. A cellular basis for *Wolbachia* recruitment to the host germline / L.R. Serbus, W. Sullivan // *PLoS Pathog.* – 2007. – Т. 3. – Вып. 12. – С. e190.
413. Serbus, L.R. The impact of host diet on *Wolbachia* titer in *Drosophila* / L.R. Serbus, P.M. White, S.J. Pintado, A. Rabe, L. Teixeira, R. Albertson, W. Sullivan // *PLoS Pathogens.* – 2015. – Т. 11. – Вып. 3. – С. e1004777.
414. Service, M.W. The *Anopheles* vector / M.W. Service, H. Townson // *Essential Malariology* – 4-е изд. / Под ред. H.M. Gilles, D.A. Warrell. – L.: Arnold; 2002. – С. 59–84.
415. Sharon, G. Commensal bacteria play a role in mating preference of *Drosophila melanogaster* / G. Sharon, D. Segal, J.M. Ringo, A. Hefetz, I. Zilber-Rosenberg, E. Rosenberg // *PNAS.* – 2010. – Т. 107. – № 46. – С. 20051–20056.
416. Shigenobu, S. Genome sequence of the endocellular bacterial symbiont of aphids *Buchnera* sp. APS / S. Shigenobu, H. Watanabe, M. Hattori, Y. Sakaki, H. Ishikawa // *Nature.* – 2000. – Т. 407. – С. 81–86.
417. Shneider, I. Cell lines derived from late embryonic stages of *Drosophila melanogaster* / I. Shneider // *J. Embryol. Exp. Morphol.* – 1972. – Т. 27. – С. 353–365.
418. Silvie, P. *Harmonia axyridis* in Paraguay and new predators identified in cotton crop / P. Silvie, H.P. Aberlenc, C. Duverger, J.M. Bérenger, R. Cardozo, V. Gomez // X Simposio de Controle Biologico. 30 June–4 July 2007. Brasilia, Brasil, c. 26.
419. Sinka, M.E. The dominant *Anopheles* vectors of human malaria in Africa, Europe and the Middle East: occurrence data, distribution maps and bionomic précis / M.E. Sinka, M.J. Bangs, S. Manguin, M. Coetzee, C.M. Mbogo, J. Hemingway, A.P. Patil, W.H. Temperley, P.W. Gething, C.W. Kabaria, R.M. Okara, T.V. Boeckel, H.C.J. Godfray, R.E. Harbach, S.I. Hay // *Parasites & Vectors.* – 2010. – Т. 3. – С. 117.

420. Sinka, M.E. A global map of dominant malaria vectors / M.E. Sinka, M.J. Bangs, S. Manguin, Y. Rubio-Palis, T. Chareonviriyaphap, M. Coetzee, C.M. Mbogo, J. Hemingway, A.P. Patil, W.H. Temperley, P.W. Gething, C.W. Kabaria, T.R. Burkot., R.E. Harbach, S.I. Hay // *Parasites & Vectors*. – 2012. – T. 5. – C. 69.
421. Sironi, M. Molecular evidence for a close relative of the arthropod endosymbiont *Wolbachia* in a filarial worm / M. Sironi, C. Bandi, L. Sacchi, B. di Sacco, G. Damiani, C. Genchi // *Mol. Biochem. Parasitol.* – 1995. – T. 74. – C. 223–227.
422. Sluder, G. Nuclear envelope breakdown is under nuclear not cytoplasmic control in sea urchin zygotes / G. Sluder, E.A. Thompson, Rieder C.L., Miller F.J. // *J. Cell Biol.* – 1995. – T. 129. – C. 1447–1458.
423. Sloggett, J.J. *Harmonia axyridis* invasions: Deducing evolutionary causes and consequences / J.J. Sloggett // *Entomological Science*. – 2012. – T. 15. – C. 261–273.
424. Sloggett, J.J. Comment on «Invasive harlequin ladybird carries biological weapons against native competitors» / J.J. Sloggett // *Science*. – 2013. – T. 341. – № 6152. – C. 1342.
425. Smith, S.M. Biological control with *Trichogramma*: Advances, successes, and potential of their use / S.M. Smith // *Anna Rev. Entomol.* – 1996. – T. 41. – C. 375–406.
426. Snook, R.R. Offsetting effects of *Wolbachia* infection and heat shock on sperm production in *Drosophila simulans*: analyses of fecundity, fertility and accessory gland proteins / R.R. Snook, S.Y. Cleland, M.F. Wolfner, T.L. Karr // *Genetics*. – 2000. – T. V. 155. – C. 167–178.
427. Solter, L.F., Kyei-Poku G.K., Johny S. «Invasive harlequin ladybird carries biological weapons against native competitors» // *Science*. – 2013. – T. 341. – № 6152. – C. 1342.
428. Sprague, V. Microspora / V. Sprague / *Synopsis and classification of living organisms* / Под ред. S.P. Parker. – N.Y.: McGraw Hill Book Co., 1982. – T. 1. – C. 589–594.

429. Stals, R. Discovery of an alien invasive, predatory insect in South Africa: the multicoloured Asian ladybird beetle, *Harmonia axyridis* (Pallas) (Coleoptera: Coccinellidae) / R. Stals, G. Prinsloo // S. Afr. J. Sci. – 2007. – Т. 103. – С. 123–126.
430. Stanković, V.M. The harlequin ladybird continues to invade southeastern Europe / V.M. Stanković, T. Koren, I. Stanković // Biol. Invasions. – 2011. – Т. 13. – Вып. 8. – С. 1711–1716.
431. Steele, T. The effects of two microsporidian pathogens on the two-spotted lady beetle, *Adalia bipunctata* L. (Coleoptera: Coccinellidae) / T. Steele, S. Bjørnson // J. Invertebr. Pathol. – 2012. – Т. 109. – С. 223–228.
432. Stegnii, V.N. Genetic adaptation and speciation in sibling species of the Eurasian «*Maculipennis*» Complex. Recent Developments in the Genetics of Insect Disease Vectors: a symposium proceedings / V.N. Stegnii; под ред W.W.M. Steiner, W.J. Tabachnick, K.S. Rai, S. Narang. – Champaign, Illinois: Stipes Publishing Company, 1997. – С. 454-464.
433. Stegnij, V.N. Cytoecological study of indigenous populations of the malaria mosquito in the territory of the USSR. I. Identification new species of *Anopheles* in the «*maculipennis*» complex by the cytodiagnostic method / V.N. Stegnij, V.M. Kabanova // Mosquito Systematics. – 1978. – Т. 10. – № 1. – С. 1–12.
434. Stouthamer, R. *Wolbachia pipientis*: microbial manipulator of arthropod reproduction R. Stouthamer, J.A.J. Breeuwer, G.D.D. Hurst // Annual Review of Microbiology. – 1999. – Т. 53. – С. 71–102.
435. Stouthamer, R. Cytogenetics of microbe-associated parthenogenesis and its consequences for gene flow in *Trichogramma* wasps / R. Stouthamer, J.D. Kazmer // Heredity. – 1994. – Т. 73. – С. 317–327.
436. Stouthamer, R. Antibiotics cause parthenogenetic *Trichogramma* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) to revert to sex / R. Stouthamer, R.F. Luck, W.D. Hamilton // PNAS. – 1990. – Т. 87. – С. 2424–2427.

437. Stouthamer, R. Taxonomic status of thelytokous forms of *Trichogramma* (Hymenoptera; Trichogrammatidae) / R. Stouthamer, J.D. Pinto, G.R. Platner, R.F. Luck // *Ann. Entomol. Soc. Am.* – 1990. – T. 83. – C. 475–481.
438. Stouthamer, R. Microbes associated with parthenogenesis in wasps of the genus *Trichogramma* / R. Stouthamer, J.H. Werren // *J. Invert. Pathol.* – 1993. – T. 61. – C. 6–9.
439. Suarez, A.V. The evolutionary consequences of biological invasions / A.V. Suarez, N.D. Tsutsui // *Mol. Ecol.* – 2008. – T. 17. – C. 351–360.
440. Sugimto, T.N. A male-killing *Wolbachia* carries a feminizing factor and associated with degradation of the sex-determining system of its host / T.N. Sugimto, Y. Ishikawa // *Biol. Lett.* – 2012. – T. 8. – C. 412–415.
441. Sun, L.V. Development of a physical and genetic map of the virulent *Wolbachia* strain wMelPop / L.V. Sun, M. Riegler, S.L. O'Neill // *J. Bacteriol.* – 2003. – T. 185. – C. 7077–7084.
442. Swevers, L. Vitellogenesis and post-vitellogenic maturation of the insect ovarian follicle / L. Swevers, A.S. Raikhel, T.W. Sappington, P. Shirk, K. Iatrou // *Comprehensive Molecular Insect Science.* – T. 1. – C. 87–156.
443. Swindell, W.R. Reduced inbreeding depression due to historical inbreeding in *Drosophila melanogaster*: Evidence for purging / W.R. Swindell, J.L. Bouzat // *J. Evol. Biol.* – 2006. – T. 19. – C. 1257–1264.
444. Tamas, I. 50 million years of genomic stasis in endosymbiotic bacteria / I. Tamas, L. Klasson, B. Canback, A.K. Naslund, A.S. Eriksson, J.J. Wernegreen, J.P. Sandstrom, N.A. Moran, S.G. Andersson // *Science.* – 2002. – T. 296. – C. 2376–2379.
445. Tamura, K. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods / K. Tamura, D. Peterson, N. Peterson, G. Stecher, M. Nei, S. Kumar // *Molecular Biology and Evolution.* – 2011. – T. 28. – C. 2731–2739.
446. Tan, C.C. Mosaic dominance in the inheritance of color patterns in the ladybird beetle, *Harmonia axyridis* / C.C. Tan // *Genetics.* – 1946. – T. 31. – C. 195–210.

447. Tayeh, A. Investigating the genetic load of an emblematic invasive species: the case of the invasive harlequin ladybird *Harmonia axyridis* / A. Tayeh, A. Estoup, R. A. Hufbauer, V. Ravigne, I. Goryacheva, I.A. Zakharov, E. Lombaert // Ecology and Evolution. – 2013. – Т. 3. – Вып. 4. – С. 864–871.
448. Teixeira, L. The bacterial symbiont *Wolbachia* induces resistance to RNA viral infections in *Drosophila melanogaster* / L. Teixeira, A. Ferreira, M. Ashburner // PLoS Biol. – 2008. – Вып. 6. – С. e1000002.
449. Thalji, R. First sighting of the invasive ladybird *Harmonia axyridis* Pallas (Coleoptera, Coccinellidae) in Serbia / R. Thalji, D. Stojanovic // Biljni Lekar. – 2008. – Т. 36. – С. 389–393.
450. Theurkauf, W.E. Reorganization of the cytoskeleton during *Drosophila* oogenesis: implications for axis specification and intercellular transport / W.E. Theurkauf, S. Smiley, M.L. Wong, B.M. Alberts // Development. – 1992. – Т. 115. – С. 923–936.
451. Thibault, I. The contribution of newly established populations to the dynamics of range expansion in a one-dimensional fluvial-estuarine system: rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in Eastern Quebec / I. Thibault, L. Bernatchez, J.J. Dodson // Diversity and Distributions. – 2009. – Т. 15. – С. 1060–1072.
452. Thomas, C.E. Investigating global invasion routes of the harlequin ladybird (*Harmonia axyridis*) using mtDNA / C.E. Thomas, E. Lombaert, R. Ware, A. Estoup, L.L. Handley // Benefits and risks of exotic biological control agents IOBC/wprs Bulletin. – 2010. – Т. 58. – С. 155–157.
453. Tinsley, M.C. A new male-killing parasitism: *Spiroplasma* bacteria infect the ladybird beetle *Anisosticta novemdecimpunctata* (Coleoptera: Coccinellidae) / M.C. Tinsley, M.E.N. Majerus // Parasitology. – 2006. – Т. 132. – Ч. 6. – С. 757–765.
454. Tokuyasu, K.T. Dynamics of spermiogenesis in *Drosophila melanogaster*, I, Individualization process / K.T. Tokuyasu, W.J. Peacock, R.W. Hardy // Zeitschrift für Zellforschung und Mikroskopische Anatomie. – 1972. – Т. 124. – № 4. – С. 479–506.

455. Tomov, R. The multicolored invasive Asian ladybird *Harmonia axyridis* (PALLAS, 1773) (Coleoptera: Coccinellidae) new to the fauna of Bulgaria / R. Tomov, K. Trencheva, G. Trenchev, M. Kenis // Acta Zool. Bulg. – 2009. – Т. 61. – С. 307–311.
456. Toomey, M.E. Extreme divergence of *Wolbachia* tropism for the stem-cell-niche in the *Drosophila* testis / M.E. Toomey, H.M. Frydman // PLoS Pathogens. – 2014. – Т. 10. – Вып. 12. – С. e1004577.
457. Toomey, M.E. Evolutionarily conserved *Wolbachia*-encoded factors control pattern of stem-cell niche tropism in *Drosophila* ovaries and favor infection / M.E. Toomey, K. Panaram, E.M. Fast, C. Beatty, H.M. Frydman // PNAS. – 2013. – Т. 110. – № 26. – С. 10788–10793.
458. Turgeon, J. Experimental evidence for the phenotypic impact of admixture between wild and biocontrol Asian ladybird (*Harmonia axyridis*) involved in the European invasion / J. Turgeon, A. Tayeh, B. Facon, E. Lombaert, P. De Clercq, N. Berkvens, J.G. Lundgren, A. Estoup // J. Evol. Biol. – 2011. – Т. 24. – Вып. 5. – С. 1044–1052.
459. Tourniaire, R. A natural flightless mutation in the ladybird, *Harmonia axyridis* / R. Tourniaire, A. Ferran, L. Giuge, C. Piotte, J. Gambier // Entomol. Exp. Appl. – 2000. – Т. 96. – С. 33–38.
460. Tram, U. Identification of *Wolbachia*-host interacting factors through cytological analysis / U. Tram, P.M. Ferree, W. Sullivan // Microbes Infect. – 2003. – Т. 5. – Вып. 11. – С. 999–1011.
461. Tram, U. Paternal chromosome segregation during the first mitotic division determines *Wolbachia*-induced cytoplasmic incompatibility phenotype / U. Tram, K. Fredrick, J.H. Werren, W. Sullivan // J. Cell Sci. – 2006. – Т. 119. – С. 3655–3663.
462. Tram, U. Role of delayed nuclear envelope breakdown and mitosis in *Wolbachia* induced cytoplasmic incompatibility / U. Tram, W. Sullivan // Science. – 2002. – Т. 296. – С. 1124–1126.

463. Truman, J.W. Steroid hormone secretion in insects comes of age / J.W. Truman // PNAS. – 2006. – T. 103. – № 24. – С. 8909 – 8910.
464. Turelli, M. Rapid spread of an inherited incompatibility factor in California *Drosophila* / M. Turelli, A.A. Hoffmann // Nature. – 1991. – T. 353. – С. 440–442.
465. Turgeon, J. Experimental evidence for the phenotypic impact of admixture between wild and biocontrol Asian ladybird (*Harmonia axyridis*) involved in the European invasion / J. Turgeon, A. Tayen, B. Facon, E. Lombaert, P. De Clerq, N. Berkvens, J.G. Lundgren, A. Estoup // J. Evol. Biol. – 2011. – T. 24. – С. 1044–1052.
466. Ukrainsky, A.S. Expansion of *Harmonia axyridis* Pallas (Coleoptera: Coccinellidae) to European Russia and adjacent regions / A.S. Ukrainsky, M.Ya. Orlova-Bienkowskaja // Biol. Invasions. – 2014. – Т. 16. – Вып. 5. – С. 1003–1008.
467. Vandekerckhove, T.T. Phylogenetic analysis of the 16S rDNA of the cytoplasmic bacterium *Wolbachia* from the novel host *Folsomia candida* (Hexapoda, Collembola) and its implications for wolbachial taxonomy / T.T. Vandekerckhove, S. Watteyne, A. Willems, J.G. Swings, J. Mertens, M. Gillis // FEMS Microbiol Lett. – 1999. – Т. 180(2). – С. 279-86.
468. Van Ham, R.C. Reductive genome evolution in *Buchnera aphidicola* / R.C. Van Ham, J. Kamerbeek, C. Palacios, C. Rausell, F. Abascal, U. Bastolla, J.M. Fernández, L. Jiménez, M. Postigo, F.J. Silva, J. Tamames, E. Viguera, A. Latorre, A. Valencia, F. Morán, A. Moya // PNAS. – 2003. – Т. 100. – С. 581–586.
469. Van Rij, R.P. The RNA silencing endonuclease Argonaute 2 mediates specific antiviral immunity in *Drosophila melanogaster* / R.P. Van Rij, M.C. Saleh, B. Berry, C. Foo, A. Houk, C. Antoniewski, R. Andino // Genes Dev. – 2006. – Т. 20. – С. 2985–2995.

470. Vavre, F. Phylogenetic evidence for horizontal transmission of *Wolbachia* in host–parasitoid associations / F. Vavre, F. Fleury, D. Lepetit, P. Fouillet, M. Bouletreau // *Mol. Biol. Evol.* – 1999. – T. 16. – C. 1711–1723.
471. Venard, C.M.-P. SYTO11 staining vs FISH staining: a comparison of two methods to stain *Wolbachia pipientis* in cell cultures / C.M.-P. Venard, P.R. Crain, S.L. Dobson // *Letters in Applied Microbiology.* – 2011. – T. 52. – C. 168–176.
472. Veneti, Z. Heads or tails: host-parasite interactions in the *Drosophila-Wolbachia* system / Z. Veneti, M.E. Clark, T.L. Karr, Ch. Savakis, K. Bourtzis // *Applied and Environmental Microbiology.* – 2004. – T. 70. – № 9. – C. 5366–5372.
473. Verhoeven, K.J. Population admixture, biological invasions and the balance between local adaptation and inbreeding depression / K.J. Verhoeven, F.M. Macel, L.M. Wolfe, A. Biere // *Proc. R. Soc. Lond. B.* – 2011. – T. 278. – C. 2–8.
474. Verne, S. Evidence for recombination between feminizing *Wolbachia* in the isopod genus *Armadillidium* / S. Verne, M. Johnson, D. Bouchon, F. Grandjean // *Gene.* – 2007. – T. 397. – C. 58–66.
475. Vilcinskas, A. Invasive harlequin ladybird carries biological weapons against native competitors / A. Vilcinskas, K. Stoecker, H. Schmidtberg, C.R. Röhrich, H. Vogel // *Science.* – 2013. – T. 340. – C. 862–863.
476. Vitousek, P.M. Biological invasions as global environmental change / P.M. Vitousek, C.M. D’Antonio, L.L. Loope, R. Westbrooks // *American Scientist.* – 1996. – T. 84. – C. 468–478.
477. Von der Schulenburg, J.H.G. Incidence of male-killing *Rickettsia* spp. (alpha-proteobacteria) in the ten-spot ladybird beetle *Adalia decempunctata* L. (Coleoptera: Coccinellidae) / J.H.G. von der Schulenburg, M. Habig, J.J. Sloggett, K.M. Webberley, D. Bertrand, G.D.D. Hurst, M.E.N. Majerus // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2001. – T. 67. – C. 270–277.
478. von der Schulenburg, J.H. History of infection with different male-killing bacteria in the two-spot ladybird beetle *Adalia bipunctata* revealed through mitochondrial DNA sequence analysis / J.H. von der Schulenburg, G.D. Hurst, D. Tetzlaff, G.E.

- Booth, I.A. Zakharov, M.E. Majerus // *Genetics*. – 2002. – Т. 160. – № 3. – С. 1075–1086.
479. Voronin, D. Transinfection and growth discrepancy of *Drosophila Wolbachia* strain wMel in cell lines of the mosquito *Aedes albopictus* / D. Voronin, V. Tran-Van, P. Potier, P. Mavingui // *Journal of Applied Microbiology*. – 2010. – Т. 108. – С. 2133–2141.
480. Vyas, A. Behavioral changes induced by *Toxoplasma* infection of rodents are highly specific to aversion of cat odors / A. Vyas, S.K. Kim, N. Giacomini, J.C. Boothroyd, R.M. Sapolsky // *PNAS*. – 2007. – Т. 104. – № 15. – С. 6442–6447.
481. Ware, R.L. Intraguild predation of immature stages of British and Japanese coccinellids by the invasive ladybird *Harmonia axyridis* / R.L. Ware, M.E.N. Majerus // *BioControl*. – 2008. – Т. 53. – С. 169–188.
482. Warren, J.T. Molecular and biochemical characterization of two P450 enzymes in the ecdysteroidogenic pathway of *Drosophila melanogaster* / J.T. Warren, A. Petryk, G. Marqués, M. Jarcho, J.-P. Parvy, C. Dauphin-Villemant, M.B. O'Connor, L.I. Gilbert // *PNAS*. – 2002. – Т. 17. – С. 11043–11048.
483. Webster, J.P. Effect of *Toxoplasma gondii* upon neophobic behaviour in wild brown rats, *Rattus norvegicus* / J.P. Webster, C.F. Brunton, D.W. MacDonald // *Parasitology*. – 1994. – Т. 109. – Ч 1. – С. 37–43.
484. Weeks, A.R. *Wolbachia*-induced parthenogenesis in a genus of phytophagous mites / A.R. Weeks, J.A. Breeuwer // *Proc. R. Soc. Lond. B*. – 2001. – Т. 268. – С. 2245–2251.
485. Weeks, A.R. From parasite to mutualist: rapid evolution of *Wolbachia* in natural populations of *Drosophila* / A.R. Weeks, M. Turelli, W.R. Harcombe, K.T. Reynolds, A.A. Hoffmann // *PLoS Biol*. – 2007. – Т. 5. – Вып. 5. – e114.
486. Weinert, L.A. Are we underestimating the diversity and incidence of insect bacterial symbionts? A case study in ladybird beetles / L.A. Weinert, M.C. Tinsley, M. Temperley, F.M. Jiggins // *Biol. Lett*. – 2007. – № 3. – P. 678–681.
487. Weir, B.S. Estimating F-statistics for the analysis of population structure / B.S. Weir, C. Cockerham // *Evolution*. – 1984. – Т. 38. – С. 1358–1370.

488. Weiss, B.L. Tsetse immune system maturation requires the presence of obligate symbionts in larvae / B.L. Weiss, J. Wang, S. Aksoy // PLoS Biol. – 2011. – Т. 9. – Вып. 5. – С. e1000619.
489. Wernegreen, J.J. Genome evolution in bacterial endosymbionts of insects / J.J. Wernegreen // Nat. Rev. Genet. – 2002. – Т. 3. – С. 850–861.
490. Werren, J.H. Biology of *Wolbachia* / J.H. Werren // Annu. Rev. Entomol. – 1997. – Т. 42. – С. 587–609.
491. Werren, J.H. Evolution and phylogeny of *Wolbachia*: reproductive parasites of arthropods / J.H. Werren, W. Zhang, L.R. Guo // Proc. R. Soc. Lond. B. – 1995. – Т. 261. – Вып. 1360. – С. 55–63.
492. Werren, J.H. Recombination in *Wolbachia* / J.H. Werren, J.D. Bartos // Curr. Biol. – 2001. – Т. 11. – С. 431–435.
493. Werren, J.H., Rickettsial relative associated with male killing in the ladybird beetle (*Adalia bipunctata*) / J.H. Werren, G.D.D. Hurst, W. Zhang, J.A. Breeuwer, R. Stouthamer, M.E. Majerus // J. Bacteriol. – 1994. – Т. 176. – С. 388–394.
494. Wesson, D.M. Sequence and secondary structure comparisons of ITS rDNA in mosquitoes (Diptera, Culicidae) / D.M. Wesson, C.H. Porter, F.H. Collins // Mol. Phylogenet. Evol. – 1992. – Т. 1. – С. 253–269.
495. Wong, Z.S. *Wolbachia*-mediated antibacterial protection and immune gene regulation in *Drosophila* / Z.S. Wong, L.M. Hedges, J.C. Brownlie, K.N. Johnson // PLoS ONE. – 2012. – Т. 6. – Вып. 9. – С. e25430.
496. Woolfit, M. Genomic evolution of the pathogenic *Wolbachia* strain, wMelPop / M. Woolfit, I. Iturbe-Ormaetxe, J.C. Brownlie, T. Walker, M. Riegler, A. Seleznev, J. Popovici, E. Rancès, B.A. Wee, J. Pavlides, M.J. Sullivan, S.A. Beatson, A. Lane, M. Sidhu, C.J. McMeniman, E.A. McGraw, S.L. O'Neill // Genome Biology and Evolution. – 2013. – Т. 5(11). – С. 2189–204.
497. World Health Organization. Progress with Roll Back Malaria in the European Region. Copenhagen, – 2001, – 15 pp.
498. Wu, M. Phylogenomics of the reproductive parasite *Wolbachia pipientis* wMel: a streamlined genome overrun by mobile genetic elements / M. Wu, L.V. Sun, J.

- Vamathevan, M. Riegler, R. Deboy, J.C. Brownlie, E.A. McGraw, W. Martin, C. Esser, N. Ahmadinejad, C. Wiegand, R. Madupu, M.J. Beanan, L.M. Brinkac, S.C. Daugherty, A.S. Durkin, J.F. Kolonay, W.C. Nelson, Y. Mohamoud, P. Lee, K. Berry, M.B. Young, T. Utterback, J. Weidman, W.C. Nierman, I.T. Paulsen, K.E. Nelson, H. Tettelin, S.L. O'Neill, J.A. Eisen // *PLoS Biol.* – 2004. – Т. 2. – Вып. 3. – С. E69.
499. Xi, Z. *Wolbachia* establishment and invasion in an *Aedes aegypti* laboratory population / Z. Xi, C.C. Khoo, S.L. Dobson // *Science.* – 2005. – Т. 310. – С. 326–328.
500. Xie, J. *Spiroplasma* bacteria enhance survival of *Drosophila hydei* attacked by the parasitic wasp *Leptopilina heterotoma* / J. Xie, I. Vilchez, M. Mateos // *PLoS ONE.* – 2010. – Т. 5. – Вып. 8. – С. e12149.
501. Yang, X.H. High levels of multiple infections, recombination and horizontal transmission of *Wolbachia* in the *Andricus mukaigawae* (Hymenoptera; Cynipidae) communities / X.H. Yang, D.H. Zhu, Z. Liu, L. Zhao, C.Y. Su // *PLoS ONE.* – 2013. – Т. 8. – Вып. 11. – С. e78970.
502. Ye, Y.H. *Wolbachia*-associated bacterial protection in the mosquito *Aedes aegypti* / Y.H. Ye, M. Woolfit, E. Rancès, S.L. O'Neill, E.A. McGraw // *PLOS Neglected Tropical Diseases.* – 2013. – Т. 7. – Вып. 8. – С. e2362.
503. Yen, J.H. New hypothesis of the cause of cytoplasmic incompatibility in *Culex pipiens* L. / J.H. Yen, A.R. Barr // *Nature.* – 1971. – Т. 232. – С. 657–658.
504. Yoshioka, K. Efficient amplification of *Drosophila simulans* copia directed by high-level reverse transcriptase activity associated with copia virus-like particles / K. Yoshioka, H. Kanda, N. Takamatsu, S. Tagashi, S. Kondo, T. Miyake, Y. Sakaki, T. Shiba // *Gene.* – 1992. – Т. 120. – С. 191–196.
505. Zabalou S. Multiple rescue factors within a *Wolbachia* strain / S. Zabalou, A. Apostolaki, S. Pattas, Z. Veneti, C. Paraskevopoulos, I. Livadaras, G. Markakis, T. Brissac, H. Merçot, K. Bourtzis // *Genetics.* – 2008. – Т. 178. – С. 2145–2160.
506. Zakharov IA, Goryacheva II, Rydkina EB, Roux V., Raoult D (1998) Cytoplasmically inherited femalebiased sex ratio in Kyrgyz population of *Adalia*

- bipunctata turanica caused by bacteria of the genus *Rickettsia* / I.A. Zakharov, I.I. Goryacheva, E.B. Rydkina, V. Roux, D. Raoult // Russian J. Genet. – 1998. – Т. 34. – С. 171–175.
507. Zchori-Fein, E. Distribution of parthenogenesis-inducing symbionts in ovaries and eggs of *Aphytis* (Hymenoptera: Aphelinidae) / E. Zchori-Fein, R.T. Roush, D. Rosen // Curr. Microbiol. – 1998. – Т. 36. – С. 1–8.
508. Zélé, F. Infection with *Wolbachia* protects mosquitoes against *Plasmodium*-induced mortality in a natural system / F. Zélé, A. Nicot, O. Duron, A. Rivero // J. Evol. Biol. – 2012. – Т. 25. – С. 1243–1252.
509. Zhang, G. *Wolbachia* uses a host microRNA to regulate transcripts of a methyltransferase, contributing to dengue virus inhibition in *Aedes aegypti* / G. Zhang, M. Hussain, S.L. O'Neill, S. Asgari // PNAS. – 2013. – V. 110. – № 25. – С. 10276–10281.
510. Zhou, W. Phylogeny and PCR-based classification of *Wolbachia* strains using *wsp* gene sequences / W. Zhou, F. Rousset, S. O'Neill // Proc. R. Soc. Lond. B. – 1998. – V. 265. – С. 509–515.
511. Zimmer, C. Parasites make scaredy-rats foolhardy / C. Zimmer // Science. – 2000. – V. 289. – Вып. 5479. – С. 525–527.
512. Zug, R. Still a host of hosts for *Wolbachia*: analysis of recent data suggests that 40% of terrestrial arthropod species are infected / R. Zug, P. Hammerstein // PLoS One. – 2012. – Т. 7. – Вып. 6. – С. e38544.

Приложение А Места (точки) сбора комаров комплекса *maculipennis* в Средней Азии

	Номер на рисунке 3.1.7
Кыргызстан	
Баткенская область Лейлекский район поселок Алга	1
Баткенская область Лейлекский район поселок Жизген	2
Баткенская область Кадамжайский район поселок Ак-Калпак	3
Ошская область Алайский район город Гюльча	4
Ошская область Узгенский район город Узген	5
Ошская область Кара-Суйский район поселок Кызыл-Шарк	6
Ошская область село Лангар	7
Джалалабатская область город Ташкумыр	8
Джалалабатская область город Кара-Куль	9
Джалалабатская область Сузакский район г. Майлуу-Суу	10
Джалалабатская область Сузакский район поселок Достук	11
Таласская область Кара-Буринский район поселок Кизил-Адыр	12
Нарынская область Акталинский район поселок Угют	13
Иссык-Кульская область город Балыкчи	14
Иссык-Кульская область поселок Бостери северный берег Иссык-Куля	15
Таджикистан	
Согдийская область Исфаринский район близ города Исфара	16
Согдийская область Матчинский район	17
Согдийская область Аштский район	18
Согдийская область Спитаменский район	19
Согдийская область Джаббар-Расуловский район	20
Согдийская область Бободжан Гафуровский район	21
Узбекистан	
Самаркандская область Булунгунский район кишлак Фармантепа	22
Ферганская область поселок пахта Бустон	23
Ташкентская область Урта-Чирчикский район хозяйство имени Навои (участок Декханабад)	24
Хорезмская область, окрестности г. Янгиарык	25
Каракалпакская АР Амударьинский район пос. Кипчак	26
Каракалпакская АР Амударьинский район окрестности города Мангит	27
Каракалпакская АР Нукусский район 20 км к западу о Нукуса	28
Каракалпакская АР Нукусский район 26 км к западу от Нукуса, хозяйство Ширкат	29
Каракалпакская АР Шимбайский район хозяйство Камсак 18 км на северо-запад от Шимбая	30
Каракалпакская АР Шимбайский район 20 км на северо-запад от Шимбая хозяйство Камсарк	31
Каракалпакская АР Кунградский район окрестности города Кунград	32
Каракалпакская АР Кунградский район – 10 км к западу от Кунграда поселок Уш-Терек	33
Туркменистан	
Лябапский велоят окрестности г. Атамурад (бывший Керки)	34

Приложение Б Места (точки) сбора комаров комплекса *maculipennis* в Закавказье

	Номер на рисунке 3.1.7
Грузия	
Лагодехский район окрестности сел Ульяновка и Неретискари	1
Сигнагского район окрестности села Ерисимеди	2
Марнеульский район окрестности сел Кулари и Амбаровка	3
Гардабанский район село Тбилскаро	4
Гардабанский район озеро Джандара	5
Озургетский район село Мерия	6
город Поти	7
город Хоби	8
город Батуми	9
город Кобулет	10
Азербайджан	
Шекинский район село Бабаратма	11
Бардинский район окрестности сел Зюмюрхач и Айриджа	12
Геокчайскогокий район окрестности села Маллышихлы	13
Бейлаганский район окрестности села Эйвазальпар	14
район Агджабеди село Агджабеди	15
район Агджабеди село Агабейли	16
район Физули село Боюкбахманлы	17
район Имишли село Гулубейлы	18
район Ках село Чодулли	19
город Мингечаур	20
район Уджар, село Кучакенд	21
Хачмасский район село Низовая	22
район Дивичи село Агали	23
Сабир-абадск село район село Мюрсалли	24
Масалинский район село Тазакенд	25
Астаринский район село Пенсар	26
район Ахсу село Дашдемирбейли	27
район Саатлы село Алисултанлы	28
район Билясувар село Нариманкенд	29
район Лерик село Джанга-Миран	30
Ленкоранский район село Герматук	31
Армения	
Арагатской марз Арташатский район село Овташен	32
Арагатский марз Массиский район село Масис	33
Арагатский марз Вединский район село Таперекан	34
Арагатск марз Вединский район село Таперекан	35
Котайск марз г. Арзни	36
Котайский марз Абовянский район село Акунк	37
Армавирский марз Эчмиадзинский район село Грибоедово	38
Армавирский марз город Армавир	39
Араготский марз село Агарак	40

Приложение В Места (точки) сбора комаров *An. messeae s.l.* в России

Место сбора	GenBank ID области ITS2
Московская область, Солнечногорский район, село Тимоново	AM409797–AM409799
Пензенская область, Пензенский район, село Большая Елань	AM409769
Ростовская область Аксайский район село Александровка	AM409770–AM409772
Ростовская область город Аксай, Мухина Балка	
Ростовская область Таганрогский район село Николаевка	
Краснодарский край Анапский район село Джигинка	AM409773
Краснодарский край Анапский район село Анапское	AM409774
Краснодарский край Анапский район Гостагаевское	
Волгоградская область Светлоярский район село Покровка	AM409789 (P1–P6 AM409790–AM409795)
Волгоградская область Среднеахтубинский район село Кировский	AM409796
Республика Калмыкия город Цаган-Аман	AM409762, AM409763, AM409764, FN646211, FN646212, AM409765, AM409766, AM409767, AM409768
Астраханская область Икрянининский р-н протока Хурдун	AM409782, AM409783
Астраханская область село Бирючья Коса	AM409784, AM409785 (B1–B3 _AM409786–AM409788_)
Томская область город Тегульдет	AM409775, AM409776

Приложение Г. Полиморфные сайты ITS2 *An. messeae*

варианты	100	104	110	161	165	167	170	191	192	228	235	263	267	327	362	363	367	382	403	406	414
11s2	c	c	a	t	t	c	g	t	a	g	a	c	t	t	a	t	a	c	a	a	a
11s5	-	-	-	a	t	c	-	-	-	-	-	-	-	-	a	-	-	c	-	-	-
1s3	-	-	-	a	a	t	-	-	-	-	-	-	-	-	a	-	-	c	-	-	-
2p13	-	-	-	t	t	c	-	-	-	-	-	-	-	-	a	-	-	c	-	-	-
2p14	-	-	-	a	t	c	-	-	-	-	-	-	-	-	a	-	-	c	-	-	-
8Sr1,2	-	-	-	a	a	t	-	-	-	-	-	-	-	-	g	-	-	g	-	-	-
8Sr3	-	-	-	a	a	t	-	-	-	-	-	-	-	-	g	-	g	g	-	-	-
8Sr4	a	a	-	t	t	c	-	-	-	-	-	-	-	-	g	-	-	g	-	-	-
8Sr5,6	-	-	-	t	t	c	-	-	-	-	-	-	-	-	g	-	-	g	-	-	-
2Sr14	-	-	-	t	t	c	-	-	-	-	-	-	-	-	a	-	-	c	-	-	-
2Sr15	-	-	-	a	a	t	-	-	-	-	-	-	-	-	a	-	-	c	-	-	-
3Sr3	-	-	-	t	t	c	-	-	-	-	-	-	-	-	a	-	-	c	-	-	-
3Sr4	-	-	-	a	t	c	-	-	-	-	-	-	-	-	a	-	-	c	-	-	-
3k2	-	-	-	t	t	c	-	-	-	-	-	-	-	-	a	-	-	c	-	-	-
3k4	-	-	-	a	t	c	-	-	-	-	-	-	-	-	a	-	-	c	-	-	-
5k2	-	-	-	a	a	t	-	-	-	-	-	-	-	-	g	-	-	c	-	-	-
5k6	-	-	-	t	t	c	-	-	-	-	-	-	-	-	a	-	-	c	-	-	-
2b17	-	-	-	a	t	c	-	-	-	-	-	-	-	-	a	-	-	c	-	-	-
2b19	-	-	-	t	t	c	-	-	-	-	-	-	-	-	g	-	-	g	-	-	g
6b1	-	-	c	a	a	t	-	-	-	-	g	-	-	-	a	-	-	c	-	-	-
6b2	-	-	-	a	t	c	-	-	-	-	-	-	-	-	g	-	-	g	-	-	-
6b3	-	-	-	t	t	c	-	-	-	a	-	-	-	c	g	-	-	g	-	-	-
6bi3	-	-	-	a	a	t	-	-	-	-	-	-	c	-	a	-	-	c	-	-	-
6bi4	-	-	-	t	t	c	-	-	-	-	-	-	-	-	a	-	-	c	-	-	-
3A9	-	-	-	a	a	t	c	-	-	-	-	-	-	-	a	-	-	c	-	-	-
5a1	-	-	-	a	a	t	-	-	-	-	-	-	-	-	a	-	-	c	-	-	-
5a2	a	-	-	t	t	c	-	-	-	-	-	-	-	-	g	-	-	g	-	-	-
6a30	a	-	-	t	t	c	-	-	-	-	-	t	-	-	g	-	-	g	c	-	-
6a31	-	-	-	a	a	t	-	-	-	-	-	-	-	-	a	a	-	c	-	-	-

Примечание. Клоны от разных особей разделены линиями. 11s 2,5; 1s3 – варианты, полученные от особей из Московской обл., 2p13, 2p14 - от особи из Пензенской обл., 8Sr1-6; 2Sr14,15; 3Sr3,4 - от особей из Волгоградской обл., 3k2, 4; 5k2,6 – из Калмыкии, 2b17,19; 6b1-4; 6bi3,4– из Астраханской обл., 3A9; 5a1,2; 6a30,31 – из Краснодарского края.

Приложение Д. Попарные оценки F_{ST} между популяциями *H. axyridis*

Популяция	N- China1	N- China2	N- China3	N- Japan1	N- Japan2	N- Korea	N- Russia1	N- Russia2	N- Kazak	EB- INRA87	EB- INRA06	EB- Koppert	EB- Biobest	EB- Biotop	UB- US	I- ENA	I- WNA	I- EU	I- SA
N-China2	0.010																		
N-China3	0.009	0.002																	
N-Japan1	0.007	0.000	0.005																
N-Japan2	0.007	0.006	0.004	0.002															
N-Korea	0.018	0.008	0.012	0.005	0.008														
N-Russia1	0.033	0.021	0.021	0.020	0.019	0.015													
N-Russia2	0.035	0.027	0.027	0.026	0.023	0.022	-0.006												
N-Kazak	0.024	0.015	0.013	0.015	0.012	0.014	0.004	0.003											
EB- INRA87	0.179	0.149	0.165	0.164	0.161	0.157	0.178	0.174	0.182										
EB- INRA06	0.261	0.216	0.240	0.225	0.231	0.230	0.262	0.277	0.271	0.231									
EB- Koppert	0.211	0.168	0.182	0.176	0.182	0.181	0.202	0.213	0.208	0.140	0.174								
EB-Biobest	0.319	0.305	0.309	0.308	0.318	0.319	0.313	0.312	0.325	0.243	0.381	0.312							
EB-Biotop	0.233	0.190	0.196	0.203	0.214	0.205	0.226	0.235	0.224	0.165	0.218	0.062	0.332						
UB-US	0.029	0.031	0.017	0.031	0.033	0.050	0.063	0.067	0.053	0.179	0.301	0.205	0.294	0.204					
I-ENA	0.029	0.017	0.012	0.016	0.022	0.034	0.036	0.041	0.028	0.188	0.255	0.207	0.335	0.224	0.048				
I-WNA	0.026	0.008	0.009	0.011	0.016	0.019	0.030	0.038	0.019	0.184	0.239	0.197	0.325	0.206	0.047	0.023			
I-EU	0.061	0.043	0.046	0.048	0.049	0.055	0.069	0.080	0.069	0.111	0.158	0.070	0.231	0.120	0.068	0.059	0.064		
I-SA	0.114	0.096	0.097	0.097	0.101	0.103	0.122	0.143	0.116	0.279	0.312	0.248	0.418	0.281	0.170	0.064	0.107	0.109	
I-AF	0.039	0.032	0.030	0.034	0.042	0.030	0.031	0.041	0.034	0.188	0.286	0.209	0.337	0.221	0.065	0.023	0.037	0.066	0.089

Примечание: Значения F_{ST} , выделенные жирным шрифтом, соответствуют выводу об отсутствии достоверных различий между выборками на основании оценки по точному тесту Фишера с коррекцией на множественные сравнения.