

## ГЕОГРАФИЧЕСКАЯ ИЗМЕНЧИВОСТЬ ITS2 рДНК и COI мтДНК И КРИПТИЧЕСКИЕ ВИДЫ МАЛЯРИЙНОГО КОМАРА *ANOPHELES MESSEAE* Fall. (DIPTERA: CULICIDAE)

О.В. Ваулин<sup>1</sup>, Ю.М. Новиков<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Учреждение Российской академии наук Институт цитологии и генетики  
Сибирского отделения РАН, Новосибирск, Россия,  
e-mail: Oleg.v.vaulin@mail.ru;

<sup>2</sup> Томский государственный университет, Томск, Россия, e-mail: novikov@bio.tsu.ru

Для *Anopheles messeae s.l.* проведен анализ 224 последовательностей второго транскрибируемого спейсера (ITS2) рДНК и 56 – 1-й субъединицы цитохромоксидазы мтДНК (COI) из базы данных ДНК DDBJ, а также 5 последовательностей ITS2, полученных авторами. Среди всего массива последовательностей ITS2 установлено присутствие двух основных паттернов, соответствующих криптическим видам А и В *Anopheles messeae* Fall., ранее выделенных по другим маркерам. Экологический и географический аспекты изменчивости ITS2 обусловлены географическим распространением *An. messeae*-А и *An. messeae*-В. Ограниченная представленность последовательностей COI не позволила выявить какой-либо географической закономерности в ее изменчивости и сделать вывод о ее диагностической значимости.

**Ключевые слова:** *Anopheles messeae*, криптические виды, ITS2, COI, молекулярные маркеры.

### Введение

Видовая диагностика, установление степени родства и дивергенции близких видов являются первостепенными задачами эволюционной систематики и филогенетики. Решение этих задач затруднительно в отношении видов-двойников. Довольно часто виды-сиблинги и, в частности криптические (скрытые) виды, обнаруживают в родах отряда Diptera: *Drosophila*, *Chironomus*, *Culex*, *Aedes* и *Anopheles* (White, 1978; Coluzzi *et al.*, 1985; Besansky, 1999). Их диагностика и оценка филогенетических связей между ними стали возможными с введением методов цитогенетического и/или молекулярно-генетического анализа. В отношении криптических видов приемлем только второй подход – вследствие их гомосеквентности. Из-за различий свойств и уровней изменчивости молекулярно-генетических маркеров не каждый из них может стать надежным диагностическим критерием в каком-либо конкретном случае. Эпидемиологическая значимость, различие между видами

по способности к передаче малярии и наличие криптических видов придают проблеме поиска молекулярно-генетических критериев вида для *Anopheles* еще большую актуальность. Наряду с этим генетические исследования малярийных комаров позволяют выявить механизмы адаптации их популяций и очень ценны для разработки методов контроля численности переносчиков заболевания. На территории России эпидемиологически наиболее опасны виды комаров комплекса *Anopheles maculipennis*. К началу 1990-х годов цитогенетические исследования комплекса *maculipennis* позволили выявить и описать 9 палеоарктических видов этой группы (Стегний, 1991). Особое положение в комплексе занимает таксон *An. messeae*, ареал которого простирается от Британских островов до Зейско-Буреинской низменности и от Северного полярного круга до Ирана и Северного Китая (Беклемишев, Желоховцев, 1945). В природных популяциях малярийного комара *An. messeae* широко распространены 5 парацентрических инверсий, локализованных в хромосомных эле-

ментах 1L (две инверсии), 2R, 3R и 3L (Кабанова и др., 1972; Стегний и др., 1976). Все эти 5 инверсий встречаются в виде как гетерозигот, так и гомозигот: 1L (плечо хромосомы X) у самок – 3 гомозиготных и 3 гетерозиготных варианта, у самцов – 3 гомозиготных варианта; 2R, 3R и 3L у особей обоих полов – по 2 гомозиготных и по 1 гетерозиготному варианту. Выявлена сезонная динамика инверсий, свидетельствующая в пользу адаптивности инверсионного полиморфизма (Кабанова и др., 1973; Плешкова и др., 1978).

Инверсии являются надежными маркерами в популяционно-цитогенетических исследованиях. Особенности популяций *An. messeae* являются отсутствие равновесия Харди–Вайнберга и неравновесие по сцеплению разных инверсий (Новиков, Кабанова, 1976, 1979). Оказалось, что две группы классов инверсионных вариантов хромосом встречаются в кариотипах особей совместно чаще, чем следовало бы ожидать при условии их случайного комбинирования. Также показано, что неравновесие популяций обусловлено гомогамным ассортативным скрещиванием (Новиков, 1980). Несмотря на выявленную репродуктивную изоляцию, в упомянутых работах неравновесие по сцеплению было интерпретировано как «адаптивный полиморфизм высокого уровня». Однако расширение работ и исследование экологии таксона побудили к пересмотру ситуации. В результате была выдвинута идея о том, что таксон *An. messeae* содержит два гомосеквентных биологических вида, условно названных А и В, которые имеют специфичные ареалы, обширную зону симпатрии и параллельные инверсионные полиморфизмы (Новиков, 1984а, б). Другие авторы, повторяя исследование сочетаний инверсий в кариофондах природных популяций, остались на позиции единства *An. messeae* как вида (Стегний, 1991).

В подобных ситуациях решению проблемы может способствовать применение молекулярно-генетических методов. Одним из путей ее решения является таксонопинт – вариант метода RFLP (полиморфизм длин рестриционных фрагментов), модифицированный для анализа электрофоретических фракций высокоповторенных нуклеотидных последовательностей. В связи с выраженным внутривидовым мономорфизмом и возможностью выявления межвидовых различий таксонопинт признан

высоконадежным методом при решении вопроса о придании группе видового статуса (Гречко и др., 1997, 1998). В результате электрофореза продуктов гидролиза рестриктазой *EcoRI* тотальной ДНК, выделенной из *An. messeae* сибирских популяций, внутри таксона установлено присутствие двух дискретных группировок, в высокой степени соответствующих формам А и В, выделенным ранее на основе популяционно-цитогенетического анализа (рис. 1) (Новиков, Шевченко, 2001). Таким образом, предположение о существовании внутри таксона *An. messeae* (далее – *An. messeae s.l.*) двух криптических видов, основанное на экологических и цитогенетических данных, получило подтверждение и на молекулярно-генетическом уровне. Вследствие полного сходства морфологии имаго рисунка политенных хромосом и высокой степени перекрытия инверсионных полиморфизмов формального описания видов до сих пор сделано не было.

Таксонопинт – относительно сложная и дорогостоящая методика, поэтому в эволюционной генетике нашли более широкое применение другие методы и ДНК-маркеры (Банникова, 2004). Дискретность различий между видами и отсутствие внутривидового полиморфизма характерны не только для коротких высокоповторенных последовательностей, выявляемых таксонопинтом, но и для умеренных повторов, в частности для генов рибосомальной РНК (Hillis *et al.*, 1991). Следовательно, ITS2 рДНК может быть приемлемым генетическим маркером для установления филогенетических связей между близкими видами. В результате исследования ITS2 видов А и В *An. messeae s.l.* установлено, что они отличаются между собой нуклеотидными заменами в пяти позициях последовательности, причем у А-вида в минорной фракции повторов выявлено присутствие нуклеотидных замен, характерных для В-вида (Ваулин и др., 2004; Шевченко, Новиков, 2004).

На основании исследования изменчивости ITS2 в популяциях палеоарктической ветви комплекса *An. maculipennis* Ирана и Румынии были выделены два новых вида – *An. persiensis* (Sedaghat *et al.*, 2003) и *An. daciae* (Nicolescu *et al.*, 2004). *An. persiensis* стал первым видом кулицид, описанным только на основании нуклеотидной последовательности ITS2. *An. daciae*

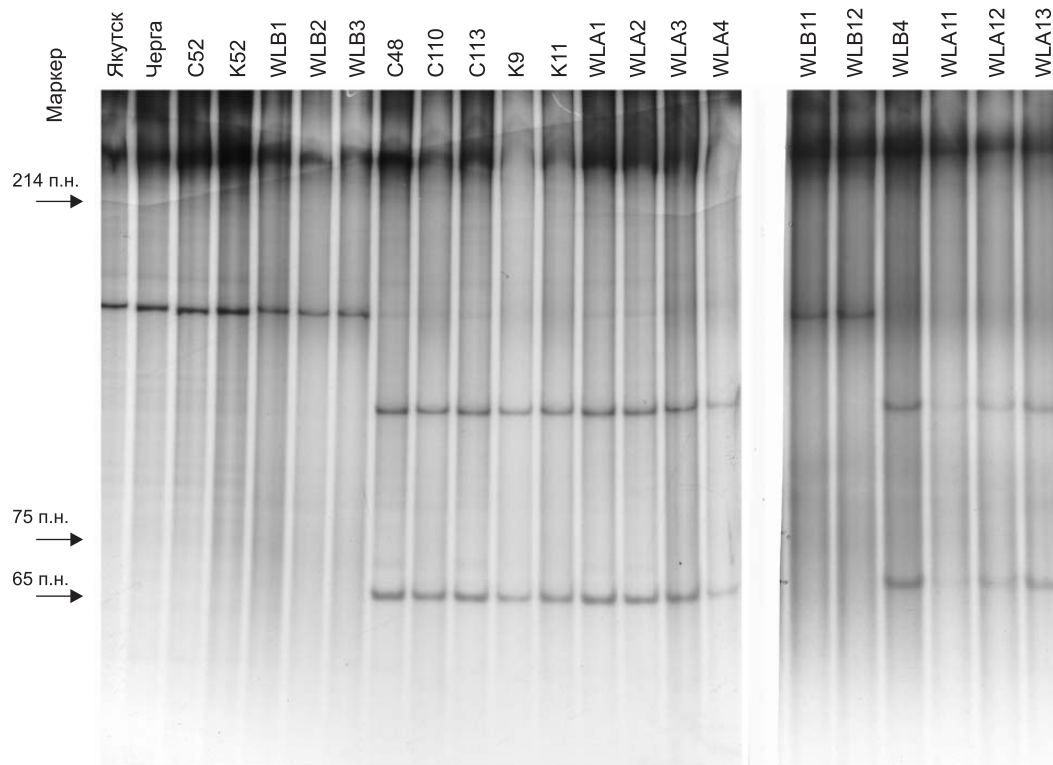


Рис. 1. Дивергенция криптических форм *An. messeae* на уровне высококопийных повторов.

А – дорожки 8–16, 19–22; В – 1–7, 17, 18 (по: Новиков, Шевченко, 2001).

описан по морфологическим особенностям яиц и на основе специфичности последовательности нуклеотидов ITS2 и отчасти COI. В Румынии он симпатричен с *An. messeae* и, по мнению авторов, отличается от него по обоим ДНК-маркерам. Широкая изменчивость, присущая морфологии яиц обоих криптических видов *An. messeae s.l.*, отсутствие между ними по этому признаку хиатуса и неубедительность иллюстраций морфологических особенностей яиц *An. daciae* позволяют сомневаться в наличии хиатуса по этому признаку между *An. messeae* и *An. daciae*.

Цель настоящей работы – изучить географическую изменчивость образцов ITS2 рДНК и COI мтДНК и на основе полученных результатов обсудить дивергенцию криптических видов *An. messeae s.l.* и проблему их связи с *An. daciae*.

### Материалы и методы

Материалом для анализа географической изменчивости ядерной последовательности ITS2 рДНК (435 п.н.) и фрагмента митохондриального

гена COI (512 п.н.), кодирующего субъединицу I цитохромоксидазы, служили 224 последовательности ITS2 и 56 последовательностей COI, представляющих популяции значительной части ареалов *An. messeae* и *An. daciae*, полученные из базы данных ДНК DDBJ (<http://www.ddbj.nig.ac.jp/>), а также последовательностей ITS2, описанных нами ранее (Ваулин и др., 2004; Шевченко, Новиков, 2004).

Выбор названных нуклеотидных последовательностей в качестве маркерных обусловлен следующими причинами: 1) выявленным ранее различием видов *An. messeae s.l.* по ITS2; 2) приемлемостью митохондриальных генов для филогенетических построений вследствие ограниченности их рекомбинации; 3) широкой представленностью нуклеотидных последовательностей ITS2 и COI в генетических базах данных; 4) возможностью исследовать пригодность ДНК-маркеров ITS2 рДНК и COI мтДНК в качестве молекулярно-генетических критериев вида на такой модельной системе, как криптические виды *An. messeae*-А и *An. messeae*-В,

между которыми на уровне высокоповторенных последовательностей и экологии наличие хиа-туса убедительно продемонстрировано.

Номера образцов из базы DDBJ, географическая локализация популяций, служивших источниками последовательностей ITS2 и COI, а также сокращенные названия географических локальностей приведены в табл. 1–3.

Для нуклеотидных позиций, обозначенных в базе данных 15-буквенным кодом, нами принят вариант прочтения нуклеотида, соответствующий уже описанным последовательностям *An. messeae*. Повторимся, что для вида *An. messeae*-А выявлено присутствие в ITS2 минорного варианта последовательности, характерной для вида *An. messeae*-В (Шевченко, Новиков, 2004). Поэтому в случае если 15-буквенным кодом обозначены позиции, различающие эти два вида, то мы принимали вариант прочтения нуклеотидов, соответствующий виду *An. messeae*-А.

Поскольку стандартные пакеты программ (PHYLIP, MEGA), позволяющие оценить родственные связи между сопоставляемыми группами, в случае повторного мутирования могут давать не вполне адекватную картину ветвления, то в данной работе мы использовали программу для построения медианных сетей NETWORK 4.5.1.6. (Bandelt *et al.*, 1999; <http://www.fluxus-technology.com/>), отображающую неоднозначности построений.

Для ПЦР-RFLP ITS2 ДНК выделяли из личинок комаров IV возраста, фиксированных в 96 %-м этиловом спирте, индивидуально по стандартной методике (Bender *et al.*, 1983). ПЦР проводили по протоколу (Beebe, Saul, 1995). Использовали праймеры 5'-TGTGAACTGCAGGACACAT-3' и 5'-TATGCTTAAATTCAGGGGT-3'. Реакционная смесь объемом 25 мкл содержала 1xPCR-buffer (16 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 67 mM трисHCl (pH 8,8 при 25 °C), 0,1 % Tween-20), 4mM MgCl<sub>2</sub>, 0,32 mM каждого dNTP, 1 mM праймер, 2,5 ед. Taq-полимеразы; для ISSR-PCR – 1xPCR-buffer, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,25 mM каждого dNTP, 1 mM каждого праймера, 1 ед. Taq-полимеразы. ПЦР проводили при следующих температурных условиях: денатурация при 94 °C – 1 мин, отжиг при 51 °C – 1 мин, полимеризация при 72 °C – 1 мин; 35 циклов, в последнем цикле стадия полимеризации продолжалась 5 мин при 72 °C.

4 мкл полученного ПЦР-продукта обрабатывали рестриктазой *BstF5I*, которая (в соответствии с данными секвенирования) разрезает ПЦР-продукт ITS2 (435 п.н.) *An. messeae*-А на 2 части длиной 159 и 276 п.н. и не изменяет ПЦР-продукт ITS2 *An. messeae* В. Полученные продукты рестрикции разделяли в 2 %-м агарозном геле, окрашенном бромистым этидием. Электрофореграммы фотографировали в ультрафиолетовом свете.

## Результаты

Наше исследование было выполнено в трех направлениях: 1) проведено сравнение паттерна сиквенса ITS2, установленного для *An. daciae* и определенных ранее нами для обоих криптических видов *An. messeae s.l.* (Ваулин и др., 2004; Шевченко, Новиков, 2004); 2) построены медианные сети по совокупности представленных в таблице последовательностей ДНК ITS2 и COI из базы данных DDBJ; 3) проведен анализ спектра продуктов рестрикции ITS2 рестриктазой *BstF5I*, узнающей нуклеотидные сайты, по которым различаются виды, для смешанной группы особей криптических видов *An. messeae s.l.*

Сразу же следует отметить, что так как выделение вида *An. daciae* произошло позднее, чем в базе данных начали накапливаться ITS2- и COI-последовательности малярийных комаров, то часть образцов с набором замен в ITS2, характерным для *An. daciae*, описана как *An. messeae*.

Нами проведено сравнение нуклеотидных последовательностей ITS2, описанных в базе данных ДНК как относящихся к *An. daciae* и *An. messeae*, с установленными нами ранее паттернами последовательностей видов *An. messeae*-А и *An. messeae*-В. Выявлено совпадение нуклеотидных последовательностей *An. daciae* и *An. messeae*-А, что позволяет отождествить эти два вида. Так же выявлено совпадение части нуклеотидных последовательностей *An. messeae* из базы данных и *An. messeae*-В.

Система ветвления, построенная по образцам ITS2, идентифицируемым их авторами как принадлежащие видам *An. daciae* и *An. messeae*, и представленная на рис. 2, наглядно демонстрирует кластеризацию большей части из 224 нуклеотидных последовательностей, привлеченных из базы данных, в две группы А и В

Таблица 1

Номера последовательностей ITS2 из базы данных ДНК, использованных в работе,  
с указанием географического происхождения

Географическая локальность	Обозначение локальности	Номера образцов в базе DDBJ
Великобритания	UK	AF452699, AF452700, AF504196, AF504197, AF504198, AF504199, AF504200, AF504201, AF504202, AF504203, AF504204, AF504205, AF504206, AF504207, AF504208, AF504209, AF504210, AF504211, AF504212, AF504213, AF504214, AF504215, AF504216, AF504217, AF504218, AF504219, AF504220, AF504221, AF504222, AF504223, AF504224, AF504225, AF504226, AF504227, AF504228, AF504229, AF504230, AF504231, AF504232, AF504233, AF504234, AF504235, AF504236, AY238412, EF090198, EF090199, EF090200, EF090201, AY822585, AY822586, AY822588, AY822589, AY822587, EF090193
Нидерланды	Ne	AY238413
Швеция	Sw	EF090194, EF090195, EF090196
Италия	It	Z50105, AY238414, AY238415, AY238416, AY238417, AY238418, AY238419
Греция	Gr	AF342711, AF342712
Черногория	MN	AY238420, AY238421
Румыния	Ro	AY634406, AY634407, AY634408, AY634409, AY634410, AY634411, AY634412, AY634413, AY634414, AY634415, AY634416, AY634417, AY634418, AY634419, AY634420, AY634421, AY634422, AY634423, AY634424, AY634425, AY634426, AY634427, AY634428, AY634429, AY634430, AY634431, AY634432, AY634433, AY634434, AY634435, AY634436, AY634437, AY634438, AY634439, AY634440, AY634441, AY634442, AY634443, AY634444, AY634445, AY634446, AY634447, AY634448, AY634449, AY634450, AY634451, AY634452, AY634453, AY634454, AY634455, AY634456, AY634457, AY634458, AY634459, AY634460, AY634461, AY634462, AY634463, AY634464, AY634465, AY634466, AY634467, AY634468, AY634469, AY634483, AY634484, AY634485, AY634486, AY634487, AY634488, AY634489, AY634490, AY634491, AY634492, AY634493, AY634494, AY634495, AY634496, AY634497, AY634498, AY634499, AY634500, AY634502, AY634501, AY634503, AY634470, AY634471, AY634472, AY634473, AY634474, AY634475, AY634476, AY634477, AY634478, AY634479, AY634480, AY634481, AY634482, AY648982, AY648983, AY648984, AY648985, AY648986, AY648987, AY648988, AY648989, AY648990, AY648991, AY648992, AY648993, AY648994, AY648995, AY648996, AY648997, AY648998, EF090197
Россия, Московская область	RuM	AM409797, AM409798, AM409799
Россия, Пензенская область	RuP	AM409769
Россия, Ростовская область	RuR	AM409770, AM409771, AM409772
Россия, Волгоградская область	RuV	AM409789, AM409790, AM409791, AM409792, AM409793, AM409794, AM409795, AM409796
Россия, Краснодарский край	RuKr	AM409773, AM409774

## Окончание таблицы 1

Географическая локальность	Обозначение локальности	Номера образцов в базе DDBJ
Россия, Калмыкия	RuKl	AM409762, AM409763, AM409764, AM409765, AM409766, AM409767, AM409768
Россия, Астраханская область	RuA	AM409782, AM409783, AM409784, AM409785, AM409786, AM409787, AM409788
Россия, Томская область, пос. Тегульдет	RuTT	AM409775, AM409776
Россия, Иркутск	RuI	AJ555482
Иран	Ir	AY050639
Казахстан, Алматы	KzA	AJ783400
Казахстан, Павлодар	KzPa	AY238422
Китай, Синьцзян	ChS	AF305556
Без указания	An	AY365011

## Таблица 2

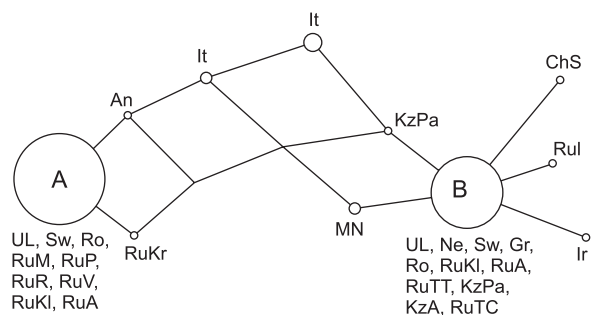
Названия последовательностей ITS2 с указанием их географического происхождения (Новиков и др., 2004)

Географическая локальность	Обозначение локальности	Номера образцов в коллекции
Россия, Томская область, пос. Киреевск	RuTK	ITS2-K11
Россия, Томская область, пос. Чернильшиково	RuTC	ITS2-C52, ITS2-C110
Россия, Якутск	RuYa	ITS2-Ya
Казахстан, Павлодар	KzPa	ITS2-P

## Таблица 3

Номера последовательностей COI, взятых из базы данных ДНК, с указанием их географического происхождения

Географическая локальность	Обозначение локальности	Номера образцов в базе DDBJ
Великобритания	UK	AY258175, AY258176, AY258177
Италия	It	AY258169, AY258170, AY258171, AY258172, AY258173, AY258174, AY258183, AY258184, AY258185, AY258186, AY258187
Греция	Gr	AF342723, AF342724
Черногория	MN	AY258178, AY258179, AY258180, AY258188, AY258189
Казахстан, г. Павлодар	KzPa	AY258181, AY258182
Румыния	Ro	AY757922, AY757923, AY757924, AY757925, AY757926, AY757927, AY757928, AY757929, AY757930, AY757931, AY757932, AY757933, AY757934, AY757935, AY757936, AY757937, AY757938, AY757939, AY757940, AY757941, AY757942, AY757943, AY757944, AY757945, AY757946, AY757947, AY757948, AY757949, AY757950, AY757951, AY757952, AY757953, AY757954



**Рис. 2.** Медианная сеть по ITS2, построенная с помощью программы NETWORK.

A и B – группы, совпадающие по набору замен с видами A и B *Anopheles messeae s.l.* Краткие обозначения локальностей, для которых были получены данные, приведены в табл. 1 и 2. Длины ветвей пропорциональны числу произошедших замен.

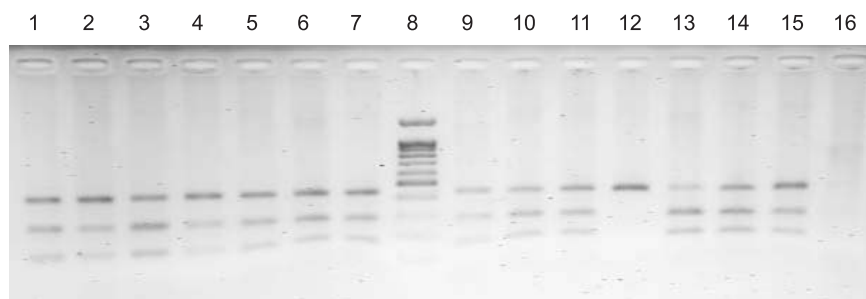
соответственно. Паттерну нуклеотидных замен *An. messeae-A* (*An. daciae*) соответствует 125 образцов, *An. messeae-B* – 78 образцов. Если к этим группам отнести и последовательности, производные по отношению к основным (т. е. не являющиеся промежуточными и отличающиеся на несколько замен от основных вариантов), то к первой группе будет отнесено также 125, а ко второй – 81 образец. 11 образцов и 6 вариантов последовательности ITS2 заняли промежуточное положение между двумя большими группами. Таким образом, среди образцов, представленных в базе данных, доминируют паттерны ITS2 A- и B-видов *An. messeae s.l.* Характер географической представленности паттернов позволяет предполагать, что ареалы видов перекрываются еще в большей степени, чем считалось ранее (Новиков, Шевченко, 2001): виды симпатричны на территории от Великобритании до Румынии

и Поволжья, а также на юге Западной Сибири. По-видимому, к этой же зоне симпатрии относится и территория между Поволжьем и Западной Сибирью, однако нуклеотидные последовательности из популяций *An. messeae s.l.*, обитающих на этой территории, в базе данных отсутствуют. На основании общей картины географического распространения паттернов складывается впечатление, что *An. messeae-B* имеет ареал, значительно превышающий ареал *An. messeae-A*, поскольку варианты последовательностей, близкие к характерному для первого вида, выявлены на юге и востоке ареала таксона *An. messeae s.l.* (Греция, Иран, Предбайкалье, Северо-Западный Китай) (последовательности в базе данных: AF342711, AF342712, AY050639, AJ555482, AF305556).

Возможно, присутствие у особей из восточноевропейских и, в частности, румынских популяций паттерна ITS2 *An. messeae-B* объясняется тем, что при анализе картин секвенирования у части особей учтены замены, характерные для минорной фракции повторов ITS2 *An. messeae-A*, которая, как уже мы отметили выше, имеет нуклеотидные замены, характерные для *An. messeae-B*.

Ранее нами был проведен теоретический поиск рестриктаз, узнающих нуклеотидные сайты, различные в ITS2 у двух рассматриваемых нами видов (Новиков и др., 2004). В настоящей работе проведен анализ продуктов рестрикции ITS2 рестриктазой *BstF51* на совокупности, включающей особей как *An. messeae-A*, так и *An. messeae-B*.

Продукты рестрикции, представленные на рис. 3, указывают на то, что, несмотря на полуколичественность различий между видами (не-



**Рис. 3.** Продукты рестрикции ферментом *BstF51* ПЦР-продукта ITS2 образцов *An. messeae s.l.*

Дорожки 1–7, 9–11, 13–15 – *An. messeae-A*; дорожка 12 – *An. messeae-B*; дорожка 8 – маркер молекулярных масс 100 bp +1,5; дорожка 16 – негативный контроль. Рестрикционный анализ проводился совместно с М.А. Сорокиным, студентом Томского университета.

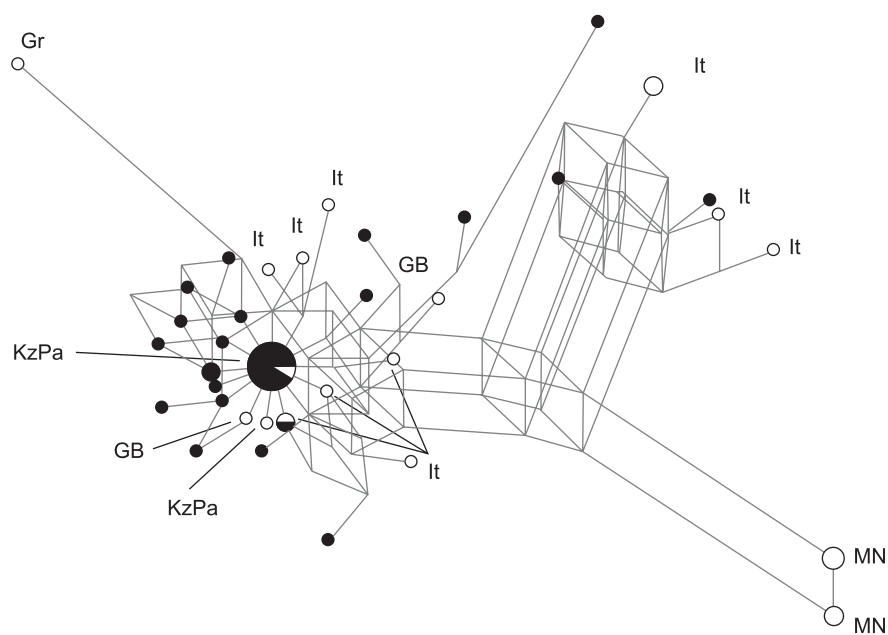
полная рестрикция у образцов *An. messeae*-A), различия между видами А и В не носят непрерывного характера. *An. messeae*-В при этом не обладает характерными для *An. messeae*-А нуклеотидными заменами в диагностических позициях. Таким образом, на уровне ITS2 для криптических видов также существует хиатус, хотя его четкость несколько снижается из-за присутствия промежуточных и производных вариантов паттернов сиквенсов.

Картина изменчивости популяций *An. messeae s.l.* по маркерной последовательности COI носит принципиально иной характер (рис. 4). Отметим отсутствие четкого разделения всей совокупности образцов на кластеры, как следовало бы ожидать при наличии продолжительной репродуктивной изоляции. Очевидным является преобладание одной гаплогруппы и ее ближайших производных вариантов, которые сгруппированы в левой части медианной сети. Это может быть объяснено спецификой географической представленности образцов в базе данных, а именно: 33 из 56 включенных в анализ последовательностей представлены *An. daciae* из Румынии. При этом к наиболее распространенному у *An. daciae* гаплотипу относятся 13 образцов, описанных как *An. daciae*, и образец *An. messeae s.l.* из Павлодара (Ка-

захстан). Следует отметить тот факт, что по результатам популяционно-цитогенетического исследования и с учетом экологической обстановки в окрестностях Павлодара *An. messeae*-А не встречается (Новиков, Шевченко, 2001). Отметим также, что хотя таксономический анализ особей из павлодарской популяции не проводили, тем не менее, паттерн нуклеотидных замен в ITS2 особей из популяции малярийных комаров Павлодара полностью соответствовал паттерну нуклеотидных замен *An. messeae*-В (Шевченко, Новиков, 2004). Отсутствие выраженного кластера, соответствующего *An. messeae*-В, может быть объяснено либо отсутствием или малой представленностью образцов маркерной последовательности COI данного вида в базе данных, либо перекрывающейся изменчивостью этой последовательности у обоих криптических видов.

### Обсуждение

Несмотря на большой объем информации в базе данных ДНК по изменчивости нуклеотидных последовательностей ITS2 и COI *An. messeae s.l.*, работ, посвященных анализу связей различных вариантов последовательностей с эколого-географическими условиями,



**Рис. 4.** Медианная сеть, построенная по COI.

Черным цветом обозначены образцы, определенные как *An. daciae* (Румыния); белым – остальные образцы *An. messeae s.l.* Сокращенные названия локальностей соответствуют обозначениям в табл. 3 и приведены только для образцов, не определенных как *An. daciae*.



ранее проведено не было. В большинстве работ обыкновенно ограничивались лишь констатацией факта обнаружения определенных видов комплекса *An. maculipennis* в изученном регионе или описанием вариантов нуклеотидных последовательностей, выявленных среди небольших выборок одной или нескольких локальностей (Marinucci *et al.*, 1999; Linton *et al.*, 2002; Di Luca *et al.*, 2004). Выделим работу О.В. Безжоновой и И.И. Горячевой (Bezzhonova, Goryacheva, 2008), в которой хотя и не было поставлено задачи исследования географической изменчивости маркера, тем не менее приведены результаты изучения изменчивости ITS2 внутри ряда географически удаленных популяций *An. messeae s.l.* Авторы показали, что для *An. messeae s.l.* характерен определенный полиморфизм по ITS2, выражающийся в наличии ряда различающихся вариантов этого умеренного повтора. Ими упомянуты 5 нуклеотидных замен, приводящих к двум паттернам нуклеотидных последовательностей ITS2, которые были описаны нами раньше (Ваулин и др., 2004; Шевченко, Новиков, 2004). О.В. Безжоновой и И.И. Горячевой было проведено клонирование участков ITS2. Последующее секвенирование вскрыло большую изменчивость этого участка в пределах геномов отдельных особей. Так, для ряда образцов по результатам секвенирования ПЦР-продукта ITS2 (полученного с тотальной ДНК), имеющих паттерн диагностических позиций, характерный для *An. messeae-A*, отмечены клонированные варианты как с паттерном, характерным для *An. messeae-B*, так и с ранее не описанными наборами замен. Часть образцов несла паттерн диагностических позиций, характерный только для *An. messeae-B*. На основании существенного разнообразия последовательности ITS2, выявленного по описанной методике даже у отдельных особей, авторы сделали вывод о необоснованности выделения вида *An. daciae*. Мы склонны поддержать это мнение авторов, однако не считаем основным аргументом выявленный факт внутригеномного полиморфизма. Обоснованности выделения вида *An. daciae* противоречит его вполне очевидная конспецифичность с *An. messeae-A*, а именно этот из криптопических видов и является собственно *An. messeae*, поскольку Д. Фаллерони (Falleroni, 1926) описал вид по особям *Anopheles* из Италии, где судя

по цитогенетической структуре популяций, а также экологическим особенностям региона, обитает только *An. messeae-A*. На медианной сети (рис. 2) образцы из Италии занимают промежуточное положение между характерными для видов паттернами, по-видимому, в связи с неоднозначностью прочтения нуклеотидной последовательности.

Предметом отдельного обсуждения является изменчивость ДНК митохондриального гена COI. Для относительно давно разошедшихся видов можно было бы ожидать существенного расхождения по спектру замен в этом полиморфном гене. Однако данные, представленные на рис. 3, свидетельствуют о таком размахе изменчивости среди особей *An. daciae* из Румынии, который сравним с ее размахом среди всех изученных образцов.

В соответствии с представлениями об экологии *An. messeae-A*, с которым *An. daciae* конспецифичен, этот вид, преобладавая в западной и центральной Евразии (западной и центральной части ареала *An. messeae s.l.*), отсутствует в географических регионах, характеризующихся резко континентальным климатом: относительно более холодным или, наоборот, более жарким и сухим, с резкими перепадами температуры, где обитает *An. messeae-B*. В связи с этим следовало бы ожидать, что образцы из популяций, обитающих в локальностях «Павлодар (Казахстан)» и «Греция», продемонстрируют какой-то особый паттерн нуклеотидной последовательности COI, который был бы характерным для *An. messeae-B*. Однако образец из Павлодара относится к наиболее характерной для *An. daciae* гаплогруппе, тогда как вариант последовательности COI из Греции отличается от него менее, чем отдельные образцы *An. daciae* друг от друга. На наш взгляд, один из вариантов интерпретации полученного результата может заключаться в следующем: нуклеотидная последовательность митохондриального гена COI в процессе дивергенции видов оказалась нейтральной и предковую изменчивость сохранили оба криптопических вида. Второй вариант интерпретации полученной картины: все последовательности COI, представленные в базе данных, получены от особей из конспецифичных популяций, принадлежащих *An. messeae-A*, тогда как образец

из Павлодара является исключением, и этот факт нуждается в дальнейшем исследовании.

Результаты проведенного анализа позволяют дать оценку приемлемости маркерных последовательностей ITS2 рДНК и COI мтДНК для дискриминации криптических видов на адекватной модели – криптических видах *An. messeae*-А и *An. messeae*-В, выявленных иными методами, и пригодности названных маркеров в качестве молекулярно-генетических критериев вида. ДНК-маркер ITS2 может быть как вполне полноценным самостоятельным диагностическим признаком, что было проиллюстрировано при описании *An. persiensis* (Sedaghat *et al.*, 2003), так и вспомогательным, когда его используют в исследованиях высокополиморфных видов, таких, как *An. messeae*-А и *An. messeae*-В. Как мы продемонстрировали на большом числе последовательностей из базы данных ДНК, паттерны криптических видов выделяются (рис. 1), однако производные и промежуточные варианты последовательностей несколько размывают картину дифференциации. Еще более осложняют наблюдаемую картину возможные ошибки секвенирования и/или наличие нескольких вариантов «прочтения» нуклеотидных последовательностей. Вместе с тем при наличии других диагностических признаков ITS2 может быть серьезным аргументом в решении вопроса о принадлежности разных групп популяций к одному или разным видам в ситуациях, подобных той, в которой находится *An. messeae s.l.* (т. е. при малой степени межвидовой дифференциации). Так как два основных паттерна ITS2 соответствуют двум криптическим видам *An. messeae s.l.*, то картина географической изменчивости по ITS2 определяется распространением этих видов. Спектр сведений по последовательности COI, представленный в базе данных ДНК, пока ограничен главным образом западно- и центральноевропейскими регионами, что не позволяет судить о диагностических свойствах этой последовательности, равно как и не позволяет усмотреть какие-либо закономерности в ее географической изменчивости.

### Выводы

1. *An. messeae*-А и *An. daciae* конспецифичны, их имена – синонимы. Поскольку Д. Фал-

лерони (Falleroni, 1926) описал *An. messeae* по особям из итальянских популяций, т. е. региона, где обитает только *An. messeae*-А, постольку *An. messeae*-А, и только он, является *An. messeae*, и это имя имеет безусловный приоритет перед *An. daciae*.

2. При очевидной дискретности различий между *An. messeae*-А и *An. messeae*-В по высокоповторенным последовательностям и экологии довольно четкая картина дивергенции между ними по ДНК-маркеру ITS2 проявляется в виде разделения большого массива образцов на две группы, соответствующие двум основным паттернам нуклеотидных последовательностей, а также по спектрам продуктов рестрикции тотальной ДНК рестриктазами, узнающими видоспецифические сайты рестрикции, что свидетельствует о несомненной диагностической значимости маркера.

3. Относительно высокий полиморфизм последовательностей COI, а также их ограниченная географическая представленность в базе данных пока не позволяют оценить диагностическую роль этого ДНК-маркера.

Работа поддержана программой фундаментальных исследований Президиума РАН «Биологическое разнообразие» № 23.30.

### Литература

- Банникова А.А. Молекулярные маркеры и современная филогенетика млекопитающих // Журн. общ. биологии. 2004. Т. 65. № 4. С. 278–305.
- Беклемишев В.Н., Желоховцев А.Н. Ареалы некоторых видов *Anopheles* в СССР и причины, их обуславливающие // Бюл. МоИП, отд. биологии. 1945. Т. 50. № 1/2. С. 56–63.
- Ваулин О.В., Шевченко А.И., Новиков Ю.М. Изменчивость маркерных геномных последовательностей ITS2 и COI внутри комплекса *Anopheles maculipennis* (Diptera, Culicidae) // Генетика в XXI веке: современное состояние и перспективы развития. 3-й Съезд ВОГиС, Москва, 6–12 июня 2004. М.: Изд-во УРСС, 2004. С. 197.
- Гречко В.В., Рябинин Д.М., Федорова Л.В. и др. Молекулярно-генетическая классификация и филогенетическое родство некоторых видов ящериц сем. Lacertidae на основании изучения специфичности распределения сайтов рестрикции в повторах ДНК (таксонопринта) // Молекуляр. биология. 1998. Т. 32. № 1. С. 172–183.

- Гречко В.В., Федорова Л.В., Федоров А.Н. и др. Рестриктазное картирование высокоповторяющихся последовательностей ДНК и исследование генетического родства низших таксонов животных // Молекуляр. биология. 1997. Т. 31. № 2. С. 244–252.
- Кабанова В.М., Карташова Н.Н., Лужкова А.Г. Сезонная динамика инверсионного полиморфизма в природных популяциях малярийного комара *Anopheles messeae* (Diptera: Culicidae) // Генетика. 1973. Т. 9. № 10. С. 1247–1253.
- Кабанова В.М., Карташова Н.Н., Стегний В.Н. Кариологическое исследование природных популяций малярийного комара в Среднем Приобье. II. Хромосомный полиморфизм *Anopheles maculipennis messeae* // Цитология. 1972. Т. 14. № 8. С. 1027–1032.
- Новиков Ю.М. Взаимодействие инверсий в популяциях малярийного комара *Anopheles messeae* Fall., дифференциация его кариофонда и механизмы поддержания популяционно-генетического гомеостаза // Новые данные по кариосистематике двукрылых насекомых / Под ред. Л.А. Чубаревой: Тр. Зоол. ин-та АН СССР. Л., 1980. Т. 95. С. 40–49.
- Новиков Ю.М. Инверсионный полиморфизм и экологическая дивергенция *Anopheles messeae* (Diptera: Culicidae) // Экологическая генетика растений и животных: Тез. докл. Второй Всесоюз. конф. 29–31 октября 1984 г. Кишинев: Штиинца, Ин-т экол. генетики АН МССР, 1984а. С. 86–87.
- Новиков Ю.М. *Anopheles messeae* Fall. (Diptera: Culicidae) – два вида *in statu nascendi* // Макроэволюция: Матер. I Всесоюз. конф. по проблемам эволюции. М., 1984б. С. 13–14.
- Новиков Ю.М., Кабанова В.М. Взаимодействие инверсий в кариофонде природной популяции малярийного комара // Проблемы генетики и селекции в Западно-Сибирском регионе. Тюмень: Изд-во Тюменского гос. ун-та, 1976. С. 19–21.
- Новиков Ю.М., Кабанова В.М. Адаптивная ассоциация инверсий в природной популяции малярийного комара *Anopheles messeae* Fall. // Генетика. 1979. Т. 15. № 6. С. 1033–1045.
- Новиков Ю.М., Шевченко А.И. Инверсионный полиморфизм и дивергенция двух криптических форм таксона *Anopheles messeae* (Diptera, Culicidae) на уровне повторяющихся элементов геномной ДНК // Генетика. 2001. Т. 37. № 7. С. 915–925.
- Новиков Ю.М., Шевченко А.И., Ваулин О.В. О молекулярно-генетической дивергенции криптических видов таксона *Anopheles messeae* (Diptera: Culicidae) и филогении комплекса *maculipennis* // Вестн. Томского гос. ун-та. Приложение. Томский гос. ун-т. Томск, 2004. № 10. С. 69–77.
- Плешкова Г.Н., Стегний В.Н., Новиков Ю.М., Кабанова В.М. Инверсионный полиморфизм малярийного комара *Anopheles messeae*. Сообщение III. Временная динамика концентрации инверсий в популяции центра ареала // Генетика. 1978. Т. 14. № 12. С. 2169–2176.
- Стегний В.Н. Популяционная генетика и эволюция малярийных комаров. Томск: Изд-во ТГУ, 1991. 136 с.
- Стегний В.Н., Кабанова В.М., Новиков Ю.М., Плешкова Г.Н. Инверсионный полиморфизм малярийного комара *Anopheles messeae*. Сообщение I. Распространение инверсий по ареалу вида // Генетика. 1976. Т. 12. № 4. С. 47–55.
- Шевченко А.И., Новиков Ю.М. Криптические виды *Anopheles messeae* (Diptera, Culicidae): хиатус и связи на молекулярно-генетическом уровне // Генетика в XXI веке: современное состояние и перспективы развития. III ВОГиС, Москва, 6–12 июня 2004. М.: Изд-во УРСС, 2004. С. 230.
- Bandelt H.-J., Forster P., Rohlf A. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies // Mol. Biol. Evol. 1999. V. 16. № 1. P. 37–48.
- Beebe N.W., Saul A. Discrimination of all members of the *Anopheles punctulatus* complex by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism analysis // Am. J. Trop. Med. Hvg. 1995. V. 53. № 5. P. 478–481.
- Bender W., Spierer P., Hogness D.S., Chambon P. Chromosomal walking and jumping to isolate DNA from *Ace* and *rosy* loci of *bithorax* loci in *Drosophila melanogaster* // J. Mol. Biol. 1983. V. 168. № 1. P. 17–33.
- Besansky N.J. Complexities in the analysis of cryptic taxa within the genus *Anopheles* // Parasitologia. 1999. V. 41. № 1/3. P. 97–100.
- Bezzhonova O.V., Goryacheva I.I. Intragenomic Heterogeneity of rDNA Internal Transcribed Spacer 2 in *Anopheles messeae* (Diptera: Culicidae) // J. Med. Entomol. 2008. V. 45. № 3. P. 337–341.
- Di Luca M., Boccolini D., Marinucci M., Romi R. Intrapopulation polymorphism in *Anopheles messeae* (*An. maculipennis* complex) inferred by molecular analysis // J. Med. Entomol. 2004. V. 41. № 4. P. 582–586.
- Coluzzi M., Petrarca V., Di Deco M.A. Chromosomal inversion intergradation and incipient speciation in *Anopheles gambiae* // Bull. Zool. 1985. V. 52. № 1/2. P. 45–63.
- Falleroni D. Fauna anofelica italiana e suo 'habitat' (paludi, risaie, canali). Metodi di lotta contro la malaria // Rivista di Malariologia. 1926. V. 5. P. 553–593.
- Hillis D.M., Moritz C., Porter C.A., Baker R.J. Evidence for biased gene conversion in concerted evolution of ribosomal DNA // Science. 1991. V. 251. № 4991. P. 308–310.

- Linton Y.-M., Smith L., Harbach R.E. Molecular confirmation of sympatric populations of *Anopheles messeae* and *Anopheles atroparvus* overwintering in Kent, south-east England // Eur. Mosqu. Bull. 2002. V. 13. P. 8–16.
- Marinucci M., Romi R., Mancini P. M. *et al.* Phylogenetic relationships of seven palearctic members of the maculipennis complex inferred from ITS2 sequence analysis // Insect Mol. Biol. 1999. V. 8. № 4. P. 469–480.
- Nicolescu G., Linton Y.-M., Vladimirescu A. *et al.* 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 // Bull. Ent. Res. 2004. V. 94. № 6. P. 525–535.
- Sedaghat M.M., Linton Y.-M., Oshagi M.A. *et al.* The *Anopheles maculipennis* complex (Diptera: Culicidae) in Iran: molecular characterization and recognition of a new species // Bull. Entomol. Res. 2003. V. 93. № 6. P. 527–535.
- White M.J.D. Modes of Speciation. San Francisco: W.H. Freeman, 1978. 455 p.

**GEOGRAPHICAL VARIABILITY OF ITS2 rDNA AND COI mtDNA  
AND CRYPTIC SPECIES OF MOSQUITO  
*ANOPHELES MESSEAE* FALL. (DIPTERA: CULICIDAE)**

**O.V. Vaulin<sup>1</sup>, Yu.M. Novikov<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences,  
Novosibirsk, Russia, e-mail: Oleg.v.vaulin@mail.ru;

<sup>2</sup>Tomsk State University, Tomsk, Russia, e-mail: novikov@bio.tsu.ru

**Summary**

The results of analysis of 224 sequences of the second transcribed rDNA spacer (ITS2) and 56 sequences of subunit I of cytochrome oxidase (COI) mtDNA retrieved from DDBJ and five ITS2 sequences obtained by the authors are presented. Two major patterns were found in the whole set of ITS2 sequences. They correspond to cryptic *Anopheles messeae* Fall. species A and B, formerly recognized according to other markers. The environmental and geographical aspects of ITS2 variability are determined by the geographic range of *An. messeae* A and *An. messeae* B. The limited set of COI sequences hampered elucidation of any geographic regularity in its variability and assessment of its diagnostic value.

**Key words:** *Anopheles messeae*, cryptic species, ITS2, COI, molecular markers.