

УДК 575.174.015.3:575.2:577.21

**ПОЛИМОРФИЗМ И МЕЖВИДОВАЯ ИЗМЕНЧИВОСТЬ
НУКЛЕОТИДНОЙ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ ГЕНА
СУБЪЕДИНИЦЫ I ЦИТОХРОМОКСИДАЗЫ (COI)
У ВИДОВ-ДВОЙНИКОВ А И В *ANOPHELES MESSEAE*
И *AN. BEKLEMISHEVI* (DIPTERA: CULICIDAE)**

© 2012 г. О.В. Ваулин¹, Ю.М. Новиков²

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук,
Новосибирск, Россия, e-mail: Oleg.v.vaulin@mail.ru;

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

Поступила в редакцию 12 февраля 2012 г. Принята к публикации 1 марта 2012 г.

Методом PCR-RFLP ITS2 определена видовая принадлежность 159 особей комплекса *Anopheles maculipennis* из 5 локальностей Урала и Сибири. Изучена последовательность ДНК фрагмента гена COI для 124 особей из этих локальностей. Последовательности COI, относящиеся к группе *Anopheles messeae*, сопоставлены с таковыми из базы данных ДНК. Исследована и количественно оценена изменчивость (меры H и π) нуклеотидной последовательности COI криптических видов А и В *An. messeae* и *An. beklemishevi*. Установлено, что изменчивость COI не позволяет дискриминировать криптические виды А и В *Anopheles messeae* и не имеет географической упорядоченности для этих двух видов. Сделан вывод о том, что полиморфизм по COI, наряду с инверсионным полиморфизмом видов А и В *An. messeae*, является для них общим и возник задолго до дивергенции их предка. Подтверждена диагностическая значимость межвидовой изменчивости ITS2.

Ключевые слова: *Anopheles maculipennis*, *messeae*, *beklemishevi*, криптические виды, ITS2, COI, изменчивость, полиморфизм.

Введение

В связи с дифференциальной способностью к переносу малярии виды комплекса *Anopheles maculipennis* являются важными объектами в популяционных и эволюционных исследованиях. Филогенетическая близость видов придает их изучению значимость и представляет особый интерес с эволюционной точки зрения. На основе исследования природных популяций *An. messeae*, полиморфного по 5 парацентрическим инверсиям, сделан вывод о том, что внутри *An. messeae* существуют два криптических вида, условно названных «хромосомными формами А и В» (Новиков, 1978, 1984). Позже их видовой статус был подтвержден на молекулярно-генетическом уровне: методом таксонопринта показано, что эти формы дискретно

различаются на уровне высокоповторенной геномной ДНК (Новиков, Шевченко, 2001). Установлено, что эти виды также различаются по пяти парам нуклеотидов в повторах ITS2 генов рРНК, причем различия по ITS2 между видами носят полуколичественный характер: для А характерно присутствие обоих вариантов полиморфной последовательности в геноме, для В – только одного (Шевченко, Новиков, 2004). Одновременно на основе анализа ITS2 из вида *An. messeae* был выделен новый вид – *An. daciae* (Nicolescu *et al.*, 2004), однако, по нашему мнению (Ваулин, Новиков, 2010), этот вид тождествен виду *An. messeae* А. Вследствие полуколичественности различий последовательностей ITS2 в группе *An. messeae* s.l. часть исследователей усомнилась в валидности *An. daciae* как вида (Bezzhonova, Goryacheva,

2008). В результате проведенного нами анализа изменчивости ядерной последовательности ITS2 и фрагмента митохондриального гена COI, представленных в базе данных ДНК DDBJ под видовыми названиями *An. messeae* и/или *An. daciae*, по ITS2 выявлены два четких кластера образцов, соответствующих разным видам, однако по COI такой картины не показано (Ваулин, Новиков, 2010). Не исключено, что этот факт был обусловлен присутствием в базе данных последовательностей COI, полученных только от криптического вида *An. messeae* А.

В настоящей работе мы представляем результаты анализа изменчивости фрагмента митохондриального гена COI в ряде популяций малярийных комаров из регионов совместного обитания обоих видов *An. messeae* и еще одного вида комплекса *Anopheles maculipennis* – *An. beklemishevi*.

Материалы и методы

Материалом для выполнения работы служили выборки личинок *Anopheles* 3-го и 4-го возрастов, отловленных в природных популяциях Урала и Сибири (табл. 1). Материал фиксировали в 96 %-м этаноле. Выделение ДНК проводили индивидуально по стандартной методике с модификациями (Bender *et al.*, 1983). Видовую принадлежность особей определяли с помощью рестрикции ПЦР-продукта ITS2: одна характерная виду А пара нуклеотидов ITS2 из 5 пар, различающих виды А и В *An. messeae*, входит в состав сайта узнавания рестриктазой *BstF5I*, такой же сайт есть и в геноме *An. beklemishevi*, однако размер ПЦР-продукта ITS2 *An. beklemishevi* существенно больше, чем у видов *An. messeae* (рис. 1).

ПЦР и рестрикционный анализ ITS2

Для ПЦР использовали праймеры состава: 5'-TGTGA-ACTGC-AGGAC-ACAT-3' (прямой) и 5'-TATGC-TTAAA-TTCAGGGGGT-3' (обратный).

Состав реакционной смеси для ПЦР ITS2: 1×PCR-buffer; 4 mM MgCl₂; 0,4 mM каждого dNTP; 1 mM каждого праймера и 1 ед. Taq-полимеразы. Температурный режим ПЦР: денатурация при 94 °C – 1 мин; отжиг при 50 °C – 1 мин; полимеризация при 72 °C – 1 мин; в последнем цикле стадия полимеризации продолжалась 5 мин при 72 °C.

Для рестрикционного анализа брали на реакцию: 2 мкл ПЦР-продукта, 1 ед. фермента *BstF5I*, 2 мкл 10-кратного SE-буфера Y фирмы «Сибэнзим»; объем реакционной смеси – 20 мкл. Время рестрикции – 3 ч. Продукты реакции разделяли в 2 %-м агарозном геле, окрашенном бромистым этидием. Гель фотографировали в ультрафиолетовом свете (рис. 1).

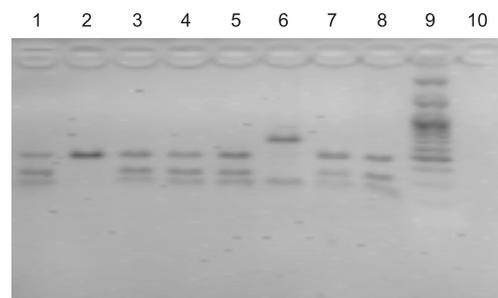


Рис. 1. Фрагмент электрофореграммы продуктов PCR-RFLP ITS2 *Anopheles*.

Дорожки: 1, 3, 4, 5, 7 и 8 соответствуют *An. messeae* А; 2 – *An. messeae* В; 6 – *An. beklemishevi*; 9 – маркер молекулярных масс 100 bp+1,5+3 kb (фирма «Медиген», Новосибирск); 10 – негативный контроль.

Таблица 1

Характеристика исследованных выборок видов *Anopheles*

Локальность, дата сбора, условное обозначение	Географические координаты	Изучено особей
г. Миасс, Челябинская область 17.08.2010 (М)	55° 01' N, 60° 06' E	52
г. Новосибирск 30.07.2010 (N)	54° 52' N, 84° 03' E	7
с. Чаинск, Томская область 23.08.2010 (Ch)	57° 56' N, 82° 36' E	57
г. Асино, Томская область 01.08.2010 (А)	57° 00' N, 86° 08' E	42
с. Черга, Республика Алтай 16.08.2010 (Chr)	51° 36' N, 85° 34' E	1

ПЦР COI

Для ПЦР COI использованы праймеры следующего состава, подобранные нами по последовательности мтДНК *An. quadrimaculatus* (номер последовательности в базе данных – L04272): 5'-CGAGG-AATAG-TAGGA-ACTTC-3' (прямой) и 5'-CTGTA-AATAT-GTGAT-GAGCT-C-3' (обратный). Условия ПЦР идентичны таковым для ITS2. Секвенирование COI и ITS2 проведено с использованием ресурсов ЦКП «Секвенирование ДНК» СО РАН (г. Новосибирск, <http://sequest.niboch.nsc.ru>).

Полученные нами последовательности ДНК представлены в базе данных ДНК под номерами: HE659576-HE659585 – *An. beklemishevi*, COI; HE659586-HE659699 – *An. messeae*, COI; HE659700, HE659701 – *An. beklemishevi*, ITS2; HE659702-HE659708 – *An. messeae*, ITS2.

Обработка данных

Для полученных последовательностей COI с помощью программы NETWORK 4.6.0.0. построены медианные сети (Bandelt *et al.*, 1999), значения нуклеотидной изменчивости (мера π) рассчитаны с помощью программы MEGA 4 (Tamura *et al.*, 2007), значения меры H (gene diversity) (Nei, 1973) – вручную.

Для последовательности COI проведено сравнение результатов, полученных в настоящей работе, с образцами *An. messeae s. l.* из

базы данных (табл. 2). Отметим, что последовательности, представленные в базе данных, существенно короче определенных нами (522 и 767 п.н. соответственно).

Результаты

Определена видовая принадлежность 159 образцов ДНК, индивидуально выделенной из особей всех изученных выборок (табл. 3). В четырех локальностях численно преобладал вид *An. messeae*. Его доля варьировала от 0,65 в Чаинске до 0,93 в Асино. В выборке из Чаинска отмечен вид *An. beklemishevi* с частотой 0,16. К этому же виду относится и единичный образец из Черги.

Распределение особей, изученных секвенированием COI, по выборкам приведено в табл. 4. В связи с тем что секвенирование представляет собой дорогостоящую процедуру, для него была отобрана только часть особей, идентифицированных в выборках. Мы стремились включить в анализ до 25–26 особей каждого вида из каждой выборки. Так как виды *An. messeae* В и *An. beklemishevi* были относительно редки и их количество в любой из выборок было менее 25, то все образцы, относящиеся к этим видам, были включены в изучение изменчивости по гену COI.

В ходе исследования также были просеквенированы последовательности ITS2 7 особей *An. messeae* (рис. 2) и двух особей *An. beklemi-*

Таблица 2

Номера и географическое происхождение последовательностей COI из базы данных ДНК

Географическая локальность	Названия образцов	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 (Павлодар)	Kz ^{Pa}	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

Таблица 3

Абсолютные числа и доли (в скобках) особей разных видов в выборках по результатам PCR-RFLP ITS2

Локальности	Виды		
	<i>An. messeae</i> А	<i>An. messeae</i> В	<i>An. beklemishevi</i>
Миасс	36 (0,692)	16 (0,308)	0 (0)
Новосибирск	6 (0,857)	1 (0,143)	0 (0)
Чаинск	37 (0,649)	11 (0,193)	9 (0,158)
Асино	39 (0,929)	3 (0,071)	0 (0)
Черга	0 (0)	0 (0)	1 (1)
Всего	118	31	10

Таблица 4

Числа особей, изученных секвенированием фрагмента гена COI

Локальности	Виды		
	<i>An. messeae</i> А	<i>An. messeae</i> В	<i>An. beklemishevi</i>
Миасс	25	16	0
Новосибирск	6	1	0
Чаинск	26	11	9
Асино	26	3	0
Черга	0	0	1
Всего	83	31	10

11133
44446
15722

Ch-1 wwyAC
N-06 wwyAC
A-1 wwyAC
M-50 wwyAC
M-35 TTCGG
Ch-2 TTCGG
A-22 TTCrs

Рис. 2. Вариабельные сайты просеквенированных последовательностей ITS2.

Образцы: Ch-1 – Чаинск, вид А; N-06 – Новосибирск, вид А; A-1 – Асино, вид А; M-50 – Миасс, вид А; M-35 – Миасс, вид В; Ch-2 – Чаинск, вид В; A-22 – Асино, вид В с промежуточным положением по двум последним заменам.

shevi. У одной из этих особей (A-22 из Асино, последовательность HE659708) выявлен своеобразный «промежуточный» вариант последовательности *An. messeae*: если по первым трем диагностическим сайтам он соответствует виду В и не несет минорных пиков, свойственных виду А, то в четвертом и пятом диагностических сайтах, по которым криптические виды различаются дискретно, этот образец имеет наложение пиков, соответствующих обоим видам *An. messeae*. Отсутствие каких-либо плав-

ных переходов между видами *An. messeae* по продуктам рестрикции ITS2 ферментом *Bst*F51 позволяет считать PCR-RFLP ITS2 надежным методом определения вида в этой группе. На этом основании мы относим образец А-22 к виду В, но вместе с тем считаем необходимым проведение дополнительного исследования названного феномена. В результате детального сравнения нуклеотидных последовательностей ITS2 *An. beklemishevi* (образцы: Ch-22, Чаинск; Chr-28, Черга соответственно последовательности HE659700 и HE659701) с последовательностями, представленными в базе данных под номерами AJ511876 и AY593958, выявлен внутригеномный ITS2-полиморфизм у этого вида. У полученных нами последовательностей ITS2 *An. beklemishevi* в позициях 270, 416 и 422 относительно образца AY593958 обнаружено «наложение пиков», соответствующих разным нуклеотидам. Последовательность AJ511876 существенно короче, и многие ее нуклеотиды определены неоднозначно.

Полученные результаты позволили оценить изменчивость нуклеотидных последовательностей фрагмента гена COI в группах изученных образцов. Такая оценка проведена посредством расчета значений мер H и π (табл. 5) (Nei, 1973; Tamura *et al.*, 2007). Мера H фактически является эквивалентом средней расчетной гетерозиготности применительно к тем случаям, когда

Таблица 5

Значения мер изменчивости H (верхняя строка) и π (нижняя строка)
для рассматриваемых групп

Локальность	<i>An. messeae</i> A	<i>An. messeae</i> B	<i>An. beklemishevi</i>	Для всех видов
Миасс	0,93 0,008 ± 0,002	0,89 0,009 ± 0,002	–	0,93 0,008 ± 0,002
Новосибирск	0,78 0,012 ± 0,003	–	–	0,82 0,012 ± 0,003
Чаинск	0,94 0,011 ± 0,002	0,83 0,008 ± 0,002	0,89 0,005 ± 0,002	0,96 0,022 ± 0,004
Асино	0,94 0,012 ± 0,003	0,33 0,016 ± 0,004	–	0,94 0,012 ± 0,002
По объединенным данным	0,93 0,011 ± 0,02	0,94 0,010 ± 0,02	0,86 0,005 ± 0,002	–

Примечание. Для меры π приведена стандартная ошибка. Оценка объединенных мер негенетического разнообразия для *An. beklemishevi* отличается от таковой для выборки из Чаинска. Это связано с учетом при анализе единичного образца из Черги.

в принципе гетерозиготность исключена. Эта мера может иметь значение от 0 (полная мономорфность) до 1 (если в выборке бесконечно большой численности каждый вариант встречается один раз). Значения меры H для всех групп исследованных нами образцов велики и близки к 0,9. Исключение составляет группа образцов вида **B из Асино со значением H , равным 0,33**. Столь низкое ее значение, очевидно, обусловлено малым числом образцов в группе. Отметим, что для выборки из Миасса, где встречаются только виды *An. messeae*, причем с высокими частотами, значение меры H для группы из двух видов оказалось сопоставимым с таковым для каждого из видов по отдельности.

Мера π показывает, какой долей нуклеотидных позиций в среднем различаются два случайно взятых образца. Значения меры π для всех групп *An. messeae* оказались близкими к 0,01, т. е. для участка гена длиной 767 п.н. два образца *An. messeae* в среднем по изученному фрагменту гена **COI различаются 7–8 парами нуклеотидов**. В выборке из Чаинска, включающей *An. beklemishevi*, значение π составило 0,022, что обусловлено большой степенью нуклеотидной дивергенции между парой видов *An. messeae*, с одной стороны, и *An. beklemishevi* – с другой.

Знание последовательностей нуклеотидов фрагмента гена **COI в группах образцов ДНК** из разных локальностей позволило охарактери-

зовать изменчивость последовательностей аминокислотных остатков во фрагментах полипептидов, соответствующих изученным фрагментам гена. Проведенный анализ показал, что за единственным исключением (*An. messeae* A, образец А-25 из популяции Асино; последовательность HE659695) для изученных образцов характерно полное единообразие последовательностей аминокислотных остатков. Структура образца А-25 указала на замену лейцина на изолейцин в 146-й позиции фрагмента последовательности аминокислотных остатков молекулы полипептида, соответствующего просеквенированному фрагменту ДНК. Таким образом, все выявленные замены нейтральны на уровне функциональной значимости продукта, малое количество несинонимичных замен можно интерпретировать как свидетельство высокой адаптивности существующей последовательности аминокислотных остатков в молекуле цитохромоксидазы I.

В результате анализа нуклеотидных замен в исследованных образцах фрагмента гена **COI** для всех 3 видов установлено преобладание транзиций над трансверсиями. Так, для вида А отношение числа транзиций к трансверсиям составляет $8,5 \pm 2,9$, для вида В – $14,0 \pm 6,3$, для *An. beklemishevi* – $3,3 \pm 1,7$. Известное для многих групп организмов преобладание транзиций над трансверсиями можно объяснить

более высокой вероятностью преобразования пуринов или пиримидинов внутри классов оснований или селективными ограничениями. В соответствии с правилом вырожденности генетического кода транзиции значительно реже трансверсий приводят к заменам аминокислотных остатков в молекулах полипептидов (Fields *et al.*, 2007).

Медианные сети, построенные по последовательностям фрагмента гена COI образцов, принадлежащих к видам А и В *An. messeae* (рис. 3) и *An. beklemishevi* (рис. 4), соответствуют результатам оценок мер генетического разнообразия. Данные, представленные на рис. 3 и 4, свидетельствуют о том, что числа гаплотипов велики, по этой причине варианты последовательности, имеющие даже наиболее высокие частоты, могут быть встречены в популяциях

с небольшими вероятностями. Для *An. messeae* какой-либо выраженной связи между COI-ДНК-гаплотипами и видовой принадлежностью не выявляется. Отсутствует также и выраженная дифференциация между выборками по представленности вариантов COI.

В результате сравнения изученных нами последовательностей фрагмента гена COI с последовательностями, представленными в базе данных, между ними было установлено два дискретных различия, которые приходились на концы последовательностей, приведенных в базе данных (позиции 15 и 521 соответственно). Самое простое объяснение таким различиям – это методическая ошибка: включение праймеров в анализируемую последовательность с учетом того что получение ПЦР продукта и проведение секвенирования возможны и при

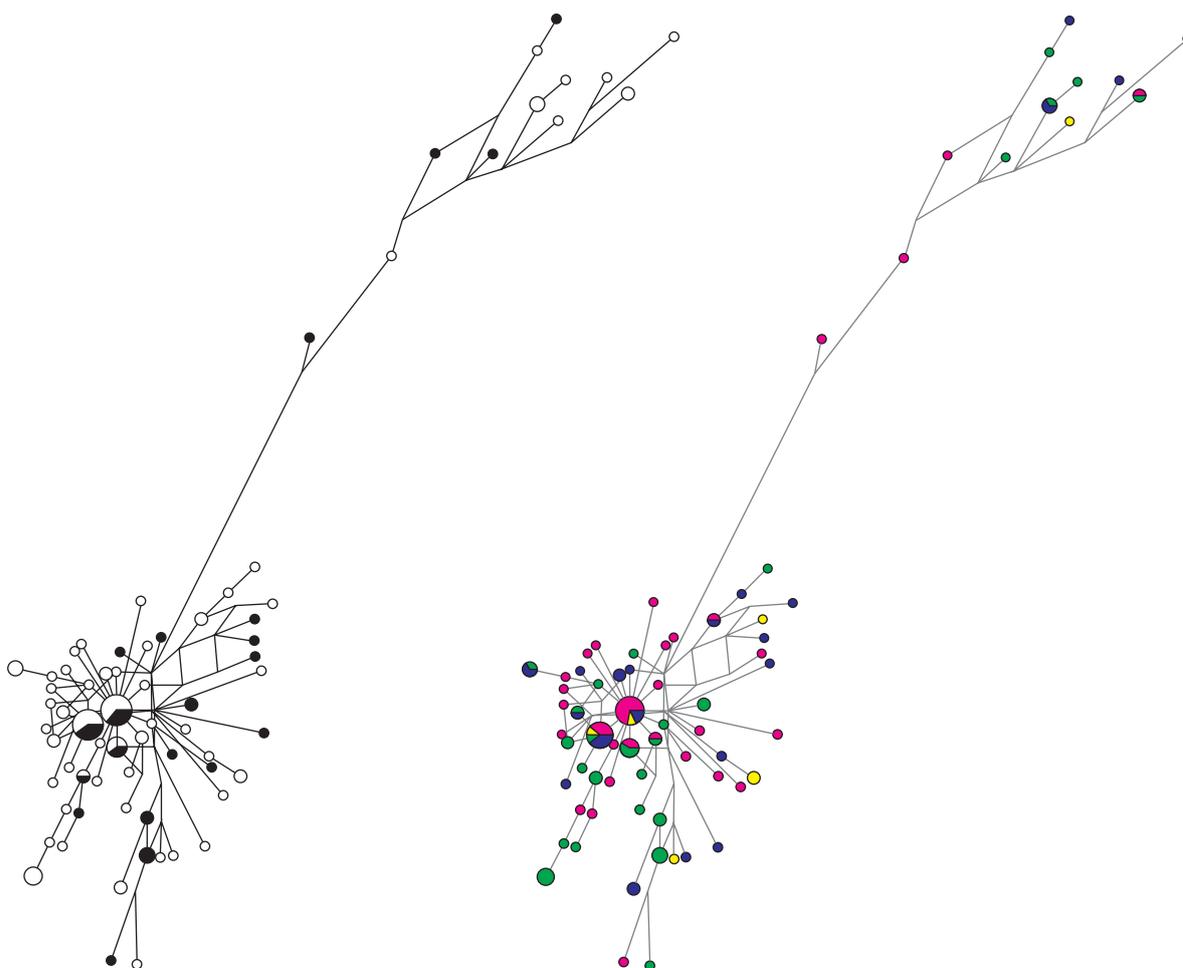


Рис. 3. Медианные сети гаплотипов мтДНК *An. messeae s.l.* по изученному фрагменту гена COI.

а – по видовой принадлежности (белый цвет – вид А, черный – вид В); б – по географической принадлежности (фиолетовый цвет – Миасс, желтый – Новосибирск, зеленый – Чаянск, синий – Асино).

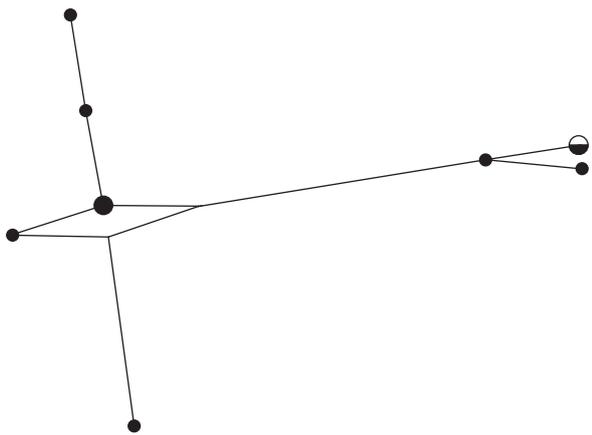


Рис. 4. Медианная сеть гаплотипов мтДНК *Anopheles beklemishevi* по изученному фрагменту гена COI.

Белым цветом выделен образец из Черги.

неполной комплементарности праймеров и соответствующих этим праймерам фланкирующих участков изучаемой ДНК. Приняв это допущение, мы исключили из анализа концы последовательностей, вероятно, приходящиеся на области сайтов посадки праймеров, и по-

строили медианную сеть на основе образцов как изученных нами, так и представленных в базе данных. Нетрудно убедиться в том, что уменьшение длины анализируемого участка с 767 до 480 п.н., сопровождающееся исключением вероятных ошибок, существенно изменяет форму сети (рис. 5). Обратим внимание на одно обстоятельство: в базе данных представлены последовательности *An. messeae*, за единственным исключением относящиеся к европейским популяциям (табл. 2), а все последовательности, изученные нами, получены из азиатских популяций. Однако каких-либо существенных различий между группами европейских и азиатских образцов не прослеживается (рис. 5).

Обсуждение

Группа *An. messeae* представляет собой пару очень близких видов, сохраняющих предковые инверсионные полиморфизмы. Случаи, когда несколько видов имеют перекрывающиеся хромосомные полиморфизмы, описаны также для пары сиблингов *An. gambiae s.s.* и двух «хро-

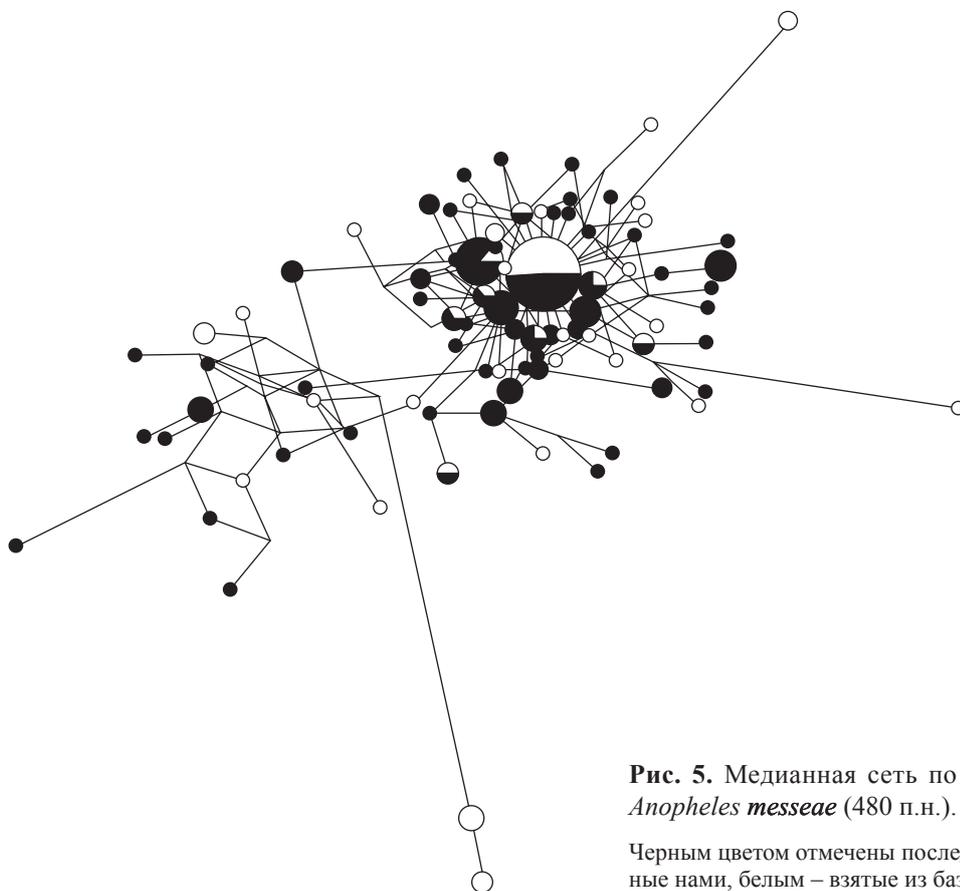


Рис. 5. Медианная сеть по фрагменту гена COI *Anopheles messeae* (480 п.н.).

Черным цветом отмечены последовательности, полученные нами, белым – взятые из базы данных ДНК.

мосомных форм» (т. е. видов) *An. funestus* (della Torre *et al.*, 2001; Cohuet *et al.*, 2004; Mishel *et al.*, 2005). Очевидно, что такие примеры редки скорее вследствие трудности их выявления, нежели из-за реально низкой встречаемости в природе. Поэтому подобные группы видов привлекательны для выяснения молекулярно-генетических механизмов эволюции и поиска надежных критериев вида на молекулярном уровне.

Повторенную последовательность ITS2 рДНК часто используют в качестве маркера в молекулярно-генетических исследованиях. На примере различных комплексов видов *Anopheles* можно увидеть большое разнообразие как длин этой последовательности, так и собственно порядка нуклеотидов (Beebe *et al.*, 1999; Marinucci *et al.*, 1999; Harbach, 2004). Такое разнообразие можно интерпретировать как высокую степень нейтральности последовательности ITS2 в отношении естественного отбора. Несмотря на нейтральность и адекватную для надвидовых филогенетических посторений изменчивость, есть и некоторые проблемы при использовании этого маркера для уточнения родственных отношений между видами.

ITS2, как и другим повторам, присуща согласованная эволюция (унификация в пределах генома каждого вида) (Dover, Flavell, 1984). Гибридизация групп особей, различающихся по последовательности ITS2, и, как следствие, комбинирование ее вариантов в геномах, должны вызвать довольно быструю утрату исходных межгрупповых различий. Иными словами, феномен согласованной эволюции повторов является естественной основой их видовой уникальности и внутривидовой однородности. Действительно, выполняя настоящую работу, мы убедились в том, что особей всех трех видов-двойников можно надежно и точно идентифицировать по электрофореграммам продуктов PCR-RFLP ITS2 (рис. 1). В то же время в геноме ряда видов, входящих в группы видов-двойников, так же, как и у *An. messeae* А, присутствуют по несколько вариантов последовательности ITS2, встречающихся со сравнимыми частотами (Beebe *et al.*, 2001; Wilkerson *et al.*, 2004). Для видов *Anopheles* выявлен также полиморфизм по отдельным клонированным копиям ITS2 (Bezzhonova, Gorryacheva, 2008; Alquezar *et al.*, 2010). Достаточно обоснованных представлений

о механизмах поддержания в геноме нескольких встречающихся со сравнимыми частотами вариантов ITS2 нам не известно. Возможно, отсутствие изогенизации объясняется тем, что часть генов рРНК транслоцирована с хромосомы X на одну из аутосом, что реально имеет место у некоторых видов *Culicidae* (Kumar, Rai, 1990). Таким образом, в соответствии с этой гипотезой у криптического вида *An. messeae* А часть рДНК транслоцирована на аутосому, что и служит причиной наличия у него двух дискретных фракций повторов.

Отметим особенности последовательности ITS2 образца А-22 из нашего исследования, занимающей промежуточное положение между ее вариантами, характерными для видов А и В (рис. 2). Такие варианты ITS2 для *An. messeae*, по-видимому, являются довольно редкими. Примером может быть названа последовательность образца ITS2 АМ409782, представленная в базе данных ДНК, варибельные сайты которой представлены нуклеотидами, идентичными таковым образца А-22. Изучение таких редких случаев представляет собой отдельную важную задачу, решение которой в сочетании с экологическими и цитогенетическими исследованиями может привести к очень значимым выводам.

Анализируя изменчивость COI, прежде всего обратим внимание на отсутствие выраженной межвидовой дифференциации в группе *An. messeae*. Поскольку мтДНК наследуется как единое структурно-функциональное образование, то отсутствие межвидовой дифференциации, возможно, имеет место не только в отношении исследованного гена, но и по другим генам митохондриальной ДНК этой пары видов. Отсутствие дивергенции последовательностей мтДНК на две ветви, соответствующих «хромосомным формам», отмечено и у *An. funestus* (Michel *et al.*, 2005). Незначительное различие криптических видов по мтДНК, а также сходство значений мер их генетического разнообразия могут свидетельствовать в пользу большой многочисленности тех групп особей, в которых происходила дивергенция форм, а также в пользу отсутствия связи между изменчивостью мтДНК и событиями, приведшими к видообразованию. С одной стороны, если бы один из видов обособился изначально как популяция с ограниченной численностью, то следовало бы ожидать резкого

уменьшения его генетического разнообразия по COI. С другой стороны, появление, закрепление в популяции и распространение среди особей вновь возникшего вида нового варианта повтора ITS2 были бы весьма затруднены в том случае, если группа основателей нового вида была бы представлена более чем единичными особями.

Результаты, полученные в работе, уместно обсудить в контексте гипотезы «молекулярных часов эволюции». Если не учитывать делеции, а неполную замену принять за эволюционное событие, то по ITS2 *An. beklemishevi* и *An. messeae s.l.* отличаются 56 заменами, а виды А и В между собой – 5 (т. е. на порядок величин). Исключение из анализируемой последовательности инсерций и делеций укоротит ее длину до 390 п.н. В этом случае значение дистанции Джукса–Кантора (Jukes, Cantor, 1969) будет равным 0,159 для пары *An. messeae s.l.* и *An. beklemishevi* и 0,013 – для пары А и В *An. messeae*. Сопоставим полученные оценки генетических расстояний с дивергенцией по COI. В связи с отсутствием выраженной дифференциации по COI внутри *An. messeae* соотносить генетические расстояния, рассчитанные по этой последовательности, можно только внутри *An. messeae s.l.* (относительно отдельных вариантов последовательности без привязки к конкретным видам), а также между *An. beklemishevi* и *An. messeae s.l.* На медианной сети COI *An. messeae* образец М-5 (Миасс; последовательность HE659590) принадлежит к одному из вариантов последовательности, наиболее часто встречающихся у обоих криптических видов. На медианной сети *An. beklemishevi* образец Ch-22 (последовательность HE659700) занимает положение, близкое к центру. Варианты фрагмента гена COI длиной 767 п.н. образцов М-5 и Ch-22 различаются по 31 позиции, а наиболее различающиеся варианты этого же фрагмента образцов *An. messeae* Ch-20 и А-8 (последовательности HE659651 и HE659678) – по 16 позициям. Генетическое расстояние Джукса–Кантора между М5 и Ch22, которое условно можно принять в качестве расстояния между *An. messeae s.l.* и *An. beklemishevi*, равно 0,042, а между образцами *An. messeae* Ch-20 и А-8 – 0,021. Отношение значений генетических расстояний в паре видов *An. messeae* и в паре *An. messeae s.l./An. beklemishevi* по ITS2 состав-

ляет 0,082, а по COI – 0,500. Эти числа различаются в 6 раз. Таким образом, время дивергенции по COI в группе *An. messeae* примерно в 6 раз больше времени дивергенции по видоспецифическому маркеру (ITS2) видов А и В. Таким образом, на основе концепции молекулярных часов можно сделать вывод о том, что COI-полиморфизм у *An. messeae* возник значительно раньше того, когда произошла дивергенция таксона на два новых вида.

Между *An. messeae s.l.* и *An. beklemishevi* по последовательности ITS2 при использованном нами методе выравнивания существуют 22 различия по инсерциям/делециям. Так как частоты возникновения инсерций и делеций фрагментов ДНК в силу ряда причин сложно соотнести с частотами нуклеотидных замен, то при филогенетическом анализе вариации такого типа часто не учитывают (Лукашов, 2009). Вместе с тем их учет уменьшил бы расчетное время дивергенции видов *An. messeae* по отношению ко времени дивергенции их последнего общего предка и *An. beklemishevi* и, следовательно, увеличил бы разницу между временем формирования предкового COI-полиморфизма и дивергенцией видов *An. messeae*. Особо отметим адекватность полученных нами оценок только в пределах допущений концепции молекулярных часов эволюции. Однако допущения эти не бесспорны. Например, известно, что скорость накопления нуклеотидных замен в митохондриальной ДНК может различаться в несколько раз даже у представителей одного вида (Алтухов, Салменкова, 2002; Даниленко, Давыденко, 2003). Другим допущением, которое не всегда удается верифицировать, является отсутствие связи между используемыми маркерами и приспособленностью особей с разными их вариантами. Каких-либо сведений о селективных ограничениях на вариацию последовательности ITS2 в литературных источниках нет. Эта последовательность может значительно варьировать по размеру даже в пределах группы близкородственных видов, в частности, это установлено у представителей комплекса *An. crucians*. Длина ITS2 в этой группе видов варьирует от 195 до 1006 п.н. (Wilkerson *et al.*, 2004). Что касается изменчивости изученного фрагмента гена COI, то, как уже упоминалось, все (за единичным исключением) изученные

нами образцы различаются по синонимичным заменам. Учет только синонимичных сайтов при наблюдаемых значениях изменчивости и длин последовательностей не внесет сколь угодно существенных изменений в соотношения генетических расстояний. Можно отметить, что на построенной нами медианной сети *An. messeae* по COI имеется два «сгущения» – в нижней и верхней части, которые включают образцы из обоих видов (рис. 3, а). Образование структуры такого типа, а также отсутствие существенного расхождения образцов видов А и В по COI могут быть объяснены только предковым полиморфизмом, который сформировался задолго до дивергенции предкового вида. Полученные данные могут указывать на факт близости размаха внутри- и межвидовой дифференциации по мтДНК видов комплекса *An. maculipennis* и ее относительной независимости в процессе преобразований геномов, связанных с видообразованием.

Заключение

1. Рестрикционный анализ повторенной последовательности ITS2 является надежным методом дискриминации особей видов-двойников А и В *Anopheles messeae* и *An. beklemishevi*.

2. Последовательность COI у видов А и В *An. messeae* и *An. beklemishevi* демонстрирует высокую внутри- и межвидовую изменчивость; изменчивость по COI в таксоне *An. messeae s.l.* географически не упорядочена и не позволяет дискриминировать криптические виды, входящие в его состав.

3. С позиции концепции молекулярных часов эволюции COI-полиморфизм у *An. messeae* так же, как и инверсионный полиморфизм, возник значительно раньше того момента, когда произошла дивергенция таксона на два новых вида.

4. Близость размаха внутри- и межвидовой дифференциации по мтДНК видов комплекса *An. maculipennis* свидетельствует об отсутствии, а дискретность отличий близких видов по ITS2 – о наличии прямой или косвенной связи с процессом видообразования.

Работа частично финансировалась Российским фондом фундаментальных исследований № 12-04-01319-а и программой фундаменталь-

ных исследований Президиума РАН «Живая природа: современное состояние и проблемы развития», проект № 30.30.

Авторы выражают признательность Шаршовой Александру Анатольевичу, сотруднику ИЦиГ СО РАН, за помощь в сборе материала.

Литература

- Алтухов Ю.П., Салменкова Е.А. Полиморфизм ДНК в популяционной генетике // Генетика. 2002. Т. 38. № 9. С. 1173–1195.
- Ваулин О.В., Новиков Ю.М. Географическая изменчивость ITS2 рДНК и COI мтДНК и криптические виды малярийного комара *Anopheles messeae* Fall. (Diptera: Culicidae) // Информ. вестник ВОГиС. 2010. Т. 14. № 3. С. 546–557.
- Даниленко Н.Г., Давыденко О.Г. Миры геномов органелл. Минск: Тэхналогія, 2003. 498 с.
- Лукашов В.В. Молекулярная эволюция и филогенетический анализ. М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2009. 256 с.
- Новиков Ю.М. Влияние ассортативного скрещивания на популяционную структуру малярийного комара *Anopheles messeae* // 14-й Междунар. генет. конгр. Секционные заседания. М., 1978. Ч. 1. С. 471.
- Новиков Ю.М. *Anopheles messeae* – два вида in statu nascendi // Макроэволюция. Матер. 1 Всесоюз. конф. по проблемам эволюции. М.: Наука, 1984. С. 67.
- 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.
- 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 Съезд ВОГиС, Москва, 6–12 июня 2004. М.: Изд-во УРСС, 2004. С. 230.
- Alquezar D.E., Hemmerter S., Cooper R.D., Beebe N.W. Incomplete concerted evolution and reproductive isolation at the rDNA locus uncovers nine cryptic species within *Anopheles longirostris* from Papua New Guinea // BMC Evol. Biol. 2010. 10: 392. doi:10.1186/1471-2148-10-392.
- Beebe N.W., Ellis J.T., Cooper R.D., Saul A. DNA sequence analysis of the ribosomal DNAITS2 region for the *Anopheles punctulatus* group of mosquitoes // Insect Mol. Biol. 1999. V. 8. No. 3. P. 381–390.
- Beebe N.W., Maung J., van den Hurk A.F. et al. Ribosomal DNA spacer genotypes of the *Anopheles bancroftii* group (Diptera: Culicidae) from Australia and New Guinea // Insect Mol. Biol. 2001. V. 10. No. 5. P. 407–414.
- Bandelt H.-J., Forster P., Rohl A. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies // Mol. Biol. Evol. 1999. V. 16. No. 1. P. 37–48.
- Bender W., Spierer P., Hognes 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. No. 1. P. 17–33.
- Bezzhonova O.V., Gorryacheva I.I. Intragenomic Heterogeneity of rDNA Internal Transcribed Spacer 2 in *Anopheles messeae* (Diptera: Culicidae) // J. Med. Ent. 2008. V. 45. No. 3. P. 337–341.
- Cohuet A., Dia I., Simard F. *et al.* Population structure of the malaria vector *Anopheles funestus* in Senegal based on microsatellite and cytogenetic data // Insect Mol. Biol. 2004. V. 13. No. 3. P. 251–258.
- Dover G., Flavell R. Molecular coevolution: DNA divergence and the maintenance of function // Cell. 1984. V. 38. Issue. 3. P. 622–623.
- Fields B.N., Knipe D.M., Howley P.M. *et al.* Fields Virology. Philadelphia: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams and Wilkins. 2007. 317 p.
- Harbach R.E. The classification of genus *Anopheles* (Diptera: Culicidae): a working hypothesis of phylogenetic relationships // Bull. Entomol. Res. 2004. V. 94. No. 6. P. 537–553.
- Jukes T.H., Cantor T.R. Evolution of protein molecules // Mammalian protein metabolism / Ed. H.N. Munro. N.Y., USA: Acad. Press, 1969. P. 21–123.
- Kumar A., Rai K.S. Chromosomal localization and copy number of 18s + 28s ribosomal RNA genes in evolutionarily diverse mosquitoes (Diptera, Culicidae) // Hereditas. 1990. V. 113. No. 3. P. 277–289.
- Michel A.P., Guelbeogo W.M., Grushko O. *et al.* Molecular differentiation between chromosomally defined incipient species of *Anopheles funestus* // Insect Mol. Biol. 2005. V. 14. No. 4. P. 375–387.
- Marinucci M., Romi R., Mancini M. *et al.* Phylogenetic relationships of seven palearctic members of the *maculipennis* complex inferred from ITS2 sequence analysis // Insect Mol. Biol. 1999. V. 8. No 4. P. 469–480.
- Nei M. Analysis of gene diversity in subdivided populations // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 1973. V. 70. No. 12. P. 3321–3323.
- 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. No. 6. P. 525–535.
- Tamura K., Dudley J., Nei M., Kumar S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0 // Mol. Biol. Evol. 2007. V. 24. No. 8. P. 1596–1599.
- della Torre A., Fanello C., Akogbeto M. *et al.* Molecular evidence of incipient speciation within *Anopheles gambiae* s.s. in West Africa // Insect Mol. Biol. 2001. V. 10. No. 1. P. 9–18.
- Wilkerson R.C., Reinert J.F., Li C. Ribosomal DNA ITS2 sequences differentiation six species in the *Anopheles crucians* complex (Diptera: Culicidae) // J. Med. Entomol. 2004. V. 41. No. 3. P. 392–401.

**POLYMORPHISM AND INTERSPECIFIC VARIABILITY
OF CYTOCHROME OXYDASE SUBUNIT I (COI) GENE
NUCLEOTIDE SEQUENCE IN SIBLING SPECIES
OF A AND B *ANOPHELES MESSEAE* AND *AN. BEKLEMISHEVI*
(DIPTERA: CULICIDAE)**

O.V. Vaulin¹, Yu.M. Novikov²

¹ Institute of Cytology and Genetics, SB RAS, Novosibirsk, Russia, e-mail: Oleg.v.vaulin@mail.ru;

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

Summary

Species identification of 159 individuals of the *Anopheles maculipennis* complex from 5 localities of Ural and Siberia was conducted by PCR-RFLP ITS2. The DNA sequences of a COI gene fragment were determined in 124 individuals from the localities. The *Anopheles messeae* group COI sequences were compared with those from a DNA database. Variability of COI nucleotide sequences (measures H and π) of the cryptic species A and B *Anopheles messeae* and *An. beklemishevi* was investigated and quantitatively estimated. It was found that the COI variability did not allow discrimination of the cryptic species A and B *Anopheles messeae*. Neither did it show any geographic regularity for these species. It is concluded that the COI polymorphism of the A and B *Anopheles messeae* species is common for them, as well as the chromosomal inversion polymorphism. It arose long before their divergence. The diagnostic importance of interspecific ITS2 variability is confirmed.

Key words: *Anopheles maculipennis*, *messeae*, *beklemishevi*, cryptic species, ITS2, COI, variability, polymorphism.