

УДК 575.1: 575.858: 575.174.015.3: 577.213.3

## ИЗМЕНЧИВОСТЬ НУКЛЕОТИДНОЙ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ МИТОХОНДРИАЛЬНОГО ГЕНА СУБЪЕДИНИЦЫ I ЦИТОХРОМОКСИДАЗЫ С У ВИДОВ РОДОВ *Aedes* И *Ochlerotatus* (DIPTERA: CULICIDAE)

© 2013 г. **Н.В. Храброва<sup>1</sup>, Ю.В. Андреева<sup>1</sup>, О.В. Ваулин<sup>2</sup>,  
С.С. Алексеева<sup>1</sup>, А.К. Сибатаев<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> Научно-исследовательский институт биологии и биофизики  
Томского государственного университета, Томск, Россия, e-mail: hrabrova@yandex.ru;

<sup>2</sup> Федеральное государственное бюджетное учреждение науки  
Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук,  
Новосибирск, Россия

Поступила в редакцию 7 декабря 2012 г. Принята к публикации 18 декабря 2012 г.

Анализировали возможность использования взятого за стандарт при баркодинге фрагмента ДНК митохондриального гена субъединицы I цитохромоксидазы С для видовой идентификации 15 видов комаров родов *Aedes* и *Ochlerotatus* (Diptera: Culicidae), собранных в Томской и Кемеровской областях, и 14 видов комаров, нуклеотидные последовательности которых были получены из базы данных GenBank. Различия между особями одного вида в среднем составили 0,6 % (значения от 0 до 1,6 %), между видами в пределах одного рода – 7,8 % (0,7–13,1 %), между видами разных родов – 14,2 % (9,7–17,6 %). Для четырех пар видов (3,7 %) выявленные различия оказались меньше 2 %, т. е. не превысили порог межвидовых различий, принятый в системе штрихкодирования. В то же время для *Och. euedes* и *Ae. vexans* выявлена значительная внутривидовая изменчивость, соответственно 1,6 % и 1,4 %, которая, однако, не превышает пороговые значения, принятые для внутривидовой дивергенции.

**Ключевые слова:** *Aedes*, *Ochlerotatus*, субъединица I цитохромоксидазы С (COI), штрихкодирование, филогения, дивергенция.

### ВВЕДЕНИЕ

Традиционные таксономические методы систематики, основанные на использовании морфологических критериев, трудоемки и часто недостаточно надежны для идентификации видов. В настоящее время для таксономических исследований необходимо применение междисциплинарного подхода, который включал бы комплекс данных – морфологических, экологических и молекулярно-генетических (Krzywinski, Besansky, 2003).

Достоверная и быстрая идентификация возбудителей заболеваний и их переносчиков имеет особое значение в медицинской энтомологии. При помощи молекулярно-генетических под-

ходов видовой диагностики можно проводить быструю и надежную идентификацию организмов на любой стадии развития, что, в свою очередь, позволяет выявить механизм передачи возбудителей и эпидемиологическую роль переносчиков (Cywinska *et al.*, 2006).

Несмотря на то что к кровососущим насекомым привлечено более пристальное внимание энтомологов и в целом они изучены более подробно, чем многие другие виды животных, наши представления о таксономии комаров остаются неполными. Со времени создания современной системы классификации комаров (Edwards, 1932) число описанных видов комаров увеличилось более чем вдвое – с 1400 до 3200 (Zavortink, 1990; Harbach, Kitching,

1998). Описание новых видов в последние десятилетия, прежде всего, связано с широким применением молекулярных методов (Beebe *et al.*, 2001; Alquezar *et al.*, 2010).

Для видовой идентификации комаров исследователями применялись разнообразные подходы, включая электрофорез белков (Van Bortel *et al.*, 1999), ДНК–ДНК гибридизацию (Cooper *et al.*, 2002), а также методы, основой которых служит полимеразная цепная реакция. Для поиска видоспецифичных признаков применяли микросателлитный анализ, анализ длин рестриционных фрагментов ДНК (RFLP), метод случайным образом амплифицированной ДНК (RAPD) (Goswami *et al.*, 2005; Храброва и др., 2006). В основе большинства подходов лежит изучение изменчивости в специфичных ядерных локусах, чаще всего мишенью исследований является рДНК (Kent *et al.*, 2004; Smith, Fonseca, 2004; Kampen, 2005; Marrelli *et al.*, 2005). Показано, что митохондриальный ген субъединицы I цитохромоксидазы *c* (COI) может служить стандартным участком ДНК для целей биоидентификации (Hebert *et al.*, 2003a, b). Идентификация образцов по последовательности стандартного участка гена COI называется ДНК-штрихкодированием, или баркодингом (англ. *barcoding*).

Участок гена COI представлен сотнями копий на клетку, обычно лишен вставок/делений и по сравнению с другими белок-кодирующими генами трети нуклеотидные позиции этого гена характеризуются высокой частотой нуклеотидных замен. Изменения аминокислотных последовательностей в этом гене происходят медленнее, чем в любом другом митохондриальном гене, что увеличивает разрешающую способность таксономического анализа и облегчает создание праймеров. В последнее время увеличилось количество работ по популяционной генетике и систематике, использующих митохондриальную ДНК (в частности, ген субъединицы I цитохромоксидазы *c*) в качестве маркера (Cywinska *et al.*, 2006; Полуконова и др., 2009; Бачевская, Переверзева, 2010; Воронова и др., 2011; Удалов, Беньковская, 2011; Laboudi *et al.*, 2011; Gibson *et al.*, 2012).

В настоящем исследовании анализировалась возможность использования нуклеотидных последовательностей участка гена COI для

идентификации видов комаров родов *Aedes* и *Ochlerotatus* из популяций Томской и Кемеровской областей.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалом для настоящей работы служили личинки комаров IV возраста родов *Aedes* и *Ochlerotatus*, собранные на территории Томской и Кемеровской области (табл. 1).

Сбор личинок проводили по стандартной методике (Гуцевич и др., 1970). Личинки фиксировались в 96 %-м этаноле. Морфологическая идентификация личинок проводилась с использованием стереомикроскопов МБС-12 (Россия), Olympus SZX9 (Япония) по определителям (Гуцевич и др., 1970; Гуцевич, Дубицкий, 1981).

Выделение ДНК проводили с использованием набора Invisorb® Spin DNA Extraction Kit (Invitek, Германия) по методике, прилагаемой к набору. Для амплификации 5'-части митохондриального гена субъединицы I цитохромоксидазы *c* использовали стандартные праймеры: LCO1490 (5'-GGTCAACAATCATAAAGATA TTGG-3') и HCO2198 (5'-TAAACTTCAGGGT-GACCAAAAATCA-3') (Folmer *et al.*, 1994). Реакционная смесь содержала однократный ПЦР-буфер (60 mM Tris – HCl, 25 mM KCl, 10 mM 2 – меркаптоэтанол, 0,1 %-й Тритон X – 100), 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 мкМ каждого dNTP, 1 единицу активности Taq ДНК-полимеразы

Таблица 1  
Места сбора комаров

Место сбора	Географические координаты
Томская область	
г. Томск	56°30'00" N, 84°58'00" E
с. Чаинск	57°56'00" N, 82°35'00" E
с. Тахтамышево	56°23'00" N, 84°52'00" E
с. Тимирязевское	56°29'32" N, 84°54'13" E
с. Михайловка	57°16'27" N, 85°47'03" E
с. Коларово	56°21'00" N, 84°56'00" E
Кемеровская область	
г. Гурьевск	54°17'00" N, 85°56'00" E
д. Дмитриевка	54°28'10" N, 85°19'42" E
пос. Белогорск	55°01'04" N, 88°29'23" E
д. Алаево	56°09'08" N, 84°54'00" E

(«СибЭнзим», г. Новосибирск), по 5 пмоль праймеров LCO1490 и HCO2198, 20 нг геномной ДНК и деионизованную воду до объема 15 мкл. Амплификацию проводили в программируемом термоциклере Bio-Rad® S1000™ Thermal Cycler (США). Условия амплификации: первичная денатурация ДНК – 3 мин при 95 °С, затем 35 циклов, включающих три этапа: 1 мин при 94 °С, 1 мин при 55 °С, 1,5 мин при 72 °С; финальная достройка цепей – 7 мин при 72 °С.

Нуклеотидные последовательности участка гена COI определяли для 1–6 особей каждого вида комаров в прямом и обратном направлении. Секвенирование проводили на приборе 3130 Genetic Analyzer с использованием BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, США). Всего были получены нуклеотидные последовательности протяженностью 538 п.н. для 68 образцов (15 видов комаров рода *Aedes* и рода *Ochlerotatus*, собранных на территории Томской и Кемеровской областей). В анализ также были включены 57 последовательностей 14 видов рода *Aedes* и рода *Ochlerotatus* из базы данных ДНК (GenBank). Каждый вид суммарно был представлен 1–23 последовательностями мтДНК (табл. 2).

Для редактирования нуклеотидных последовательностей применяли программу Sequencing Analysis 5.2 (Applied Biosystems, США) и SeqMan™ II (DNASTAR Inc). Выравнивание последовательностей проводили с помощью программы ClustalW (Higgins *et al.*, 1996). Для построения схем филогенетических связей использовались пакеты программ NETWORK 4.6.0.0. и MEGA5 (Bandelt *et al.*, 1999; Tamura *et al.*, 2011).

## РЕЗУЛЬТАТЫ

При анализе морфологических признаков личинок комаров было определено 12 видов рода *Ochlerotatus* и 3 вида рода *Aedes* (табл. 2). Для 8 представителей рода *Ochlerotatus* было выявлено перекрывание видоспецифичных признаков *Och. cantans* и *Och. annulipes*, и поэтому для них было введено обозначение *Och. cantans/annulipes*. Эти особи были поделены на 4 «морфологические группы»: 1) личинки с морфологическими признаками *Och. cantans* – жабры одной длины с седлом или длиннее; стиг-

Таблица 2

Образцы нуклеотидных последовательностей видов комаров родов *Aedes* и *Ochlerotatus*

Вид	Образцы ДНК	n
<i>Och. excrucians</i> Walker, 1856	T	12
	GB	11
<i>Och. cantans / annulipes</i> Meigen, 1818 / Meigen, 1830	T	8
	GB	1
<i>Och. cantans</i>	GB	1
<i>Och. annulipes</i>	GB	1
<i>Och. euedes</i> Howard, Dyar et Knab, 1913	T	5
	GB	4
<i>Och. behningi</i> Martini, 1926	T	5
<i>Och. cyprius</i> Ludlow, 1920	K	2
<i>Och. riparius</i> Dyar et Knab, 1907	GB	3
<i>Och. cataphylla</i> Dyar, 1916	T	2
	GB	3
<i>Och. pullatus</i> Coquilett, 1904	GB	4
<i>Och. pionips</i> Dyar, 1919	K	2
<i>Och. caspius</i> Pallas, 1771	T	1
	GB	3
<i>Och. dorsalis</i> Meigen, 1830	T	3
	GB	8
<i>Och. intrudens</i> Dyar, 1919	T	5
	GB	2
<i>Och. diantaeus</i> Howard, Dyar et Knab, 1917	T	6
	GB	2
<i>Och. communis</i> De Geer, 1776	T	4
	GB	7
<i>Och. punctor</i> Kirby, 1837	T	7
<i>Ae. vexans</i> Meigen, 1830	T	5
	GB	4
<i>Ae. cinereus</i> Meigen, 1818	GB	4
<i>Ae. rossicus</i> Dolbeshkin, Gorickaja et Mitrofanova, 1930	T	1
Всего		125

Примечание. Т – Томская область; К – Кемеровская область; GB – GenBank.

мальная пластинка с характерным по строению задним отростком рычага: между основаниями направленных назад боковых ветвей имеется в различной степени развитая срединная ветвь в форме продолговатого листка (чаще слаборазвитая); передний клапан сильнее развит в длину, чем у других видов (рис. 1, а, б); 2) личинки с морфологическими признаками *Och. annulipes* –

жабры немного короче седла, стигмальная пластинка с двухраздельным задним отростком рычага обычного для рода строения (рис. 1, б, г); 3) личинки, совмещающие черты обоих видов, – жабры немного короче седла, стигмальная пластинка характерного для *Och. cantans* строения (рис. 1, б, в); 4) особи с длинными жабрами и стигмальной пластинкой обычного для рода строения (рис. 1, а, г). Сравнение нуклеотидных последовательностей исследуемого региона мтДНК показало отсутствие связи между «морфогруппой» и вариантом последовательности мтДНК.

Таким образом, для выделяемых нами образцов *Och. cantans/annulipes* наблюдается несоответствие морфологических и генетических критериев идентичности.

Для оценки генетической дивергенции применяли двухпараметрическую модель Кимуры

(K2P). Внутривидовые различия составили в среднем 0,6 % (0–1,6 %), что превышает соответствующие средние значения для мотыльков и птиц – 0,3 % (Hebert *et al.*, 2003а, 2004) и комаров из КНР – 0,4 % (Wang *et al.*, 2012) и сопоставимы с результатами, полученными для канадских комаров – 0,6 % (Cywinska *et al.*, 2006). Различия между видами в пределах одного рода в среднем составили 7,8 % (0,8–13,1 %), между видами разных родов – 14,3 % (9,7–17,6 %). Для четырех пар видов (3,7 % от общего числа попарных сравнений видов в пределах одного рода) выявленные различия оказались меньше 2 %: *Och. excrucians* и *Och. cantans / annulipes* (0,8 %), *Och. pullatus* и *Och. pionips* (1,1 %), *Och. caspius* и *Och. dorsalis* (1,6 %), *Och. intrudens* и *Och. diantaeus* (0,9 %). В то же время наблюдается значительная внутривидовая изменчивость у *Och. euedes* и *Ae. vexans* (1,6 и

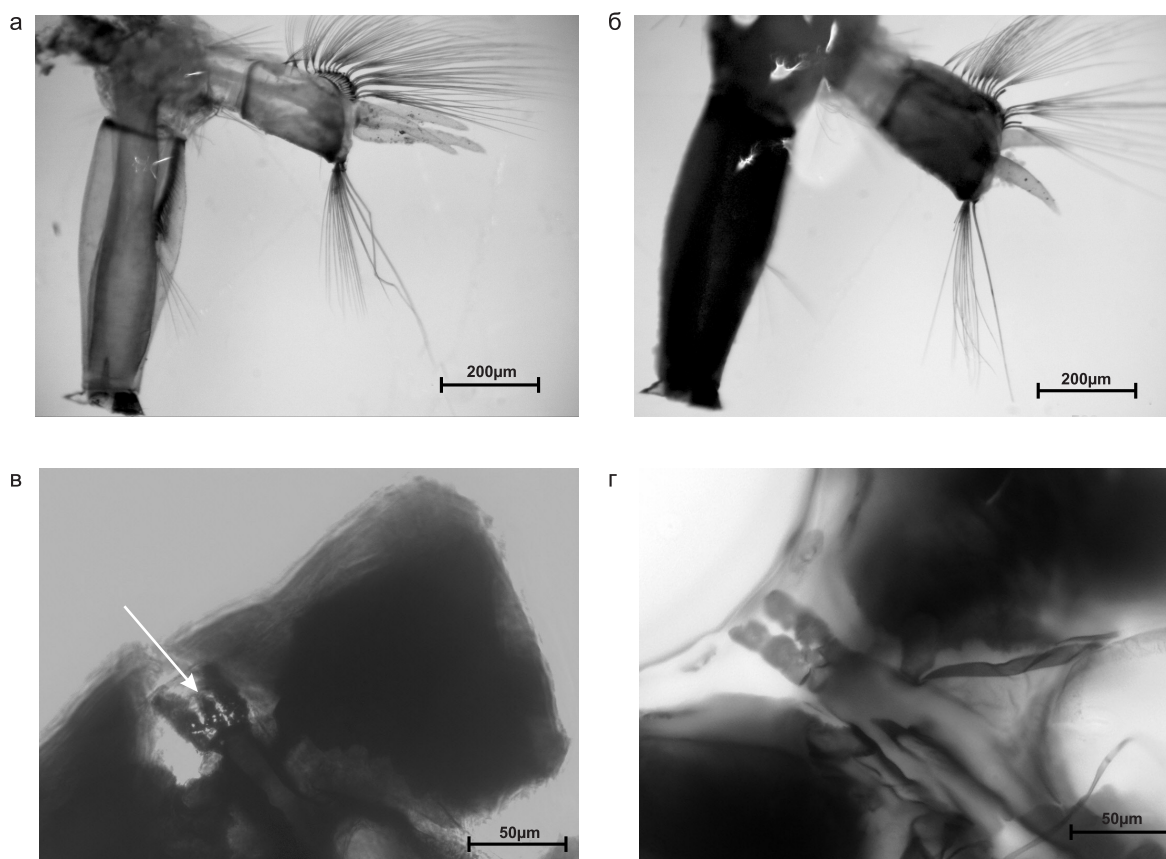


Рис. 1. Хвостовая часть личинки IV возраста и задний отросток рычага стигмальной пластинки.

а – жабры равны длине седла или длиннее; б – жабры короче седла; в – двухраздельный задний отросток рычага со срединной ветвью в форме продолговатого листка между основаниями направленных назад боковых ветвей (лепесток обозначен стрелкой); г – двухраздельный задний отросток рычага обычного для рода строения.



1,4 % соответственно), однако эти значения не превышают пороговые уровни, принятые для внутривидовой дивергенции.

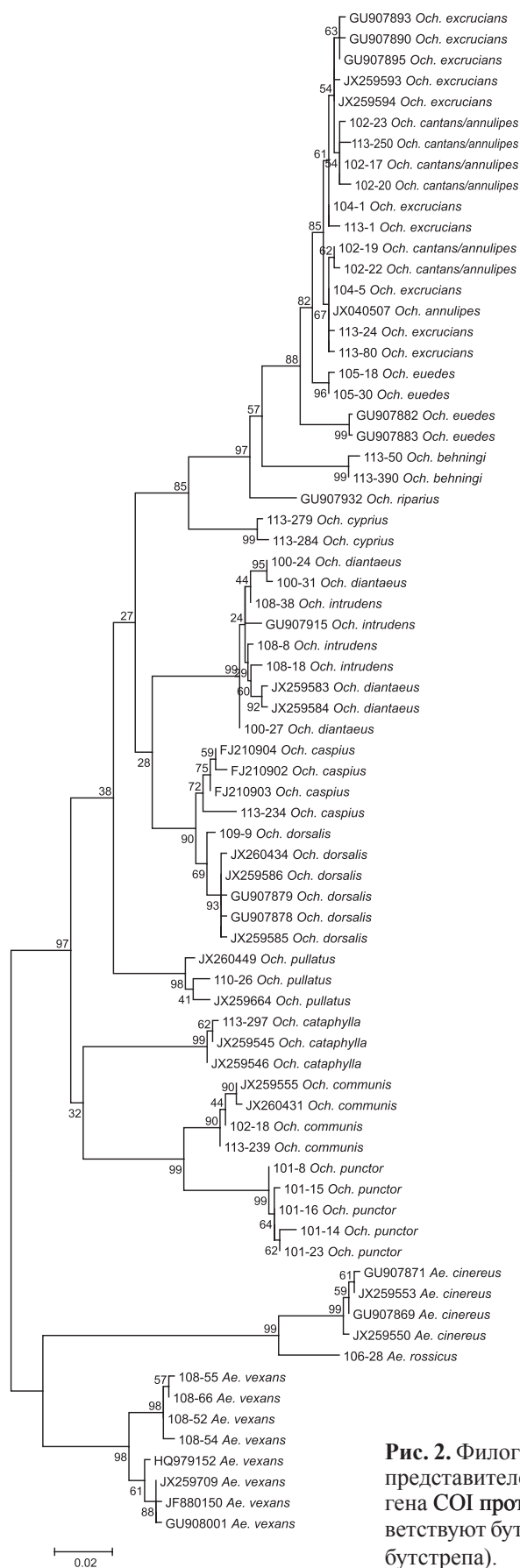
В связи с тем, что многие изученные нами нуклеотидные последовательности участка гена COI особей одного вида являются идентичными, для построения филогенетического дерева из набора одинаковых последовательностей, относящихся к одному виду, оставляли только одну последовательность. Последовательность из базы данных, относящаяся к виду *Och. cantans*, не полностью перекрывается с другими, поэтому мы исключили ее из построения филогенетического дерева, но включили в построение медианной сети (рис. 4.) Филогенетическое дерево изученных представителей родов *Aedes* и *Ochlerotatus* приведено на рис. 2. Большинство особей одного вида группируются вместе, независимо от источника последовательностей. Явное разделение кластеров наблюдается в пределах двух видов – *Och. euedes* и *Ae. vexans*. Нуклеотидные последовательности особей *Och. euedes*, полученные в ходе наших исследований, и нуклеотидные последовательности, взятые из GenBank, распределяются по разным кластерам. То же характерно и для особей вида *Ae. vexans*.

## ОБСУЖДЕНИЕ

Эффективная ДНК-система видовой идентификации должна соответствовать трем основным условиям: 1) возможность получения из любого организма участка ДНК, выбранного в качестве маркерного; 2) простота анализа данных секвенирования; 3) информативность маркерной последовательности должна быть достаточной для видовой идентификации (Cywinska *et al.*, 2006). В то же время наши исследования показали, что эти условия не выполняются в полной мере для участка митохондриального гена COI, который принят в качестве стандартного для системы штрихкодирования. Согласно нашим данным, нижняя граница межвидовых различий не соответствует пороговым значениям. В системе штрихкодирования порогом внутри- и межвидовых различий служит уровень дивергенции 2 %. Однако 4 пары видов (*Och. excrucians* и *Och. cantans/annulipes*, *Och. pullatus* и *Och. pionips*,

*Och. caspius* и *Och. dorsalis*, *Och. diantaeus* и *Och. intrudens*) невозможно дискриминировать с помощью баркодинга. В этих случаях виды имеют очень близкие или перекрывающиеся выявленные наборы вариантов фрагмента гена COI (рис. 2–4). Усредненные внутри этих пар видов значения меры генетического расстояния K2P имели значения от 0,7 до 1,6 %. В этих группах видов размах внутривидовой изменчивости оказывался сравнимым или же превышал среднее значение межвидовой дифференциации. В паре видов *Och. diantaeus/Och. intrudens* особей разных видов, но с идентичными вариантами мтДНК нами не выявлено, в то же время наборы замен, характерных для этих видов, настолько плотно перекрываются, что можно прогнозировать выявление особей с одинаковой последовательностью ДНК, используемой для баркодинга, но относящихся к разным видам. Аналогичная ситуация прослеживается для группы образцов *Och. excrucians*, *Och. cantans*, *Och. annulipes* и *Och. cantans/annulipes* (рис. 4). Группы образцов *Och. excrucians* и *Och. cantans/annulipes* «пересекаются» на медианной сети. Примечательно, что образец *Och. annulipes* оказался идентичным одному из образцов *Och. excrucians*. Подобная картина перекрывания изменчивости по мтДНК была отмечена ранее для групп видов-двойников рода *Anopheles* (Thelwell *et al.*, 2000; Michel *et al.*, 2005). Невозможность разделения с помощью анализа последовательности COI показана для пары близкородственных индийских видов рода *Ochlerotatus* – *Och. portonovoensis* и *Och. wardi* (Kumar *et al.*, 2007). Таким образом, отсутствие дифференциации по COI для изученных нами групп близких видов *Ochlerotatus* является интересным, но не уникальным результатом. В то же время в отличие от групп видов-двойников *Anopheles* морфологический критерий, как правило, эффективен для разделения видов *Ochlerotatus* неразличимых с помощью баркодинга.

Несмотря на то что для ряда видов *Ochlerotatus* характерны близкие или перекрывающиеся наборы вариантов фрагмента гена COI, морфологические критерии для определения этих видов на личиночной стадии являются надежными. Так, личинки *Och. excrucians* очень хорошо отличаются от других исследованных нами видов строением стигмальной пластинки – расстояние между вершинами задних клапанов

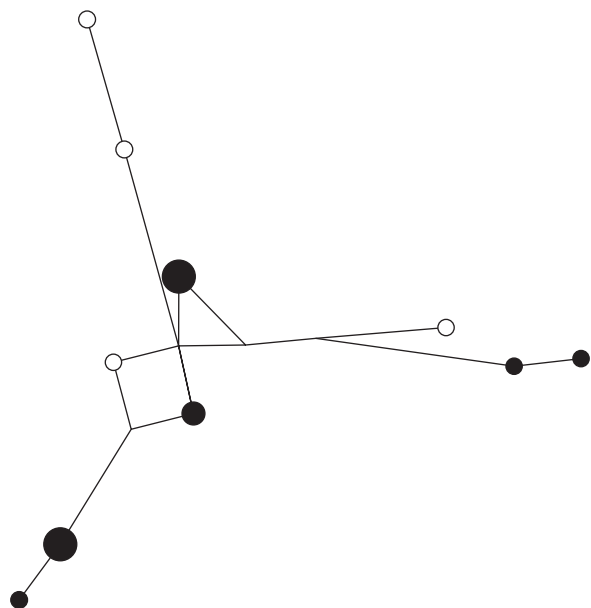


значительно превышает продольный диаметр пластинки; на вершинах задних клапанов имеются крючковидно изогнутые и утолщенные волоски. *Och. pullatus* и *Och. pionips* различаются длиной и толщиной антенн головы. У *Och. caspius* сифональный пучок состоит из 5–10 ветвей и лежит за серединой дыхательной трубки, тогда как у *Och. dorsalis* пучок из 3–5 (редко больше) ветвей и располагается у середины дыхательной трубки. *Och. diantaeus* можно легко отличить от других видов невооруженным глазом – длина его усиков превышает длину головы.

В ходе работы нами выявлена явная дивергенция между последовательностями ДНК по гену COI *Och. euedes*, полученными от особей, собранных нами в Томской области, с одной стороны, и последовательностями ДНК *Och. euedes* США и Канады (взятыми из GenBank). Аналогичная картина прослеживается и для вида *Ae. vexans*. Возможными причинами расхождения групп изучаемых последовательностей могут служить либо ошибочная идентификация, либо существование истинной дивергенции внутри этих видов, т. е. наличие подвидов или видов-сиблингов. В Сибири отмечено присутствие обоих подвидов *Ae. vexans* – *Ae. v. vexans* и *Ae. v. nipponii*, которые отличаются по морфологическим признакам имаго, тогда как личинки их неразличимы (Гуцевич и др., 1970). В то же время для форм *Ae. v. vexans* и *Ae. v. nipponii* выявлена идентичность штрихкодов (Cywinska *et al.*, 2006). Для выяснения истинной причины внутривидовой изменчивости *Ae. vexans* необходимо проведение дополнительных исследований с использованием морфологического анализа имаго. Что касается *Och. euedes*, то личинки этого вида, обитающие в Томской области, обладают характерными морфологическими чертами и без труда определяются.

Также следует отметить, что вид *Ae. rossicus* по участку гена COI значительно отличается от вида *Ae. cinereus* (GenBank) (4,6%); *Ae. rossicus* был впервые описан в 1930 г. в качестве само-

**Рис. 2.** Филогенетическое дерево максимального правдоподобия для представителей родов *Aedes* и *Ochlerotatus*, построенное по участку гена COI протяженностью 538 п.н. Числа в основаниях ветвей соответствуют бутстреп-оценкам в процентах (проведено 1000 итеграций бутстрепа).



**Рис. 3.** Медианная сеть по участку гена COI образцов видов *Och. intrudens* (белый) и *Och. diantaeus* (черный). Размер кружков пропорционален числу образцов с соответствующей последовательностью ДНК.

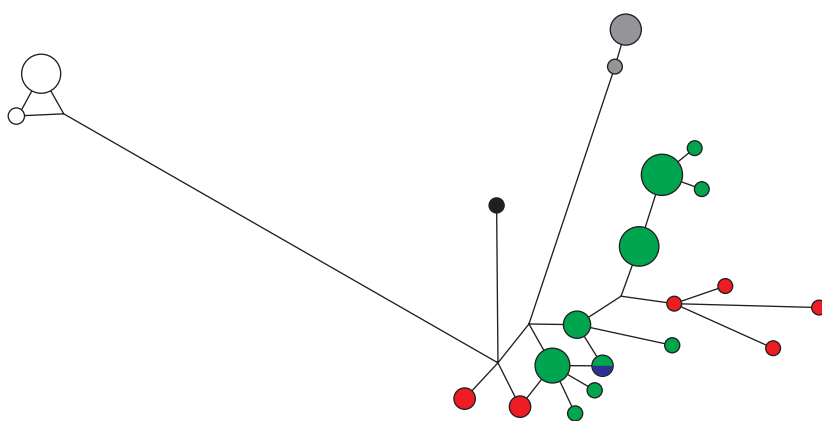
стоятельного вида (Долбешкин и др., 1930). Позже некоторые отечественные авторы рассматривали *Ae. rossicus* как подвид *Ae. cinereus* (Гуцевич и др., 1970; Гуцевич, Дубицкий, 1981). Если в основном томе «Каталога комаров мира» (Knight, Stone, 1977) *Ae. rossicus* рассматривался в качестве вида, то во втором приложении к «Каталогу комаров мира» (Ward, 1984) его статус

был понижен до подвидового. Р.М. Горностаева приходит к выводу о том, что *Ae. rossicus* – самостоятельный вид (Горностаева, 2000, 2005; Gornostaeva, 2003, 2004). Результаты нашего исследования являются дополнительным подтверждением видового статуса *Ae. rossicus*.

В дальнейшем особое внимание следует уделить вопросу видовой идентификации и дивергенции *Och. cantans* и *Och. annulipes*, так как на данном этапе исследований как морфологический, так и молекулярно-генетический анализы свидетельствуют о возможности гибридизации или существовании переходных форм.

В ряде случаев точная видовая идентификация комаров оказывается затруднительной, так как для некоторых видов четкие диагностические признаки выявлены либо только для личиночной, либо только для имагинальной стадий развития. Это обуславливает необходимость включения имаго видов *Ochlerotatus* в комплекс дальнейших морфологических и молекулярно-генетических исследований.

Хотя метод ДНК-штрихкодирования в последнее время и получил широкое распространение, однако его использование для целей видовой диагностики комаров не является абсолютно надежным. Нами показано, что для ряда видов, хорошо различимых по морфологии, тем не менее, межвидовые различия по участку гена COI могут (1) не соответствовать пороговым значениям, принятым в системе



**Рис. 4.** Медианная сеть по последовательности ДНК фрагмента гена COI некоторых видов рода *Ochlerotatus*. Размер кружков пропорционален числу образцов с соответствующим вариантом последовательности ДНК.

Обозначения: серый цвет – *Och. euedes*, собранные нами в Томской и Кемеровской областях; белый – последовательности *Och. euedes*, представленные в базе данных и собранные в Северной Америке; черный – *Och. cantans*; зеленый – *Och. excrucians*; синий – *Och. annulipes*; красный – ДНК образцов, промежуточных по морфологии между *Och. cantans* и *Och. annulipes*.

штрихкодирования, или (2) даже в ряде случаев наблюдаются «перекрывания» спектра изменчивости у близких видов. Следовательно, интерпретацию результатов ДНК-штрихкодирования необходимо проводить с осторожностью, учитывая и сопоставляя данные молекулярной генетики и морфологии.

Авторы выражают искреннюю признательность А.В. Симаковой и А.Т. Колесникову за помощь в сборе материала. Авторы благодарны И.К. Захарову за ценные замечания, сделанные при подготовке рукописи статьи.

Работа выполнена при финансовой поддержке грантов РФФИ (№ 12-04-90826-МОЛ\_РФ\_НР; № 12-04-31964-МОЛ\_А), гранта Министерства образования РФ (№ 4.5612.2011) и Программы фундаментальных исследований Президиума РАН «Живая природа: современное состояние и проблемы развития» № 30.30.

## ЛИТЕРАТУРА

- Бачевская Л.Т., Переверзева В.В. Внутривидовой полиморфизм фрагмента гена цитохрома b митохондриальной ДНК кеты (*Oncorhynchus keta* Walbaum) из рек восточной Камчатки и северного побережья Охотского моря // Информ. вестник ВОГиС. 2010. Т. 14. № 3. С. 537–545.
- Воронова Н.В., Курченко В.П., Буга С.В. Подбор молекулярно-генетических маркеров для видовой диагностики тлей и построения филогенетических систем // Тр. Белорус. гос. ун-та. Сер. Физиологические, биохимические и молекулярные основы функционирования биосистем. 2011. Т. 6. Ч. 1. С. 181–192.
- Горностаева Р.М. Список комаров (сем. Culicidae) европейской части России // Паразитология. 2000. Т. 34. Вып. 5. С. 428–434.
- Горностаева Р.М. К ревизии комаров подрода *Aedes* (Diptera: Culicidae) Палеарктики // Паразитология. 2005. Т. 39. Вып. 6. С. 457–507.
- Гуцевич А.В., Дубицкий А.М. Новые виды комаров фауны Советского Союза // Паразитол. Сб. 1981. Т. 30. С. 97–165.
- Гуцевич А.И., Мончадский А.С., Штакельберг А.А. Комары семейства Culicidae // Фауна СССР. Насекомые двукрылые. Л.: Наука, 1970. Т. 3. Вып. 4. 384 с.
- Долбешкин Б.И., Горицкая В.В., Митрофанова Ю.Г. Описание нового вида рода *Aedes* (in sp.) из Восточной Европы // Паразитол. Сб. Зоол. музея АН СССР. 1930. Т. 1. С. 253–260.
- Полуконова Н.В., Дёмин А.Г., Мюге Н.С., Шайкевич Е.В. Сравнение *Chironomus usenicus* и *Ch. curabilis* с видами группы *plumosus* (Diptera) по гену митохондриальной ДНК COI и рисунку дисков политенных хромосом // Генетика. 2009. Т. 45. № 8. С. 1029–1035.
- Удалов М.Б., Беньковская Г.В. Популяционная генетика колорадского жука: от генотипа до фенотипа // Вавилов. журн. генет. и селекции. 2011. Т. 15. № 1. С. 156–172.
- Храброва Н.В., Сибатаев А.К., Стегний В.Н. Молекулярно-генетические маркеры для идентификации представителей комплекса *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) // Матер. I Всерос. совещ. по кровососущим насекомым. СПб.: ЗИН РАН, 2006. С. 211–213.
- 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.
- Bandelt H.-J., Forster P., Röhl A. Median-Joining Networks for Inferring Intraspecific Phylogenies // Mol. Biol. Evol. 1999. V. 16. No. 1. P. 37–48.
- 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 Papua New Guinea // Insect Mol. Biol. 2001. V. 10. No. 5. P. 407–413.
- Cooper R.D., Waterson D.G.E., Frances S.P. et al. Speciation and distribution of the members of the *Anopheles punctulatus* (Diptera: Culicidae) group in Papua New Guinea // J. Med. Entomol. 2002. V. 39. P. 16–27.
- Cywinska A., Hunter F.F., Hebert P.D.N. Identifying Canadian mosquito species through DNA barcodes // Med. Vet. Entomol. 2006. V. 20. P. 413–424.
- Edwards F.W. Genera Insectorum. Diptera, Family Culicidae. Fascicle 194. Brussels: Desmet-Verteneuil, 1932.
- Folmer M., Black W., Hoeh R. et al. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates // Mol. Marine Biol. Biotechnol. 1994. V. 3. No. 5. P. 294–299.
- Gibson C.M., Kao R.H., Blevins K.K., Travers P.D. Integrative taxonomy for continental-scale terrestrial insect observations // PLoS ONE. 2012. V. 7. No. 5. e37528. doi:10.1371/journal.pone.0037528.
- Gornostaeva R.M. The status taxa of subgenus *Aedes* (Diptera: Culicidae: *Aedes*): *Ae. cinereus* Meigen, 1818, *Ae. esoensis* Yamada, 1921, *Ae. rossicus* Dolbeshkin, Gorickaja, and Mitrofanova, 1930, *Ae. geminus* Peus, 1970. I. Overview // Eur. Mosq. Bull. 2003. No. 15. P. 22–26.
- Gornostaeva R.M. The status taxa of subgenus *Aedes* (Diptera: Culicidae: *Aedes*): *Ae. cinereus* Meigen, 1818, *Ae. esoensis* Yamada, 1921, *Ae. rossicus* Dolbeshkin, Gorickaja, and Mitrofanova, 1930, *Ae. geminus* Peus, 1970. II. Illustrations // Eur. Mosq. Bull. 2004. No. 18. P. 20–30.
- Goswami G., Raghavendra K., Nanda N. et al. 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) // Acta Tropica. 2005. V. 95. P. 92–99.
- Harbach R.E., Kitching I.J. Phylogeny and classification of the Culicidae (Diptera) // Syst. Entomol. 1998. V. 23. P. 327–370.
- Hebert P.D.N., Cywinska A., Ball S., deWaard J.R. Biological identifications through DNA barcodes // Proc. Roy. Soc. Lond. 2003a. Series B. V. 270. P. 313–321.
- Hebert P.D.N., Ratnasingham S., deWaard J.R. Barcoding animal life: CO1 divergences among closely allied spe-



- cies // Proc. Roy. Soc. Lond. 2003b. Series B. V. 270. P. 596–599.
- Hebert P.D.N., Stoeckle M.Y., Zemplak T.S., Francis C.M. Identification of birds through DNA barcodes // Public Library Sci. Biol. 2004. V. 2. P. 1657–1663.
- Higgins D.G., Thompson J.D., Gibson T.J. Using CLUSTAL for multiple sequence alignments // Methods Enzymol. 1996. V. 266. P. 383–402.
- Kampen H. Integration of *Anopheles beklemishevi* (Diptera: Culicidae) in a PCR assay diagnostic for palaeartic *Anopheles maculipennis* sibling species // Parasitol. Res. 2005. V. 97. P. 113–117.
- Kent R.J., West A.J., Norris D.E. Molecular differentiation of colonized human malaria vectors by 28S ribosomal DNA polymorphism // Amer. J. of Tropical Medicine and Hygiene. 2004. V. 71. P. 514–517.
- Kimura M. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences // J. Mol. Evol. 1980. V. 16. P. 111–120.
- Knight K.L., Stone A. A catalog of the mosquitoes of the world (Diptera: Culicidae). 2nd ed. The Thomas Say Foundation. 1977. V. 6. P. 70–72.
- Krzywinski J., Besansky N.J. Molecular systematics of *Anopheles*: from subgenera to subpopulations // Annu. Rev. Entomol. 2003. V. 48. P. 111–139.
- Kumar N.P., Rajavel A. R., Natarajan R., Jambulingam P. // J. Med. Entomol. 2007. V. 44(1). P. 1–7.
- Laboudi M., Faraj Ch., Sadak A. DNA barcodes confirm the presence of a single member of the *Anopheles maculipennis* group in Morocco and Algeria: *An. sicaultii* conspecific with *An. labranchiae* // Acta Tropica. 2011. V. 118. P. 6–13.
- Marrelli M.T., Floeter-Winter L.M., Malafronte R.S. et al. Amazonian malaria vector anopheline relationships interpreted from ITS2 rDNA sequences // Med. Vet. Entomol. 2005. V. 19. P. 208–218.
- 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.
- Smith J.L., Fonseca D.M. Rapid assays for identification of members of the *Culex (Culex) pipiens* complex, their hybrids, and other sibling species (Diptera: Culicidae) // Am. J. Tropical Med. Hygiene. 2004. V. 70. P. 339–345.
- Tamura K., Peterson D., Peterson N. et al. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods // Mol. Biol. Evol. 2011. V. 28. No. 10. P. 2731–2739.
- Thelwell N.J., Huisman R.A., Harbach R.E. et al. Evidence for mitochondrial introgression between *Anopheles bwambae* and *Anopheles gambiae* // Insect Mol. Biol. 2000. V. 9. No. 2. P. 203–210.
- Van Bortel W., Trung H.D., Manh N.D. et al. Identification of two species within the *Anopheles minimus* complex in northern Vietnam and their behavioural divergences // Tropical Med. Intern. Health. 1999. V. 4. P. 257–265.
- Wang G., Li C., Guo X. et al. Identifying the main mosquito species in China based on DNA barcoding // PLoS ONE. 2012. V. 7. No. 10. e47051. doi:10.1371/journal.pone.0047051
- Ward R.A. Second supplement to a catalog of the mosquitoes of the world (Diptera: Culicidae) // Mosq. Syst. 1984. V. 16. No. 3. 233 p.
- Zavortink T.J. Classical taxonomy of mosquitoes – a memorial to John N. Belkin // J. Am. Mosquito Control Assoc. 1990. V. 6. P. 593–599.

## VARIABILITY OF MITOCHONDRIAL CYTOCHROME OXYDASE SUBUNIT I GENE SEQUENCE IN SPECIES OF THE GENERA *Aedes* AND *Ochlerotatus* (DIPTERA: CULICIDAE)

N.V. Khrabrova<sup>1</sup>, Yu.V. Andreeva<sup>1</sup>, O.V. Vaulin<sup>2</sup>, S.S. Alekseeva<sup>1</sup>, A.K. Sibataev<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Research Institute of Biology and Biophysics, Tomsk State University, Tomsk, Russia, e-mail: khrabrova@yandex.ru;

<sup>2</sup> Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia

### Summary

Sequence variation in the 538-bp fragment from the 5' end of the COI region was analyzed to test its usefulness in the identification of 15 mosquito species of the genera *Aedes* and *Ochlerotatus* (Diptera: Culicidae) from Tomsk and Kemerovo regions and 14 species from GenBank. The divergences between congeneric species averaged 7,8 % (from 0,7 to 13,1 %), whereas those for conspecific individuals averaged 0,57 % (0 to 1,6 %). The sequences for four species pairs (3,7 %) showed < 2 % divergence. In most cases, individuals of a single species grouped closely together, but deeper divergences were detected in two species (*Och. euedes* and *Ae. vexans*).

**Key words:** *Aedes*, *Ochlerotatus*, COI, barcoding, phylogeny, divergence.