

БИОЛОГИЧЕСКИЕ НАУКИ

Ученые записки Таврического национального университета им. В. И. Вернадского

Серия «Биология, химия». Том 27 (66). 2014. № 4. С. 3-11.

УДК 575.174.015.3

К ВОПРОСУ О ГЕНЕТИЧЕСКОМ ПОЛИМОРФИЗМЕ ВИДОВ-ДВОЙНИКОВ МАЛЯРИЙНЫХ КОМАРОВ КОМПЛЕКСА *ANOPHELES MACULIPENNIS* В КРЫМУ

Артова М.А., Разумейко В.Н., Симчук А.П.

Таврический национальный университет им. В.И. Вернадского, Симферополь, Россия
E-mail: razumeiko@gmail.com

Рассмотрены методы определения генетического полиморфизма малярийных комаров комплекса *Anopheles maculipennis*. Осуществлён подбор случайных ДНК маркеров методом RAPD-PCR. Проведена идентификация видов-двойников комплекса *An. maculipennis* методом PCR-RFLP с применением второго внутреннего транскрибируемого спейсера кластера рибосомных генов ITS2. Проведена эндонуклеазная рестрикция ПЦР продукта *CfoI* (*HhaI*).

Ключевые слова: генетический полиморфизм, ДНК маркеры, PCR-RFLP, внутренний транскрибируемый спейсер (ITS2), эндонуклеаза *CfoI*, *Anopheles maculipennis*.

ВВЕДЕНИЕ

Общеизвестно, что малярийные комары являются переносчиками возбудителей арбовирусных инфекций, в том числе и малярийного плазмодия. По данным Глобального Фонда по борьбе со СПИД, малярией и туберкулёзом, ежегодно от малярии погибают около 2,6 миллиона человек, из которых 75 % – дети в возрасте менее 5-ти лет. В Крыму отмечено 6 видов малярийных комаров, 3 из которых принадлежат комплексу *Anopheles maculipennis* (Meigen, 1818), включающему виды-двойники *A. m. maculipennis* Meigen, *A. m. atroparvus* van Thiel и *A. m. messeae* Falleroni [1]. Их распределение на полуострове неравномерное, что объясняется приуроченностью их к определенным территориям.

Морфологическая идентификация видов комплекса *A. maculipennis* проводится по окраске экзохориона яйца и морфологии яиц, что приводит к ряду неточностей при промежуточных вариантах окраски и схожести морфологии яиц (*A. maculipennis*, *A. atroparvus*). Цитогенетические методы также не всегда применимы для идентификации, например, у гомосеквентных видов невозможно проанализировать видовую структуру политенных хромосом. Методы молекулярно-генетической идентификации в исследованиях видов-двойников комплексов рода *Anopheles* последнее время всё более популярны, так как они позволяют надёжно и

быстро устанавливать видовую принадлежность [2-3]. На территории Крыма молекулярно-генетические исследования видовой принадлежности малярийных комаров ранее не проводились.

Цель работы – анализ популяционно-видовой генетической дифференциации видов-двойников комплекса *Anopheles maculipennis* на территории Крыма методами RAPD-PCR и PCR-RFLP анализа с подбором оптимальных ДНК маркеров и идентификацией видов-двойников комплекса *A. maculipennis*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалом для молекулярно-генетических исследований послужили личинки III-IV стадии развития комаров комплекса *A. maculipennis*, отловленные в анофелогенных водоемах Крыма в 2014 г в посёлках Курганное, Ишунь, Мирное, Калиновка, Красногорка и Останино Крымского полуострова.

Используемые методы анализа: метод RAPD-PCR (случайная амплификация полиморфной ДНК, Random Amplification of Polymorphic DNA) и метод PCR-RFLP (полиморфизм длин рестрикционных фрагментов, Restriction Fragment Length Polymorphism). RAPD-PCR проводили в реакционной смеси (25 мкл) на термоциклере «Терцик» (ДНК-Технология, Россия) с использованием реактивов для полимеразной цепной реакции GenePak™ PCR Universal (ИзоГен, Москва) с праймерами, комплементарными 3'-концу гена 5,8S рРНК и 5'-концу гена 28S рРНК и фланкирующими область второго внутреннего транскрибируемого спейсера кластера рибосомных генов для комаров комплекса *A. maculipennis*. Амплификацию проводили в режиме: 1 цикл денатурации 98 °С в течение 3 мин и последующие 35 циклов по схеме: денатурация – 95 °С (20 сек), отжиг – 36 °С (20 сек), полимеризация – 72 °С (40 сек). Терминальную стадию синтеза проводили при 72 °С – 7 мин. Отжиг для праймеров 5,8S и 28S проводили при $t = 500$ °С.

Видовую идентификацию комаров комплекса *A. maculipennis* проводили методом PCR-RFLP на основании различий в паттернах рестрикции. Полученные ПЦР-продукты обрабатывали эндонуклеазой рестрикции *CfoI* (*HhaI*) (Promega Corporation, USA). Для этого 10 мкл ПЦР продукта смешивали с 2мкл 10х буферного раствора для рестриктазы *CfoI* и 10 ед рестриктазы. Смесь инкубировали при 37 °С в течение 5-7 мин, затем производили визуализацию результатов методом горизонтального электрофореза в 2,5 % агарозном геле (1,8 %) с использованием трис-борат-ЭДТА буфера.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Подбор случайных молекулярно-генетических (ДНК) маркеров

На первом этапе исследования для выявления методом RAPD-PCR генетического полиморфизма видов-двойников как основы для сравнительного генетического анализа произвели подбор случайных ДНК-маркеров, представляющих уникальную последовательность ДНК. Были использованы образцы ДНК, выделенные из 10 личинок вида *A. maculipennis*.

В итоге из 30-ти праймеров (длиной 10 пар нуклеотидов) случайным методом было отобрано 9, из которых выбрали праймеры с 3 и более четкими ампликонами (дисками)

на электрофореграмме. Из 6 праймеров с видимыми ампликонами отобраны два: № 38 (CCGCCCACTG), № 42 (GGGATATCGC). Для идентификации размеров ампликонов использовали DNA-markers M 100 (ИзоГен, Москва) с длиной фрагментов 100-1000 пар нуклеотидов.

При использовании праймера № 38 получено 17 продуктов амплификации (дисков) (Табл. 1.). Диск f (размер 0.6 тысяч пар нуклеотидов – тыс.п.н), диск n (размер 0.15 тыс. п.н.) и диск l (размер 0.3 тыс. п.н.) отмечены у 60 % отобранных личинок комаров, диск k (размер 0.35 тыс. п.н.) отмечен у 80 % экземпляров. Остальные фрагменты отмечены у половины и меньше экземпляров *A. maculipennis*. Соответственно, фрагменты f, n, l и k праймера № 38 были признаны наиболее перспективными для выявления генетического полиморфизма *A. maculipennis*.

Таблица 1

RAPD-фрагменты, полученные в результате исследования праймеров № 38 и № 42 на образцах ДНК из 10 личинок вида *A. maculipennis*

Ампликоны	Длина праймера № 38 (тыс. пар нукл.)	Встречаемость праймера № 38 (%)	Длина праймера № 42 (тыс.пар нукл.)	Встречаемость праймера № 42 (%)
p	0.10	50	0.15	70
o	0.13	30	0.20	50
n	0.15	60	0.22	40
m	0.22	50	0.25	30
l	0.30	60	0.30	60
k	0.35	80	0.33	20
j	0.40	40	0.35	70
i	0.45	50	0.40	100
h	0.50	50	0.45	40
g	0.52	40	0.50	80
f	0.60	60	0.55	50
e	0.67	20	0.60	60
d	0.70	20	0.75	20
c	0.80	20	0.80	20
b	0.90	30	0.90	80
a	0.95	30	1,00	70

При использовании праймера № 42 получено также 17 дисков (Табл. 1.). У 60 % отобранных личинок комаров на электрофореграмме зарегистрированы диск e (размер 0.6 тыс. п.н.) и диск l (размер 0.3 тыс. п.н.). Диск a (размер 1.0 тыс. п.н.), диск j (размер 0.35 тыс. п.н.) и диск p (размер 0.15 тыс. п.н.) отмечены у 70 % личинок, диск b (размер 0.9 тыс. п.н.) и диск g (размер 0.5 тыс. п.н.) зарегистрированы у 80 % личинок *A. maculipennis*. Диск i (размер 0.4 тыс. п.н.) обнаружен у всех отобранных личинок малярийных комаров. Соответственно, диск i может быть наиболее перспективным для изучения генетического полиморфизма при использовании праймера № 42. Наряду с

ним, в индикации полиморфизма возможно использовать фрагменты e, l, a, j, p, b и g.

На основе литературных источников были отобраны 3 ДНК-маркера, наиболее точно отражающие полиморфизм малярийных комаров комплексов *A. gambiae* и *A. arabiensis* [4]. Было решено использовать данные маркеры для изучения полиморфизма малярийных комаров комплекса *A. maculipennis* в Крыму. Последовательность праймера № 1 – 5'-CTGCTGGGAC-3', праймера № 2 – 5'-GAAACGGGTG-3', праймера № 3 – 5'-TCACGATGCA-3'.

Таблица 2

Ампликоны (диски на электрофореграмме), выделенные из праймеров № 1-3

Ампликоны праймера № 1	Длина (пар нукл.)	Ампликоны праймера № 2	Длина (пар нукл.)	Ампликоны праймера № 3	Длина (пар нукл.)
a	600	a	650	a	720
b	450	b	580	b	610
c	350	c	430	c	500
d	300	d	400	d	370
e	220	e	320	e	250
f	180	f	280	f	200
		e	210		
		h	150		

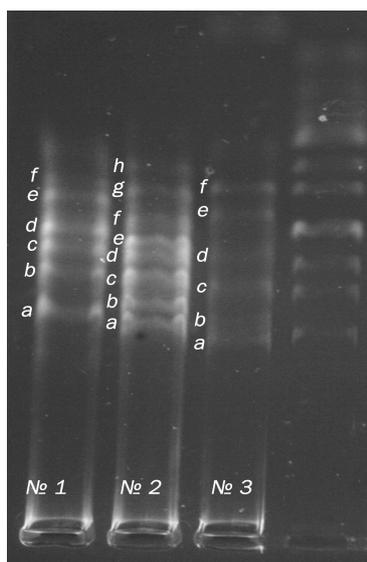


Рис. 1. Разделение дисков на электрофореграмме, полученные при изучении праймеров № 1, № 2, № 3.

При исследовании праймеров № 1, № 2 и № 3 было получено от 6 до 8 видимых ампликонов (Табл. 2.; Рис. 1.), с помощью которых возможно выявление внутривидовых и межпопуляционных различий комаров комплекса *A. maculipennis*.

Видовая идентификация малярийных комаров комплекса *A. maculipennis* с использованием маркера области ITS2.

При использовании молекулярно-генетического подхода для идентификации спорных видов и видов-двойников комплексов малярийных комаров маркерами могут служить внутренние транскрибируемые спейсеры ITS, разделяющие тандемно повторенные 18S-, 5.8S-, 28S- подобные гены в кластере рибосомной ДНК. Был разработан молекулярный ключ с использованием первичной структуры области второго внутреннего транскрибируемого спейсера (ITS2) для идентификации видов комплекса *A. maculipennis*, обитающих в России и сопредельных территориях [5]. Для более точной видовой идентификации малярийных комаров комплекса использовали метод ПЦР с изучением полиморфизма длин рестрикционных фрагментов генома.

Для проведения видовой диагностики были выделены образцы ДНК с 30 личинок малярийных комаров комплекса *A. maculipennis*, отловленных в различных водоемах центральной и северной части степного Крыма.

Были использованы праймер 5,8S с последовательностью 5'-TGT GAA CTG CAG GAC ACA TG-3' и праймер 28S с последовательностью 5'- ATG CTT AAA TTT AGG GGG TA-3'. Указанные праймеры в процессе амплификации способны ограничивать (фланкировать) область второго внутреннего транскрибируемого спейсера кластера рибосомных генов ITS2 и тем самым являются ДНК маркерами, способными идентифицировать принадлежность видов-двойников к комплексу.

Была проведена ПЦР с праймерами, комплементарными 3'-концу гена 5,8S рРНК и 5'-концу гена 28S рРНК и фланкирующими область второго внутреннего транскрибируемого спейсера кластера рибосомных генов. Для амплификации данной области генома комаров комплекса *A. maculipennis* были использованы праймеры 5,8S и 28S. Для определения принадлежности комаров к комплексу *A. maculipennis* проанализировали размер второго внутреннего транскрибируемого спейсера кластера рибосомных генов (ITS2). Размер продукта амплификации, полученного в результате ПЦР с праймерами 5,8S и 28S, составляет около 450 п.н. (Рис. 2.).

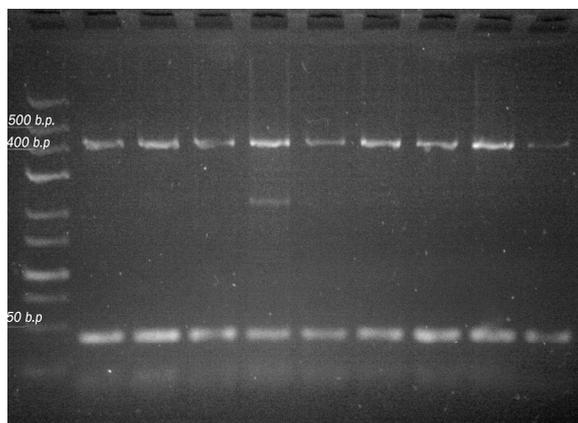


Рис. 2. Электрофоретическое фракционирование транскрибируемого спейсера ITS2 ПЦР-продуктов.

Полученные данные подтверждают гипотезу [3] о подобии молекулярного ключа для идентификации видов комплекса *A. maculipennis* по наличию специфичного ампликона с размером около 450 п.н. в средней полосе России и соседних географических регионах, коим и является Крымский полуостров. Ампликоны размером около 50 п.н не стоит считать специфическими для данного комплекса, и вполне вероятно, что их появление связано с условиями проведения амплификации. Таким образом, доказана возможность использования специфических ДНК-маркеров 5,8S и 28S с анализом размера транскрибируемого спейсера ITS2 для эффективной идентификации принадлежности к комплексу *A. maculipennis*.

Видовая идентификация комаров комплекса *A. maculipennis* методом PCR-RFLP на основании различий длин рестрикционных фрагментов

Идентификация видов комплекса *A. maculipennis* (*A. atroparvus*, *A. maculipennis*, *A. messeae*) непосредственно после реакции амплификации с праймерами 5,8S и 28S затруднена из-за сходства размеров ПЦР-продуктов. Поэтому идентификацию видов осуществляли во время проведения рестрикции ПЦР продукта с использованием эндонуклеазы *CfoI* (*HhaI*). Анализ полученных фрагментов рестрикции с использованием литературных данных [5] позволяют достаточно четко идентифицировать вышеуказанные виды (Рис. 3.)

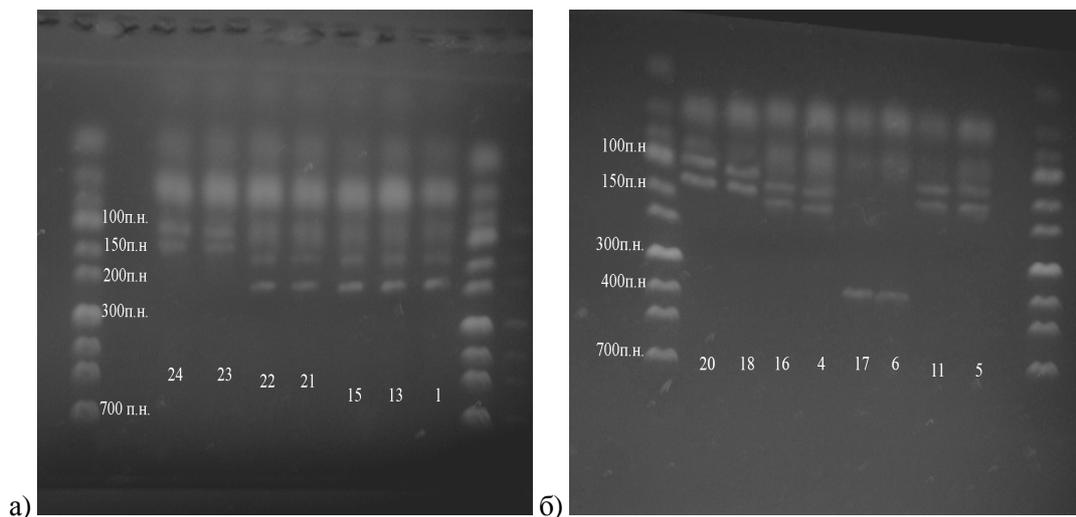


Рис. 3. Электрофоретическое фракционирование ПЦР-фрагментов рестрикции: а) 1, 13, 15 – *A. maculipennis*; б) 6, 17 – *A. atroparvus*; а-б) 23, 24, 5, 11, 4, 16, 18, 20 – *A. messeae*.

Общеизвестно, что мутационную изменчивость сайтов рестрикции можно легко зафиксировать по определению разности длины рестрикционных фрагментов ДНК во время гибридизации со специфическими ДНК-зондами. Результаты замера размеров фрагментов рестрикции эндонуклеазы *CfoI* у личинок комплекса *A. maculipennis* представлены в таблице 3.

Таблица 3.

Размер фрагментов рестрикции ДНК

Вид	Длина фрагментов рестрикции (п.н.)					
	100	120	140	150	200	390
<i>A. maculipennis</i>	+		+		+	
<i>A. atroparvus</i>						+
<i>A. messeae</i>		+		+		

Размеры рестрикционных фрагментов по методу PCR-RFLP помогли установить видовой состав малярийных комаров в полевых сборах. В водных биотопах Керченского полуострова обнаружены все три вида комплекса *A. maculipennis*, указанные ранее нами в литературных источниках [1]. Личинки малярийного комара *A. maculipennis* отмечены на полузатопленных болотистых участках Останинских плавней, богатых водной растительностью, в районе Самарлинского водохранилища. Вблизи посёлка Калиновка во временных водотоках обнаружены личинки *A. messeae*. Данные виды приурочены к пресноводным водоёмам, где создают множественные биотопы. Для малярийного комара *A. atroparvus* характерно заселение водоёмов с небольшой степенью минерализации, что также подтверждено находками личинок этого вида в солоноватых водотоках со слабым течением вблизи села Красная горка.

Наиболее массовый в Крыму малярийный комар *A. maculipennis* также был найден в водоёмах предгорной части Крыма. В частности, отбор материала для ДНК-анализа произвели в водоёмах близ посёлка Мирное, Симферопольский район.

Результаты генетических исследований свидетельствуют о наличии в степной части Крымского полуострова биотопов выхлода малярийного комара *A. messeae*. В частности, ДНК-идентификация комаров показала наличие этого вида в Раздольненском и Джанкойском районах. Личинки *A. messeae* отмечены в рисовых чеках вблизи села Курганное, на участках сбросного канала вблизи села Ишунь и в рукаве Северо-Крымского канала недалеко от г. Джанкой. Отмечено также снижение количества водных участков, заселяемых комарами в связи со снижением объёмов орошения и уменьшением количества воды в степном Крыму.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. При анализе генетического полиморфизма малярийных комаров комплекса *A. maculipennis* были подобраны и изучены случайные ДНК-маркеры длиной 10 пар нуклеотидов. Наиболее оптимальными из них являются праймеры № 1, № 2 и № 3 с 6-8 ампликонами. Для генетических исследований комплекса *A. maculipennis* был использован праймер № 42 с 17 ампликонами, 8 из которых отмечены более чем у 50% изученных особей.
2. Анализ размеров второго внутреннего транскрибируемого спейсера кластера рибосомных генов (ITS2) с помощью специфических праймеров 5,8S и 28S показал возможность определения с его помощью видовой принадлежности к комплексу *A. maculipennis*. Для точного ДНК-анализа был получен продукт амплификации

длиной 450 п.н., что подтверждает генетическое сходство фауны малярийных комаров Крыма и средней полосы России.

3. Применение метода PCR-RFLP с помощью рестрикции ПЦР продукта с использованием эндонуклеазы *CfoI* (*HhaI*) для идентификации видов двойников комплекса *Anopheles maculipennis* позволило определить распределение видов по территории Крыма. На Керченском полуострове были зарегистрированы все три вида комплекса *A. maculipennis*, к степной части Крыма приурочен *A. messeae*, к предгорной зоне Крыма – *A. maculipennis*. Условия вылова данных видов определяют специфические ландшафты и разнообразие характерных водоёмов в каждой зоне.

Благодарности. Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта по конкурсу p_юг_a № 14-44-01607.

Список литературы

1. Разумейко В. Н. Особенности распределения кровососущих комаров комплекса *Anopheles* в бассейне реки Салгир / В.Н. Разумейко, А.В. Ивашов // Экосистемы, их оптимизация и охрана (темат. сб. науч. тр.). – 2011. – Вып. 4. (23). – С. 78–83.
2. Гордеев М. И. Молекулярно-генетический анализ малярийных комаров комплекса *Anopheles maculipennis* (Diptera, Culicidae) Азербайджана / М.И. Гордеев, О.В. Безжонова, И.И. Горячева [и др.] // Медицинская паразитология и паразитарные болезни. – 2010. – Вып. 4. – С. 43–45.
3. Кешишьян А. Генетический анализ малярийных комаров комплекса *Anopheles maculipennis* (Diptera, Culicidae) Армении / А. Кешишьян, М.И. Гордеев, О.В. Безжонова [и др.] // Медицинская паразитология и паразитарные болезни. – 2009. – Вып. 3. – С. 24–28.
4. Wilkerson R.C. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers readily distinguish cryptic mosquito species (Diptera: Culicidae: *Anopheles*) / R.C. Wilkerson, T.J. Parsons, D.G. Albright, T.A. Klein, M.J. Braun // *Insect Molecular Biology* (1993). – 1(4). – P. 205-211.
5. Безжонова О.В. Комплексы видов кровососущих комаров рода *Anopheles* (Diptera, Culicidae) России и ближнего зарубежья / О.В. Безжонова // Автореф. дис. канд. биол. наук. – М.: МГУ им. Ломоносова, 2011. – 24 с.

ON THE PROBLEM OF THE GENETIC POLYMORPHISM OF SIBLING SPECIES OF MALARIA MOSQUITO *ANOPHELES MACULIPENNIS* COMPLEX IN CRIMEA

Artova M. A., Razumeiko V. N., Simchuk A. P.

*Taurida National V.I. Vernadsky University, Simferopol, Crimea Republic, Russia
E-mail: razumeiko@gmail.com*

The analysis of population-specific genetic differentiation of sibling species from the *Anopheles maculipennis* complex in Crimea was carried out using RAPD-PCR and PCR-RFLP methods. Nine primers were used and two of them were selected due to the most distinct amplification (electrophoregram disks): #38 (CCGCCCACTG) and #42 (GGGATATCGC). DNA-markers M 100 (IzoGen, Moscow) with lengths of 100-1000 bp were used to identify the size of the amplicons. Thirty four DNA fragments were totally

obtained using the primers selected. Fragments f, n, l and k (primer #38) and fragment i (primer #42) were the most promising for the detection of genetic polymorphisms in *A. maculipennis*. Next tree primers were selected in accordance to World-wide literature. They are: #1 – 5'-CTGCTGGGAC-3', #2 - 5'-GAAACGGGTG-3', #3 - 5'-TCACGATGCA -3'. Their application to the *A. maculipennis* complex allowed obtaining 6-8 visible amplicons.

Species identification of sibling species from the *A. maculipennis* complex was also carried out using molecular key based on the primary structure of the area of the second internal transcribed spacer (ITS2). For more accurate species identification of *Anopheles* mosquitoes we used PCR with the study of restriction fragment length polymorphism of the genome. There were used primers 5,8S (5'-TGT GAA CTG CAG GAC ACA TG-3') and 28S (5'- ATG CTT AAA TTT AGG GGG TA-3'). These DNA markers when amplifying can flank region ITS2, which is important for the identification of sibling species belonging to the complex. PCR was carried out with primers complementary to the 3'-end of the 5,8S rRNA gene and to the 5' end of the 28S rRNA gene and there was defined the size of flanking regions of ITS2 ribosomal gene cluster. The size of the amplification product obtained by PCR with primers 5,8S and 28S was approximately 450 bp.

Identification of species from the *A. maculipennis* complex (*A. atroparvus*, *A. maculipennis*, *A. messeae*) is difficult directly after the amplification reaction with the primers and 28S 5,8S due to close sizes of the PCR products. Nonetheless PCR-RFLP method helped to establish the species composition of *Anopheles* mosquitoes in field collections. *A. maculipennis* and *A. messeae* larvae confined to freshwater ponds in the Kerch Peninsula, *A. atroparvus* larvae inhabit salted water bodies. The results of genetic studies suggest the presence of the *A. messeae* breeding mosquitoes in the steppe part of Crimea habitat. It was also noted reduction of water areas populated by mosquitoes due to lower volumes of irrigation and reducing the amount of water in the steppe Crimea.

Keywords: genetic polymorphism, DNA markers, PCR-RFLP, the internal transcribed spacer (ITS2), endonuclease *CfoI*, *Anopheles maculipennis*.

References

1. Razumeiko V.N., Ivashov A.V. Features of distribution of mosquitoes *Anopheles* complex river basin Salgir, *Ecosystems, their optimization and security*, **4** (23), 78-83 (2011).
2. Gordeev M.I., Bezzhonova O.V., Goryachev I. et al. Molecular genetic analysis of complex malaria mosquito *Anopheles maculipennis* (Diptera, Culicidae) Azerbaijan *Medical Parasitology and parasitic diseases*. **4**, 43-45 (2010).
3. Keshishyan A.A., Gordeev M.I., Bezzhonova O.V. et al. Genetic analysis of complex malaria mosquito *Anopheles maculipennis* (Diptera, Culicidae) RA, *Medical Parasitology and Parasitic Diseases*, **3**, 24-28 (2009).
4. Wilkerson R.C., Parsons T.J., Albright D.G., Klein T.A. and Braun M.J. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers readily distinguish cryptic mosquito species (Diptera: Culicidae: *Anopheles*), *Insect Molecular Biology*, **1** (4), 205-211 (1993).
5. Bezzhonova O.V. Complex of species of mosquitoes genus *Anopheles* (Diptera, Culicidae) in Russia and CIS, *thesis of the candidate of biological sciences*, MSU University, 24 p (2011).

Поступила в редакцию 28.10.2014 г.