

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ИДЕНТИФИКАЦИЯ КОМАРОВ ГРУППЫ CULEX PIPIENS (DIPTERA: CULICIDAE) МЕТОДОМ RAPD-АНАЛИЗА

© 2005 г. Н. В. Храброва, А. К. Сибатаев, В. Н. Стегний

Представлено академиком В.К. Шумным 29.07.2004 г.

Поступило 29.07.2004 г.

Culex pipiens L., 1758 – северный обыкновенный комар, имеет две формы или экотипа, *pipiens* и *molestus*, для которых характерно симпатрическое распространение, небольшие морфологические и значительные биологические различия [13]. Морфологические различия в основном количественного характера, что затрудняет их определение, особенно в симпатрических популяциях. Многие признаки, отмеченные в ранних работах как диагностические, в настоящее время считаются неудовлетворительными для этих целей из-за значительной индивидуальной и межпопуляционной вариации [3]. Формы достаточно четко различаются по комплексу эколого-физиологических признаков [2–4], в то же время единственным достоянным морфологическим различием на личиночной стадии является величина сифонального индекса (отношение длины сифона к его ширине) [2]. У *pipiens* его значение больше (около 5), чем у *molestus* (около 4); для гибридов характерно промежуточное значение этого признака [1]. Биологические различия настолько очевидны, что некоторые авторы рассматривают автогенную форму в качестве самостоятельного вида *C. molestus* [5, 6], другие, напротив, считают *pipiens* и *molestus* формами одного вида, а различия между ними – только физиологической изменчивостью [2, 7], третьи авторы – подвидами или полувидами [3, 8].

В данной работе впервые найден способ генетической идентификации эпидемически опасного городского комара *C. molestus* с помощью RAPD-метода.

В работе использовали ДНК, выделенную из отдельных особей *pipiens* (четыре выборки) и *molestus* (две выборки), собранных в г. Томске, Томской области и Республике Казахстан в июне-сентябре 2003г. Объем каждой выборки составлял 48 особей. ДНК получали, используя набор для

выделения ДНК на стеклянном носителе (ООО “Лаборатория МЕДИГЕН”, г. Новосибирск) по методике, прилагаемой к набору. Скринингу подвергались 26 десятинуклеотидных случайных праймеров из наборов А, В, F, M (“Operon Technologies”, США, синтезированные фирмой “INTEGRATED DNA TECHNOLOGIES”, США). Реакционная смесь содержала однократный ПЦР-буфер (60 мМ трис-НСl, 1.5 мМ MgCl₂, 25 мМ KCl, 10 мМ 2-меркаптоэтанол, 0.1%-ный Тритон X-100), 1 мМ MgCl₂, 200 мМ каждого dNTP, 1 ед. Taq ДНК-полимеразы (“СибЭнзим”, г. Новосибирск), 15 нг праймера, 20 нг геномной ДНК и деионизованную воду до объема 25 мкл. Амплификацию проводили в программируемом термоциклере Eppendorf®Mastercycler®personal (Германия). Условия амплификации: первичная денатурация ДНК 3 мин при 94°C, затем 45 циклов, включающих три этапа: 15 с при 94°C, 30 с при 35°C, 1 мин при 72°C; финальная достройка цепей – 5 мин при 72°C. Продукты амплификации разделяли в 1.5%-ном агарозном геле в однократном ТАЕ-буфере (0.04М трис-ацетат, 0.002М ЭДТА) при напряжении 60 В в течение трех часов, окрашивали бромистым этидием (1 мкг/мл), визуализировали в ультрафиолетовом свете и фотодокументировали. Приблизительную оценку размеров фрагментов ДНК осуществляли относительно 1 kb ДНК-маркёра (“СибЭнзим”, г. Новосибирск).

После первичного скрининга двадцати шести RAPD-праймеров были отобраны три праймера (ОРА-09, ОРВ-02 и ОРМ-08), которые амплифицировали потенциальные специфичные фрагменты ДНК (бэнды), способные идентифицировать формы *pipiens* и *molestus*. Дополнительный анализ на большем числе особей показал, что маркерные бэнды, амплифицирующиеся праймерами ОРА-09 и ОРМ-08, не являются таковыми, так как проявляют внутри- (праймер ОРМ-08) или межпопуляционную (праймер ОРА-09) изменчивость. Фрагменты ДНК, размером около 1200 п.н. и около 2250 п.н., полученные в результате амплификации с праймером ОРВ-02 (5'-TGATCCCTGC-3'), рассматриваются нами в качестве специфичных для идентификации *pipiens* и *molestus*, со-

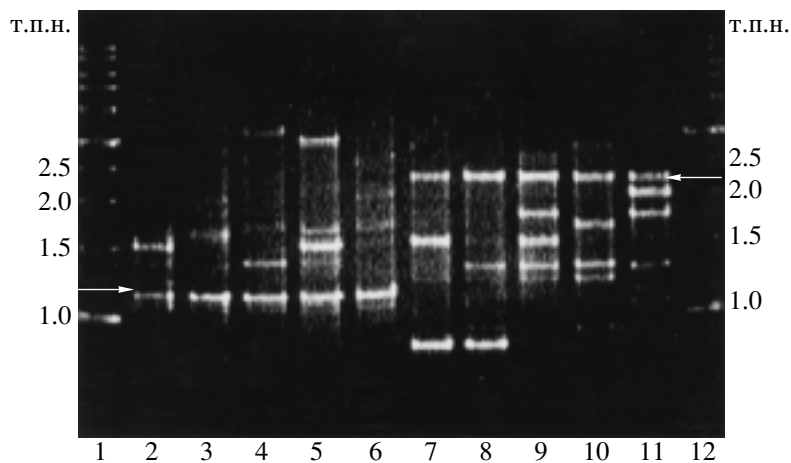


Рис. 1. Специфичные фрагменты ДНК, идентифицирующие формы *ripiens* (дорожки 2–6) и *molestus* (дорожки 7–11), размером около 1200 п.н. и около 2250 п.н. соответственно (отмечены стрелками), полученные при амплификации с RAPD-праймером ОРВ-02. Дорожки 1, 12 – 1kb ДНК-маркёр.

ответственно (рис. 1). Эти бэнды являются мономорфными, т.е. не проявляют индивидуальной и географической изменчивости. Кроме того, они достаточно яркие и четкие, что исключает двусмысленную интерпретацию результатов амплификации. Амплификация проводилась трижды, во всех случаях были получены идентичные результаты, что подтверждает их достоверность.

Таким образом, можно с уверенностью говорить о возможности использования RAPD-маркёров в качестве дополнительного критерия для определения *ripiens* и *molestus* в природных популяциях. Эти маркёры также могут оказаться полезными при анализе гибридогенеза, который до сих пор остается малоизученным. Поэтому в дальнейшем планируется изучить наследование этих маркеров у гибридов между формами *ripiens* и *molestus* в разных системах скрещивания, а также провести поиск аналогичных молекулярных маркеров для других представителей рода *Culex*.

Авторы выражают признательность Брагинец О.П., которая любезно предоставила RAPD-праймеры, использованные в работе.

Работа финансировалась грантом НШ-15.2003.4.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Виноградова Е.Б.* // Энтومол. обозрение. 1961. Т. 40. № 1. С. 63–73.
2. *Виноградова Е.Б.* Комары комплекса *Culex ripiens* в России (таксономия, распространение, экология, физиология, генетика, практическое значение и контроль). СПб.: Зоол. ин-т РАН, 1997. 307 с.
3. *Лопатин О.Е.* // Сбир. экол. журн. 2000. № 4. С. 461–475.
4. *Byrne K., Nichols R.A.* // Heredity. 1999. V. 82. P. 7–15.
5. *Miles S.J.* Austral. J. Zool. 1977. V. 25. P. 491–498.
6. *Miles S.J., Patterson H.E.* // Mosquito Syst. 1979. V. 11. P. 187–202.
7. *Harbach R.E., Harrison B.A., Gad A.M.* // Proc. Entomol. Soc. Wash. 1984. V. 86. P. 521–542.
8. *Bullini L.* // Parasitologia. 1982. V. 27. P. 1–11.