

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации
НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ТОМСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ (НИ ТГУ)
Биологический институт
Кафедра генетики и клеточной биологии

ДОПУСТИТЬ К ПРЕДСТАВЛЕНИЮ ГЭК

Руководитель ООП
д-р биол. наук, доцент
 Д.С. Воробьев
« 07 » июня 2021 г.

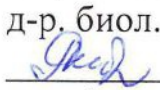
НАУЧНЫЙ ДОКЛАД

об основных результатах подготовленной научно – квалификационной
работы (диссертации)

МОЛЕКУЛЯРНЫЙ И ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ЧЕТЫРЕХ
ПОДРОДОВ КОМАРОВ РОДА Aedes (DIPTERA: CULICIDAE)

по основной образовательной программе подготовки научно-педагогических
кадров в аспирантуре
направление подготовки 06.06.01 – Биологические науки

Алексеева Светлана Сергеевна

Научный руководитель
д-р. биол. наук, профессор
 А.К. Сибатаев
подпись

« 07 » июня 2021 г.

Автор работы
аспирант
 С.С. Алексеева
подпись

Работа выполнена на базе Федерального государственного автономного образовательного учреждения «Национальный исследовательский Томский государственный университет» в лаборатории эволюционной цитогенетики научно-исследовательского института биологии и биофизики кафедры генетики и клеточной биологии

Научный руководитель:

Сибатаев Ануарбек Каримович
д.б.н., профессор каф.
сельскохозяйственной биологии

Рецензент:

Усов Константин Евгеньевич
к.б.н., доцент каф. генетики и клеточной
биологии

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность. Мировая фауна семейства кровососущих комаров (*Culicidae*), относящихся к отряду двукрылых (*Diptera*), насчитывает 3664 вида (Халин А.В., 2011). Ареал их обитания включает все континенты, кроме Антарктиды. Комары рода *Aedes*, родовое название которых было предложено Мейгеном (Meigen, 1818), относятся к трибе *Aedini*, семейству *Culicidae* (Meigen, 1818), отряду *Diptera* и имеют большое эпидемиологическое и значение. Большинство кровососущих комаров, включая род *Aedes*, являются переносчиками различных заболеваний человека и животных, в связи с чем возникает необходимость их исследования. Наиболее опасными для человека видами являются малярийные комары рода *Anopheles* и не малярийные комары рода *Aedes*, относящиеся к подсемействам *Anophelinae* и *Culicinae* соответственно. На территории России обитает 12 видов малярийных комаров (Горностаева Р.М. и др., 2003) и около 40 видов немалярийных (Боголюбов А.С. и др., 2018), включая 21 вид комаров рода *Aedes* (Meigen, 1818) в Томской области (Andreeva et al., 2017), которые идентифицируются на основании морфологических данных. В настоящее время в различных регионах мира все чаще обнаруживаются инвазивные виды комаров рода *Aedes*, что может способствовать возникновению вспышек заболеваний в несвойственных им регионах, следовательно, возникает необходимость постоянного мониторинга и точной идентификации видового состава (Schaffner et al., 2013; Medlock et al., 2015; Ibañez-Justicia et al., 2017; Metzger et al., 2017; Kalan et al. 2014; Kalan et al., 2017; Montarsi et al., 2013, Andreeva et al., 2021). Комары рода *Aedes* достаточно хорошо изучены по морфологическим видовым признакам имаго и личинок (Гуцевич А.В. др., 1970; Andreeva et al., 2017), однако их классификация неоднократно менялась, повышались и понижались таксономические ранги видов, родов, подродов (Reinert et al., 2006; Reinert et al., 2008; Wilkerson et. al., 2015). Молекулярный и цитогенетический анализы вносят существенный вклад

в изучение близкородственных видов, обитающих на определенной территории, играют важную роль в изучении видового состава, таксономического статуса видов и родов, а также необходимы при изучении эволюционных процессов, происходящих внутри таксонов. У комаров рода *Aedes* анализ поличенных хромосом является затруднительным, в связи с этим для цитогенетического анализа видового состава были выбраны метафазные хромосомы имагинальных дисков (Кабанова и Карташова, 1972; Choochote, 2001; Sharakhova, 2011).

Т.о., для мониторинга видового состава, изучения близкородственных видов и поиска дополнительных методов видовой идентификации были поставлены следующие задачи и цель исследования.

Цель работы: провести молекулярный и цитогенетический анализ комаров рода *Aedes*

Для достижения цели были поставлены следующие **задачи:**

1. Провести сравнительный анализ близкородственных видов комаров рода *Aedes* на основе последовательностей гена COI митохондриальной ДНК
2. Провести сравнительный цитогенетический анализ метафазных хромосом имагинальных дисков у ряда видов комаров рода *Aedes*
3. Изучить локализацию 18S рДНК у представителей подродов *Aedes*, *Finlaya* и *Ochlerotatus* рода *Aedes* и групп «cantans» и «communis» подрода *Ochlerotatus*

Научная новизна. В результате проведения данного исследования впервые изучены и описаны кариотипы представителей четырех подродов комаров рода *Aedes* (*Diptera: Culicidae*), построены идиограммы на основании С- и DAPI окрашиваний, определена локализация рДНК на хромосомах, изучено родство этих видов по митохондриальному гену COI. Кариотипический анализ выявил внутривидовую изменчивость длин хромосом у комаров рода *Aedes*.

Хромосомный бэндинг по С- и DAPI- окраскам также показал видовую специфичность у всех изученных видов. Различия между видами были обнаружены и в локализации 18S рДНК. Полученные результаты говорят о пригодности цитогенетического анализа, как дополнительного метода видовой идентификации, а также в комплексе с молекулярным анализом появляется возможность изучения эволюции и филогении этих видов.

Теоретическая и практическая значимость. Полученные результаты носят как фундаментальный, так и прикладной характер. Впервые получены данные по кариотипированию, а также исследовано филогенетическое родство некоторых видов комаров рода *Aedes*. Изучение видового состава комаров различными методами дает возможность достоверно исследовать видовой состав, оценивать уровень эпидемиологической обстановки на определенной территории, а также изучать эволюционные аспекты представителей данного рода и их филогенетические взаимоотношения.

Полученные в данном исследовании результаты, могут быть использованы для мониторинга видов на территории Западной Сибири, контроля эпидемиологической обстановки, а также могут быть использованы в дальнейших исследованиях таксономии и эволюции видов комаров рода *Aedes*.

Положения, выносимые на защиту:

1. Филогенетически близкие виды рода *Aedes* сложно различимы по митохондриальному гену субъединицы I цитохромоксидазы *c* (COI), в связи с чем, ген COI не является идеальным маркером для оценки генетического расстояния у видов рода *Aedes*.

2. Кариотипы представителей рода *Aedes* имеют видовую специфику по длине хромосом и хромосомному бэндингу. Цитогенетический анализ может использоваться в качестве дополнительного метода видовой идентификации, и изучения эволюции комаров рода *Aedes*.

3. Гены 18S рРНК имеют различную локализацию у видов внутри подродов рода *Aedes*, содержат рибосомальные гены в разных хромосомах, а также отличаются по количеству локусов 18S рДНК на геном.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Методология и организация работы

Материалом для работы послужили личинки четвертого возраста комаров рода *Aedes*, собранные на территории Томской и Кемеровской областей (Западная Сибирь) и на территории Южного Казахстана (Алма-Ата). Всего исследованы представители 19 видов из четырех подродов рода *Aedes* (*Aedes*, *Ochlerotatus*, *Aedimorphus*, *Finlaya*). Личинок фиксировали в растворе Карнуа для цитогенетического анализа и в 96% этаноле – для молекулярного анализа.

Методика проведения молекулярного анализа митохондриального гена субъединицы 1 цитохромоксидазы *c*. Выделение ДНК проводили при помощи набора Invisorb® Spin DNA Extraction Kit (Invitek, Германия) по методике, прилагаемой к набору. Для проведения ПЦР 5'-части гена COI использовали праймеры: LCO1490 и HCO2198. Амплификацию проводили в программируемом термоциклере Bio-Rad® S1000™ Thermal Cycler (США). Секвенирование проводили на приборе 3130 Genetic Analyzer с использованием BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, США).

Методика приготовления хромосомных препаратов из имагинальных дисков личинок. Для цитогенетического анализа были приготовлены суховоздушные препараты с применением жидкого азота. Лакто-ацето-орсеиновое окрашивание проводили на препаратах, полученных непосредственно из фиксированных личинок. С-дифференциальное окрашивание было проведено по протоколу Самнера (Sumner, 1972). Для получения DAPI бэндинга использовались суховоздушные препараты, окрашенные красителем DAPI. Для проведения флуоресцентной *in situ*

гибридизации (FISH) локусов 18S рДНК был получен зонд из геномной ДНК. Гибридизация предобработанных препаратов с зондом проходила в гибридизаторе ThermoBrite model S500-2 на протяжении 14 – 18 часов, после чего препараты анализировались на флуоресцентном микроскопе

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

По результатам изучения комаров рода *Aedes* на основании митохондриального гена цитохромоксидазы с субъединицы 1 можно сделать следующее заключение:

- Изменчивость внутри родов представителей рода *Aedes* составила в среднем 0,6%, межвидовая в пределах одного подрода – 7,8%, между видами разных подродов – 14,3%.

- Изменчивость по гену COI у видов *Ae. (Och.) intrudens* и *Ae.(Och.) diantaeus* составила 0,9 %, *Ae. (Ochlerotatus) excrucians* и *Ae. (Ochlerotatus) cantans/annulipes* – 0,8%, у *Ae. (Och.) caspius* и *Ae.(Och.) dorsalis* 1,6 %.

Уровнем внутри- и межвидовых различий служит уровень дивергенции 2%. Данные показатели ниже 2%, т.е. их идентификация с помощью баркодинга является затруднительной

- У видов *Ae.(Och.) euedes* и *Ae. vexans* выявлена высокая внутривидовая изменчивость, которая равна 1,6 и 1,4 % соответственно, однако эти значения не превышают пороговые уровни внутривидовой дивергенции.

- *Ae. rossicus* значительно отличается от *Ae.cinereus* по гену COI, подтверждая свой видовой статус.

Результатом цитогенетического анализа является следующее:

Впервые описаны кариотипы 8 видов комаров рода *Aedes* (*Aedes excrucians*, *Ae. behningi*, *Ae. euedes*, *Aedes communis*, *Ae. punctor*, *Ae. intrudens*, *Ae. rossicus* и *Ae. koreicus*). Вычислена относительная длина хромосом и центомерный индекс,

в результате чего было установлено, что все хромосомы изученных видов являются метацентрическими (табл.1)

Таблица 1. Числовая характеристика хромосом восьми видов комаров рода *Aedes*. L_r , % – относительная длина хромосом; J_c , % – центромерный индекс

Виды	Хромосомы					
	1		2		3	
	L_r , %	J_c , %	L_r , %	J_c , %	L_r , %	J_c , %
<i>Ae. behningi</i>	24	50	38	50	37,7	49
<i>Ae. excrucians</i>	26	48	39	45	35	49
<i>Ae. euedes</i>	24	50	37	45	38	51
<i>Ae. communis</i>	24	48	40	45	35	47
<i>Ae. punctator</i>	27	51	39	54	34	51
<i>Ae. intrudens</i>	25	48	40	53	36	48
<i>Ae. rossicus</i>	27	49	38	45	35	45
<i>Ae. koreicus</i>	25	49	39	48	36	49

Для визуализации и измерения хромосом они были окрашены лакто-ацето-орсеином (рис.1), где была обнаружена закономерность в распределении лакто-ацето-орсеиновых паттернов на хромосоме 1.

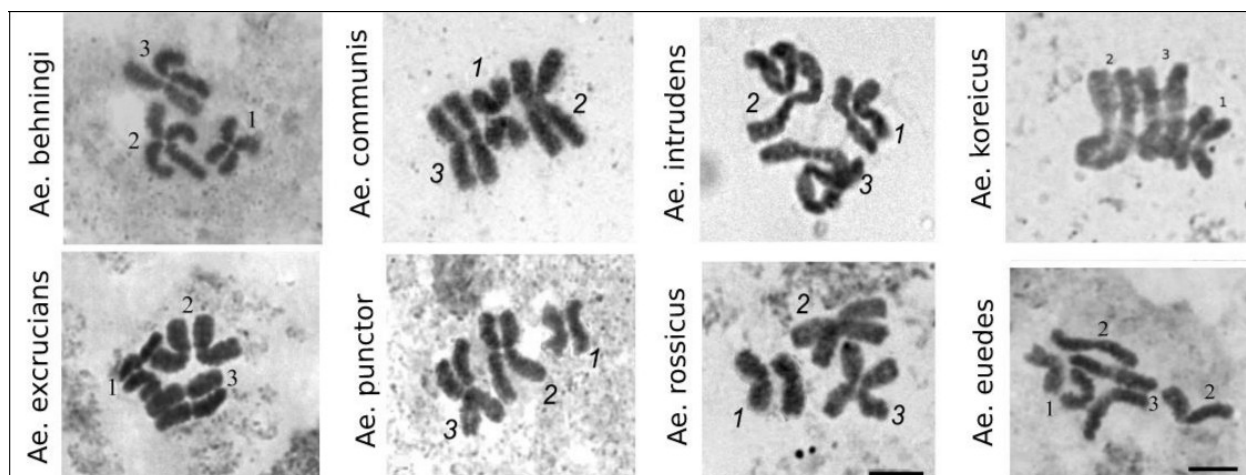


Рисунок 1. Окрашивание метафазных хромосом комаров рода *Aedes* лакто-ацето-орсеином. Масштабная шкала 5 мкм.

В результате С – и DAPI-окрашиваний также была обнаружена видовая специфика в распределении хромосомного бэндинга. Данные результаты послужили основой для построения идиограмм (рис.2)

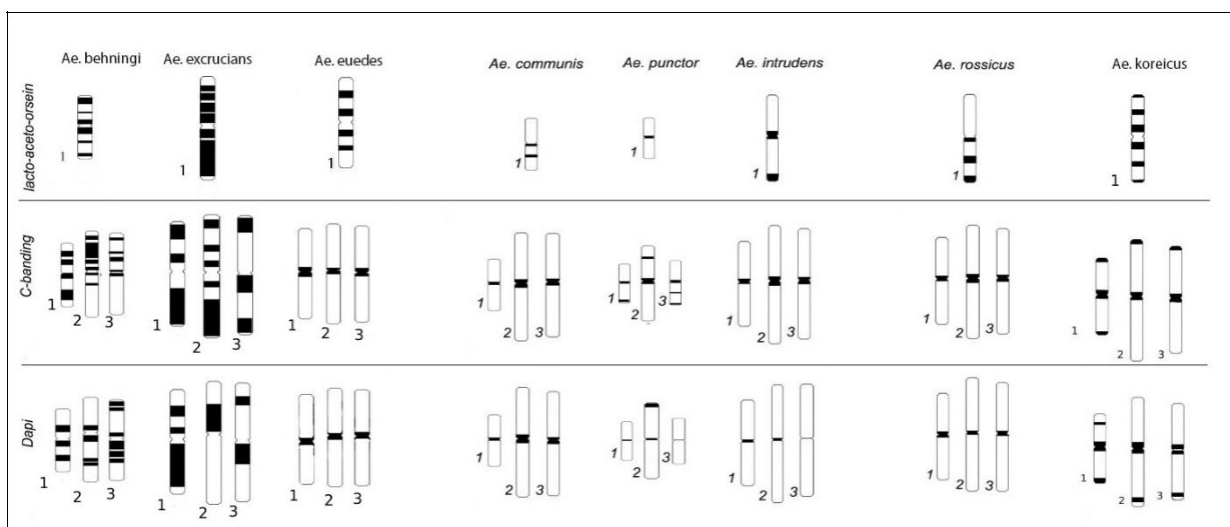


Рисунок 2. Идиограммы хромосомного бэндинга восьми видов комаров рода *Aedes*.

В результате флуоресцентной *in situ* гибридизации было выявлено расположение локусов 18S рДНК на хромосомах у видов комаров *Aedes excrucians*, *Ae. behningi*, *Ae. euedes*, *Aedes communis*, *Ae. punctator*, *Ae. intrudens*, *Ae. rossicus*, *Ae. koreicus* и *Ae. cataphilla*, который также был включен в данный анализ. Схема локализации рибосомальных генов указана на рисунке 3.

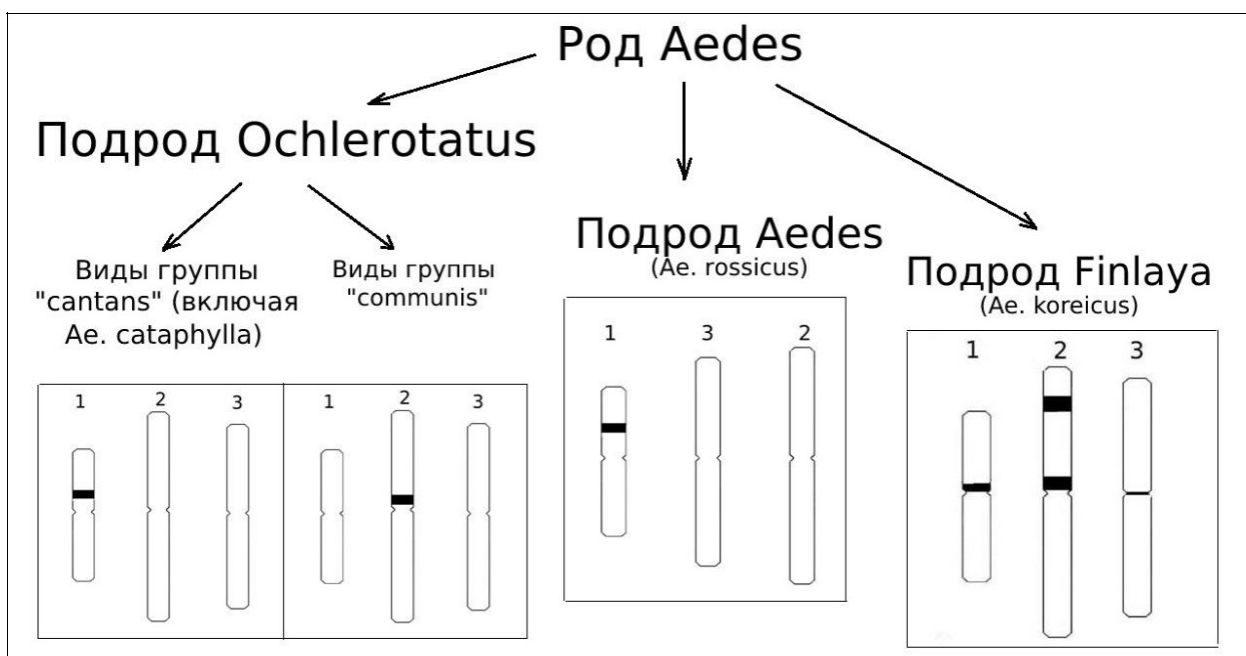


Рисунок 3. Локализации 18S рДНК на хромосомах комаров подродов *Ochlerotatus*, *Aedes* и *Finlaya* рода *Aedes*

ВЫВОДЫ

1. В результате анализа митохондриального гена субъединицы I цитохромоксидазы с у представителей рода *Aedes*, был выявлен уровень дивергенции ниже 2% у видов *Ae. dianteus* и *Ae. intrudens*, *Ae. caspius* и *Ae. dorsalis*, *Ae. excrucians* и *Ae. cantans/annulipes*. Вероятно, эти виды филогенетически близки, в связи с чем сложно различимы по гену COI. Однако, для некоторых отдаленных в эволюционном плане видов, ген COI может служить достоверным маркером для видовой идентификации. Данным методом был подтвержден видовой статус *Aedes rossicus* и других изученных видов.
2. Впервые проведен кариотипический анализ восьми представителей трех подродов рода *Aedes* (*Aedes excrucians*, *Ae. behningi*, *Ae. euedes*, *Aedes communis*, *Ae. punctator*, *Ae. intrudens*, *Ae. rossicus* и *Ae. koreicus*). Показана видовая

специфичность метафазных хромосом по их длине, хромосомному бэндингу, а также выявлены отличия по локализации генов рибосомальной ДНК на хромосомах. Выяснено, что методы цитогенетического анализа могут быть использованы в качестве дополнительного метода видовой идентификации и использоваться для изучения эволюции видов комаров рода *Aedes*.

3. На основании анализа локализации 18S рДНК методом флуоресцентной *in situ* гибридизации было показано следующее:

а) Различная локализация 18S рДНК у подродов *Ochlerotatus*, *Aedes* и *Finlaya*, что может говорить о разнонаправленном течении эволюции, сопровождающейся различными хромосомными перестройками в изученных под родах рода *Aedes*.

б) У большинства из анализируемых видов подрода *Ochlerotatus* рДНК распределилась в соответствии с морфологическим подразделением этих видов на группы («cantans», «communis»)

в) *Ae. cataphilla* по локализации рДНК отличается от остальных представителей своей подгруппы в связи с несоответствием в распределении морфологических признаков и локализации рДНК. *Ae. cataphilla* относится к группе «communis» подрода *Ochlerotatus*, однако 18S рДНК локализована в хромосоме 1, как у видов группы «cantans»

г) *Ae. koreicus*, являющийся представителем подрода *Finlaya*, имеет наибольшее количество локусов рДНК среди видов, исследованных в данной работе. Показано, что в геноме *Ae. koreicus* имеется 4 различных по размеру локуса генов 18S рДНК, в то время как остальные изученные представители рода *Aedes* имеют только один локус на геном.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

Ae. - Aedes

COI – ген цитохромоксидазы с субъединицы 1

рДНК – рибосомальная ДНК

рРНК – рибосомальная РНК

Директору Биологического института
Д.С. Воробьеву

Служебная записка

В связи с тем, что выпускная квалификационная работа аспиранта, выполненная аспирантом направления 06.06.01 – Биологические науки, содержит неопубликованные данные, прошу дать разрешение разместить текст работы данного студента в Электронной библиотеке (репозитории) ТГУ в сокращённом объёме с изъятием неопубликованных данных в соответствии с п. 3.2. Регламента размещения ВКР в электронной библиотеке НБ ТГУ (Приказ ректора ТГУ № 413/ОД от 24.05.2016).

1. Алексеева Светлана Сергеевна. Тема работы: «Молекулярный и цитогенетический анализ четырех подродов комаров рода *aedes* (diptera: culicidae)» Руководитель: Сибатаев А.К.

Руководитель ВКР аспиранта



А.К. Сибатаев

Руководитель ООП
06.06.01 – Биологические науки



Д.С. Воробьев

Отчет о проверке на заимствования №1



Автор: sveta.alexh@mail.ru / ID: 9261268

Проверяющий: sveta.alexh@mail.ru / ID: 9261268)

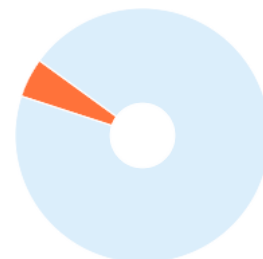
Отчет предоставлен сервисом «Антиплагиат» - users.antiplagiat.ru

ИНФОРМАЦИЯ О ДОКУМЕНТЕ

№ документа: 2
Начало загрузки: 08.06.2021 11:46:28
Длительность загрузки: 00:00:01
Имя исходного файла: ВКР асп.pdf
Название документа: ВКР асп
Размер текста: 14 кБ
Символов в тексте: 14273
Слов в тексте: 1742
Число предложений: 161

ИНФОРМАЦИЯ ОБ ОТЧЕТЕ

Начало проверки: 08.06.2021 11:46:30
Длительность проверки: 00:00:14
Комментарии: не указано
Модули поиска: Интернет



ЗАИМСТВОВАНИЯ

5,08% 

САМОЦИТИРОВАНИЯ

0% 

ЦИТИРОВАНИЯ

0% 

ОРИГИНАЛЬНОСТЬ

94,92% 

Заимствования — доля всех найденных текстовых пересечений, за исключением тех, которые система отнесла к цитированиям, по отношению к общему объему документа.
Самоцитирования — доля фрагментов текста проверяемого документа, совпадающий или почти совпадающий с фрагментом текста источника, автором или соавтором которого является автор проверяемого документа, по отношению к общему объему документа.

Цитирования — доля текстовых пересечений, которые не являются авторскими, но система посчитала их использование корректным, по отношению к общему объему документа. Сюда относятся оформленные по ГОСТу цитаты; общеупотребительные выражения; фрагменты текста, найденные в источниках из коллекций нормативно-правовой документации.

Текстовое пересечение — фрагмент текста проверяемого документа, совпадающий или почти совпадающий с фрагментом текста источника.

Источник — документ, проиндексированный в системе и содержащийся в модуле поиска, по которому проводится проверка.

Оригинальность — доля фрагментов текста проверяемого документа, не обнаруженных ни в одном источнике, по которым шла проверка, по отношению к общему объему документа.

Заимствования, самоцитирования, цитирования и оригинальность являются отдельными показателями и в сумме дают 100%, что соответствует всему тексту проверяемого документа.

Обращаем Ваше внимание, что система находит текстовые пересечения проверяемого документа с проиндексированными в системе текстовыми источниками. При этом система является вспомогательным инструментом, определение корректности и правомерности заимствований или цитирований, а также авторства текстовых фрагментов проверяемого документа остается в компетенции проверяющего.

№	Доля в отчете	Источник	Актуален на	Модуль поиска
[01]	4,18%	http://vital.lib.tsu.ru/vital/access/services/Download/vital:8008/SOURCE1 http://vital.lib.tsu.ru	07 Сен 2020	Интернет
[02]	0,9%	http://vital.lib.tsu.ru/vital/access/services/Download/vtls:000709330/SOURCE1 http://vital.lib.tsu.ru	28 Окт 2020	Интернет