

УДК 595.771: 591.488.1

© Е. Б. Виноградова, Е. В. Ившина и Е. В. Шайкевич

ИЗУЧЕНИЕ БИОТОПИЧЕСКОГО РАСПРЕДЕЛЕНИЯ КОМАРОВ CULEX PIPIENS L. (DIPTERA, CULICIDAE) В ЗАКАВКАЗЬЕ С ПРИМЕНЕНИЕМ МОЛЕКУЛЯРНЫХ МЕТОДОВ ИХ ИДЕНТИФИКАЦИИ

[E. B. VINOGRADOVA, E. V. IVSHINA a. E. V. SHAIKEVICH. A STUDY OF THE MOSQUITO
CULEX PIPIENS (DIPTERA, CULICIDAE) POPULATION STRUCTURE IN TRANSCAUCASUS
BY MOLECULAR METHODS OF IDENTIFICATION]

Комар *Culex pipiens* широко распространен в Европе, на севере и юге Африки, во внетропической части Азии, в Северной Америке (севернее 39° с. ш.), Южной Америке (между 32° и 50° ю. ш.) и Австралии. Он является активным кровососом и переносчиком возбудителей ряда заболеваний человека. *Culex pipiens* включает две формы, или экотипа (биотипа): *pipiens* и *molestus*. При незначительных морфологических отличиях они хорошо различаются по эколого-физиологическим особенностям. Форма *molestus* характеризуется автогенией (развитием первой порции яиц без кровососания), стеногамией (спариванием в небольшом пространстве) и гомодинамным развитием (отсутствием диапаузы). Форму *pipiens* отличают неспособность к автогенному овогенезу, эвригамия (спаривание возможно только при отсутствии значительных пространственных ограничений) и способность формировать репродуктивную диапаузу (цит. по: Виноградова, 1997).

Степень обособленности двух форм варьирует в разных частях ареала. В умеренном климате они достаточно хорошо разобцены биотопически. Если форма *pipiens* развивается в открытых наземных водоемах, то круглогодичное развитие популяций формы *molestus* в связи с отсутствием диапаузы возможно только в подземных биотопах с относительно стабильным температурным режимом (подвалы и т. п.). В наземных водоемах форма *molestus* развивается только летом и довольно редко. Такие случаи отмечены в Москве и в более южных регионах — Новочеркасске, Волгограде, Казахстане (Алма-Ата), Узбекистане (Самарканд), а также в Венгрии, Польше и Северной Америке (Бостон). Известны сравнительно редкие случаи развития формы *pipiens* в небольшом количестве в подвалах, например на Украине, в Узбекистане (Нукус), во Франции (Монпелье) (цит. по: Виноградова, 1997).

Вопрос о взаимоотношении форм *pipiens* и *molestus* в природных популяциях *Culex pipiens* в разных частях ареала активно изучается и обсуждается в литературе. Идентификации этих форм методами традиционной таксономии трудна, что стимулировало поиск молекулярных маркеров для диагностики членов комплекса *Culex pipiens*, в том числе *Culex torrentium* и двух форм *Culex pipiens*. Как и при изучении распространения комаров *Culex pipiens* и *Culex torrentium* в европейской части России (Vinogradova et al., 2007), в настоящем исследовании мы использовали методику, разработанную

Е. В. Шайкевич (2007, 2009). Она позволяет дифференцировать две формы *Culex pipiens* с помощью метода ПЦР-ПДРФ (полиморфизм длин рестрикционных фрагментов продуктов полимеразной цепной реакции). После рестрикции эндонуклеазой *Hae*III ДНК 5' конца гена цитохромоксидазы I (*COI*) ампликон размером 603 пн остается неизменным у формы *molestus* и разрезается на 2 фрагмента (206 и 397 пн) у формы *pipiens*.

Статья посвящена изучению биотопического распределения двух форм *Culex pipiens* в некоторых пунктах Закавказья с помощью молекулярных методов и сопоставлению установленных закономерностей с результатами исследования биологии и экологии *Culex pipiens* в этом регионе.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Объектом исследования служили преимущественно личинки IV возраста, собранные в разнообразных наземных (открытых) водоемах населенных пунктов Абхазии (сентябрь 2007 г.), Грузии (август 1960 г.) и Азербайджана (июль 1960 г.). Были собраны также личинки в двух подземных биотопах (подвалах) в Баку. В двух случаях анализировались имаго, выведенные из личинок или собранные в природе (см. таблицу). Личинки фиксировались в 70%-ном этиловом спирте и через 50 лет оказались пригодными для молекулярного анализа. Часть личинок, собранных в Грузии и Азербайджане, использовалась для молекулярных исследований, а другая — для измерения сифонального индекса (70—100 особей из каждой популяции) согласно общепринятой методике (Гуцевич и др., 1970). Часть личинок из азербайджанских популяций была доведена до имаго. Путем вскрытия самок, получавших только углеводное питание, определяли экспрессию автогении, а визуальными наблюдениями за спариванием в садке — выраженность стеногамии. Об активности кровососания судили по числу самок, напившихся крови на руке человека за 30 мин: активность оценивалась как низкая (30 % напившихся особей), средняя (около 50 %) и высокая (более 70 %). Выделение ДНК, ПЦР и рестрикцию проводили по описанной ранее методике (Шайкевич, 2009).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Рестрикционный анализ продуктов амплификации гена *COI* митохондриальной ДНК проведен на выборках из популяций личинок *Culex pipiens*, собранных в разнообразных открытых водоемах на территории Абхазии (всего 35 экз.): в Сухуми (подтопленный подземный переход), пос. Приморский (кислый минеральный источник), Аджаква (бочка) и Очамчире (канавы) (см. таблицу). Во всех случаях личинки были идентифицированы как форма *pipiens*. В Грузии в наземных водоемах из окрестностей Тбилиси (канавы) и Батуми (бочка и канава) большинство личинок (26 экз.) тоже относились к форме *pipiens* и только 1 экз. — к форме *molestus*. По величине среднего сифонального индекса 2 изученные популяции (Тбилиси и Батуми-1) соответствуют форме *pipiens* (Vinogradova et al., 1996). Снижение индекса в популяции из Батуми-2, вероятно, обусловлено присутствием в ней небольшой примеси личинок формы *molestus*, о чем свидетельствует и минимальная величина индивидуального индекса (3.7) у личинок этой популяции. Таким образом, несмотря на ограниченность материала, можно считать, что открытые водоемы из населенных пунктов Абхазии и Грузии заселены большей частью личинками формы *pipiens*, а смешанные популяции с небольшой долей формы *molestus* встречаются реже. Это утверждение вполне согласуется с выводами о биотопическом распределении форм *Culex pipiens* на основании многолетнего изучения биологии и экологии этих комаров в Грузии (Сичинава, 1974, 1975а, 1975б, 1976, 1978, 1989). Ш. Г. Сичинава приходит к выводу, что в условиях влажного субтропического климата За-

Состав выборок из популяций комаров *Culex pipiens*, собранных в населенных пунктах Закавказья, установленный с помощью молекулярного метода идентификации форм

№ сбора	Место сбора	Координаты, °с. ш., °в. д.	Сифональный индекс, среднее значение (min и max)	Состав выборки, экз.	
				форма <i>pipiens</i>	форма <i>molestus</i>
Абхазия					
1	Сухуми	43, 41	—	3	0
2	Приморское	43, 41	—	6	0
3	Аджакуа	43, 41	—	6	0
4	Гудаута	43, 40	—	9	0
5	Очамчире	40, 41	—	11	0
Грузия					
6	Окрестности Тбилиси	41, 45	5.7 ± 0.07 (4.4—7.2)	3	0
7	Батуми-1	42, 41	4.9 ± 0.04 (4.1—6.2)	18	0
8	Батуми-2	42, 41	4.6 ± 0.03 (3.7—5.9)	5	1
Азербайджан					
9	Евлах	41, 47	4.7 ± 0.03 (3.9—5.7)	2	6
10	Баку-1	40, 50	4.6 ± 0.04 (3.4—5.5)	—	—
11	Баку-2	40, 50	4.3 ± 0.03 (3.3—5.7)	—	—
12	Баку-3	40, 50	3.7 ± 0.02 (2.9—4.5)	0	20

Примечание. 1—10 — наземные водоемы; 11, 12 — подвал; 4 — имаго, остальные сборы — личинки.

падной Грузии повсеместно распространен стено-эвригамный, гетеродинамный и неавтогенный *Culex pipiens pipiens*, развитие которого происходит преимущественно в открытых наземных водоемах. Период его активной жизнедеятельности в равнинно-низменной и холмистой зонах Грузии составляет 8—8.5 месяцев, здесь возможно развитие 7 поколений в год, а наступление диапаузы и уход на зимовку наблюдаются в конце октября—начале ноября. Типичным местом выплода формы *molestus* служат подвальные помещения. Небольшое количество этих комаров встречается летом и в наземных биотопах. Например, доля автогенных особей, развивавшихся в открытых водоемах, в 3 случаях составляла 0.4, 2.1 и 18.9 %, а доля автогенных самок, отловленных в двух местах среди растительности, составляла 0.2 и 14 %.

В Азербайджане в зоне субтропиков изучены 4 популяции *Culex pipiens* из Евлаха и Баку (см. таблицу, № 9—12). В Евлахе, расположенном на Прикуринской низменности, личинки собраны в открытом водоеме, их средний сифональный индекс равен 4.7. В этой выборке большая часть личинок идентифицирована как форма *molestus*. Две выборки из подвальных популяций Баку также определены как форма *molestus* и характеризовались типичным для этой формы значением сифонального индекса; доля стеногамных (осемененных) и автогенных самок превышала 70 %, комары про-

являли высокую активность нападения. Таким образом, в Азербайджане наблюдается близкая к Грузии ситуация — развитие формы *molestus* в подвальных биотопах с выходом в летнее время в наземные водоемы и образованием там смешанных популяций. В Азербайджане в некоторые теплые годы развитие *molestus* в наземных водоемах не прекращается даже зимой (Багиров, Алирзаев, 1983).

Представление о степени репродуктивной изоляции между формами *molestus* и *pipiens* в Абхазии можно получить из экспериментов по их скрещиванию (Сичинава, 1975а, 1975б). Оно происходило успешно в обоих направлениях, хотя число осемененных самок не превышало 30 и 40 %; гибриды были жизнеспособны. Следует отметить, что в 1—3-м поколениях родительской формы *pipiens* доля осемененных самок в условиях длинного дня составляла 33—45 %, а в условиях короткого — снижалась до 21 %, тогда как у формы *molestus* она держалась на уровне 97—100 %. У гибридов 1—8-го поколений массовая копуляция происходила преимущественно без роевания (показатель стеногамии). Эти данные свидетельствуют о том, что грузинские популяции формы *pipiens* действительно являются стено-эвригамными. Успешная гибридизация в садках предполагает возможность появления гибридных особей и в природных условиях. Однако проявление признаков формы *molestus* (автогении и стеногамии) у значительной доли гибридных самок теоретически исключает возможность их зимовки и длительного существования гибридных популяций в природе. Таким образом, приведенные данные свидетельствуют об отсутствии прекопуляционного барьера между формами *pipiens* и *molestus* в Абхазии и об ослаблении изолирующих механизмов.

Известно, что степень обособленности двух форм *Culex pipiens* изменяется в пределах ареала, уменьшаясь с севера на юг. Это подтверждено разными методами исследования — лабораторным скрещиванием, изоферментным и генетическим анализами. В умеренном климате формы *pipiens* и *molestus* достаточно хорошо дифференцированы. Такие данные есть для России (Санкт-Петербург: Виноградова, 1997), Англии (Лондон: Byrne, Nichols, 1997), Центральной Европы (Weitzel et al., 2007), Испании (Chevillone et al., 1995), Италии (Urbanelli et al., 1983) и юга Франции (Pasteur et al., 1977), а также США (Бостон: Spielman, 1964). У более южной популяции из Казахстана (Алма-Ата) между формами уже происходит реципрокное скрещивание, хотя и с низкой эффективностью (Лопатин, 1988). Еще южнее, например в субтропиках Египта и Израиля, *Culex pipiens* не дифференцирован на генетически изолированные локальные популяции (демы), прекопуляционный барьер между ними отсутствует (Villani et al., 1986; Nudelmann et al., 1988; Farid et al., 1991). Сходная ситуация, видимо, наблюдается в Алжире (Roubaud, Ghelelovich, 1956) и Тунисе (Dancesco et al., 1975). В роли изолирующих механизмов в разных частях ареала могут выступать биотопическая специализация, прекопуляционный барьер (стеногамия — эвригамия), разные места спаривания и отсутствие зимовочных адаптаций.

ВЫВОДЫ

1. Метод рестрикционного анализа продуктов амплификации 5' конца гена цитохромоксидазы (COI) мтДНК рестриктазой *HaeIII* позволяет дифференцировать две формы комаров *Culex pipiens* (*pipiens* и *molestus*). Этот метод использован при изучении биотопического распределения форм *Culex pipiens* в популяциях из нескольких населенных пунктов Абхазии, Грузии и Азербайджана.

2. Отмечено отсутствие строгой биотопической приуроченности форм *pipiens* и *molestus*: открытые наземные водоемы заселены преимущественно

популяциями формы *pipiens* (6 случаев), совместное обитание двух форм встречается реже (2 случая). Подземные биотопы (подвалы) Баку заселены автогенной формой (*molestus*).

3. Показано соответствие закономерностей биотопического распределения форм *Culex pipiens*, установленных с помощью их идентификации молекулярным методом, биологическим и экологическим особенностям этих форм, выявленных классическими методами.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы благодарны О. В. Безжоной за предоставление материала из Абхазии.

Работа поддержана Российским фондом фундаментальных исследований (грант № 08-04-01511-а).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Багиров Г. А., Алирзаев Г. У. Зимний выплод комаров *Culex pipiens molestus* Forsk. в открытых водоемах в Баку // Мед. паразитол. и паразитар. болезни. 1983. № 1. С. 22—24.
- Виноградова Е. В. Комары комплекса *Culex pipiens* в России. СПб.: Изд-во Зоол. ин-та РАН, 1997. 307 с.
- Гуцевич А. В., Мончадский А. С., Штакельберг А. А. Фауна СССР. Насекомые двукрылые. Т. 3, вып. 4. Комары сем. Culicidae. Л.: Наука, 1970. 384 с.
- Лопатин О. Е. Биологические, экологические и биохимические особенности двух подвидов комаров *Culex pipiens* в синантропных популяциях. Автореф. дис. ... канд. биол. наук. Алма-Ата, 1988. 16 с.
- Сичинава Ш. Г. Результаты зимних наблюдений по биологии и экологии *Culex pipiens* L. в Сухуми // Мед. паразитология и паразитар. болезни. 1974. Т. 43, № 5. С. 557—558.
- Сичинава Ш. Г. Биологические и экологические особенности годового цикла жизни комаров комплекса *Culex pipiens* в Сухуми и окрестностях // Тр. НИИ мед. паразитол. и тропич. мед. ГССР. 1975а. Т. 21. С. 158—167.
- Сичинава Ш. Г. Реципрокное скрещивание *C. p. pipiens* и *C. p. molestus*, копуляция и соотношение полов родительских и гибридных поколений // Сообщ. АН ГССР. 1975б. Т. 80, № 3. С. 733—736.
- Сичинава Ш. Г. Реципрокное скрещивание *C. p. pipiens* с *C. p. molestus*, автогенность и плодовитость родительского и гибридных поколений // Сообщ. АН ГССР. 1976. Т. 81, № 3. С. 717—720.
- Сичинава Ш. Г. Биологические особенности комаров комплекса *Culex pipiens* в Абхазии // Паразитология. 1978. № 6. С. 523—528.
- Сичинава Ш. Г. Интегрированная система борьбы с массовыми видами кровососущих комаров с учетом их биологических и экологических особенностей (на примере Грузинской ССР). Автореф. дис. ... докт. биол. наук. М., 1989. 41 с.
- Шайкевич Е. В. Идентификация комаров рода *Culex* (Diptera, Culicidae) методом рестрикционного анализа продуктов амплификации // Мед. паразитология и паразитар. болезни. 2009. № 3. С. 28—32.
- Byrne C., Nichols R. A. *Culex pipiens* in London Underground tunnels: differentiation between surface and subterranean populations // Heredity. 1999. Vol. 82. P. 7—15.
- Chevillon C., Eritja R., Pasteur N., Raymond M. Commensalism, adaptations and gene flow: Mosquitoes of the *Culex pipiens* complex in different habitats // Genet. Res. 1995. Vol. 66, N 2. P. 147—157.
- Dancesco P., Chadi A., Khouk M., Horak M. A propos d'un biotype saisonnier hivernal de *Culex pipiens* autogenicus // Bull. Soc. Exot. 1975. Vol. 14. P. 503—507.
- Farid H. A., Gad A. M., Spielman A. Genetic similarity among Egyptian populations of *Culex pipiens* (Diptera, Culicidae) // J. Med. Ent. 1991. Vol. 28, N 2. P. 198—204.

- Nudelman S., Galun R., Kitron U., Spielman A. Physiological characteristics of *Culex pipiens* populations in the Middle East // *Med. Vet. Ent.* 1988. Vol. 2, N 2. P. 161—169.
- Pasteur N. Recherches de generatique chez *Culex pipiens pipiens*. Polymorphisme enzymatique, autogenes et resistance aux insecticides organophosphores // Ph. D. diss. Univ. Montpellier, France, 1977.
- Roubaud E., Ghelelovich S. Observations sur le moustique anthropophile mediterraneen du groupe *pipiens*, *Culex berbericus* Roub. // *C. R. Acad. Sci.* 1956. N 242. P. 2900—2903.
- Shaikovich E. V. PCR-RFLP of the COI gene reliably differentiates *Cx. pipiens*, *Cx. pipiens f. molestus* and *Cx. torrentium* of the *Pipiens* Complex // *Europ. Mosq. Bull.* 2007. Vol. 23. P. 25—30.
- Spielman A. Studies on autogeny in *Culex pipiens* populations in nature. Reproductive isolation between autogenous and unautogenous populations // *Am. J. Hyg.* 1964. Vol. 80, N 2. P. 175—183.
- Urbanelli S., Coluzzi M., Petrarca V., Bullini L. Differenziamento genetico in popolazioni italiane di *Culex pipiens* (Diptera, Culicidae) // *Atti XII Congresso Nazionale Italiano di Entomologia* (Roma). Roma, 1983. Vol. 2. P. 273—280.
- Villani F., Urbanelli S., Gad S., Nudelman S., Bullini L. Electrophoretic variation of *Culex pipiens* from Egypt and Israel // *Biol. J. Linn. Soc.* 1986. Vol. 29. P. 49—62.
- Vinogradova E. B. *Culex pipiens pipiens* mosquitoes: taxonomy, distribution, ecology, physiology, genetics, applied importance and control. Sofia—Moscow: Pensoft, 2000. 250 p.
- Vinogradova E. B., Reznik S. Ya., Kuprijanova E. S. Ecological and geographical variations in the siphonal index of *Culex pipiens* larvae (Diptera: Culicidae) // *Bull. Entomol. Res.* 1996. Vol. 86. P. 281—287.
- Vinogradova E. B., Shaikovich E. V., Ivanitsky A. V. A study of the distribution of the *Culex pipiens* complex (Insecta: Diptera: Culicidae) mosquitoes in the European part of Russia by molecular methods of identification // *Comp. Cytogenetics*. 2007. Vol. 1, N 2. P. 129—138.
- Weitzel T., Collado A., Jost A., Pietsh K., Storch V., Becker N. Genetic differentiation of *Culex pipiens* populations and phylogeny of related species (Diptera: Culicidae) // *The 4th Workshop of the Prague, Czech Republic, Sept. 11—14th, 2007.* P. 19.

Зоологический институт РАН,
Санкт-Петербург;
Институт общей генетики РАН,
Москва.

Поступила 19 VIII 2008.

SUMMARY

The mosquito species *Culex pipiens* consists of two forms, or ecotypes: the typical *pipiens* form and the *molestus* form. These forms are similar morphologically, but have significant ecophysiological differences. The *Cx. pipiens* population structure has been studied in overground and underground (house basements) habitats in several localities in Abkhazia, Georgia and Azerbaijan. The *pipiens* and *molestus* forms have been identified by molecular method, namely by the restriction analysis of the amplification products with *Hae*III endonuclease. Altogether 90 individuals from 10 local populations have been studied. The *pipiens* form has been found exclusively in overground water bodies (8 cases); in two cases both the *pipiens* and *molestus* forms were found in one habitat. The homogeneous populations of the *molestus* form were recorded in two underground habitats. The analysis of the *Cx. pipiens* population structure by molecular method corresponds to the results of the study of biology and ecology of this mosquito in Georgia by Sh. Sichinava (1974, 1978, 1989). Thus the molecular diagnostics of the intraspecific forms in *Cx. pipiens* populations is undoubtedly reliable.