

## СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА МЕЖГЕННЫХ СПЕЙСЕРОВ КЛАСТЕРА ГЕНОВ РИБОСОМНОЙ РНК КОМАРОВ РОДА *Culex* (Diptera: Culicidae)

© 2013 г. Е. В. Шайкевич\*, М. В. Загоскин, Д. В. Муха

Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук, Москва, 119991

Поступила в редакцию 17.10.2012 г.

Принята к печати 01.11.2012 г.

Впервые определены нуклеотидные последовательности межгенного спейсера кластера генов рибосомной РНК (Ribosomal Intergenic Spacer – rIGS) комаров *Culex modestus*, *C. torrentium* и *C. pipiens pallens*. Впервые дана оценка уровня межпопуляционной изменчивости исследуемого участка генома у подвида *C. pipiens pipiens* (*pipiens* – комары открытых водоемов, *molestus* – подвальные комары), обитающего на территории России. Показано, что в последовательности rIGS комаров рода *Culex* нет протяженных повторяющихся участков, характерных для генома всех описанных ранее видов комаров, но имеются консервативные мотивы и относительно короткие вырожденные последовательности различных классов мобильных элементов. Кроме того, обнаружено множество блоков варибельных микросателлитных повторов. Исследованный участок генома комаров рода *Culex* может рассматриваться в качестве перспективного молекулярно-генетического маркера для анализа популяционных и филогенетических взаимоотношений в пределах этой группы насекомых.

**Ключевые слова:** кластер генов рРНК, межгенный спейсер (rIGS), комары рода *Culex*.

COMPARATIVE CHARACTERISTICS OF INTERGENIC SPACERS OF RIBOSOMAL RNA GENE CLUSTER IN MOSQUITOES OF THE GENUS *Culex* (Diptera: Culicidae), by E. V. Shaikevich\*, M. V. Zagoskin, D. V. Mukha (Vavilov Institute of General Genetics, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia; \*e-mail: elenashaikevich@mail.ru). Nucleotide sequences of intergenic spacer of ribosomal RNA gene cluster (rIGS) were identified in mosquitoes *Culex modestus*, *Culex torrentium* and *Culex pipiens pallens*. The level of interpopulation variability of the rIGS in the subspecies *C. pipiens pipiens* (form *pipiens* – mosquitoes that inhabit the open waters, and form *molestus* – mosquitoes that inhabit basements) living in Russia was estimated. No extensive repetitive sequences characteristic of the rIGS of all previously described species of mosquitoes were found within the rIGS of *Culex* mosquitoes. At the same time, evolutionarily conserved motifs and relatively short degenerate sequences of different classes of transposable elements, as well as multiple blocks of variable microsatellite repeats were identified. Our data demonstrated that the rIGS of *Culex* mosquitoes can be considered as a promising molecular marker for the analysis of population and phylogenetic relationships within this group of insects.

**Keywords:** ribosomal RNA, ribosomal intergenic spacer, mosquitoes of genus *Culex*.

DOI: 10.7868/S0026898413030129

Комары р. *Culex* (настоящие, или кровососущие, комары, сем. Culicidae) распространены в широком ареале. Они представляют эпидемиологическую угрозу как активные кровососы и переносчики возбудителей ряда эпидемиологически опасных заболеваний, таких как лимфатический филяриоз, лихорадка долины Рифт и несколько форм энцефалита, в том числе лихорадка западного Нила (ЛЗН). Большинство этих вирусных заболеваний характерно для субтропиков – за исключением более широко распространенной ЛЗН.

\* Эл. почта: elenashaikevich@mail.ru

Это заболевание ранее обнаружено в странах Африки, в Индии и Израиле, но с 1990-х гг. регистрируются вспышки в южной Европе, США и южной России. Кроме того, укусы этих комаров у людей вызывают зуд и аллергические реакции.

Систематика комаров этого рода представляет собой непростую задачу, так как многие их близкородственные группы незначительно отличаются по морфологическим признакам. В роде *Culex* выделяют более 500 видов. На территории Европейской части России распространены, главным образом, три из них – *C. torrentium*, *C. modestus* и *C. pipiens*. Ко-

мары *C. modestus* имеют специфические морфологические характеристики [1]. Комары *C. pipiens* представляют собой политипический комплекс видов, который включает четыре подвида: ssp. *quinquefasciatus* обитает в субтропических районах, ssp. *pallens* — в Японии, ssp. *australicus* — в Австралии и ssp. *pipiens* — повсеместно. Последний подвид имеет две формы: *C. p. p. f. pipiens* и *C. p. p. f. molestus*, основными диагностическими признаками которых являются строение гениталий самцов и сифональный индекс личинок. Эти признаки подвержены существенной изменчивости, что затрудняет диагностику [2].

Несмотря на незначительные морфологические отличия, две формы подвида *C. p. pipiens* — *pipiens* и *molestus* — значительно отличаются по экологии и физиологии [3]. Для номинативной формы *pipiens* характерна орнитофилия (они предпочитают кровь птиц), неспособность к автотенному овогенезу (они не способны отложить яйца без предварительного кровососания), эвригамия (спаривание происходит только в роях в большом пространстве) и зимняя репродуктивная диапауза. Местами обитания комаров формы *pipiens* служат открытые природные водоемы, бочки с водой, затопленные канавы. Для комаров формы *molestus* характерна антропофилия (они предпочитают кровь человека), автогенез (развитие первой порции яиц без кровососания), стеногамия (спаривание в небольшом пространстве) и гомодинамное развитие (отсутствием диапаузы); они обитают в умеренном климате, главным образом в закрытых биотопах, в частности — в затопленных подвалах. *C. torrentium* считается видом-двойником *C. pipiens*; в умеренном климате комары этого вида заселяют те же водоемы, что и *C. pipiens pipiens f. pipiens*, самки не имеют морфологических отличий, самцы различаются по строению гениталий.

При отсутствии легко детектируемых морфологических отличий между многими подвидами и экотипами (формами) комаров рода *Culex* становится целесообразным применение молекулярных маркеров, которые позволяют ограничивать таксономические единицы, а также выявлять частоту вероятной гибридизации между подвидами и формами этих комаров в природных условиях (как это наблюдается в лабораторных условиях [3]). С этой целью можно использовать кластеры генов рибосомной РНК (рРНК), пригодные для поиска молекулярно-генетических различий, поскольку в их составе имеются как консервативные участки (гены 28S, 5.8S и 18S рРНК), так и переменные участки (внутренние транскрибируемые, ITS, и межгенные спейсеры кластеров генов рРНК, rIGS). Гены рРНК комаров р. *Culex* локализованы на первой хромосоме и организованы в виде тандемно повторяющихся повторов (около 100), формирующих мультигенное семейство [4].

Межгенные спейсеры рибосомной ДНК (rIGS) расположены между 3'-концом гена 28S рРНК и 5'-концом гена 18S рРНК. Участки rIGS состоят из прилегающих к гену 18S рРНК внешнего транскрибируемого спейсера (ETS) и нетранскрибируемого спейсера (NTS). На границе между ETS и NTS располагается промотор РНК-полимеразы I.

Известно, что участок rIGS относится к числу наиболее переменных в геноме — даже между близкородственными видами наблюдается высокий уровень генетического полиморфизма. Архитектура межгенных спейсеров эукариотических организмов, включая низшие эукариоты, имеет много общих черт, например, в регуляторных элементах. Все изученные эукариотические организмы имеют основной промотор, с которого транскрибируются гены рРНК, а во многих из них в составе межгенного спейсера имеются энхансерные последовательности, представленные множественными, относительно протяженными, повторами [5–7]. Многие rIGS содержат также протяженные микросателлитные ряды. Высокая степень генетического полиморфизма rIGS делает этот участок генома привлекательным для поиска маркеров, позволяющих на молекулярном уровне различать виды, не отличающиеся по морфологическим признакам.

В данной работе впервые определены последовательности rIGS трех видов комаров рода *Culex* (*C. torrentium*, *C. modestus* и *C. pipiens pallens*). Оказалось, что rIGS комаров не содержит протяженных повторов ДНК, характерных для этого участка генома многих других эукариот. В то же время, в пределах rIGS комаров исследованного рода обнаружены эволюционно консервативные домены и относительно короткие вырожденные последовательности различных классов мобильных элементов. Кроме того, найдены множественные блоки переменных микросателлитных повторов. Мы определили последовательности нуклеотидов и провели анализ эволюционной изменчивости rIGS двух форм *C. p. pipiens* — *C. p. p. f. pipiens* и *C. pipiens pipiens f. molestus*, обитающих в географически удаленных ареалах России. Исследованный участок генома комаров рода *Culex* рассматривается нами как перспективный молекулярно-генетический маркер для анализа филогенетических взаимоотношений.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали следующие выборки комаров рода *Culex*: *C. modestus* (открытый водоем, г. Волгоград); *C. torrentium* (открытые водоемы Подмосковья: № 1 — пос. Икша и № 2 — пос. Чашниково); *C. pipiens pallens* (Япония, лабораторная культура); *C. p. pipiens f. molestus* (подвальные помещения: № 1 — Москва, Ломоносовский пр., и

№ 2 – Волгоград, ул. Рокоссовского); *C. p. pipiens* f. *pipiens* (открытые водоемы: № 1 – Подмоскowie, пос. Икша, и № 2 – Волгоград, пос. Сарепта).

ДНК выделяли из живых или заспиртованных личинок комаров при помощи набора D1Atom™ DNA Prep (“Изоген”, Россия). В реакции амплификации использовали по 0.1 мкг тотальной ДНК.

Для определения нуклеотидных последовательностей межгенных спейсеров кластера генов рРНК амплифицировали тотальную ДНК исследуемых комаров, используя праймеры *Culex28S* (tgaacgcctctaagctgctatc) и *Culex18S* (gatgtgtagccatttctcat), специфичные для 3'-конца 28S и 5'-конца 18S генов рРНК соответственно. Последовательности этих “универсальных” праймеров конструировали на основе сравнения эволюционно консервативных последовательностей генов рРНК ряда насекомых: *Aedes aegypti* (U65375); *Aedes albopictus* (L22060); *Anopheles albimanus* (L78065); *Drosophila willistoni* (XR\_049571), *Aedes vexans* (AM071382), *Ochlerotatus caspius* (EU700339), *Aedes vittatus* (AM071384).

**Полимеразную цепную реакцию (ПЦР)** проводили на термоциклере GeneAmp<sup>®</sup> PCR System 2700 (“Applied Biosystems”, USA), применяя набор для амплификации GenePak™ PCR Core (“Изоген”, Россия), по инструкции производителя. Конечные концентрации компонентов реакционной смеси: буфер Трис-НCl, pH 8.8, 67 мМ; 16 мМ (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 2.5 мМ MgCl<sub>2</sub>; 200 мкМ каждого dNTP и одна единица Taq-ДНК-полимеразы. Условия ПЦР: первичная денатурация 94°C – 5 мин, затем 35 циклов, включающих этапы 94°C – 30 с, 50°C – 1 мин, 72°C – 1.5 мин; завершение синтеза при 72°C – 7 мин. Концентрация праймеров *Culex28S* и *Culex18S* в реакции составляет 0.5 пкмоль/мкл.

Для клонирования фрагментов ДНК, содержащих участки rIGS исследуемых видов комаров, продукты амплификации фракционировали в 0.8%-ном геле легкоплавкой агарозы (“Sigma”, США) и окрашивали бромистым этидием. Основной продукт ПЦР, длиной примерно 2500 п.н., вырезали из геля и очищали, используя набор реактивов QIAquick Gel Extraction (“Qiagen”, США). Клонирование проводили при помощи наборов реактивов pGEM-T Easy Vector Systems (“Promega”, США). Для секвенирования использовали прибор ABI PRISM 310 и набор реактивов BigDye Termination kit (“Applied Biosystems”, США), согласно инструкции производителя.

**Последовательности нуклеотидов** клонированных фрагментов (~2500 п.н.) определяли методом пошагового секвенирования. Для построения протяженных контигов использовали программу ChromasPro (<http://chromaspro.findmysoft.com>). Последовательности, полученные в результате секвенирования продуктов амплификации, зарегистрированы в базе данных GenBank (JX500430–JX500433, JX500436–JX500439).

При исследовании структурной организации участка rIGS комаров р. *Culex* в качестве типовой последовательности вида *C. pipiens* использовали последовательность rIGS *C. p. p. pipiens* № 1.

Для поиска эволюционно консервативных мотивов и вырожденных протяженных повторяющихся последовательностей использовали программу MEME version 4.9.0 (<http://meme.sdsc.edu/meme/cgi-bin/meme.cgi>).

Микросателлитные повторы выявляли посредством программы Microsatellite repeats finder ([http://www.biophp.org/minitools/microsatellite\\_repeats\\_finder/demo.php](http://www.biophp.org/minitools/microsatellite_repeats_finder/demo.php)).

Для поиска вырожденных последовательностей мобильных элементов в пределах исследуемых последовательностей ДНК использовали программу Sensor (<http://www.girinst.org/censor/index.php>).

Сходство между анализируемой последовательностью и последовательностями, представленными в базе данных GenBank, определяли посредством программы BLASTN (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Нуклеотидные последовательности выравнивали, используя программу MAFFT V.6 (<http://mafft.cbrc.jp/alignment/server/>).

Эволюционную изменчивость и филогенетические дистанции между исследованными таксонами комаров анализировали при помощи программы MEGA version 5.0 [8].

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### *Сравнение структурной организации участка rIGS трех видов комаров рода Culex – C. torrentium, C. modestus и C. pipiens*

Границы межгенного спейсера исследуемых видов комаров определяли путем сравнения соответствующих протяженных последовательностей ДНК, включающих в себя фрагменты генов 18S и 28S рРНК, с последовательностями базы данных GenBank в программе BLAST. Границы наиболее протяженных консервативных последовательностей при 100%-ном сходстве с последовательностями генов рРНК базы данных принимали за фланги межгенного спейсера.

Длины межгенных спейсеров исследованных комаров различаются как между различными видами и подвидами, так и между комарами одного вида, одного подвида и даже форм, обитающих в различных популяциях. Так, длины межгенных спейсеров комаров *C. torrentium* составляют 1761 п.н. (№ 1) и 1770 п.н. (№ 2); *C. p. p. pipiens* – 1689 п.н. (№ 1) и 1731 п.н. (№ 2); *C. p. p. molestus* – 1741 п.н. (№ 1) и 1777 п.н. (№ 2); *C. p. p.* – 1720 п.н.; и *C. modestus* – 1649 п.н. Отметим, что межгенные спейсеры кластера генов рРНК видов *C. torrentium*, *C. modestus* и подвида *C. p. pallens* описаны нами впервые. Межгенные спейсеры кластера

генов рРНК комаров подвида *C. p. p.* (формы *C. p. p. f. pipiens* и *C. p. p. f. molestus*) ранее описаны при анализе комаров, обитающих в популяциях США [9]. Для всех описанных форм комаров из популяций США также характерна вариабельность длины межгенного спейсера кластера генов рРНК.

Ранее опубликованные результаты исследований комаров родов *Anopheles* и *Aedes* и различных видов дрозophil также свидетельствуют о том, что размеры rIGS могут различаться как у близкородственных видов, так и у представителей одного вида: *Ae. aegypti* (1.8 т.п.н.) [10, 11], *An. albanus* (1.5 т.п.н.) [12], *An. gambiae* (1.4 т.п.н.) [13, 14], *Ae. albopictus* (2–10 т.п.н.) [15], *An. sinensis* (3.2–4.3 т.п.н.) [16], *D. pseudoobscura* (3.3 т.п.н.), *D. paulistorum* (11.6 т.п.н.) и *D. mojavensis* (4.2–4.8 т.п.н.) [17].

Известно, что межгенные спейсеры кластера генов рРНК эукариот являются одними из наиболее вариабельных участков генома. Вариация длины rIGS близкородственных видов и особей одного вида, обитающих в различных популяциях, может быть обусловлена как различиями в числе субповторов, которые представляют собой энхансерные последовательности, регулирующие активность промотора РНК полимеразы I, так и различиями в длине микросателлитных последовательностей, характерных для этого участка генома.

Для поисков субповторов в последовательности межгенных спейсеров кластера генов рРНК использовали программу MEME. Нам не удалось выявить каких-либо повторяющихся последовательностей (в том числе – вырожденных), которые имели бы длину более 20 п.н. (данные не представлены). По-видимому, отсутствие протяженных субповторов в пределах межгенных спейсеров кластера генов рРНК комаров рода *Culex* является их характерной особенностью, так как во всех других, описанных к настоящему времени видах комаров (родов *Anopheles* и *Aedes*), обнаружены субповторы протяженностью 60, 200 п.н. и более [7, 11, 16, 18].

Визуальный анализ последовательностей, а также множественных выравниваний этого участка генома, показывает, что эти последовательности содержат протяженные микросателлитные повторы, причем длины повторов могут значительно отличаться даже у представителей одного подвида и формы, обитающих в различных популяциях. На рис. 1 представлен фрагмент выравнивания участка rIGS комаров р. *Culex*, а также последовательностей, представленных в GenBank. Как видно, основной вклад в вариабельность этого фрагмента rIGS вносит полиморфизм в числе динуклеотидных повторов (ag). Для более детального анализа паттерна микросателлитных повторов rIGS использовали программу Microsatellite repeats finder. В каждой последовательности ДНК обнару-

жены множественные микросателлитные повторы с повторяющейся единицей от 2 до 4 н., которая встречается не менее четырех раз подряд (данные не представлены).

Как указано выше, при использовании программы MEME, выявляющей как совершенные, так и вырожденные повторяющиеся мотивы, нами не найдены протяженные (более 20 н.) повторы в последовательностях rIGS комаров р. *Culex*. В то же время, посредством этой же компьютерной программы нами обнаружены относительно протяженные, эволюционно консервативные, вырожденные мотивы, общие для всех трех исследованных видов комаров – *C. pipiens*, *C. torrentium* и *C. modestus*. “Усредненные” последовательности этих мотивов ДНК имеют значимое сходство с последовательностями rIGS трех исследованных видов комаров и соответствуют выявленным мотивам LOGO, которые характеризуют вариабельность встречаемости нуклеотидов в пределах описанных мотивов (рис. 2а). На рис. 2б приведена схема локализации обнаруженных пяти мотивов в rIGS трех исследованных видов комаров. Каждый из пяти консервативных мотивов сравнивали с последовательностями, представленными в базе данных GenBank, с использованием программы Blast. Первый мотив (Motif 1) (рис. 2а) эволюционно высококонсервативен не только в пределах комаров рода *Culex*; он в высокой степени сходен с последовательностью rIGS комара *Aedes aegypti* (рис. 2в). Очевидно, что эти эволюционно консервативные мотивы играют определенную функциональную роль, общую для всех исследуемых видов комаров.

Известно, что основной промотор генов рРНК (core promoter) эукариот расположен в области примерно (+)10 п.н. и (–) 40 п.н. от сайта инициации транскрипции. Уникальная особенность промотора генов рРНК (Pol I) – его видоспецифичность. За исключением некоторых пар родов, например мышь – крыса [19, 20], человек – обезьяна [21], промотор Pol I неактивен в клетках организма другого вида. Другими словами, гены рРНК одного вида не могут быть транскрибируемы белковыми компонентами другого вида [22]. В то же время, почти у всех исследованных организмов перед стартом транскрипции расположены “ТАТА-бокс”-подобные последовательности, а за стартом – G/C-богатые районы. У многих видов животных, в частности комаров *A. aegypti* и *A. albopictus*, расположение промотора РНК-полимеразы I определено экспериментально [11, 23].

На рис. 3 представлено выравнивание последовательностей ДНК, соответствующих промотору РНК-полимеразы I этих двух видов комаров, с последовательностями rIGS комаров, исследованных в данной работе (*C. pipiens*, *C. torrentium*, *C. modestus*). Можно предположить, что участки rIGS комаров

C. p. GU911328	agag-----gagaggacaagagagagag-----agagta-----atg-tat-----agg
C. p. GU911327	agag-----gagaggacaagagagagag-----agagta-----atg-tat-----agg
C. p. GU911330	agag-----gagaggacaagagagagag-----agagta-----atg-tat-----agg
C. p. GU911329	agag-----gagaggacaagagagagag-----agagta-----atg-tat-----agg
C. p. GU911316	agag-----gagaggacaagagagagag-----agagta-----atg-tat-----agg
C. p. GU911315	agag-----gagaggacaagagagagag-----agagta-----atg-tat-----agg
C. p. GU911314	agag-----gagaggacaagagagagag-----agagta-----atg-tat-----agg
C. p. GU911308	agag-----gagaggacaagagagagag-----agagta-----atg-tat-----agg
C. p. GU911309	agag-----gagaggacaagagagagag-----agagta-----atg-tat-----agg
C. p. GU911305	agag-----gagaggacaagagagagag-----agagta-----atg-tat-----agg
C. p. GU911318	ggag-----gagaggacaagagagagag-----agagta-----atg-tgtataagagg
C. p. GU911312	ggag-----gagaggacaagagagagag-----agagta-----atg-tgtataagagg
C. p. GU911332	ggga-----ggaggagaggacaagagagag-----agagta-----atg-tat-----agg
C. p. GU911319	ggag-----gagaggacaagagagagag-----agagtaaatgatgatg-tat-----agg
C. p. GU911317	ggag-----gagaggacaagagagagag-----agagtaaatgatgatg-tat-----agg
C. p. GU911310	ggag-----gagaggacaagagagagag-----agagtaaatgatgatg-tat-----agg
C. p. GU911313	agag-----gagaggacaagagagagag-----agagta-----atg-tat-----agg
C. p. GU911311	ggag-----gagaggacaagagagagag-----agagta-----atg-tgtataagagg
C. p. GU911321	ggag-----gagaggacaagagagagag-----agagta---atgatg-tat-----agg
C. p. GU911333	ggag-----gagaggacaagagagagag-----agagta-----atg-tgtataagagg
C. p. GU911331	ggag-----gagaggacaagagagagag-----agagta---atgatg-tat-----agg
C. p. GU911326	ggag-----gagaggacaagagagagagag--agagta-----atg-tat-----agg
C. p. GU911325	ggag-----gagaggacaagagagagagag--agagta-----atg-tat-----agg
C. p. GU911324	ggaggaggagagagaggacaagagagagagag--agagta-----atg-tgtataagagg
C. p. GU911320	ggaggaggagagagaggacaagagagagagag--agagta-----atg-tgtataagagg
C. p. GU911307	ggag-----gagaggacaagagagag-----agagta-----atg-tgtataagagg
C. p. GU911306	ggag-----gagaggacaagagagagag-----agagta-----atg-tgtataagagg
C. m. #2	ggag-----gagaggacaagagagagag-----agagtacagatgatg-tat-----agg
C. m. #1	ggag-----gagaggacaagagagagag-----agagtacagatgatg-tat-----agg
C. p. #2	ggag-----gagaggacaagagagagag-----agagta-----atg-tgtacaagagg
C. p. #1	ggag-----gagaggacaagagagagag-----agagta---atgatg-tat-----agg
C. p. GU911323	ggag-----gagaggacaagagagagagag-----aga-----g
C. p. GU911322	ggag-----gagaggacaagagagagagag-----aga-----g
C. pal.	ggag-----gagaggacaagagagagagta-----ttg-tat-----agg
C. t. #1	ggac-----acgacgcgcgaaagagg-----agagag-----aggttcgatcgaggg
C. t. #2	ggac-----acgacgcgcgaaagagg-----agagag-----aggttcgatcgaggg
C. mod.	agag-----gagagagcgcgaaagagagcgcgaaagagag-----tgtaatacagag
	. * . . . . * * . * *

**Рис. 1.** Фрагмент выравнивания нуклеотидных последовательностей межгенного спейсера кластера генов рРНК исследуемых видов комаров. Условные обозначения: C. p. – *C. pipiens pipiens* f. *pipiens*; C. m. – *C. p. p.* f. *molestus*; C. pal. – *C. p. p.*; C. t. – *C. torrentium*; C. mod. – *C. modestus*. № 1 и № 2 – номера соответствующих популяций. В случае, когда последовательности взяты из GenBank, представлены соответствующие каталожные номера.

рода *Culex*, имеющие максимальное сходство с экспериментально определенными промоторными областями других видов комаров, также ответственны за инициацию транскрипции рРНК. На рис. 3 показано, что сайты инициации транскрипции генов рРНК у описанных нами видов комаров расположены в положениях 922 н. (*C. modestus*), 1163 н. (*C. torrentium*) и 1159 н. (*C. pipiens pipiens* f. *pipiens* № 1).

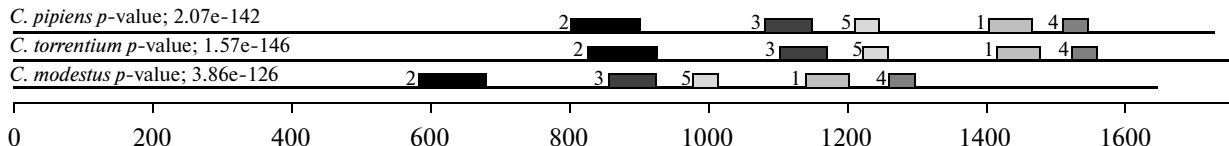
Сопоставляя места локализации промоторов РНК-полимеразы I на последовательностях r1GS исследованных видов комаров и места локализации выявленных высококонсервативных мотивов (рис. 2б), можно заключить, что мотив № 3

содержит часть последовательности, соответствующей промотору (на рис. 2а подчеркнута). Соответственно, мотивы №№ 1, 4 и 5 локализованы в районе внешнего транскрибируемого спейсера, а мотив № 2 – в нетранскрибируемом спейсере. С нашей точки зрения, наиболее вероятно предположение, что эволюционно консервативные мотивы №№ 1, 2, 4 и 5 выполняют роль энхансеров промотора РНК-полимеразы I, которые у комаров рода *Culex* могут быть представлены в пределах r1GS в единичных копиях, в отличие от многих других видов эукариот, у которых энхансеры этого промотора представлены в виде множественных сходных по нуклеотидному составу повторов.

a

Motif 1: Length 61 bp; *E*-value 4.1e-013.**TAACATGAACGTCATACGGCTACCCCGCTGCCAGTCGGCGATCGTAGCGAGTATTATGTGT**Motif 2: Length 99 bp; *E*-value 7.5e-013.**CCCGTCATAGCGTACGCGTGTATGGTGGCCCCGTCTACGGGCACGGAAGAGGACCCGCAGAGCATGCCTA  
CCTTCGGGGGAAGCCATCTTTGCCGTTCC**Motif 3: Length 66 bp; *E*-value 1.3e-009.**TTTCTCGTACSTATAGGGAAGTCAAGTTTGGTGATGGAGGTCGTCGATGGGCGTATATGAAAATTC**Motif 4: Length 37 bp; *E*-value 9.6e-007.**ATGGGAATCTTTTGACGATTGTATTGCGCGCATGATA**Motif 5: Length 34 bp; *E*-value 6.6e-004.**ATGCATGCACGTATCTACCACCGAGAGCGCGCAC**

б

*C. pipiens* *p*-value; 2.07e-142*C. torrentium* *p*-value; 1.57e-146*C. modestus* *p*-value; 3.86e-126

в

*Aedes*  
Motif 1 GTACATGAATGTCATACGGCTACCACGCTATGATGGAAGGATAGCGACAGTAGCAAGTATTATGACC  
TAACATGAACGTCATACGGCTACCCCGCTGCCA-----GTCGGCGATCGTAGCGAGTATTATGTGT  
:\*\*\*\*\* \*\*\*\*\*.\*\*\*\*. \* \* : .\*\*\*\* .\*\*\*\*\*.\*\*\*\*\*

**Рис. 2.** Характеристика высококонсервативных мотивов в последовательностях межгенного спейсера кластера генов рРНК (rIGS) трех видов комаров рода *Culex*: *C. pipiens*, *C. torrentium* и *C. modestus*. а – “Усредненные” последовательности пяти выявленных мотивов ДНК, имеющие максимальное сходство с последовательностями rIGS трех исследованных видов комаров и соответствующие выявленным мотивам LOGO, которые характеризуют встречаемость нуклеотидов в пределах описанных мотивов. *E*-value отражает степень достоверности выявленных мотивов. В мотиве № 3 подчеркнута последовательность, соответствующая промоторной области РНК-полимеразы I (см. рис. 3). б – Схема локализации выявленных пяти мотивов в пределах rIGS трех исследованных видов комаров (мотивы № 1–№ 5 обозначены цифрами 1–5); *P*-value – степень достоверности взаимного расположения мотивов. в – Результат попарного сравнения “усредненной” последовательности, соответствующей первому мотиву (Motif 1), с фрагментом rIGS *Aedes aegypti*.

```

C. pipiens      CGATGGGCGTATATG-GAAATTC AATCACC GAA-CCGGGAA--C-GC-CA
C. torrentium CGATGGGCGTATATG-AAAATTC CATC-CCGGAGCCGGGAA--C-GT-CA
C. modestus  CG-TGAGCGTAT-TG-AAAATTC CACCACC GAA-CCGGGAA--C-GTTC-
A. aegypti    -GTTG-GCCCG---G-AAAAC CCT-TCAG-GGA-----GGAAGGCAGTGTG
A. albopictus -GCTG-GCC-A---GTAAAAC CCTAT-AG-GGA-----GGA-----
                * * * * * * * * * * * * * * * *

```

**Рис. 3.** Выравнивание предполагаемых промоторных областей РНК-полимеразы I исследованных комаров р. *Culex* (*C. pipiens*, *C. modestus* и *C. torrentium*) с промоторной областью генов рРНК комаров р. *Aedes* (*A. aegypti*, *A. albopictus*). Подчеркнут предполагаемый старт инициации транскрипции генов рРНК.

Известно, что последовательности rIGS могут являться мишенями для интеграции мобильных элементов. В принципе, любой класс мобильных элементов, случайно распределяющихся по геному, может быть интегрирован в участок rIGS; кроме того, известны сайт-специфические ретротранспозоны, сайты интеграции которых локализованы исключительно в rIGS [24]. Интегрированные в rIGS мобильные элементы могут привносить в эту регуляторную область промотора РНК-полимеразы I собственные регуляторные элементы, обуславливая повышение уровня эволюционной изменчивости структурно-функциональной организации этого участка генома.

Используя программу Sensor, мы искали последовательности мобильных элементов в пределах участка rIGS комаров рода *Culex*. Принцип действия программы заключается в сравнении тестируемой последовательности ДНК с обновляемой базой данных нативных и выродившихся повторяющихся последовательностей генома эукариот “Repbase” (поддерживается на базе Genetic Information Research Institute). Полноразмерных мобильных элементов какого-либо класса с характерной структурой или протяженными открытыми рамками считывания нами обнаружено не было. Однако в пределах анализируемых последовательностей имеются протяженные выродившиеся последовательности, значимо сходные либо с ДНК-транспозонами, либо с ретротранс-

позонами, как содержащими, так и не содержащими длинные концевые повторы (рис. 4). Обнаружение “следов” мобильных элементов в функционально значимой области кластера генов рРНК может иметь значение для понимания эволюционной роли подвижных элементов генома и их взаимоотношений с геномом организма-хозяина.

### Эволюционная изменчивость участка rIGS комаров рода *Culex*

На рис. 5 представлено филогенетическое древо, построенное на основе сравнения последовательностей rIGS исследованных в данной работе видов комаров. Такая топология дерева, поддерживаемая высокими значениями бутстрепа, наблюдается при использовании алгоритмов UPGMA и Maximum Likelihood. В таблице представлены значения уровней дивергенции между анализируемыми последовательностями по среднему числу нуклеотидных замен между двумя сравниваемыми последовательностями в пересчете на один сайт.

Из топологии ветвей филогенетического древа и данных таблицы видно, что наиболее эволюционно удаленным от других является *C. modestus*. Комары *C. torrentium*, обитающие в разных популяциях, также формируют на древе отдельную кладу. Результаты хорошо согласуются с данными таксономии, полученными на основе морфоло-

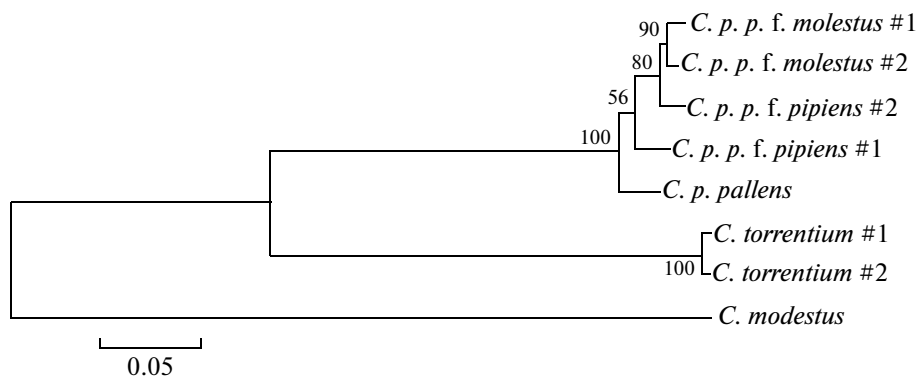
Уровень эволюционной дивергенции между последовательностями межгенного спейсера кластера генов рРНК у исследованных видов комаров

Вид комара	1	2	3	4	5	6	7
1							
2	0.038						
3	0.039	0.023					
4	0.033	0.018	0.013				
5	0.038	0.042	0.046	0.044			
6	0.365	0.365	0.361	0.373	0.373		
7	0.364	0.363	0.360	0.371	0.373	0.008	
8	0.561	0.570	0.565	0.561	0.565	0.597	0.593

1 — *C. p. f. pipiens* № 1; 2 — *C. p. f. pipiens* № 2; 3 — *C. p. f. molestus* № 1; 4 — *C. p. f. molestus* № 2; 5 — *C. p. p.*; 6 — *C. torrentium* № 1; 7 — *C. torrentium* № 2; 8 — *C. modestus*. Уровни дивергенции выражены в величинах, обозначающих среднее число нуклеотидных замен между двумя сравниваемыми последовательностями в пересчете на один сайт.







**Рис. 5.** Филогенетическое древо исследованных видов комаров, построенное на основе сравнения последовательностей межгенных спейсеров кластера генов рРНК методом максимального правдоподобия (ML). Значения достоверности ветвей дерева обозначены цифрами (выражено в процентах). Шкала соответствует среднему числу нуклеотидных замен в пересчете на один сайт сравниваемых последовательностей.

ности межгенного спейсера кластера генов рРНК *C. p. p. f. pipiens*. На филогенетическом древе комары из открытых водоемов Москвы и Волгограда не образуют общей клады, в то время как комары *C. p. p. f. pipiens* из популяции Волгограда группируются вместе с *C. p. p. f. molestus* (рис. 5). Уровень эволюционной дивергенции между *C. p. p. f. pipiens* из различных популяций равен 0.038, что соответствует уровню дивергенции между *C. p. p. f. pipiens* из московской популяции и *C. pipiens pallens* (см. таблицу).

В целом, эти данные свидетельствуют о том, что уровень эволюционной дивергенции последовательностей межгенного спейсера кластера генов рРНК комаров р. *Culex* позволяет рассматривать его в качестве перспективного маркера для анализа филогенетических связей, в частности, в пределах комплекса таксономических единиц *C. pipiens*. В дальнейшей работе предполагается продолжить исследования с использованием большего числа популяций каждого вида комаров и больших выборок из каждой популяции. Кроме того, с нашей точки зрения, представляется интересным изучить внутригеномную изменчивость rIGS в пределах мультигенного семейства генов рРНК комаров р. *Culex*.

Работа получила финансовую поддержку программы Президиума Российской академии наук «Живая природа: современное состояние и проблемы развития», Российского фонда фундаментальных исследований (11-04-01776) и Федеральной целевой программы «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России на 2009–2013 гг.» (ГК № 16.740.11.0238).

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Гуцевич А.В., Мончадский А.С., Штакельберг А.А. 1970. Фауна СССР. Насекомые двукрылые. Т. 3, вып. 4: Комары. Семейство Culicidae. Л.: Наука. с. 384.
2. Федорова М.В., Шайкевич Е.В. 2007. Морфологические и молекулярно-генетические различия имаго комаров *Culex torrentium* и *Cx. pipiens* (Diptera, Culicidae) Московского региона. *Энтомологическое обозрение*. **86**, 32–41.
3. Виноградова Е.Б. 1997. Комары комплекса *Culex pipiens* в России. СПб: Тр. ЗИН РАН.
4. Kumar A., Rai K.S. 1990. Chromosomal localization and copy number of 18S+28S ribosomal-RNA genes in evolutionarily diverse mosquitos Diptera, Culicidae). *Hereditas*. **113**, 277–289.
5. Mayer C., Schmitz K.M., Li J., Grummt I., Santoro R. 2006. Intergenic transcripts regulate the epigenetic state of rRNA genes. *Mol. Cell*. **22**, 351–361.
6. Albert B., Perez-Fernandez J., Leger-Silvestre I., Gadal O. 2012. Regulation of ribosomal RNA production by RNA polymerase I: does elongation come first? *Genetics Res. Int.* **2012**, Article ID 276948, 13 p.
7. Mukha D.V., Mysina V., Mavropulo V., Schal C. 2011. Structure and molecular evolution of the ribosomal DNA external transcribed spacer in the cockroach genus *Blattella*. *Genome*. **54**, 222–234.
8. Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M., Kumar S. 2011. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.* **28**, 2731–2739.
9. Huang S., Molaei G., Andreadis T.G. 2011. Reexamination of *Culex pipiens* hybridization zone in the Eastern United States by ribosomal DNA-based single nucleotide polymorphism markers. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **85**, 434–441.
10. Brown S.E., Knudson D.L. 1997. FISH landmarks for *Aedes aegypti* chromosomes. *Insect. Mol. Biol.* **6**, 197–202.
11. Wu C.C., Fallon A.M. 1998. Analysis of a ribosomal DNA intergenic spacer region from the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. *Insect. Mol. Biol.* **7**, 19–29.
12. De Merida A.M., De Mata M.P., Molina E., Porter C.H., Black W.C. 1995. Variation in ribosomal DNA intergenic spacers among populations of *Anopheles albimanus* in South and Central America. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **53**, 469–477.

13. Scott J.A., Brogdon W.G., Collins F.H. 1993. Identification of single specimens of the *Anopheles gambiae* complex by the polymerase chain reaction. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **49**, 520–529.
14. Favia G., della Torre A., Bagayoko M., Lanfrancotti A., Sagnon N., Toure Y.T., Coluzzi M. 1997. Molecular identification of sympatric chromosomal forms of *Anopheles gambiae* and further evidence of their reproductive isolation. *Insect. Mol. Biol.* **6**, 377–383.
15. Black W.C., McLain D.K., Rai K.S. 1989. Patterns of variation in the rDNA cistron within and among world populations of a mosquito, *Aedes albopictus* (Skuse). *Genetics*. **121**, 539–550.
16. Whang I.J., Jung J., Park J.K., Min G.S., Kim W. 2002. Intragenomic length variation of the ribosomal DNA intergenic spacer in a malaria vector, *Anopheles sinensis*. *Mol. Cells*. **14**, 158–162.
17. Mateos M., Markow T.A. 2005. Ribosomal intergenic spacer (IGS) length variation across the Drosophilinae (Diptera: Drosophilidae). *BMC Evol. Biol.* **5**, 46.
18. Ambrose C., Crease T. 2010. Evolution of repeated sequences in the ribosomal DNA intergenic spacer of 32 arthropod species. *J. Mol. Evol.* **70**, 247–259.
19. Kishimoto T., Nagamine M., Sasaki T., Takakusa N., Miwa T., Kominami R., Muramatsu M. 1985. Presence of a limited number of essential nucleotides in the promoter region of mouse ribosomal RNA gene. *Nucl. Acids Res.* **13**, 3515–3532.
20. Mishima Y., Financsek I., Kominami R., Muramatsu M. 1982. Fractionation and reconstitution of factors required for accurate transcription of mammalian ribosomal RNA genes: identification of a species-dependent initiation factor. *Nucl. Acids Res.* **10**, 6659–6670.
21. Learned R.M., Tjian R. 1982. *In vitro* transcription of human ribosomal RNA genes by RNA polymerase I. *J. Mol. Appl. Genet.* **1**, 575–584.
22. Grummt I., Roth E., Paule M.R. 1982. Ribosomal RNA transcription *in vitro* is species specific. *Nature*. **296**, 173–174.
23. Baldridge G.D., Fallon A.M. 1992. Primary structure of the ribosomal DNA intergenic spacer from the mosquito, *Aedes albopictus*. *DNA Cell Biol.* **11**, 51–59.
24. DeMarco R., Machado A.A., Bisson-Filho A.W., Verjovski-Almeida S. 2005. Identification of 18 new transcribed retrotransposons in *Schistosoma mansoni*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **333**, 230–240.