

Популяционный анализ кровососущих комаров различных регионов Евразии

Черняк Александр Дмитриевич
кафедра информационной биологии ФЕН НГУ, гр.
17410

Научный руководитель: Баричева Элина
Михайловна, д. б. н., в. н. с. лаборатории
механизмов клеточной дифференцировки

Комары

- Кровососущие комары, (лат. Culicidae) — семейство двукрылых насекомых, принадлежащих к группе длинноусых (*Nematocera*). В современном мире насчитывается около 3600 видов комаров, относящихся к 38 родам. В России обитают представители 100 видов, относящихся к родам настоящих комаров (*Culex*), кусак (*Aedes*), *Culiseta*, малярийных комаров (*Anopheles*), *Toxorhynchites*, *Uranotaenia*, *Orthopodomyia*, *Coquillettidia*.



Переносчики болезней

- Многие из них переносят опасные человеческие болезни, передающихся через кровь, наиболее опасной из которых является малярия. Согласно прогнозам, основанным на расчетах по изменению климата, ареал обитания наиболее опасных переносчиков расширяется. Например, к концу 21 века ареал *Ae. aegypti* будет включать Краснодарский край, Ставрополье, Калининградскую область, юг Ростовской области и Северный Кавказ.



Зачем их изучать

- Изучение популяционной структуры кровососущих комаров, их экологических предпочтений и генетических особенностей помогает установить их поведение и вероятность переносить болезни, следовательно, необходимо для предотвращения вспышек массовых заболеваний. Чтобы разработать эффективную стратегию контроля численности комаров очень важно понимать происхождение популяций, которые в настоящее время распространяются по территории России. Хорошо известно, что популяции комаров с разным генофондом имеют разные возможности адаптироваться к изменениям окружающей среды.

Цель исследования

- Целью данной работы является анализ видового состава комаров различных регионов России и зарубежья, определение их экологических предпочтений и популяционный анализ на основе полногеномного секвенирования наиболее распространённого на территории Евразии вида малярийных комаров *An. messeae* s. l.

В задачи работы входит:

Первая часть.

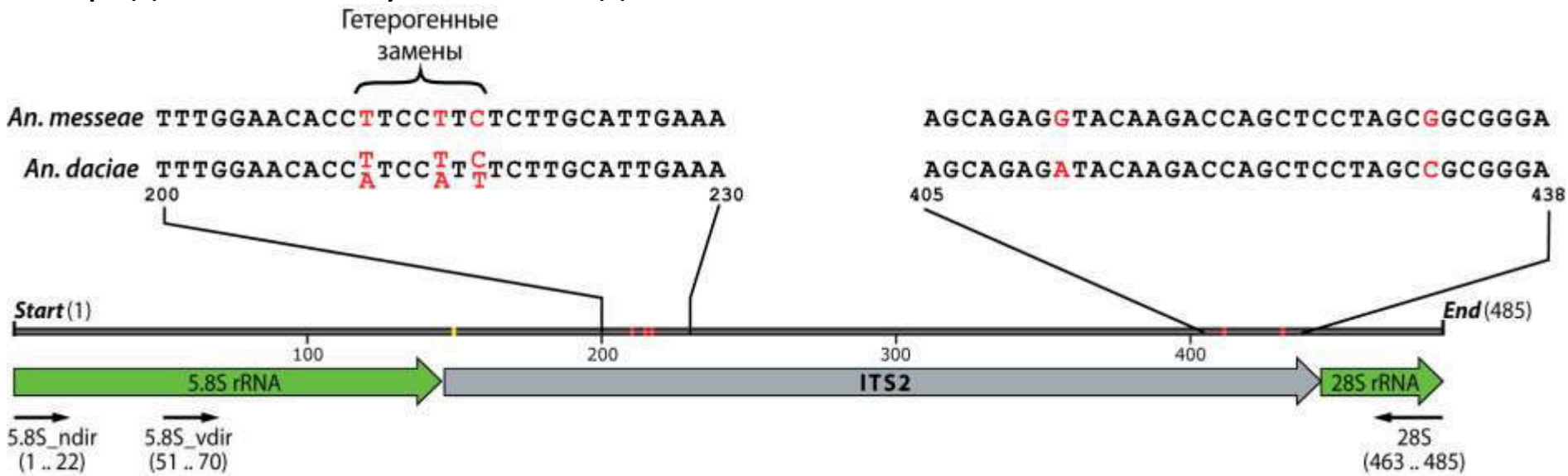
Определение видового состава трех популяций малярийных комаров из Томской области на основе анализа ITS2 и анализ экологических предпочтений комаров разных видов.

А) Выделение образцов ДНК из комаров.

Б) Проведение полимеразной цепной реакции (ПЦР) с использованием праймеров, позволяющих амплифицировать внутренний транскрибируемый спейсер 2 (ITS2), и гель-электрофореза ПЦР-продуктов.

В) Секвенирование участков ITS2 для *An. messeae* s. l., для определения видов-двойников.

Г) На основе анализа полученных результатов выявить экологические предпочтения изучаемых видов.



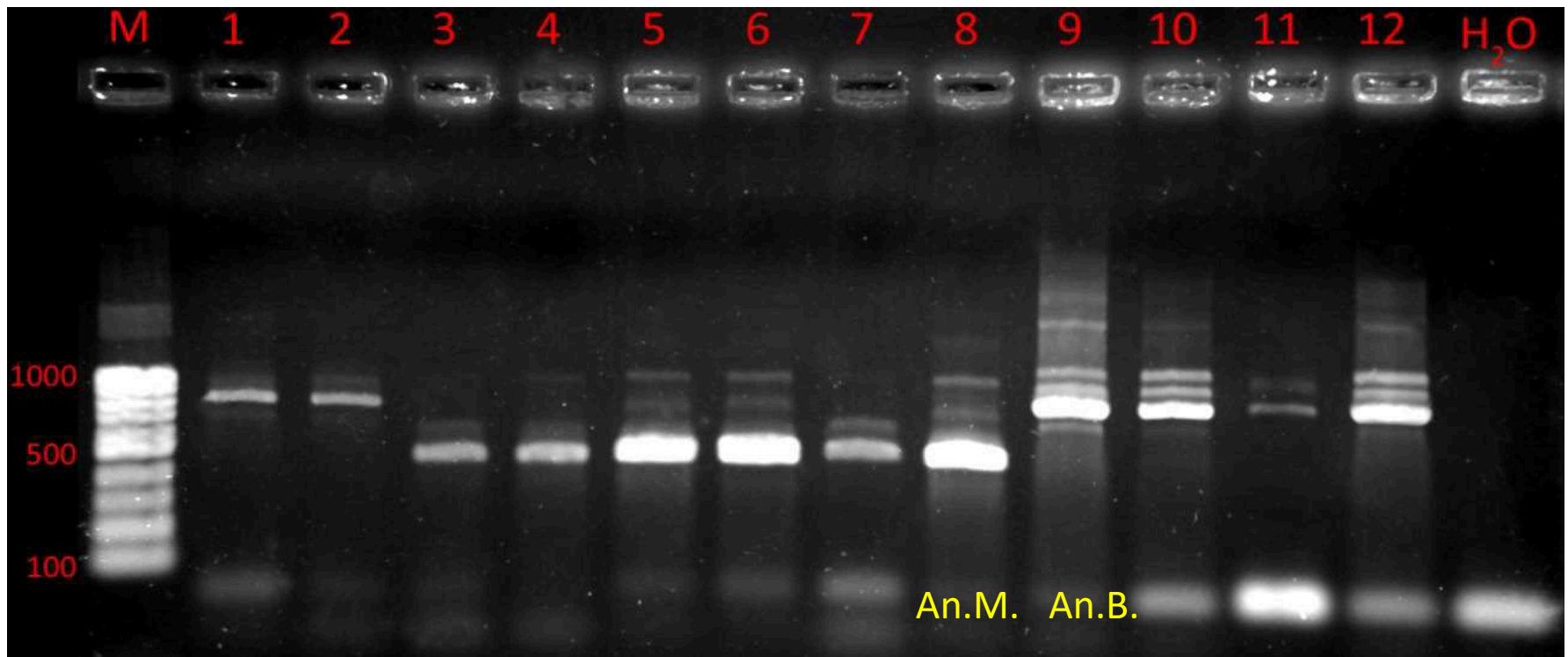
Выделение образцов ДНК

- ДНК выделялась из тел личинок комаров, собранных в 3 разных водоёмах (В, F, D) села Тегульдет Томской области, различающихся по экологическим характеристикам (составу воды, растительности).
Водоем F является классическим анофелогенным водоемом, расположенным рядом с рекой, со сравнительно высокой плотностью личинок. Водоемы В и D являются водоемами с низкой плотностью личинок. Известно, что от плотности зависят скорость развития и жизнеспособность комаров на доимагинальных стадиях развития.
- С этой ДНК провели ПЦР-анализ ITS2.



Разделение видов *An. Beklemishevi* и *An. Messeae* с помощью гель-электрофореза

- Для электрофореза использовался агарозный гель с концентрацией 1%, (агароза: буфер TBE). По результатам фореа можно разделить *An. Beklemishevi* и *An. Messeae* s. l., так как у первого вида длина ITS2 (800 п.н.) вдвое превышает длину у второго (400 п.н.)



Результаты

Водоем	<i>An. beklemishevi</i>	<i>An. messeae</i>	<i>An. daciae</i>	Гибриды
T(B)	93,33 %	0,00 %	6,67 %	0,00 %
T(D)	65,12 %	4,65 %	25,58 %	4,65 %
T(F)	5,41 %	75,68 %	18,92 %	0,00 %

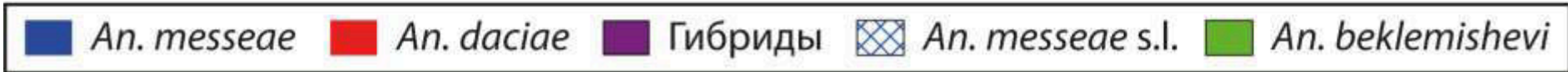
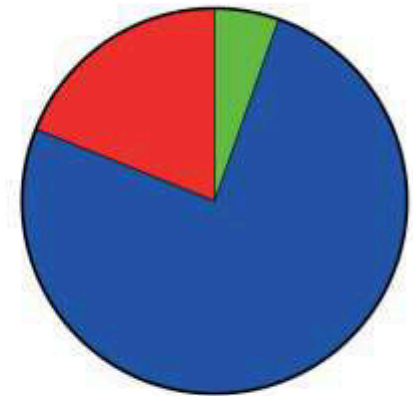
водоем В



водоем D



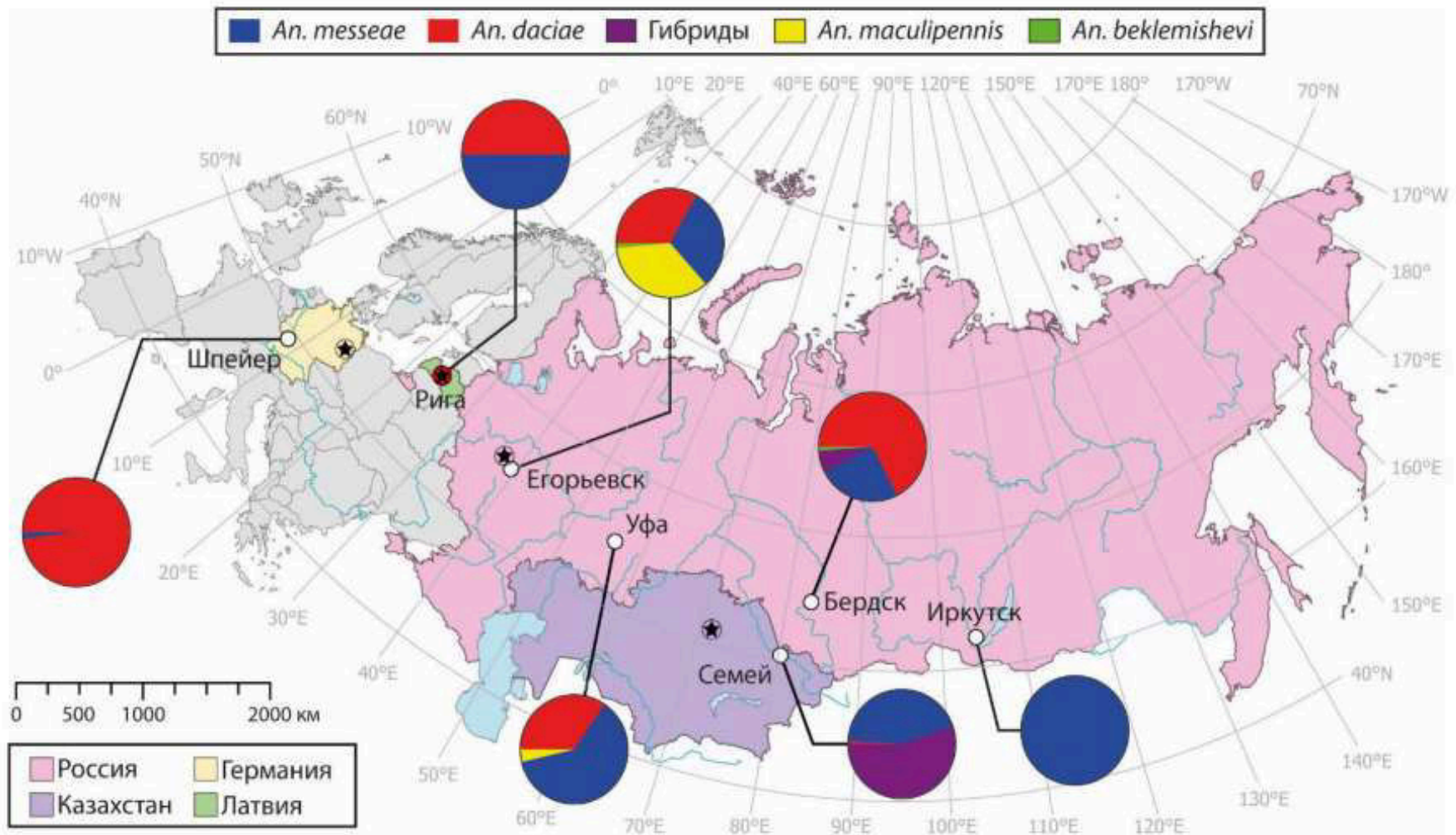
водоем F



Задачи работы, вторая часть:

- Популяционный анализ с использованием результатов полногеномного секвенирования 55 индивидуальных геномов *An. messeae* s. l. из 6 популяций (три популяции из России, по одной из Казахстана, Латвии и Германии).
- 55 образцов ДНК были отправлены на секвенирование в фирму “Novogen”, Англия.
- Секвенирование было выполнено для *An. messeae* и *An. daciae* и их гибридов с использованием платформы Illumina NovaSeq 6000, 2×150 bp, с приблизительно 10× покрытием генома.

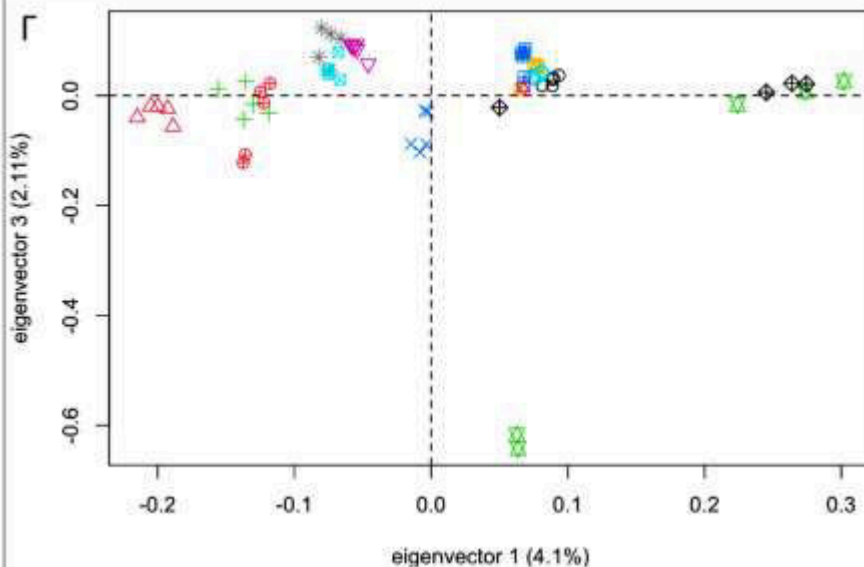
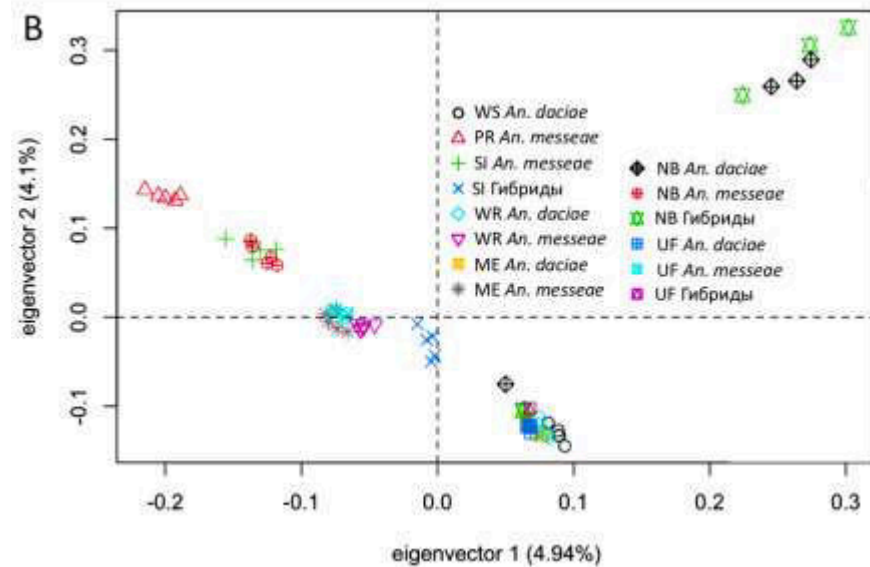
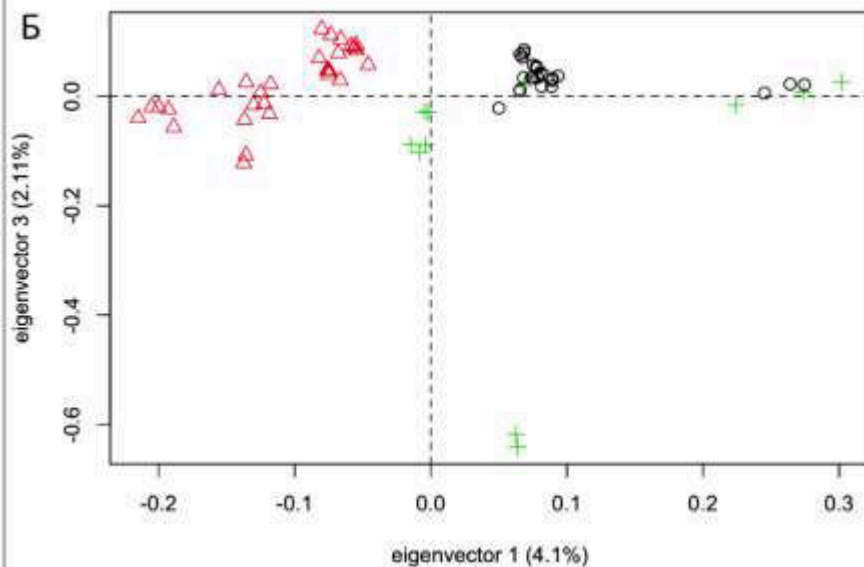
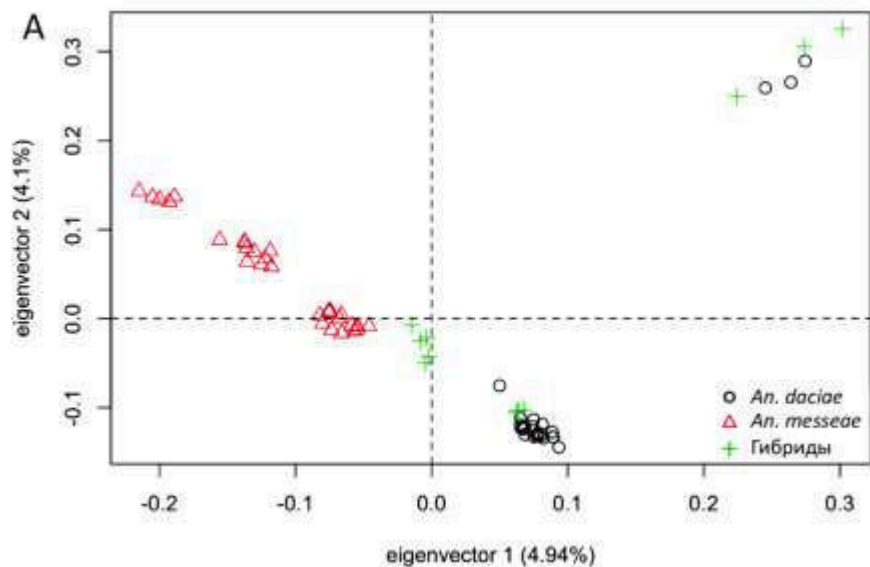
Места обитания исследуемых популяций



Биоинформационный анализ, этап 1

- Для первичного общего анализа был использован метод главных компонент (PCA), который позволяет увидеть общую структуру изучаемых популяций. Анализ проводился по признаку однонуклеотидных замен (SNP), используя пакет SNPrelate v 1.20.159 в среде R v 4.05.

Результаты: метод главных компонент



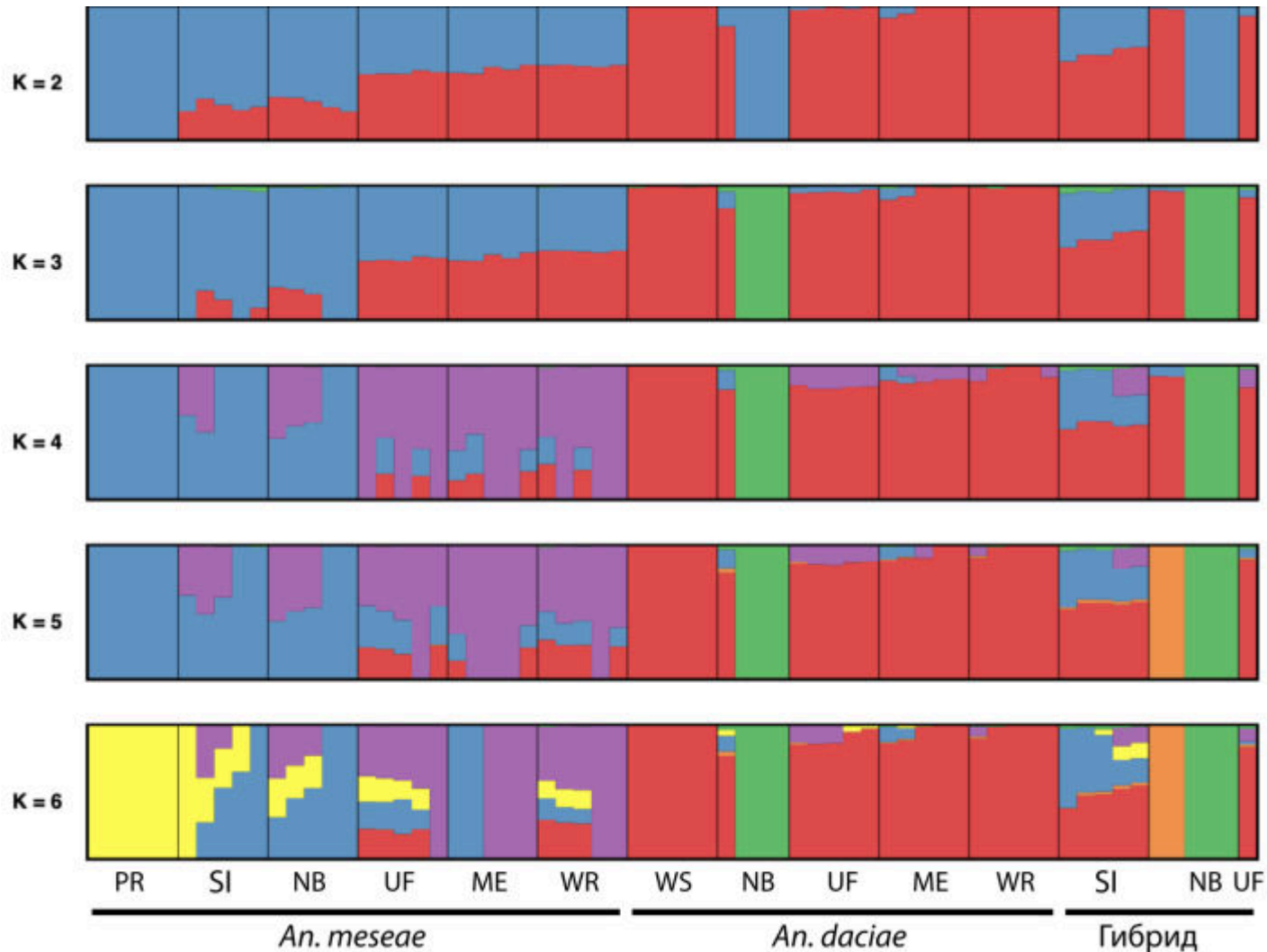
Биоинформационный анализ, этап 2

- Также были построены филогенетические деревья отдельно для аутосом и для X-хромосомы.
- В X хромосоме расположены широко распространённые хромосомные варианты, по которым виды сильнее всего отличаются. Так, у *An. messeae* отсутствуют варианты XL00 и XL01, в то время как у *An. dasiae* представлены все три варианта (XL00, XL01, XL11).

Биоинформационный анализ, этап 3

- Наконец, была проведена кластеризация индивидуальных геномов на основе мультилокусных генотипов аутосом в пакете ADMIXTURE. Анализировалось от 2 до 6 разных генотипов.

Результаты: кластеризация



Обсуждение результатов

- В пространстве главных компонент виды четко разделяются вдоль первой компоненты, при этом популяции *An. messeae* демонстрируют гораздо большее генетическое разнообразие, в то время как особи из удаленных популяций *An. daciae* группируются вместе. Гибриды ожидаемо занимают промежуточное положение между видами.
- Анализ деревьев показывает, что расхождение между видами наблюдалась как по аутосомам, так и по X хромосоме, но различие более выражена по X хромосоме.
- Кластеризация позволила выявить однонаправленные генные потоки от *An. daciae* к *An. Messeae*. При этом 3 образца *An. daciae* и гибриды из Бердска сильно отличаются от остальных. Возможно это связано с присутствием в Бердской популяции *An. Veklemishevi*, скрещивание с которым может влиять на генофонд популяции.

Резюме

- Таким образом, исходя из проведенного исследования можно резюмировать, что виды совершенно четко разделяются между собой особенно по X хромосоме, между ними существует однонаправленный поток генов (от *An. daciae* к *An. messeae*), при этом *An. daciae* представлен одной большой панмиктической популяцией, в то время как *An. messeae* подразделен на локальные географические популяции. Это может быть связано с тем, что *An. daciae* достаточно быстро расширил свой ареал, возможно в связи с глобальным потеплением климата, и поэтому его популяции не успели накопить различия в отличие от *An. messeae*, более холодоустойчивого вида.

Выводы

- 1) С помощью ПЦР и секвенирования ITS2 генов рРНК определен видовой состав личинок из трех популяций малярийных комаров с. Тегульдет Томской области. Установлено, что видовой состав в изученных водоемах существенно отличается, причем пропорция *An. beklemishevi* и *An. messeae* s.l. сохраняется значительное время. Это свидетельствует о наличие четких экологических предпочтений у изучаемых видов.
- 2) Выполнен биоинформационный анализ с использованием результатов полногеномного секвенирования 65 индивидуальных геномов *An. messeae* s. l. из 7 популяций (четыре популяции из России, по одной из Казахстана, Латвии и Германии). Установлено, что изучаемые виды разделяются между собой, особенно сильно различия выражены по X хромосоме. Различия между популяциями отчетливо выражены у *An. messeae* и слабо у *An. Daciae*.

Приборы и оборудование

- В работе использованы следующие приборы и оборудование:
амплификатор Eppendorf Mastercycler gradient,
центрифуги Eppendorf 5415C и 5417R, электрофоретическое оборудование,
система документирования гелей Bio-Rad Chemidoc XRS+.
Для работы с сиквенсами использовались программы Chromas v. 2.6 и UGENE v. 35.
Для анализа электрофореграмм использовалась программа Bio-Rad Image Lab v. 6.0.1.
Анализ методом главных компонент (PCA) выполняли, используя пакет SNPrelate v 1.20.159 в среде R v 4.05.
Кластеризация особей на основе генотипов проводилась в программе ADMIXTURE для $K=2-6$, для конвертации VCF использовался пакет PLINK v 1.9.
Построение не укоренённых филогенетических деревьев по методу ближайшего соседства осуществлялось в программе rapidnj на основе расстояний Кимуры и тестировалось с помощью 10000 бутстреп-реплик.