

УДК 59.595.76 575.2

**МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ И ГЕНЕТИЧЕСКИЕ РАЗЛИЧИЯ
МЕЖДУ КОМАРАМИ *CULEX VAGANS* WIEDEMANN, 1828
И *CULEX TORRENTIUM* MARTINI, 1925
(DIPTERA, CULICIDAE)**

© 2021 г. М. В. Федорова, ^{1*} Е. В. Шайкевич, ^{2,3**} К. А. Сычева, ^{4***}
А. В. Халин, ^{5****} И. М. Махинова, ^{6*****} Л. А. Ганушкина ^{3*****}

¹ Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии Роспотребнадзора
ул. Новогиревская, 3а, Москва, 111123 Россия
* e-mail: culicidae@mail.ru

² Институт общей генетики им. Н. И. Вавилова РАН
ул. Губкина, 3, Москва, 119991 Россия
** e-mail: elenashaikevich@mail.ru

³ Институт медицинской паразитологии, тропических и трансмиссивных заболеваний
им. Е. И. Марциновского Первого МГМУ им. И. М. Сеченова
ул. Малая Пироговская, 20, Москва, 119435 Россия
***** e-mail: lganushkina@mail.ru

⁴ Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова
ул. Колмогорова, 1, стр. 12, Москва, 119192 Россия
*** e-mail: k.sycheva2019@gmail.com

⁵ Зоологический институт РАН
Университетская наб., 1, С.-Петербург, 199034 Россия
**** e-mail: hallisimo@yandex.ru

⁶ Читинская противочумная станция Роспотребнадзора
ул. Биологическая, 1, Чита, 672014 Россия
***** e-mail: mixer-i@mail.ru

Поступила в редакцию 29.10.2020 г.

После доработки 7.08.2021 г.

Принята к публикации 7.08.2021 г.

Для уточнения диагностики видов *Culex vagans* и *C. torrentium* изучены морфологические особенности гениталий самцов, а также маркерные участки ДНК (*COI* и *ITS2*). Исследованы бальзамные микропрепараты гениталий самцов данных видов из различных частей ареалов, для генетического анализа использован спиртовой материал. Обнаружены морфологические различия между гениталиями самцов *C. vagans* и *C. torrentium* в форме латеральной пластинки фаллосомы. Генетические различия между видами составляют 3.5–3.6 % по участку гена *COI* и 14 % по участку ядерного маркера *ITS2*. Последовательность *ITS2* у *C. vagans* установлена впервые. Полученные данные могут быть использованы для определения *C. vagans* и *C. torrentium* и уточнения их ареалов.

Ключевые слова: кровососущие комары, диагностика видов, гениталии самцов, молекулярная филогения, *COI*, *ITS2*, *Culicidae*, *Culex vagans*, *Culex torrentium*.

DOI: 10.31857/S0367144521030059

Начиная с 90-х годов XX в. в странах Южной и Центральной Европы регулярно регистрируют заболевания лихорадкой Западного Нила (ЛЗН) (Leggiewie et al., 2016). В Российской Федерации природные очаги заболевания находятся на территории Южного федерального округа, в Нижнем и Среднем Поволжье и некоторых областях центрального региона (Platonov et al., 2014). Основные переносчики вируса Западного Нила (ВЗН) – это кровососущие комары рода *Culex* Linnaeus, 1758, в том числе представители группы *pipiens*: *C. pipiens* Linnaeus, 1758 и *C. torrentium* Martini, 1925 (Leggiewie et al., 2016). Данные виды морфологически близки, из них первый встречается в Палеарктике повсеместно, тогда как ареал *C. torrentium* ограничен Европой и Западной Сибирью (Виноградова, 1997). В отечественной литературе в течение длительного времени *Culex torrentium* чаще упоминался как *C. exilis* Dyar, 1924 (Виноградская, 1970; Гуцевич и др., 1970). Между тем название *C. exilis*, согласно ревизии, проведенной Эдвардсом (Edwards, 1926), представляет собой синоним *C. vagans* Wiedemann, 1828 (Гуцевич и др., 1970; Harbach, 1988). *Culex vagans* распространен в восточной части Палеарктики (в том числе на юге Восточной Сибири и на Дальнем Востоке РФ), очень сходен с *C. torrentium* (Гуцевич и др., 1970; Супин, 1983; Chong, Wada, 1985), но не отмечен как переносчик ВЗН. Таким образом, название *C. exilis* в России использовалось для двух видов – *C. torrentium* и *C. vagans*. В последние десятилетия *C. vagans* стал упоминаться в списках видов кровососущих комаров европейской части России (Горностаева, 2000; Будаева и др., 2014) и Западной Сибири (Малькова и др., 2013), т. е. был указан для территорий, выходящих за пределы ранее известного ареала данного вида. Цель нашей работы заключалась в уточнении диагностических признаков, позволяющих надежно дифференцировать *C. vagans* и *C. torrentium*.

Согласно литературным данным, *Culex torrentium* и *C. vagans* имеют ряд морфологических различий.

1. Признаки хетома личинки противоречивы. Так, Гуцевич с соавт. (Гуцевич и др., 1970) указывают наличие 5 пар пучков волосков на сифоне у *Culex vagans* и 4 пар – у *C. torrentium*. Р. Харбах (Harbach, 1988) же отмечает, что у *C. vagans* на сифоне может быть как 4, так и 5 пучков, и предлагает дополнительные признаки для различения этих видов (строение волосков на груди, а также на 3-м, 4-м, 5-м и 10-м сегментах брюшка).

2. Имаго *Culex vagans* характеризуется светлыми продольными полосами на передней поверхности передних и средних бедер и голеней, у *C. torrentium* таких полос нет (Harbach, 1988). Однако Гуцевич с соавт. (Гуцевич и др., 1970) отмечают изменчивость этого признака и наличие экземпляров *C. vagans* с едва выраженными полосами.

3. Гениталии самцов сем. *Culicidae*, как правило, имеют четкие видоспецифичные морфологические признаки, но у *Culex torrentium* и *C. vagans* гениталии очень похожи (Гуцевич и др., 1970). Р. Харбах (Harbach, 1988) указывает на различие в форме дорсальной и латеральной пластин фаллосомы, но не включает эти признаки в определительную таблицу и считает необходимым проведение дополнительных исследований. Кроме того, данный автор отметил следующие различия в строении генитального ап-

парата: лопасти IX тергита с 6–14 щетинками у *C. vagans* и 5–11 – у *C. torrentium*, на бородавке коксита уплощенная щетинка на вершине заострена у *C. vagans* и округлая – у *C. torrentium*.

Генетический анализ подтверждает различия между *Culex pipiens* и *C. torrentium* (Федорова, Шайкевич, 2007; Becker et al., 2012; Danabalan et al., 2012), а также между *C. pipiens* и *C. vagans* (Wang et al., 2012; Maekawa et al., 2016), но специальных сравнительных генетических исследований в отношении *C. torrentium* и *C. vagans* не проводили.

В работе были поставлены следующие задачи: изучить строение генитального аппарата самцов методами световой и растровой электронной микроскопии, а также провести молекулярно-генетический анализ двух маркерных участков ДНК. Один из них находится в области митохондриального гена цитохромоксидазы (*COI*) и ранее был рекомендован для диагностики *C. pipiens* и *C. torrentium* (Shaikevich, 2007; Danabalan et al., 2012), а также использован в Китае, Японии и Южной Корее для определения *C. vagans* (Wang et al., 2012; Maekawa et al., 2016). Второй маркерный участок, расположенный в высоко вариабельной области транскрибируемого спейсера рибосомной РНК (ITS2), также применяли для определения видов рода *Culex* (Miller et al., 1996), в том числе *C. pipiens* и *C. torrentium* в России (Федорова, Шайкевич, 2007). Использование маркеров ядерной ДНК, в частности ITS2, позволяет избежать ошибок видовой идентификации в случаях митохондриальной интрогрессии при гибридизации близких видов (Абрамсон, 2007).

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Работа выполнена в лаборатории паразитологии и в Центре коллективного пользования «Таксон» Зоологического института РАН (ЗИН), а также в лаборатории природно-очаговых инфекций ЦНИИ эпидемиологии и в Институте общей генетики РАН. Использованы материалы фондовых коллекций ЗИН (спиртовой материал, бальзамные микропрепараты), Института Медицинской паразитологии, тропических и трансмиссивных заболеваний (ИМПТиЗ) (спиртовой материал), сборы сотрудников Читинской Противочумной станции (спиртовой материал).

Морфологический анализ. Изучены бальзамные микропрепараты гениталий самцов 2 видов: *Culex vagans* (17 экз.) и *C. torrentium* (10 экз.).

Culex vagans. **Россия.** *Забайкальский край:* Каларский р-н, пос. Чара, 1 ♂ (№ 1704). *Амурская обл.:* г. Зея, 06.IX.1970, 1 ♂ (№ 7) (ИМПТиЗ). *Хабаровский край:* Верхнебуреинский р-н, пос. Ургал, 4 ♂ (№№ 1392, 1394, 1494, 1498). *Приморский край:* г. Уссурийск, 2 ♂ (№№ 1170, 1254); Хасанский р-н, заповедник «Кедровая падь», 8 ♂ (№№ 1253, 1384–1387, 1391, 1393, 1975). **Китай.** Пров. Ляонин, Далянь, 1 ♂ (№ 1390) (ЗИН).

Culex torrentium. **Чехия.** 1 ♂ (№ 1406). **Россия.** *Ленинградская обл.,* 4 ♂ (№№ 277, 1169, 1400, 1402). *Ставропольский край:* г. Ессентуки, 1 ♂; г. Кисловодск, 1 ♂ (№ 1401). *Оренбургская обл.:* г. Оренбург, 22.VI.1935, 1 ♂. *Томская обл.:* г. Томск, 2 ♂ (№№ 1921, 1922).¹

Фотографии препаратов (1–4 фотографии каждого препарата) получали с помощью светового микроскопа Leica MZ95 и видеокамеры Leica DFC320. Обработку фотографий осуществляли в программе Helicon Focus 7. Всего было проанализировано 79 фотографий.

¹ Бальзамные микропрепараты *Culex torrentium* из Оренбурга, Томска, Ессентуков, Кисловодска и Ленинградской обл. (№№ 277, 1169, 1400) были подписаны как *Culex exilis* или *Culex exilis* = *C. torrentium*.

С целью уточнения строения пластин фаллосомы использовали растровый электронный микроскоп (РЭМ) Hitachi TM-1000. Были изучены 3 самца *Culex torrentium* и 2 самца *C. vagans* из коллекции ЗИН. Мы препарировали экземпляры при помощи вольфрамовых игл, микрохирургических ножниц и пинцета под бинокулярным микроскопом Leica MZ95, затем фиксировали на специальных столиках двухсторонним скотчем (Халин, 2009).

Генетический анализ. Всего исследовано 9 экз. *Culex vagans*. *Забайкальский край*: Шилкинский р-н, пос. Галкино, VII.2019, 2 личинки (№№ 1.2 и 1.3). Окр. Читы, IX.2019, 1 ♀ (№ 3). Оловянинский р-н, р. Олон, V.2019, 1 ♀ (№ 4) (Читинская противочумная станция). *Амурская обл.*: г. Зея, сборы 1970 г., 1 ♂ (№ 7), 2 ♀ (№№ 5 и 6) (ИМиТМ). *Приморский край*: с. Красный Яр, 22.VII.1939, 2 личинки (№№ 8 и 9) (ЗИН).

Выделение ДНК проводилось с использованием набора D1Atom™ DNA Prep («Изоген», Москва), ПЦР-набора Evrogen Encyclo PCR kit («Евроген», Москва). Для амплификации ITS2 использовали праймеры 5.8S и 28S (Porter, Collins, 1991). Размер ПЦР-фрагмента составляет для *Culex torrentium* – 410 п. н. и для *C. vagans* – 414 п. н. Участок гена цитохромоксидазы I (*COI*) размером около 750 п. н. амплифицировали с помощью праймеров TY-J-1460 (Simon et al., 1994) и COI-R (Shaikovich, 2007). ПРЦ-продукты выделяли из 1%-ного агарозного геля с помощью набора Clean up extraction kit («Евроген», Москва) для последующего секвенирования с BigDye Termination kit 3.1 (Applied Biosystems, США). Вновь полученные последовательности гена *COI* зарегистрированы в Генбанке (The National Center for Biotechnology Information) под номерами MT711531–MT711536, последовательности локуса ITS2 – под номерами MT711188–MT711190.

Для анализа нуклеотидных последовательностей были применены программы ChromasPro, BLASTN, ClustalW, MAFFT v. 6, MEGA v. 6. Филогенетические деревья построены с использованием метода Neighbor-Joining, эволюционные расстояния рассчитаны методом Maximum Composite Likelihood в программе MEGA v. 6 (Tamura et al., 2013). Результаты сравнивались с данными, полученными ранее для *Culex torrentium* и *C. pipiens* (Федорова, Шайкевич, 2007; Shaikovich, Zakharov, 2010), а также с последовательностями ДНК *C. vagans* и видов рода *Culex*, отобранными из ГенБанка. Соответствующие регистрационные номера представлены на дендрограммах. Статистическую достоверность ветвей филогенетических деревьев оценивали бутстреп-методом (1000 итераций). Генетические различия вычисляли как уровень эволюционной дивергенции между последовательностями и анализировали в программе MEGA v. 6 (Tamura et al., 2013).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Морфологический анализ. Исследование гениталий самцов *Culex vagans* и *C. torrentium* показало, что у обоих видов парапрокт имеет длинные, серповидно изогнутые, склеротизованные базальные отростки, расположенные симметрично относительно фаллосомы (рис. 1, А–Е). Форма, длина и кривизна отростков практически одинаковы у обоих видов. Фаллосома представлена тремя отделами: вентральной, дорсальной и латеральной пластинками. Вентральная пластинка (ventral arm) имеет заостренный дистальный конец, и по форме одинакова у *C. vagans* и *C. torrentium*. Дорсальная пластинка (dorsal arm) в дистальной части у обоих видов также имеет сходную листовидную форму (рис. 1, В, Г, Д, Е). Латеральная пластинка представлена структурой сложной формы. У *C. torrentium* латеральная пластинка широкая, дистальный конец покрыт многочисленными шипиками, а у *C. vagans* – узкая, с редкими шипиками. У основания латеральной пластинки *C. torrentium* развит широкий базальный выступ, который в 1.3–1.6 раза короче дистальной части пластинки; конец выступа тупой, угол между основанием выступа и дистальной частью пластинки острый (рис. 1, Г, Е). У *C. vagans* этот выступ узкий, сужающийся к концу, в 2–2.5 раза короче дистальной части, угол между основанием выступа и дистальной частью пластинки

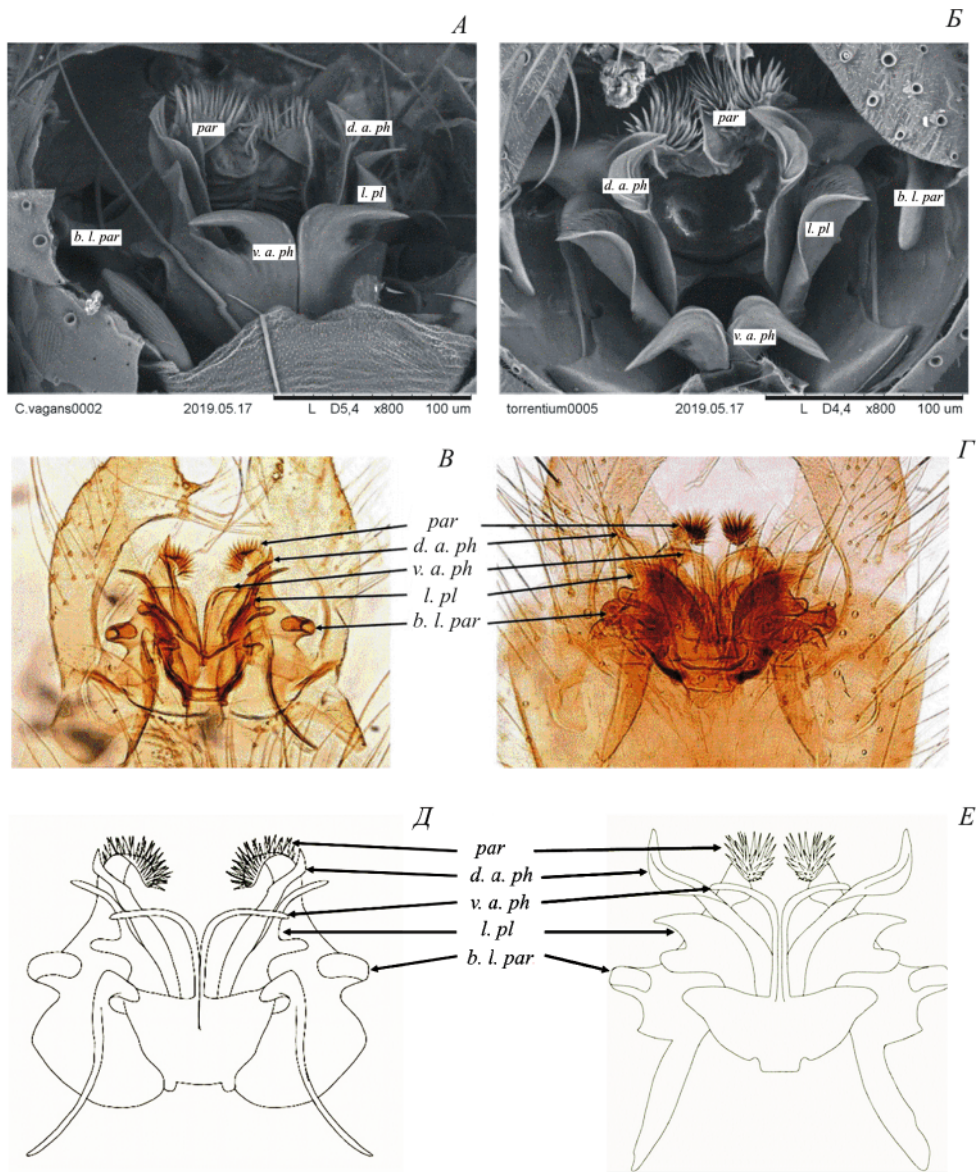


Рис. 1. Гениталии самцов *Culex vagans* Wiedemann (A, B, Д) и *C. torrentium* Martini (Б, Г, E).

A, Б – под сканирующим электронным микроскопом; B, Г – под световым микроскопом; Д, E – схема.
A, B–E – вид снизу; Б – вид сзади.

b. l. par – базальный вырост парапрокта; *d. a. ph* и *v. a. ph* – дорсальная и вентральная пластинки фаллосомы; *l. pl* – латеральная пластинка; *par* – парапрокты.

прямой (рис. 1, В, Д). Гениталии самцов из коллекции ЗИН, подписанные как *Culex exilis* или *Culex exilis* = *C. torrentium*, по строению идентичны таковым *C. torrentium*. Экземпляр имаго ♂ № 7 из коллекции ИМПТиТЗ по строению гениталий определен нами как *C. vagans*.

Генетический анализ. При сравнении нуклеотидных последовательностей гена *COI* мтДНК *Culex vagans* с таковыми *C. torrentium* и *C. pipiens* обнаружены 21 или 22 нуклеотидные замены в паре *C. vagans* и *C. pipiens* и 22–25 замен в паре *C. vagans* и *C. torrentium*. Различия между *C. vagans* и *C. torrentium* составили 3.5–3.6 %, что соответствует уровню межвидовых различий и незначительно превышает уровень различий между *C. pipiens* и *C. torrentium* (табл. 1). Определение имаго ♂ № 7 и личинок №№ 1.2 и 1.3 как *C. vagans* по морфологическим признакам подтверждено анализом маркерного участка *COI* (ГенБанк, №№ МТ711531 и МТ711532).

На филогенетической дендрограмме *Culex vagans*, *C. pipiens* и *C. torrentium* образуют отдельные кластеры, внешняя группа представлена видами группы *sitiens* подрода *Culex*: *C. pseudovishnui* Colless, 1957; *C. tritaeniorhynchus* Giles, 1901 и *C. vishnui* Theobald, 1901 (рис. 2).

Сравнение последовательностей ДНК гена *COI* экземпляров *Culex vagans* выявило 6 митохондриальных гаплотипов (ГенБанк, №№ с МТ711531 по МТ711536). Среди них 3 гаплотипа отмечено в материале из Забайкалья (2019 г.), 2 – из Амурской обл. (1970 г.) и 1 – из Приморья (1939 г.) (см. рис. 2). Полученные последовательности *C. vagans* отличаются от таковых из Южной Кореи на 0.3 %, из Японии – на 0.5 % и из КНР – на 1.3 %, что соответствует уровню внутривидовой изменчивости данного участка ДНК. В целом на исследованном участке гена *COI* различия между особями *C. vagans* из географически удаленных популяций варьировали от 0.3 до 1.6 % (табл. 2). Разнообразие последовательностей ДНК гена *COI* среди наших 9 экз. *C. vagans* составило 0.2 % (см. табл. 2). Для *C. vagans* из Южной Кореи и Японии также характерна изменчивость мтДНК в пределах одной популяции (см. рис. 2, табл. 2).

При сравнении ядерной ДНК мы исследовали область ITS2 кластера генов рРНК и в последовательностях у *Culex vagans*, *C. torrentium* и *C. pipiens* обнаружены замены нуклеотидов, делеции и вставки (рис. 3). Генетические отличия *C. vagans* от *C. torrentium* и *C. pipiens* (биотипы ‘*pipiens*’ и ‘*molestus*’ Forskal, 1775) составляют соответственно 14 и 17 % (см. табл. 1). *Culex vagans* образует отдельный

Таблица 1. Межвидовые и внутривидовые (отмечены полужирным шрифтом) генетические различия в роде *Culex* L. на основе анализа гена *COI* и ITS2

Вид	<i>COI</i>			ITS2		
	<i>C. vagans</i>	<i>C. torrentium</i>	<i>C. pipiens</i>	<i>C. vagans</i>	<i>C. torrentium</i>	<i>C. pipiens</i>
<i>C. vagans</i> Wiedemann	0.00483	0.004*	0.001*	0.00410	0.008*	0.006*
<i>C. torrentium</i> Martini	0.03471	–	–	0.14145	–	–
<i>C. pipiens</i> L.	0.03666	0.01300	–	0.17276	0.14487	–
<i>C. vishnui</i> Theobald	0.07310	0.08435	0.08347	0.18067	0.14284	0,14796

Примечание. * – данные по: Шайкевич, 2015.



Рис. 2. Филогенетическая дендрограмма видов группы *pipiens* по данным анализа нуклеотидных последовательностей митохондриального гена *COI*.

кластер на дендрограмме, значительно отличаясь от кластеров *C. torrentium*, *C. pipiens* и *C. vishnui* (рис. 4). В ГенБанке нет зарегистрированных последовательностей ITS2 *C. vagans* из других регионов. У исследованных нами экземпляров *C. vagans* ДНК в области ITS2 мало вариабельна, внутривидовые различия составляют 0.4 % (см. табл. 1). Нами обнаружено 3 гаплотипа. 1-й (ГенБанк № MT711188) найден у 3 экз. из Забайкалья (№№ 1.2, 3 и 4). 2-й (ГенБанк

Таблица 2. Межпопуляционные и внутривидовые (отмечены полужирным шрифтом) генетические различия у *Culex vagans* Wiedemann на основе анализа гена *COI*

Страна происхождения популяции <i>C. vagans</i>	Россия	Южная Корея	Япония
Россия	0.00187	0.0047	0.0092
Южная Корея	0.00312	–	–
Япония	0.00528	0.00716	–
Китай	0.01329	0.01483	0.01687

№ МТ711189), отличающийся от 1-го одной мутацией (С325Т), обнаружен у всех 3 экз. из Амурской обл. (№№ 5, 6 и 7) и 1 экз. из Забайкалья (№ 1.3). 3-й гаплотип (ГенБанк № МТ711190) найден среди экземпляров *C. vagans* из Приморья и характеризуется отсутствием одного из 6 микросателлитных повторов АС в районе сайтов 168–180.

ОБСУЖДЕНИЕ

Culex vagans, *C. torrentium*, а также *C. pipiens* относятся к группе *pipiens* подрода *Culex*, но принадлежат к разным подгруппам: *C. torrentium* и *C. vagans* – к подгруппе *trifilatus*, а *C. pipiens* – к подгруппе *pipiens* (Harbach, 2011). Однако по мнению Р. Харбаха (Harbach, 1988), среди видов своей подгруппы *C. vagans* занимает особое место, отличаясь от них и от *C. pipiens* наличием продольных полос на передних и средних бедрах и голенях. Этот признак сближает *C. vagans* с видами подгруппы *theileri*. Проведенный нами филогенетический анализ также подтверждает, что *C. vagans* эволюционно далек как от *C. pipiens*, так и от *C. torrentium*, и генетические различия между *C. torrentium* и *C. pipiens* меньше, чем между *C. vagans* и каждым из указанных видов.

Сложности диагностики *Culex vagans* по морфологическим признакам были известны и ранее. Так, *Culex tipuliformis* Theobald, 1901, синоним *C. vagans*, был включен в список видов фауны Турции в 1931 г. Мартини (Martini, 1931, цит. по: Harbach, 1988) на основании признаков гениталий самцов. Повторное изучение данных препаратов показало принадлежность исследуемых экземпляров к *C. torrentium* (Mattingly, 1955). В Египте из-за наличия светлых полосок на передних и средних бедрах и голенях название *C. vagans* ошибочно относили к *Culex theileri* Theobald, 1903 (Ramsdale et al., 2001).

Проведенные нами исследования подтвердили результаты Р. Харбаха (Harbach, 1988): диагностические различия в строении гениталий самцов *Culex vagans* и *C. torrentium* заключаются в форме латеральной пластинки фаллосомы. Харбах исследовал экземпляры из Афганистана, Ирана, Гонконга и 1 экз. из России (Владивосток) – лектотип *C. exilis*. В нашей работе этот список расширен за счет материала из других частей ареала, расположенных на юге Восточной Сибири и на Дальнем Востоке России. Кроме того, морфологические данные нами подтверждены высоким уровнем генетических различий по митохондриальному и ядерному маркерам, что позволяет использовать указанные морфологические признаки для различения *C. vagans* и *C. torrentium*.

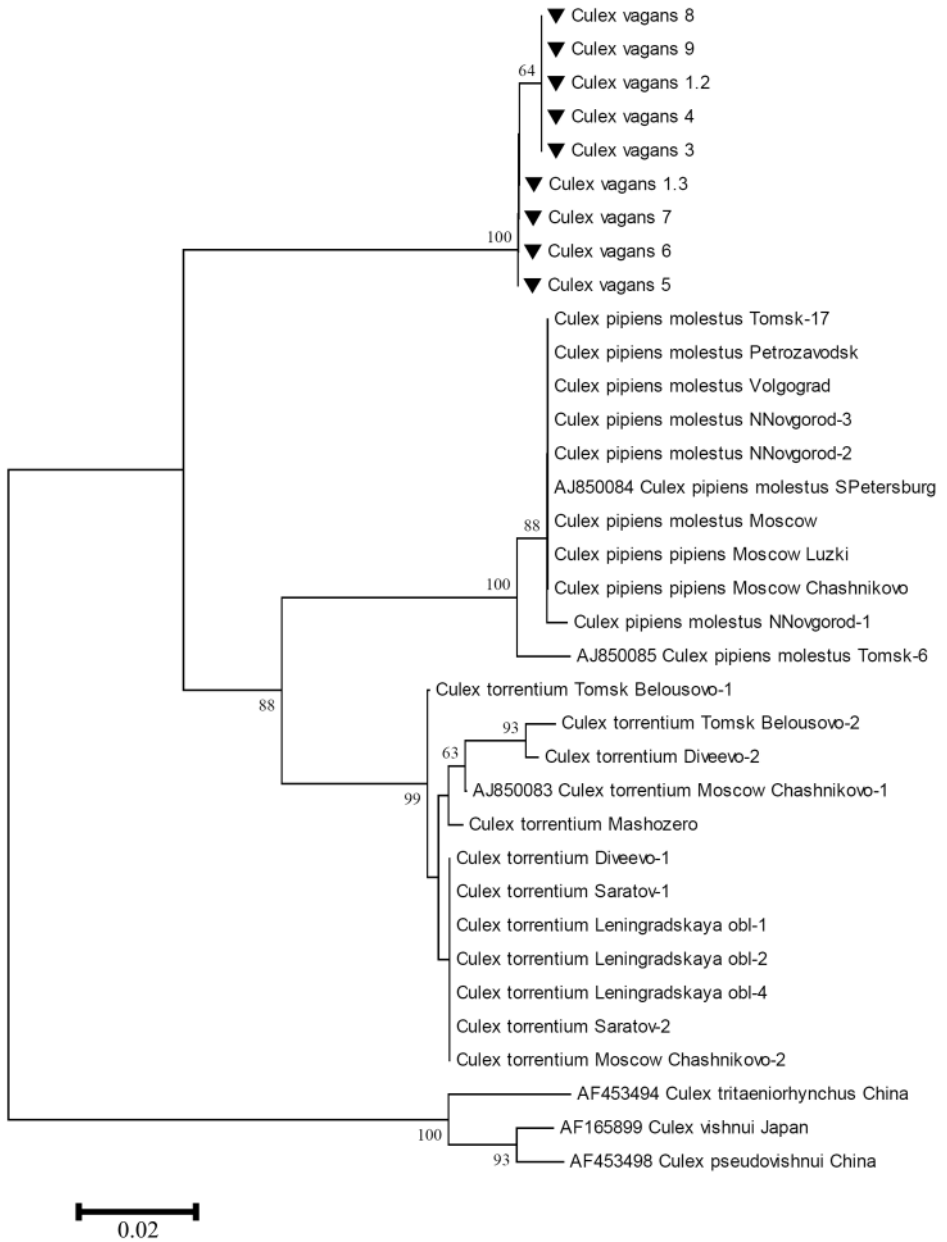


Рис. 4. Филогенетическая дендрогамма форм группы *pipiens* по данным анализа нуклеотидных последовательностей области ITS2 кластера генов рРНК.

Хотя небольшой объем материала не позволяет делать выводы относительно разнообразия популяций *Culex vagans*, интересно отметить генетические различия между экземплярами, собранными в трех регионах с временными промежутками в 30–80 лет. В каждой выборке выявлены митохондриальные гаплотипы, не повторяющиеся у особей из других выборок. Одинаковые ядерные гаплотипы обнаружены у особей, собранных в Забайкалье и Амурской обл. с интервалом в 50 лет. Образцы 1939 г. из Приморья практически идентичны по исследованным генетическим маркерам, но отличаются от экземпляров из других областей. Наиболее разнообразна ДНК у экземпляров, собранных в Забайкалье в 2019 г.: у них обнаружены 3 митохондриальных и 2 ядерных гаплотипа. Расстояния между точками сбора позволяют предполагать пространственную изоляцию особей и независимое накопление мутаций со временем. Такая географическая изменчивость, однако, не превышает обычный порог внутривидовой и свидетельствует о наличии единой популяции *C. vagans* на востоке России. Такое же разнообразие мтДНК было выявлено у *C. torrentium* (Shaikovich, Zakharov, 2010). В отличие от *C. vagans* и *C. torrentium*, у *C. pipiens* наблюдается крайне низкий уровень полиморфизма мтДНК при отсутствии снижения разнообразия ядерной ДНК, что связывают с инфекцией симбиотической бактерией *Wolbachia* (Shaikovich, Zakharov, 2010).

В Европе недавние исследования показали, что *Culex torrentium* – более эффективный переносчик ВЗН, чем *C. pipiens* (Hesson et al., 2014; Zित्रa et al., 2016). Напротив, *C. vagans* не входит в число переносчиков арбовирусных инфекций (Karthika et al., 2018). В средней полосе европейской части России вспышки ЛЗН наблюдаются регулярно в ряде областей, в том числе Воронежской, Липецкой, Саратовской и Ульяновской (Путинцева и др., 2020). Точное определение переносчиков ВЗН имеет большое значение для мониторинга их численности и прогнозирования эпидемической ситуации. Проведенные нами исследования подтвердили отсутствие *C. vagans* на территории европейской части России и Западной Сибири, однако изученный материал недостаточен для того, чтобы делать окончательные выводы. Полученные данные могут послужить основой для определения современных границ ареалов *C. torrentium* и *C. vagans* и уточнения видового состава переносчиков ЛЗН в очагах заболевания.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Подтверждены различия в строении генитального аппарата самцов *Culex vagans* и *C. torrentium*: у первого вида латеральная пластинка фаллосомы и расположенный на ней базальный выступ более узкие.
2. Генетические отличия *Culex vagans* от *C. torrentium* составляют 3.5–3.6 % на исследованном участке гена *COI* и 14 % в области ITS2. Последовательность ITS2 у *C. vagans* установлена впервые.
3. Полученные данные могут быть использованы для различения *Culex vagans* и *C. torrentium* и уточнения их ареалов.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена на базе Центра коллективного пользования «Таксон» при поддержке Государственной темы «Пути формирования видового, таксономического и морфоэкологического разнообразия паразитических и кровососущих членистоногих»

(Гос. регистрационный номер: АААА-А17-117030310209-7) с использованием уникальной фондовой коллекции Зоологического института РАН, а также при финансовой поддержке проекта № 0112-2019-0002 «Генетические технологии в биологии, медицине, сельскохозяйственной и природохозяйственной деятельности».

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Абрамсон Н. И. 2007. Филогеография: итоги, проблемы, перспективы. Вестник Вавиловского общества генетики и селекции **11** (2): 307–331.
- Будаева И. А., Колупаев А. С., Веслевская Е. Ю., Болгова А. В. 2014. К таксономическому составу и изученности кровососущих комаров (Diptera, Culicidae) Воронежской области. В кн.: С. П. Гапонова (ред.) Современные проблемы зоологии и паразитологии. Воронеж: Издательство «Дом ВГУ», с. 21–29.
- Виноградова Е. Б. 1997. Комары комплекса *Culex pipiens* в России (таксономия, распространение, экология, физиология, генетика, практическое значение и контроль). Л.: Зоологический институт РАН, 307 с. (Труды Зоологического института РАН, т. 271).
- Виноградская О. Н. 1970. К нахождению *Culex torrentium* Martini (*Culex exilis* Dyar) в Подмоскowie. Медицинская паразитология и паразитарные болезни **4**: 502–504.
- Горностаева Р. М. 2000. Список комаров (сем. Culicidae) европейской части России. Паразитология **34** (5): 428–433.
- Гуцевич А. В., Мончадский А. С., Штакельберг А. А. 1970. Фауна СССР. Насекомые двукрылые. Л.: Наука, 384 с. (Труды Зоологического института АН СССР. Т. 3, вып. 4).
- Кухарчук Л. П. 1980. Кровососущие комары (Diptera, Culicidae) Сибири. Систематика. Новосибирск: Наука, 223 с.
- Малькова М. Г., Якименко В. В., Винарская Н. П., Немчинова Н. Н., Михайлова О. А. 2013. Кровососущие комары Западной Сибири: фауна, систематика, особенности экологии, методы полевых и лабораторных исследований: методическое пособие. Омск: ООО ИЦ «Омский научный вестник», 80 с.
- Путинцева Е. В., Алексейчик И. О., Чеснокова С. Н., Удовиченко С. К., Бородай Н. В., Никитин Д. Н., Агаркова Е. А., Батурин А. А., Шпак И. М., Фомина В. К., Несговорова А. В., Смелянский В. П., Викторов Д. В., Топорков А. В. 2020. Результаты мониторинга возбудителя лихорадки Западного Нила в Российской Федерации в 2019 г и прогноз развития эпидемической ситуации на 2020 г. Проблемы особо опасных инфекций **1**: 51–60.
- Супин В. И. 1983. Кровососущие комары (Diptera, Culicidae) Восточного Забайкалья. Автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата биологических наук. М., 28 с.
- Федорова М. В., Шайкевич Е. В. 2007. Морфологические и молекулярно-генетические различия имаго комаров *Culex torrentium* и *C. pipiens* (Diptera, Culicidae) Московского региона. Энтомологическое обозрение **86** (1): 32–41.
- Халин А. В. 2009. Трехмерность формы гениталий самцов комаров в диагностике видов рода *Aedes* Meigen, 1818 (Diptera, Culicidae). Паразитология **43** (5): 389–410.
- Шайкевич Е. В. 2015. Генетическая идентификация близкородственных видов насекомых и роль симбионтов в их эволюции (на примере комплекса видов *Culex pipiens* и *Adalia* spp.). Автореферат диссертации на соискание ученой степени доктора биологических наук. М.: Институт общей генетики РАН, 45 с.
- Becker N., Jost A., Weitzel T. 2012. The *Culex pipiens* complex in Europe. Journal of the American Mosquito Control Association **28** (4s): 53–67. doi: 10.2987 / 8756-971X-28.4s.53
- Chong Y. J., Wada Y. 1985. Seasonal prevalence of the vector mosquitoes of Japanese encephalitis virus in Kyungpook Province, Korea. The Korean Journal of Parasitology **23** (1): 139–150.
- Dahl C. 1988. Taxonomic studies on *Culex pipiens* and *Culex torrentium*. Biosystematics of Haematophagous Insects **37**: 149–172.
- Danabalan R., Ponsonby D. J., Linton Y. M. 2012. A critical assessment of available molecular identification tools for determining the status of *Culex pipiens* s. l. in the United Kingdom. Journal of the American Mosquito Control Association **28** (4s): 68–74. <https://doi.org/10.2987/8756-971X-28.0.68>
- Edwards F. W. 1926. Una revisione delle zanzare delle regioni paleartiche. Rivista di Malariologia **5**: 1–152.

- Harbach R. 1988. The mosquitoes of the subgenus *Culex* in Southwestern Asia and Egypt (Diptera: Culicidae). Contribution of the American Entomological Institute **24** (1): 1–239.
- Harbach R. 2011. Classification within the cosmopolitan genus *Culex* (Diptera: Culicidae): The foundation for molecular systematics and phylogenetic research. Acta Tropica **120** (1–2): 1–14. doi: 10.1016/j.actatropica.2011.06.005
- Hesson J. C., Rettich F., Merdić E., Vignjević G., Ostman O., Schäfer M., Schaffner F., Foussadier R., Besnard G., Medlock J., Scholte E.-J., Lundström J. O. 2014. The arbovirus vector *Culex torrentium* is more prevalent than *Culex pipiens* in northern and central Europe. Medical and Veterinary Entomology **28**: 179–186.
- Karthika P., Vadivalagan C., Thirumurugan D., Kumar R. R., Murugan K., Canale A., Benelli G. 2018. DNA barcoding of five Japanese encephalitis mosquito vectors (*Culex fuscocephala*, *Culex gelidus*, *Culex tritaeniorhynchus*, *Culex pseudovishnui* and *Culex vishnui*). Acta Tropica **183**: 84–91. doi: 10.1016/j.actatropica.2018.04.006
- Leggewie M., Badusche M., Rudolf M., Jansen S., Börstler J., Krumkamp R., Huber K., Krüger A., Schmidt-Chanasit J., Tannich E., Becker S. C. 2016. *Culex pipiens* and *Culex torrentium* populations from Central Europe are susceptible to West Nile virus infection. One Health **2**: 88–94. doi: 10.1016/j.onehlt.2016.04.001
- Maekawa Y., Ogawa K., Komagata O., Tsuda Y., Sawabe K. 2016. DNA barcoding for molecular identification of Japanese mosquitoes. Medical Entomology and Zoology **67** (3): 183–198. doi: 10.7601/mez.67.183
- Mattingly P. F. 1955. Mosquitoes (Diptera: Culicidae) from the Tropical Institute at Hamburg. Proceedings of the Royal Entomological Society of London. Series B. Taxonomy **24**: 27–33.
- Miller B. R., Crabtree M. B., Savage H. M. 1996. Phylogeny of fourteen *Culex* mosquito species, including the *Culex pipiens* complex, inferred from the internal transcribed spacers of ribosomal DNA. Insect Molecular Biology **5**: 93–107. doi: 10.1111/j.1365-2583.1996.tb00044.x
- Platonov A. E., Tolpin V. A., Gridneva K. A., Titkov A. V., Platonova O. V., Kolyasnikova N. M., Busani L., Rezza G. 2014. The incidence of West Nile disease in Russia in relation to climatic and environmental factors. International Journal of Environmental Research and Public Health **11** (2): 1211–1232. doi: 10.3390/ijerph110201211
- Porter C. H., Collins F. H. 1991. Species-diagnostic differences in a ribosomal DNA internal transcribed spacer from the sibling species *Anopheles freeborni* and *Anopheles hermsi* (Diptera: Culicidae). The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene **45**: 271–279.
- Ramsdale C. D., Alten B., Çağlar S. S., Ozer N. 2001. A revised, annotated checklist of the mosquitoes (Diptera, Culicidae) of Turkey. European Mosquito Bulletin **9**: 18–27.
- Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipiński A., Kumar S. 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. Molecular Biology and Evolution **30**: 2725–2729. doi: 10.1093/molbev/mst197
- The National Center for Biotechnology Information. [URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>].
- Shaikovich E. V. 2007. PCR-RFLP of the *COI* gene reliably differentiates *Cx. pipiens*, *Cx. pipiens* f. *molestus* and *Cx. torrentium* of the Pipiens Complex. European Mosquito Bulletin **23**: 25–30.
- Shaikovich E. V., Zakharov I. A. 2010. Polymorphism of mitochondrial *COI* and nuclear ribosomal ITS2 in *Culex pipiens* complex and in *Culex torrentium* (Diptera, Culicidae). Comparative Cytogenetics **4** (2): 161–174. <http://dx.doi.org/10.3897/compcytogen.v4i2.45>
- Simon C., Frati F., Beckenbach A., Crespi B., Liu H., Flook P. 1994. Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. Annals of the Entomological Society of America **87** (6): 651–701.
- Wang G., Li C., Guo X., Xing D., Dong Y., Wang Z., Zhang Y., Liu M., Zheng Z., Zhang H., Zhu X., Wu Z., Zhao T. 2012. Identifying the main mosquito species in China based on DNA barcoding. PLoS One **7** (10): e47051. doi: 10.1371/journal.pone.0047051
- Zittra C., Flechl E., Kothmayer M., Vitecek S., Rossiter H., Zechmeister T., Fuehrer H.-P. 2016. Ecological characterization and molecular differentiation of *Culex pipiens* Complex taxa and *Culex torrentium* in Eastern Austria. Parasites & Vectors **9**: 197. doi: 10.1186/s13071-016-1495-4

MORPHOLOGICAL AND GENETIC DIFFERENCES BETWEEN
MOSQUITOES *CULEX VAGANS* WIEDEMANN, 1828
AND *CULEX TORRENTIUM* MARTINI, 1925 (DIPTERA, CULICIDAE)

M. V. Fedorova, E. V. Shaikevich, K. A. Sycheva, A. V. Khalin, I. M. Makhinova,
L. A. Ganushkina

Key words: mosquitoes, identification, male genitalia, molecular phylogeny, *COI*, *ITS2*, Culicidae, *Culex vagans*, *Culex torrentium*.

SUMMARY

Culex torrentium and *C. vagans* are morphologically similar mosquito species, for which the name *C. exilis* was used in Russia for several decades. The aim of the work was to compare the male genitalia and to analyze genetic differences for separation of *C. vagans* and *C. torrentium*. We examined specimens of *C. vagans* and *C. torrentium* sampled in different parts of the species ranges. The results show that *C. vagans* is readily distinguished from *C. torrentium* by the shape of the lateral plates of the phallosome. Genetic differences between the species are 3.5–3.6% for the *COI* gene and 14% for the *ITS2* nuclear marker and reliably differentiate *C. vagans* from *C. torrentium*. The *ITS2* sequence of *C. vagans* is determined for the first time. The data obtained can be used to separate *C. vagans* and *C. torrentium* and to specify their ranges.