

ДНК-БАРКОДИРОВАНИЕ И МОРФОЛОГИЧЕСКАЯ ИДЕНТИФИКАЦИЯ КОМАРОВ РОДА *Aedes* (Diptera: Culicidae) ПОДРОДА *Stegomyia* РОССИИ И СЕВЕРНОГО ВЬЕТНАМА

© 2022 г. А. Бега^{2, *}, Т. Ву¹, И. И. Горячева^{1, 2}, А. В. Москаев², Б. В. Андрианов^{1, 2, **}

¹Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук, Москва, 119991 Россия

²Московский государственный областной университет, Московская область, Мытищи, 141014 Россия

*e-mail: anni.miya@gmail.com

**e-mail: andrianovb@mail.ru

Поступила в редакцию 28.06.2021 г.

После доработки 03.09.2021 г.

Принята к публикации 13.09.2021 г.

Методом ДНК-баркодирования охарактеризована изменчивость комаров рода *Aedes* подрода *Stegomyia* на юге европейской части России и на Дальнем Востоке России: в Приморском и Хабаровском краях, Амурской области и в Еврейской автономной области и уточнены ареалы инвазивных и потенциально инвазивных видов комаров. Проведено сравнение митохондриальной изменчивости комаров из инвазивной популяции *Aedes albopictus* юга России с комарами из популяции *Ae. albopictus* Северного Вьетнама из области нативного ареала вида. На юге европейской части России обнаружено расширение ареала популяции инвазивного вида *Ae. albopictus* на территории полуострова Крым, на запад до г. Севастополя, и на территории Краснодарского края, на север до г. Тихорецка. В Приморском и Хабаровском краях обнаружен *Aedes flavopictus*, а также и *Aedes galloisi*. В Амурской области обнаружен *Aedes galloisi*. Северная и восточная границы ареала *Ae. flavopictus* совпадают с изотермами: июля +20°C и января –24°C. Впервые выявлены плотные синантропные популяции *Ae. flavopictus* и *Ae. galloisi* на Дальнем Востоке России. Анализ изменчивости BOLD-фрагмента митохондриального гена *COI* позволил выявить 9 новых митохондриальных гаплотипов у *Ae. galloisi* и 10 новых гаплотипов у *Ae. flavopictus*. Проведенный филогенетический анализ полученных нуклеотидных последовательностей выявляет точную кластеризацию гаплотипов, со 100%-ной бутстреп-поддержкой, соответствующую видам *Ae. flavopictus*, *Ae. galloisi*, *Ae. albopictus* и *Aedes aegypti*. Случаев митохондриальной интрогрессии между *Ae. flavopictus* и *Ae. galloisi* в области симпатрического обитания этих видов нами не выявлено. Комары из синантропных популяций *Ae. flavopictus*, *Ae. galloisi* и *Ae. albopictus* близки к мономорфизму.

Ключевые слова: инвазивные популяции, *COI*, природные популяции, *Aedes flavopictus*, *Aedes galloisi*, *Aedes sibiricus*.

DOI: 10.31857/S001667582203002X

Комары рода *Aedes* подрода *Stegomyia* являются основными переносчиками арбовирусных лихорадок человека. К этому подроду относятся инвазивные виды комаров *Aedes albopictus* Skuse, 1895 и *Aedes aegypti* L., 1762, встречающиеся в тропической и субтропической зонах как Старого, так и Нового Света. Оба эти вида за последние 20 лет появились на юге европейской части России. *Ae. aegypti* после длительного отсутствия был обнаружен в 2001 г. на территории большого Сочи [1] и распространялся последующие десять лет вдоль Черноморского побережья Кавказа, после чего численность данного вида начала сокращаться. Снижение численности *Ae. aegypti* совпадает с появлением в 2011 г. *Ae. albopictus* на территории большого Сочи

и расширением его ареала [2, 3]. На территории Дальнего Востока России эти виды не встречаются. Подрод *Stegomyia* на территории Дальнего Востока России представлен двумя видами: *Aedes flavopictus* Yamada, 1921 и *Aedes galloisi* Yamada, 1921. Данные виды комаров на Дальнем Востоке России ранее не образовывали популяции с высокой плотностью и обнаруживались в единичных экземплярах до начала XXI в. [4, 5]. С 2018 г. появились сообщения о больших популяциях кровососущих комаров, похожих на *Ae. albopictus*, в Хабаровске. Для идентификации видов *Aedes* подрода *Stegomyia* используются следующие методы: классическое определение имаго и личинок по морфологическим признакам [4, 6, 7], ПДРФ митохондриальной ДНК

[8], изоферментный анализ [9], изменчивость ядерных рибосомных повторов ITS-1 и ITS-2 [10] и ДНК-баркодирование [11, 12]. Наиболее простым, экономичным и быстрым методом определения видовой принадлежности комаров является морфологический метод. Поэтому мы использовали его для первичной диагностики большого количества особей. Однако некоторые виды комаров подрода *Stegomyia* очень близки по морфологии, к тому же в литературе описана их гибридизация [13]. Поэтому часть особей была подвергнута повторному идентифицированию с помощью метода ДНК-баркодирования. Нами был выбран митохондриальный ген *COI* как локус, по которому в открытых базах имеется наибольший объем данных.

Популяционная изменчивость инвазивных комаров подрода *Stegomyia* была проанализирована в ряде работ [14, 15]. Отмечена значительная изменчивость *Ae. albopictus* на территории предполагаемого нативного ареала в субтропиках Старого Света [16]. На территории России изменчивость *Ae. albopictus* изучалась на территории Краснодарского края [17]. Комары подрода *Stegomyia* Северной Евразии изучены хуже. ДНК-баркодирование *Ae. flavopictus* и *Ae. galloisi* в России проведено нами впервые.

Цель данного исследования – характеристика изменчивости BOLD-фрагмента митохондриального гена *COI* комаров рода *Aedes* (Diptera: Culicidae) подрода *Stegomyia*, отловленных на территории России и Северного Вьетнама, и уточнение современных границ распространения инвазивных и потенциально инвазивных видов комаров подрода *Stegomyia* на юге европейской части России и на Дальнем Востоке России.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Сборы комаров

Имаго комаров рода *Aedes* собирали в июне и июле 2020 г. на территории 54 населенных пунктов юга европейской части России, п-ова Крым, Дальнего Востока России. Личинок комаров рода *Aedes* собирали на территории г. Ханой (Вьетнам). Количественные данные о сборах комаров представлены в табл. 1.

Имаго отлавливали “на себе” эксгаустером, а также в местах дневки и роения с помощью энтомологического сачка. Личинок комаров собирали в типичных местах выплода, естественного и искусственного происхождения. Отловленных насекомых помещали в 96%-ный спирт. Все собранные экземпляры комаров анализировались индивидуально.

Оценка плотности популяции комаров

Оценку плотности имаго проводили на основании активности нападения самок. Нападающих самок отлавливали “на себе” эксгаустером в вечерние часы (с 18:00 до 20:00). Во всех населенных пунктах учеты производили одни и те же три исследователя одновременно, находясь на некотором расстоянии друг от друга. Каждый исследователь садился на стул и обнажал ноги ниже колен. Мы подсчитывали сколько самок комаров нападет за 30 мин. Из полученных сборщиками данных вычислялась средняя величина. Для учета выбирали защищенные от ветра, умеренно затененные места, окруженные растительностью.

Идентификация комаров подрода Stegomyia на Дальнем Востоке России по морфологическим признакам

Определение видов проводили по ключам, опубликованным в определителях комаров [4, 6, 7]. На первом этапе имаго определяли по окраске средне-спинки. Половой диморфизм по этому признаку отсутствует. *Ae. galloisi* и *Ae. sibiricus* различали по типу волосков на бородавке коксита [18].

Морфологическая дифференциация имаго *Ae. flavopictus* и *Ae. albopictus* проводилась по форме чешуек, образующих светлое пятно над основанием крыла самок, и строению гипопигия самцов. Морфологическая идентификация личинок *Ae. albopictus* и *Ae. aegypti* проводилась по типу чешуек щетки VIII членика брюшка и чешуек сифона [19].

Выделение ДНК и ПЦР

Для выделения тотальной ДНК из имаго и личинок каждую особь извлекали из спирта, просушивали и гомогенизировали в лизирующем растворе с протеиназой К. Тотальную ДНК выделяли фенол-хлороформным методом [20]. После очистки ДНК растворяли в деионизованной воде. Концентрация ДНК определялась спектрофотометрическим методом с использованием Implen NanoPhotometer NP80. Чистоту препарата ДНК тестировали по величине отношения 260/280 нм. Концентрацию ДНК в препаратах выравнивали до 4 нг/мкл. ПЦР проводили в конечном объеме 25 мкл с использованием наборов для амплификации EncycloPlus PCR kit (Евроген, Россия) в соответствии с инструкцией фирмы-производителя.

BOLD-фрагменты митохондриального гена *COI* получали с помощью стандартных фолмеровских праймеров LCO1490 и HCO2198 как описано в оригинальной работе [21]. Полученные фрагменты секвенировали.

Таблица 1. Количественные данные о сборах комаров

Населенный пункт	Вид	Количество особей, определенных морфологически	Идентифицированные COI-гаплотипы	Количество нападающих самок в 2020 г. (шт./30 мин)
Хабаровский край				
г. Хабаровск	<i>Ae. flavopictus</i>	150	Fl_1, Fl_2, Fl_3, Fl_4, Fl_5, Fl_8, Fl_10	122
г. Вяземский	<i>Ae. flavopictus</i>	15	—	—
	<i>Ae. galloisi</i>	1	Gal_1	—
г. Бикин	<i>Ae. flavopictus</i>	15	—	14
с. Маяк	<i>Ae. flavopictus</i>	15	—	—
с. Лидога	<i>Ae. flavopictus</i>	15	—	—
г. Комсомольск	<i>Ae. flavopictus</i>	150	Fl_1, Fl_2	89
Приморский край				
пгт. Лучегорск	<i>Ae. flavopictus</i>	15	—	—
с. Пожарское	<i>Ae. flavopictus</i>	15	—	—
г. Дальнереченск	<i>Ae. flavopictus</i>	15	—	—
п. Горные ключи	<i>Ae. flavopictus</i>	15	—	—
с. Дмитриевка	<i>Ae. flavopictus</i>	15	—	—
	<i>Ae. galloisi</i>	1	Gal_5	—
г. Уссурийск	<i>Ae. flavopictus</i>	100	—	82
г. Владивосток	<i>Ae. flavopictus</i>	150	—	106
п. Русский	<i>Ae. flavopictus</i>	15	—	11
г. Фокино	<i>Ae. flavopictus</i>	15	—	—
г. Находка	<i>Ae. flavopictus</i>	150	Fl_2, Fl_5, Fl_6, Fl_7, Fl_9	98
г. Партизанск	<i>Ae. flavopictus</i>	15	—	—
с. Барабаш	<i>Ae. flavopictus</i>	15	—	—
Еврейская автономная область				
пгт. Теплозерск	<i>Ae. flavopictus</i>	15	—	—
Амурская область				
г. Благовещенск	<i>Ae. galloisi</i>	35	Gal_1, Gal_2, Gal_3, Gal_6	68
г. Свободный	<i>Ae. galloisi</i>	26	Gal_4, Gal_7, Gal_8, Gal_9	—
Республика Крым				
г. Севастополь	<i>Ae. albopictus</i>	50	Alb_1	28
г. Ялта	<i>Ae. albopictus</i>	15	Alb_1	14
Краснодарский край и Республика Адыгея				
г. Тихорецк	<i>Ae. albopictus</i>	100	Alb_2	51
пгт. Джубга	<i>Ae. albopictus</i>	50	—	47
пгт. Агой	<i>Ae. albopictus</i>	15	—	—
г. Туапсе	<i>Ae. albopictus</i>	50	—	59
с. Шепси	<i>Ae. albopictus</i>	50	—	—
с. Зубова Щель	<i>Ae. albopictus</i>	300	—	41
с. Детляжка	<i>Ae. albopictus</i>	15	—	—

Таблица 1. Окончание

Населенный пункт	Вид	Количество особей, определенных морфологически	Идентифицированные COI-гаплотипы	Количество нападающих самок в 2020 г. (шт./30 мин)
с. Пластунка	<i>Ae. albopictus</i>	15	—	—
г. Адлер	<i>Ae. albopictus</i>	50	—	—
	<i>Ae. cretinus</i>	12	—	—
с. Эстодок	<i>Ae. albopictus</i>	15	—	—
г. Сочи	<i>Ae. albopictus</i>	300	—	237
	<i>Ae. cretinus</i>	42	—	6
ст. Ханская	<i>Ae. albopictus</i>	15	—	—
г. Белореченск	<i>Ae. albopictus</i>	15	—	—
г. Майкоп	<i>Ae. albopictus</i>	300	—	110
г. Апшеронск	<i>Ae. albopictus</i>	15	—	—
г. Хадыженск	<i>Ae. albopictus</i>	15	—	—
с. Гайдук	<i>Ae. albopictus</i>	15	—	—
г. Анапа	<i>Ae. albopictus</i>	50	—	18
г. Геленджик	<i>Ae. albopictus</i>	15	—	—
г. Абинск	<i>Ae. albopictus</i>	50	—	21
пгт. Ильский	<i>Ae. albopictus</i>	15	—	—
пгт. Яблоневский	<i>Ae. albopictus</i>	15	—	—
г. Краснодар	<i>Ae. albopictus</i>	300	—	134
г. Лабинск	<i>Ae. albopictus</i>	15	—	—
г. Армавир	<i>Ae. albopictus</i>	15	—	—
г. Кропоткин	<i>Ae. albopictus</i>	15	—	—
г. Кореновск	<i>Ae. albopictus</i>	15	—	—
г. Тимашевск	<i>Ae. albopictus</i>	15	—	—
г. Усть-Лабинск	<i>Ae. albopictus</i>	15	—	—
с. Цибанобалка	<i>Ae. albopictus</i>	15	—	—
ст. Ладожская	<i>Ae. albopictus</i>	15	—	—
Социалистическая Республика Вьетнам				
Вьетнам. г. Ханой	<i>Ae. albopictus</i>	6	Alb_3, Alb_4, Alb_5	—
	<i>Ae. aegypti</i>	18	Aeg_1, Aeg_2, Aeg_3, Aeg_4, Aeg_5	—

Примечание. Следует отметить, что первичные сборы комаров проводились без разделения на виды. Собирались все комары, относящиеся к роду *Aedes*, и затем проводилась их видовая идентификация. Отсутствие определенного вида комаров в точке сбора означает его отсутствие, а не избирательность при сборах. В населенных пунктах Биробиджан, Смидович из Еврейской автономной области и Чеддомын, Березовый, Де-Кастри из Хабаровского края комаров подрода *Stegomyia* не обнаружено.

Элюция продуктов амплификации

Фрагменты, полученные в результате амплификации, очищали в 1.5%-ном агарозном геле. Элюция фрагментов из геля проводилась с использованием набора для элюции Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit (Zymo Research, США) в соответствии с инструкцией фирмы-производителя.

Секвенирование

Нуклеотидную последовательность ПЦР-фрагментов определяли с прямого и обратного праймеров на приборе 3500 Genetic Analyzer с использованием реагентов BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, США) согласно рекомендациям фирмы-производителя.

Биоинформационный анализ

Анализ хроматограмм проводили с помощью программы ChromasPro 13.3 (Technelysium, Австралия). Выравнивание последовательностей, полученных в результате секвенирования, с последовательностями, размещенными в базах данных GenBank, было выполнено с использованием ресурсов NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Для построения дендрограммы применяли программу MEGA7 [22] с использованием метода ближайших соседей (NJ). Статистическую достоверность полученного дерева оценивали при помощи величины бутстреп-поддержки с числом репликаций 1000. Количественные данные о величине нуклеотидной изменчивости выборки и сравнение межгрупповой и внутригрупповой изменчивости проводили в программе MEGA7 [22].

Медианная сеть митохондриальных гаплотипов была построена в программе PopART [23] с применением алгоритма TCS [24].

Построение рисунков географического расположения точек отлова комаров

Приведенные рисунки являются оригинальными. Первичное построение проводилось в геоинформационной системе “Панорама 14.0.1”. Данные наблюдаемых температур были взяты из научно-прикладного справочника “Климат России” с шагом 2.5 мин. Изотермы построены методом интерполирования. Итоговый вариант рисунка оформлен в программе Adobe Illustrator 2020.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Места сборов комаров на территории Дальнего Востока России представлены на рис. 1. Описание сборов комаров дано в табл. 1.

На территории Приморского края нами были обнаружены два вида комаров подрода *Stegomyia* – во всех точках сбора *Ae. flavopictus* и одна особь *Ae. galloisi*. В Хабаровском крае обитает *Ae. flavopictus*, а также было отловлено две особи *Ae. galloisi*. В более суровом климате и Амурской области встречался только *Ae. galloisi*. Граница, разделяющая ареалы видов, проходит в Еврейской автономной области.

Места сборов комаров на территории юга европейской части России представлены на рис. 2.

На юге европейской части России нами было выявлено два вида комаров рода *Aedes* подрода *Stegomyia*: *Ae. albopictus* и *Aedes cretinus* Edwards, 1921. Мы выявили дальнейшее расширение инвазивной популяции *Ae. albopictus* на север до г. Тихорецка и продвижение комаров на п-ове Крым, на запад до г. Севастополя. На юге Черноморского побережья Кавказа был найден *Ae. cretinus*, который

здесь обитал совместно с *Ae. albopictus*. *Ae. aegypti* обнаружен не был.

Нами также были изучены комары рода *Aedes* подрода *Stegomyia* г. Ханой, из Вьетнама. Были обнаружены *Ae. albopictus* и *Ae. aegypti*. Во всех местах сбора эти виды обитали совместно.

Для характеристики генетической изменчивости комаров мы определили митохондриальные гаплотипы по гену *COI* и провели анализ кластеризации митохондриальных гаплотипов *Ae. albopictus*, *Ae. aegypti*, *Ae. flavopictus* и *Ae. galloisi*. В литературе описаны тысячи зарегистрированных в GenBank последовательностей BOLD-фрагментов митохондриального гена *COI* *Ae. albopictus* и *Ae. aegypti*, зарегистрированных исследователями из многих стран. Среди такого количества последовательностей неизбежно встречаются определенные ошибочно как относящиеся к другому виду, тем более что морфологическая идентификация самок комаров подрода *Stegomyia* не проста. По этой причине мы использовали в качестве контролей последовательности наиболее сходные с нашими последовательностями, но представляющие максимально широкий охват ареала вида, включая как инвазивную часть ареала, так и нативный ареал видов в области тропиков Старого Света. Полученная кладограмма представлена на рис. 3. На этом рисунке систематизированы прежде всего наши собственные данные и мы не претендуем на решение проблемы реконструкции филогенетической истории комаров подрода *Stegomyia* и проблемы происхождения и экспансии инвазивных популяций *Ae. albopictus* и *Ae. aegypti*, которые в настоящее время довольно запутаны.

Мы выявили четкую кластеризацию каждого из видов комаров. Все выявленные видовые кластеры имеют высокие значения бутстреп-поддержки и точно соответствуют разным видам комаров, определенных по морфологическим признакам.

Внутригрупповая изменчивость для кластера *Ae. galloisi* равна 0.005, для кластера *Ae. flavopictus* – 0.005, для кластера *Ae. albopictus* – 0.004, для кластера *Ae. aegypti* – 0.013. Межгрупповая изменчивость равна 0.09.

Во всех случаях внутригрупповая изменчивость существенно меньше межгрупповой. Так как у изученных видов комаров при условии тщательного определения и исключения сомнительных случаев внутривидовая изменчивость всегда меньше межвидовой и выделение видовых кластеров имеет высокую достоверность, мы считаем видовую идентификацию комаров подрода *Stegomyia* на основании анализа изменчивости BOLD-фрагмента митохондриального гена *COI* надежным методом. Особым случаем является пара видов *Ae. sibiricus* и *Ae. galloisi*. Гаплотипы *Ae. sibiricus* кластеризуются вместе с *Ae. galloisi*.

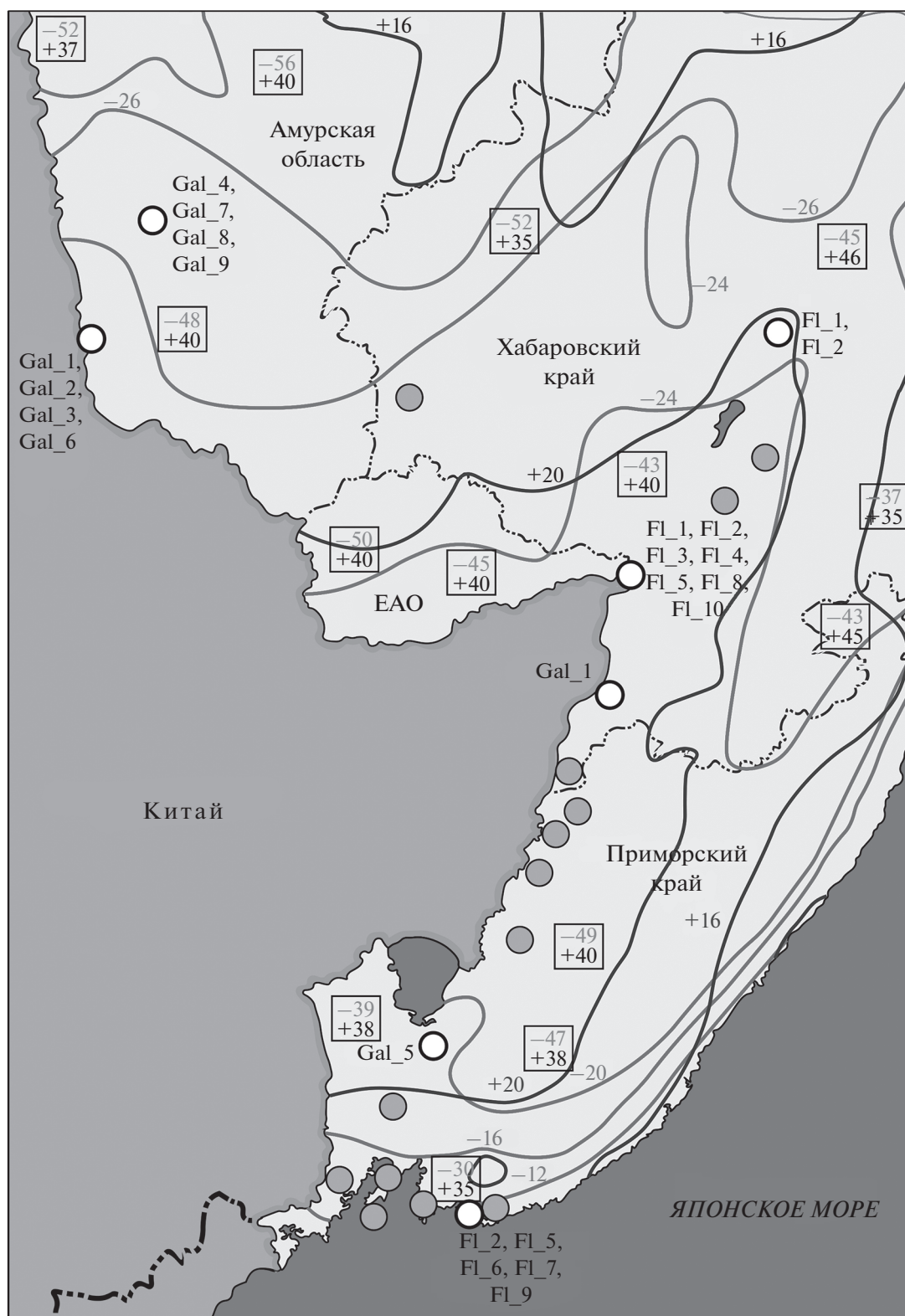


Рис. 1. Географическое расположение точек отлова комаров на территории Дальнего Востока России. Для рис. 1 и 2: линиями обозначены изотермы января и июля. Цифрами в квадратах указаны максимальные и минимальные температурные значения, отмеченные для данного региона. Серыми пунсонами отмечены точки сбора комаров, определенных только морфологическим методом; белыми пунсонами отмечены места сборов комаров, проанализированных морфологически и методом ДНК-баркодирования. Описание митохондриальных гаплотипов дано в табл. 2.

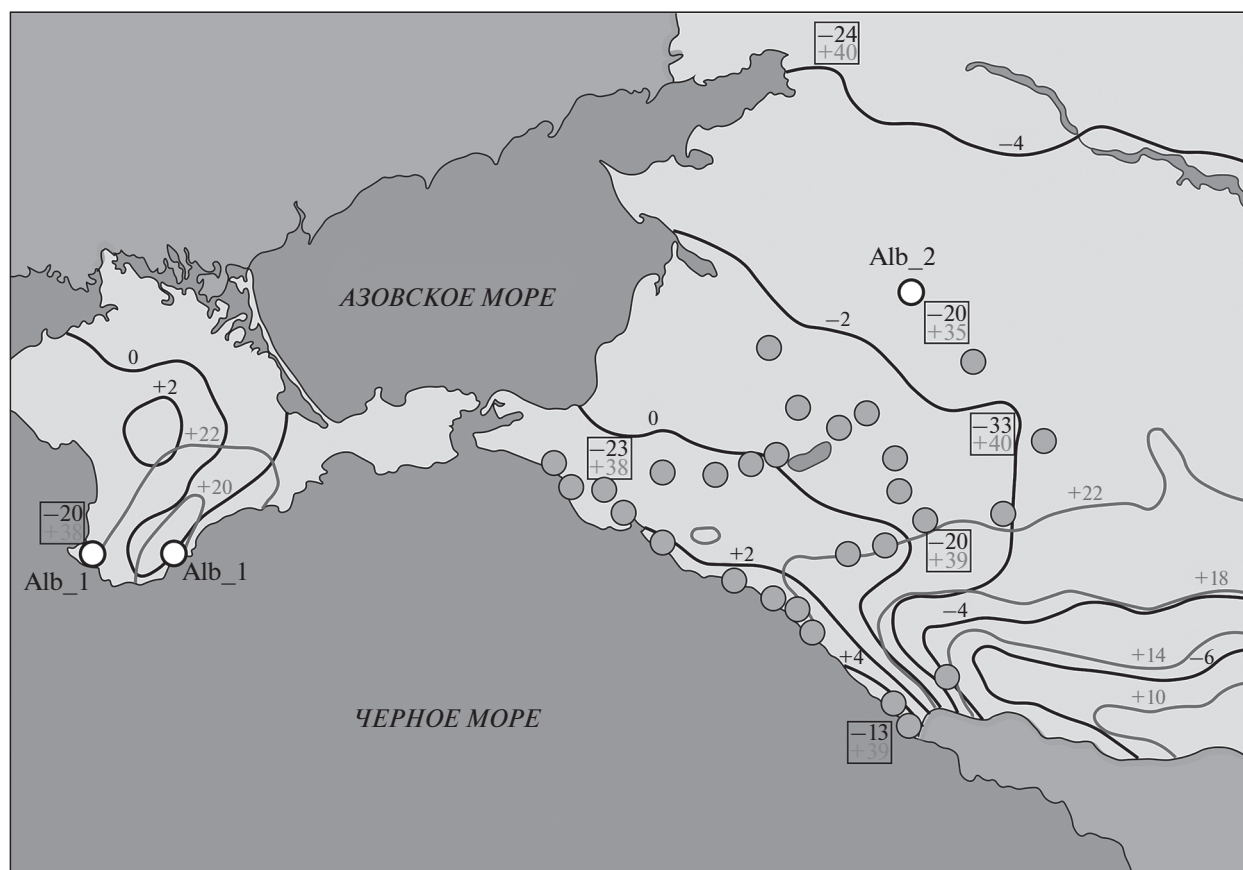


Рис. 2. Географическое расположение точек отлова комаров на юге европейской части России и п-ове Крым.

Всего мы выявили 10 гаплотипов *Ae. flavopictus*, 9 гаплотипов *Ae. galloisi*, 5 гаплотипов *Ae. albopictus* и 5 гаплотипов *Ae. aegypti*. Гаплотип Alb_1 характеризуется мутацией, приводящей к замене изолейцина на валин в 21-й позиции продукта концептуальной трансляции контрольной последовательности BOLD-фрагмента *Ae. albopictus* (GenBank ID: MZ230337). Гаплотип Alb_4 *Ae. albopictus* характеризуется мутацией, приводящей к замене лейцина на фенилаланин в позиции 193. Две значимые мутации выявлены в гаплотипах Gal_2 и Gal_5 *Ae. galloisi* при сравнении с контрольной последовательностью BOLD-фрагмента *Ae. galloisi* (GenBank ID: MZ230351). Гаплотип Gal_2 характеризуется мутацией, приводящей к замене валина на изолейцин в позиции 112, а гаплотип Gal_5 характеризуется мутацией, приводящей к замене аденина на валин в позиции 125 продукта концептуальной трансляции. Количественные данные о гаплотипическом разнообразии изученных комаров приведены в табл. 2. Полученные в данной работе нуклеотидные последовательности BOLD-фрагментов комаров подрода *Stegomyia* перечислены в табл. 2.

Для анализа генетической изменчивости по гену *COI* двух потенциально инвазивных популяций Дальнего Востока России *Ae. galloisi* и *Ae. flavopictus* была построена медианная сеть митохондриальных гаплотипов. Она представлена на рис. 4. Интересной особенностью *Ae. galloisi* и *Ae. flavopictus* является отсутствие четко выраженного предкового гаплотипа, что обычно хорошо видно в случае инвазивных популяций [25]. Тем не менее все гаплотипы образуют компактную группу.

ОБСУЖДЕНИЕ

В Российской Федерации обитает большое количество видов комаров рода *Aedes*, из них шесть видов относятся к подроду *Stegomyia*. Среди разных аспектов биологии комаров подрода *Stegomyia* большое внимание привлекает межвидовая конкуренция и конкурентное исключение видов со сходной биологией. В ряде стран наблюдалось конкурентное исключение *Ae. aegypti* и *Ae. albopictus* в обоих направлениях [26]. Данные виды имеют близкие экологические ниши. *Ae. albopictus* предпочитает агроландшафты, но может обитать и в городах, тогда как *Ae. aegypti* имеет строгое предпочтение к населенным пунктам [27, 28]. Оба

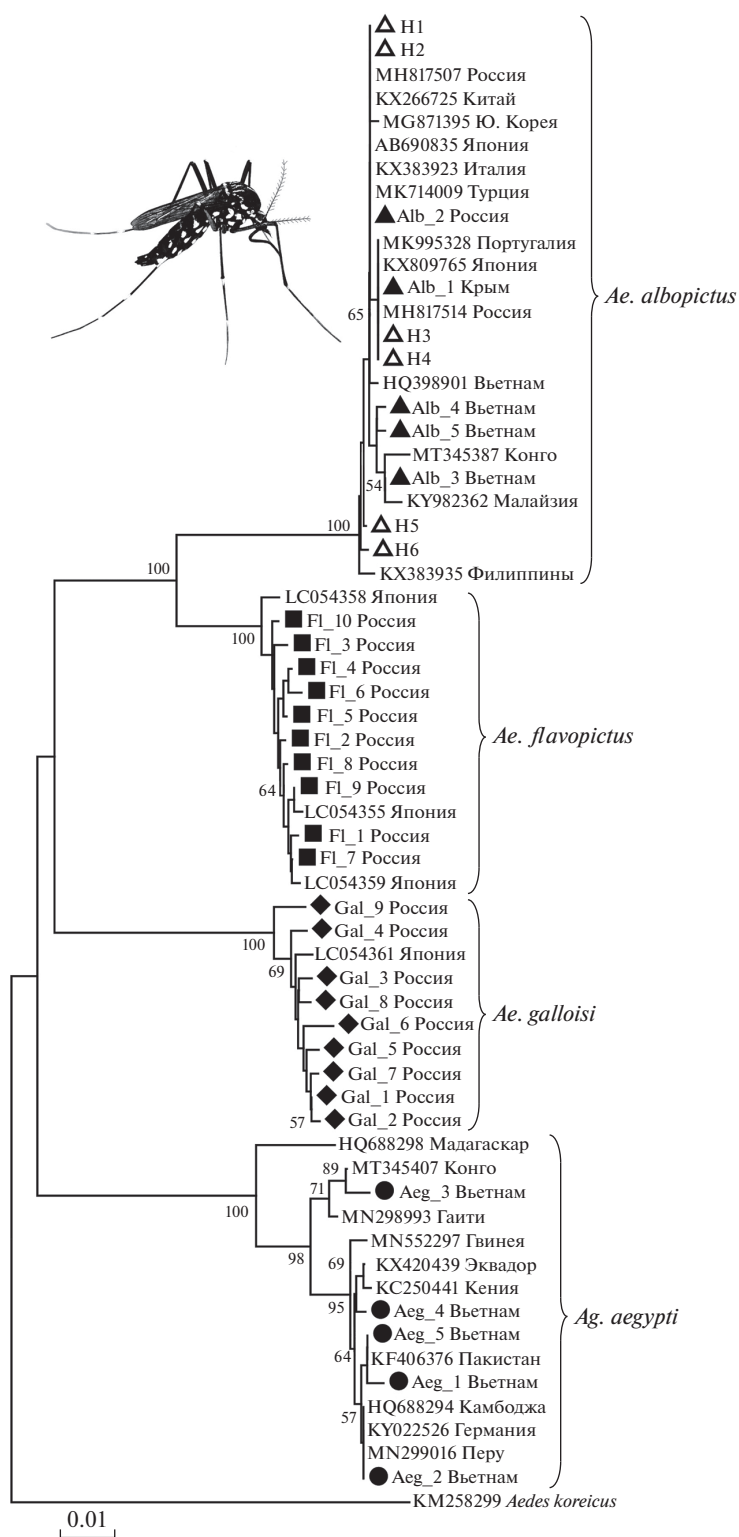


Рис. 3. Кладограмма BOLD-фрагментов митохондриального гена *COI* комаров подрода *Stegomyia*. Темными значками отмечены нуклеотидные последовательности, полученные в данном исследовании и перечисленные в табл. 1 и 2; светлыми значками отмечены нуклеотидные последовательности *Ae. albopictus*, собранные на территории Краснодарского края и описанные в работе [17], но не зарегистрированные в GenBank. Нуклеотидные последовательности, взятые для сравнения, приведены с GenBank номером. В качестве внешней группы взята *Aedes koreicus* из группы *Finlaya*.

Таблица 2. Распространение митохондриальных COI гаплотипов комаров рода *Aedes* подрода *Stegomyia*

Вид	Имя гаплотипа	GenBank ID	Приморский край	Хабаровский край	Амурская область	Краснодарский край и п-ов Крым	Вьетнам, г. Ханой
<i>Ae. albopictus</i>	Alb_1	MZ230336	—	—	—	10	—
<i>Ae. albopictus</i>	Alb_2	MZ230337	—	—	—	10	—
<i>Ae. albopictus</i>	Alb_3	MZ230338	—	—	—	—	4
<i>Ae. albopictus</i>	Alb_4	MZ230339	—	—	—	—	1
<i>Ae. albopictus</i>	Alb_5	MZ230340	—	—	—	—	1
<i>Ae. flavopictus</i>	Fl_1	MZ230341	—	4	—	—	—
<i>Ae. flavopictus</i>	Fl_2	MZ230342	1	5	—	—	—
<i>Ae. flavopictus</i>	Fl_3	MZ230343	—	2	—	—	—
<i>Ae. flavopictus</i>	Fl_4	MZ230344	—	1	—	—	—
<i>Ae. flavopictus</i>	Fl_5	MZ230345	1	2	—	—	—
<i>Ae. flavopictus</i>	Fl_6	MZ230346	1	—	—	—	—
<i>Ae. flavopictus</i>	Fl_7	MZ230347	2	—	—	—	—
<i>Ae. flavopictus</i>	Fl_8	MZ230348	—	1	—	—	—
<i>Ae. flavopictus</i>	Fl_9	MZ230349	1	—	—	—	—
<i>Ae. flavopictus</i>	Fl_10	MZ230350	—	1	—	—	—
<i>Ae. galloisi (Ae. sibiricus)</i>	Gal_1	MZ230351	—	1	5	—	—
<i>Ae. galloisi (Ae. sibiricus)</i>	Gal_2	MZ230352	—	—	1	—	—
<i>Ae. galloisi (Ae. sibiricus)</i>	Gal_3	MZ230353	—	—	1	—	—
<i>Ae. galloisi (Ae. sibiricus)</i>	Gal_4	MZ230354	—	—	1	—	—
<i>Ae. galloisi</i>	Gal_5	MZ230355	—	1	—	—	—
<i>Ae. galloisi (Ae. sibiricus)</i>	Gal_6	MZ230356	—	—	1	—	—
<i>Ae. galloisi (Ae. sibiricus)</i>	Gal_7	MZ230357	—	—	1	—	—
<i>Ae. galloisi (Ae. sibiricus)</i>	Gal_8	MZ230358	—	—	1	—	—
<i>Ae. galloisi (Ae. sibiricus)</i>	Gal_9	MZ230359	—	—	1	—	—
<i>Ae. aegypti</i>	Aeg_1	MZ230360	—	—	—	—	11
<i>Ae. aegypti</i>	Aeg_2	MZ230361	—	—	—	—	6
<i>Ae. aegypti</i>	Aeg_3	MZ230362	—	—	—	—	2
<i>Ae. aegypti</i>	Aeg_4	MZ230363	—	—	—	—	1
<i>Ae. aegypti</i>	Aeg_5	MZ230364	—	—	—	—	3

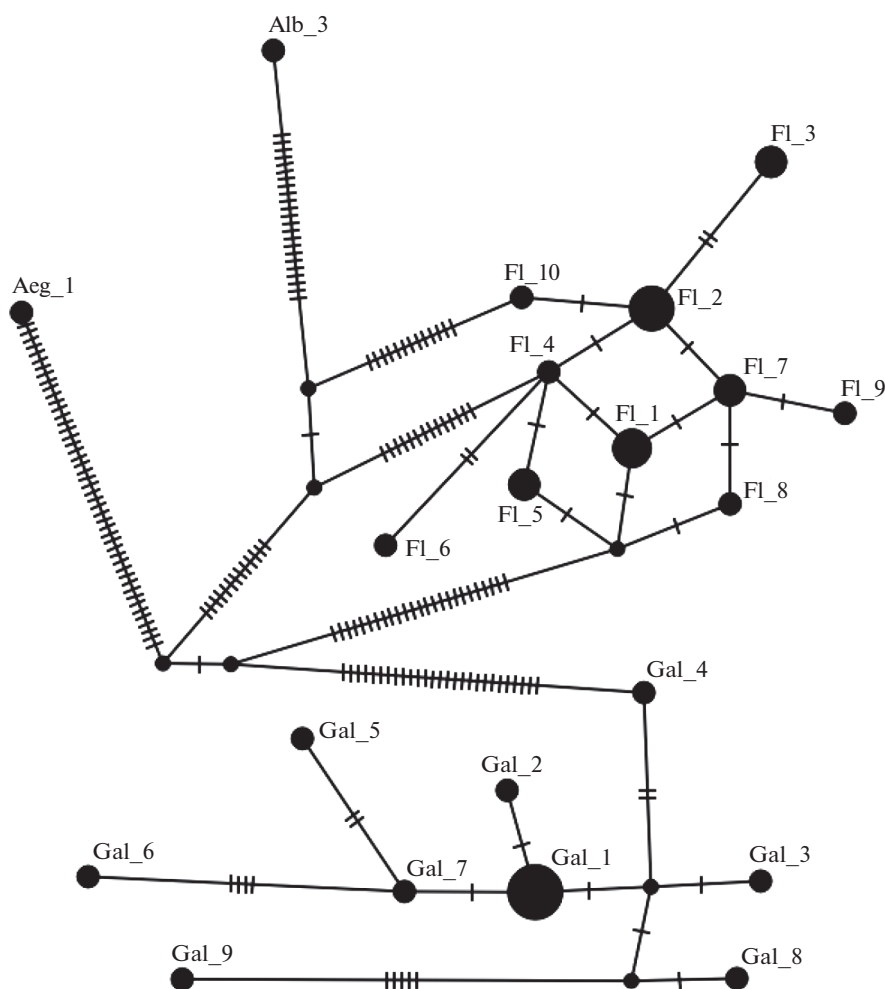


Рис. 4. Медианная сеть митохондриальных гаплотипов *Ae. flavopictus* (FI) и *Ae. galloisi* (Gal) Дальнего Востока России, построенная с участием единичных гаплотипов *Ae. aegypti* (Aeg) и *Ae. albopictus* (Alb). Медианная сеть построена в программе PopArt на основании нуклеотидного полиморфизма фрагмента гена *COI* длиной 658 пн. Штрихи отмечают мутационные события. Размер кружков пропорционален числу синонимичных гаплотипов.

вида выбирают в качестве мест выплода небольшие емкости со стоячей водой, объемом от 100 мл, которые часто оказываются общими. На территории России описаны только инвазивные формы обоих видов. Мы полагаем, что одной из причин исчезновения *Ae. aegypti* на юге европейской части России стала его конкуренция с *Ae. albopictus* на личиночной стадии [29]. Третий вид комаров подрода *Stegomyia*, обитающий на юге европейской части России, — *Ae. cretinus* обнаруживается как в агроландшафте, так и в лесу, в удалении от населенных пунктов. Таким образом, лесная часть популяции почти не конкурирует с *Ae. albopictus*.

Существование конкурентного исключения возможно и в паре видов *Ae. flavopictus* и *Ae. galloisi*, что могло бы объяснить преимущественно раздельное обитание этих видов. Однако в данном случае более вероятно влияние климатических факторов. *Ae. galloisi* может обитать на territori-

ях с существенно более суровым и континентальным климатом, чем *Ae. flavopictus*. Северная и восточная границы ареала *Ae. flavopictus* совпадают с изотермами: июля +20°C и января –24°C.

Отдельного внимания заслуживает уточнение видового статуса *Ae. galloisi*. Используемые нами определители комаров не включали новые данные о выделении вида *Ae. sibiricus* из ранее описанного *Ae. galloisi* [18]. В литературе приводятся ключи для идентификации данных видов по окраске лапок и по строению гипопигия самцов [5, 18], однако в наших сборах окраска лапок сильно варьировала, поэтому мы идентифицировали только самцов по строению гипопигия.

По результатам морфологического анализа все найденные самцы комаров из Амурской области и Хабаровского края были определены как *Ae. sibiricus*, а единственная особь, найденная нами в Приморском крае, — самец *Ae. galloisi*. Такое разде-

ление соответствует экологическим предпочтениям видов. *Ae. sibiricus* обнаруживался в Томской, Новосибирской областях [5]. Ранее *Ae. sibiricus* был обнаружен в Приморском крае [18]. *Ae. galloisi* характерен для территорий со значительно более мягким климатом: Южной Кореи и Японии. Однако результаты ДНК-баркодирования не показали значимых различий между комарами, определенными как *Ae. sibiricus*, особью из Приморского края и *Ae. galloisi* из Японии, гаплотипы которых представлены в GenBank. Возможно, это объясняется тем, что *Ae. sibiricus* и *Ae. galloisi* недавно разделившиеся виды и митохондриальный ген *COI* не подходит для их идентификации.

В базе данных GenBank содержится большое количество данных по митохондриальным гаплотипам комаров подрода *Stegomyia*. Некоторые митохондриальные гаплотипы, зарегистрированные в GenBank как *Ae. albopictus*, кластеризуются с другими видами подрода. Так, гаплотипы с GenBank ID: HQ398902 [30], KY982363, KY982365 [31] кластеризуются с *Ae. galloisi*. Митохондриальные гаплотипы *Ae. albopictus* с GenBank ID: KY982343–KY982352, KY982361 [31], MF148257, MF148262, MF148266, MF148269, MF148272, MF148273, MF148294–MF148300, MF148302, MT434294 Viet Nam кластеризуются с *Ae. aegypti*. Если эти данные верны, то внутривидовая генетическая изменчивость *Ae. albopictus* почти равна изменчивости всего подрода *Stegomyia*. Альтернативным объяснением этих аномалий может являться ошибочное отнесение вышеуказанных образцов к *Ae. albopictus* в силу визуальной схожести комаров подрода *Stegomyia*. Если это так, то вывод о высокой изменчивости *Ae. albopictus* и соответственно о древности нативной популяции вида ошибочен. Существенно отметить, что аномальные последовательности *Ae. albopictus* не образуют уникальных клад, а кластеризуются вместе с известными видами. Мы полагаем, что если исключить случаи сомнительного определения *Ae. albopictus*, то логичным выводом из генетических данных будет представление о *Ae. albopictus* как о молодом виде, недавно прошедшем через период взрывного роста численности. Этот же вывод может быть справедлив и в отношении других видов комаров подрода *Stegomyia*.

Интересной особенностью стало наблюдение смены экологических предпочтений *Ae. galloisi* (*Ae. sibiricus*) и *Ae. flavopictus* на Дальнем Востоке России. Ранее эти виды описывались как лесные, почти никогда не нападающие на человека [5, 10], однако в настоящий момент мы выявили плотные популяции этих видов на территориях крупных городов. Самки *Ae. galloisi* и *Ae. flavopictus* активно питаются на человеке и выбирают в качестве мест для откладки яиц емкости антропогенного происхождения. Мы считаем, что наблюдается переход к синантропному существованию, что значитель-

но повышает инвазивный потенциал этих видов. Инвазивный статус популяций *Ae. galloisi* и *Ae. flavopictus* подтверждается близким родством найденных нами в этих популяциях митохондриальных гаплотипов. Отсутствие единственного доминантного гаплотипа в случае этих видов может быть связано как с начальной стадией формирования инвазивной популяции, так и с другими причинами, например активными процессами миграции. Мы предполагаем дальнейшее расширение ареала и повышение плотности популяций *Ae. galloisi* и *Ae. flavopictus* в Сибири и на Дальнем Востоке Российской Федерации. В этих регионах *Ae. galloisi* и *Ae. flavopictus* могут представлять угрозу как потенциальные переносчики арбовирусных лихорадок человека [32].

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 19-34-90192.

Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены.

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

Все авторы статьи внесли равный вклад в исследование.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Рябова Т.Е., Юничева Ю.В., Маркович Н.Я. и др. Обнаружение комаров *Aedes (Stegomyia) aegypti* в г. Сочи // Мед. паразитол. 2005. № 3. С. 3–5.
2. Ганушкина Л.А., Таныгина Е.Ю., Безжонова О.В., Сергеев В.П. Об обнаружении комаров *Aedes (Stegomyia) albopictus* Skus. на территории Российской Федерации // Мед. паразитол. 2012. № 1. С. 3–4.
3. Коваленко И.С., Якунин С.Н., Абибулаев Д.Э. и др. Обнаружение *Aedes (Stegomyia) albopictus* (Skuse, 1895) в Крыму // Проблемы особо опасных инфекций. 2020. В. 2. С. 135–137. <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2020-2-135-137>
4. Гуцевич В.А., Мончадский А.С., Штакельберг А.А. Насекомые двукрылые. Комары (семейство Culicidae). Фауна СССР. Т. 3. Вып. 4. Л.: Наука, 1970. 384 с.
5. Полторацкая Н.В., Мирзаева А.Г. О новых находках редкого для Западной Сибири вида комаров *Aedes sibiricus* Danilov et Filippova, 1978 (Diptera, Culicidae) // Евразийский энтомолог. журн. 2013. В. 12(2). С. 144–146.
6. Ree H. Taxonomic review and revised keys of the Korean mosquitoes (Diptera: Culicidae) // Korean J. Entomology. 2003. V. 33(1). P. 39–52. <https://doi.org/10.1111/j.1748-5967.2003.tb00047.x>
7. Tanaka K., Mizusawa K., Saugstad E.S. A revision of the adult and larval mosquitoes of Japan (including the Ryukyu Archipelago and the Ogasawara Islands) and Korea (Diptera: Culicidae) // Contrib. Am. Entomol. Inst. 1979. V. 16. P. 1–987.
8. Kambhampati S., Rai K.S. Variation in mitochondrial DNA of *Aedes* species (Diptera: Culicidae) // Evolu-

- tion. 1991. V. 45. P. 120–129.
<https://doi.org/10.2307/2409487>
9. Gaunt C.M.T., Mutebi J.P., Munstermann L.E. Biochemical taxonomy and enzyme electrophoretic profiles during development, for three morphologically similar *Aedes* species (Diptera: Culicidae) of the subgenus *Stegomyia* // J. Med. Entomol. 2004. V. 41(1). P. 23–32.
<https://doi.org/10.1603/0022-2585-41.1.23>
 10. Toma T., Miyagi I., Crabtree M.B., Miller B.R. Investigation of the *Aedes (Stegomyia) flavopictus* complex (Diptera: Culicidae) in Japan by sequence analysis of the internal transcribed spacers of ribosomal DNA // J. Med. Entomol. 2002. V. 39. P. 461–468.
<https://doi.org/10.1603/0022-2585-39.3.461>
 11. Maekawa Y., Ogawa K., Komagata O. et al. DNA barcoding for molecular identification of Japanese mosquitoes // Med. Entomol. Zool. 2016. V. 67. P. 183–198.
<https://doi.org/10.7601/mez.67.183>
 12. Taira K., Toma T., Tamashiro M., Miyagi I. DNA barcoding for identification of mosquitoes (Diptera: Culicidae) from the Ryukyu Archipelago // Med. Entomol. Zool. 2012. V. 63. P. 289–306.
<https://doi.org/10.7601/mez.63.289>
 13. Miyagi I., Toma T. Experimental crossing of *Aedes albopictus*, *Aedes flavopictus downsi* and *Aedes riversi* (Diptera: Culicidae) occurring in Okinawajima, Ryukyu Islands // Japanese J. Sanit Zool. 1989. V. 40. P. 87–95.
 14. Battaglia V., Gabrieli P., Brandini S. et al. The worldwide spread of the tiger mosquito as revealed by mitogenome haplogroup diversity // Front Genet. 2016. V. 23.
<https://doi.org/10.3389/fgene.2016.00208>
 15. Ze-Ze L., Borges V., Osorio H.C. et al. Mitogenome diversity of *Aedes (Stegomyia) albopictus*: Detection of multiple introduction events in Portugal // PLoS Negl. Trop. Dis. 2020. PMID: 32997656. PMCID: PMC7549828.
<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008657>
 16. Minard G., Tran Van V., Tran F.H. et al. Identification of sympatric cryptic species of *Aedes albopictus* subgroup in Vietnam: new perspectives in phyllosymbiosis of insect vector // Parasit. Vectors. 2017. V. 10(1).
<https://doi.org/10.1186/s13071-017-2202-9>
 17. Федорова М.В., Швец О.Г., Медяник И.М., Шайкевич Е.В. Генетический анализ популяции завозных кровососущих комаров *Aedes (Stegomyia) albopictus* (Skuse, 1895) (Diptera, Culicidae) в Краснодарском крае // Паразитология. 2019. Т. 53. № 6. С. 518–528.
<https://doi.org/10.1134/S0031184719060073>
 18. Данилов В.Н., Филиппова В.В. Новый вид комара *Aedes (Stegomyia) sibiricus* sp. n. (Culicidae) // Паразитология. 1978. Т. 12(2). С. 170–176.
 19. Press M. Pictorial keys for the identification of mosquitoes (Diptera: Culicidae) associated with Dengue Virus Transmission // Zootaxa. 2004. 60 p.
<https://doi.org/10.5281/zenodo.169153>
 20. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. М.: Мир, 1984. 479 с.
 21. Folmer O., Black M., Hoeh W. et al. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates // Mol. Mar. Biol. Biotechnol. 1994. V. 3(5). P. 294–299.
 22. Kumar S., Stecher G., Tamura K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets // Mol. Biol. Evol. 2016. V. 33(7). P. 1870–1874.
<https://doi.org/10.1093/molbev/msw054>
 23. Leigh J.W., Bryant D., Nakagawa S. PopArt: full-feature software for haplotype network construction // Methods Ecol. Evol. 2015. V. 6(9). P. 1110–1116.
<https://doi.org/10.1111/2041-210x.12410>
 24. Clement M., Posada D., Crandall K.A. TCS: A computer program to estimate gene genealogies // Mol. Ecology. 2000. V. 9(10). P. 1657–1659.
<https://doi.org/10.1046/j.1365-294x.2000.01020.x>
 25. Андрианов Б.В., Романов Д.А., Горелова Т.В., Горячева И.И. Полиморфизм контрольного района митохондриальной ДНК нативных и инвазивных популяций *Harmonia axyridis* (Coleoptera, Coccinellidae) // Генетика. 2019. Т. 55. № 7. С. 819–825.
<https://doi.org/10.1134/S0016675819070038>
 26. Shragai T., Harrington L., Alfonso-Parra C., Avila F. Oviposition site attraction of *Aedes albopictus* to sites with conspecific and heterospecific larvae during an ongoing invasion in Medellín, Colombia // Parasites Vectors. 2019. V. 12.
<https://doi.org/10.1186/s13071-019-3710-6>
 27. Wilson-Bahun T.A., Kamgang B., Lenga A., Wondji C.S. Larval ecology and infestation indices of two major arbovirus vectors, *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae), in Brazzaville, the capital city of the Republic of the Congo // Parasites Vectors. 2020. V. 13.
<https://doi.org/10.1186/s13071-020-04374-x>
 28. Farjana T., Tuno N., Higa Y. Effects of temperature and diet on development and interspecies competition in *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* // Med. Vet. Entomol. 2012. V. 26(2).
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2915.2011.00971.x>
 29. Бега А.Г., Москаев А.В., Гордеев М.И. Экология и распространение инвазивного вида комаров *Aedes albopictus* (Skuse, 1895) на юге Европейской части России // РЖБИ. 2021. № 1. С. 27–38.
<https://doi.org/10.1134/S2075111721020041>
 30. Cook S., Lien N.G., McAlister E., Harbach R.E. *Bothael-la manhi*, a new species of tribe *Aedini* (Diptera: Culicidae) from the Cuc Phuong National Park of Vietnam based on morphology and DNA sequence // Zootaxa. 2010. V. 266(1). P. 33–46.
<https://doi.org/10.11646/zootaxa.2661.1.2>
 31. Adilah-Amrannudin N., Hamsidi M., Ismail N.A. et al. *Aedes albopictus* in urban and forested areas of Malaysia: A study of mitochondrial sequence variation using the CO1 marker // Trop. Biomed. 2018. V. 3. P. 639–652.
 32. Srisawat R., Phanitchat T., Komalamisra N. et al. Susceptibility of *Aedes flavopictus miyarai* and *Aedes galloisi* mosquito species in Japan to dengue type 2 virus // Asian Pac. J. Trop. Biomed. 2016. V. 6(5). P. 446–450.
<https://doi.org/10.1016/j.apjtb.2016.03.003>

A Barcoding and Morphological Identification of Mosquito Species of the Genus *Aedes* (Diptera: Culicidae) of the Russian Far East and North Vietnam

A. G. Bega^{b, *}, T. Vu^a, I. I. Goryacheva^{a, b}, A. V. Moskaev^b, and B. V. Andrianov^{a, b, **}

^a Vavilov Institute of General Genetics, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119333 Russia

^b Moscow Region State University, Moscow oblast, Mytishchi, 141014 Russia

*e-mail: anni.miya@gmail.com

**e-mail: andrianovb@mail.ru

We characterized variability of mosquitoes of the genus *Aedes*, subgenus *Stegomyia* in the south of European Russia and in the Far East of Russia: in Primorsky, Khabarovsk and Amur regions, and in the Jewish Autonomous Region. We aimed to identify new invasive species of mosquitoes of the subgenus *Stegomyia* and to document expansion of the *Aedes albopictus* range. We analyzed samples of mosquitoes based on a combination of mosquito identification by morphological features and DNA barcoding. We compared the variability of *Ae. albopictus* invasive population of in southern Russia with variability of *Ae. albopictus* population of the native range of northern Vietnam. We found further expansion of *Ae. albopictus* in the south of the European part of Russia, in the west direction to the territory of the Southern coast of the Crimea, and northwards to the city of Tikhoretsk of Krasnodar region. We found *Ae. flavopictus* in Primorsk and Khabarovsk regions. In the Amur region we found *Ae. galloisi*. *Ae. flavopictus* range borders coincide with the isotherms of July +20°C and January –24°C. We found synanthropic dense populations of *Ae. flavopictus* and *Ae. galloisi* in the Russian Far East for the first time. Analysis of variability of the BOLD fragment of the mitochondrial *COI* gene revealed nine new mitochondrial haplotypes of *Ae. galloisi* and ten new haplotypes of *Ae. flavopictus*. The analysis of the obtained nucleotide sequences reveals the exact clustering of the haplotypes, with 100% bootstrap value, corresponding to the species: *Ae. flavopictus*, *Ae. galloisi*, *Ae. albopictus* and *Ae. aegypti*. We do not found cases of mitochondrial introgression between *Ae. flavopictus* and *Ae. galloisi* in the area of sympatric habitat of these species. Synanthropic populations of *Ae. flavopictus*, *Ae. galloisi* and *Ae. albopictus* are close to monomorphism.

Keywords: invasive populations, *COI*, natural populations, *Aedes flavopictus*, *Aedes galloisi*, *Aedes sibiricus*.