

Сведения о выполненных работах в 2016 году
по проекту «**Реконструкция филогении малярийных комаров в группе
Maculipennis**»,
поддержанному Российским научным фондом

Соглашение № 15-14-20011

Руководитель канд. биол. наук Шарахов Игорь Валентинович

Хромосомные фото-карты высокого разрешения являются необходимыми для объективного сравнительного анализа последовательностей хромомерного рисунка, а также документирования локализации нуклеотидных последовательностей ДНК с помощью флуоресцентной *in situ* гибридизации (FISH). В рамках настоящего проекта хромосомные карты необходимы для документирования локализации точек разрывов фиксированных (видоспецифичных) хромосомных перестроек и реконструкции филогенетических взаимоотношений в комплексе *Maculipennis*. Нами были разработаны хромосомные карты для трех видов малярийных комаров *An. sacharovi*, *An. messeae* и *An. beklemishevi*. С целью разработки хромосомных карт *An. sacharovi* была организована экспедиция в Армению. Материал для хромосомных карт *An. messeae* и *An. beklemishevi* был собран в Томской области (с. Чаинск, с. Кандинка, с. Ярское). Идентификация видов проводилась с помощью цитогенетического анализа хромосом трофоцитов яичников. Для приготовления хромосомных карт фиксировали яичники в растворе Карнуа (этанол:уксусная кислота, 3:1). Материал помещали на предметное стекло в каплю 50% пропионовой кислоты, оставляли на 10 минут, накрывали покровным стеклом и раздавливали. Хромосомы анализировали при увеличении 100x в фазовом контрасте под микроскопом Axioimager A1 (Zeiss, Германия). Цифровые изображения политенных хромосом размером 2584x1936 пикселей и разрешением 150 пикселей на дюйм получали с использованием CCD-камеры Mr5 (Zeiss) и программного обеспечения AxioVision 4.8.1 (Zeiss, Германия). В этой программе также проводили измерение длин хромосомных плеч в не менее чем 10 ядрах трофоцитов яичников. Для приготовления хромосомной карты отбирали высококачественные изображения расположенных вне ядер, отдельно лежащих, расплавленных, с четким дисковым рисунком хромосом и обрабатывали в программе Adobe Photoshop CS6. Хромосомы «вырезали», освобождая от лишних участков изображения и «выравнивали», «вырезая» и «склеивая» небольшие участки хромосомы последовательно один за другим от теломерам к центромерам. Комбинировали наиболее удачные районы отдельно выровненных хромосом и «подрезали» контур. Хромосомные плечи были поделены на 39 районов, в соответствии с делением на районы хромосом у других видов малярийных комаров.

Кроме линейной организации хромосом, пространственная организация хромосом в ядре может быть информативным признаком для различения видов малярийных комаров. Мы провели детальный анализ особенностей объема и формы X-хромосомы

и ядрышка клеток фолликулярного эпителия и трофоцитов яичников *Anopheles atroparvus* с применением новейших средств анализа. Для экспериментов были использованы малярийные комары *An. atroparvus*. Материалом для микродиссекции и 2D-FISH служили фиксированные в растворе Карнуа (75% этанол, 25% уксусная кислота) яичники. Материал для 3D-FISH выделяли непосредственно перед проведением гибридизации из 3 особей *An. atroparvus*. Методом микродиссекции получали ДНК-пробу X-хромосомы, который служил матрицей для degenerate oligo primer (DOP)-амплификации флуоресцентно-меченного зонда. Полученный зонд гибридизовали с надавленными препаратами яичников комаров методом 3D-FISH. Ядрышко окрашивали при помощи флуоресцентных антител к фибрилларину. Полученные с помощью конфокального микроскопа LSM 780 (Carl Zeiss) и программного обеспечения ZEN 2012 (Carl Zeiss) серии снимков-срезов ядра были обработаны и проанализированы с помощью Fiji (ImageJ), комплекса инструментов для анализа пространственной организации ядра TANGO (<http://biophysique.mnhn.fr/tango/measuregeometrical>) и базы данных MongoDB (MongoDB, Inc. n.d.). На этапе преобработки использовался фильтр «Mean» из плагина для ImageJ «Fast Filters 3D» и фильтр «Gaussian Blur 3D» из плагина для ImageJ «Misc Filters 3D». Для сегментации сигнала на изображениях использовался классический алгоритм (thresholding) встроенный в плагин для ImageJ «Hysteresis Segmenter». С помощью инструментов из плагина для ImageJ «Simple Measure Geometrical» для каждого ядра были проведены пространственные измерения, которые и использовались в статистическом анализе. Мы изучили тканеспецифичные аспекты формы и размера политенных хромосом, а также динамику хромосом во время роста ядер. Пространственные характеристики X-хромосомы и ядрышка у *An. atroparvus* будут служить в качестве основы для аналогичных исследований у других видов комплекса *Maculipennis*, к которому *An. atroparvus* принадлежит. Будущие исследования рассмотрят видоспецифичные аспекты ядерной архитектуры. Изучение эволюции структуры ядра позволит оценить возможность использования некоторых особенностей 3D организации генома в качестве маркеров для понимания филогенетических отношений в пределах данного видового комплекса.

Проведено сравнение линейной организации геномов *An. albimanus*, который является внешней группой для комплекса *Maculipennis*, *An. atroparvus*, который относится к комплексу *Maculipennis*, и *An. gambiae*, который является референсным видом. Эти геномные сравнения показали, что положение центромеры изменялось в ходе полно-плечих перестроек в процессе эволюции комаров. Многочисленные "полно-плечие" транслокации нарушили целостность хромосомных плеч вблизи центромер и локально перетасовали прицентромерные последовательности между различными хромосомными элементами. Эти данные должны быть учтены при реконструкции филогении в комплексе *Maculipennis* на основе фиксированных инверсий. Для того, чтобы исследовать характер хромосомных перестроек между видами, находящимися на меньших эволюционных расстояниях, мы провели BLAST-поиск гомологичных последовательностей между геномами *An. atroparvus* (комплекс

Maculipennis), *An. lesteri* и *An. sinensis* (группа *An. hyrcanus*). Данный анализ продемонстрировал хорошее соответствие хромосомных плеч, отсутствие полноплечих транслокаций и наличие перетасовки порядка генов при помощи парацентрических инверсий между этими видами комаров. Сравнительные цитогенетические и физические геномные карты представителей комплекса *Maculipennis* и группы *An. hyrcanus* являются полезными инструментами для реконструкции филогении в комплексе *Maculipennis* на основе порядка генов с использованием внешней группы.

В 2016 году проведена работа по получению последовательностей транскриптомов малярийных комаров *An. beklemishevi*, *An. labranchiae*, *An. maculipennis* и *An. freeborni*. Некормленных кровью самок и самцов *Anopheles*, мы фиксировали в RNAlater для предотвращения деградации РНК. Тотальная РНК была выделена из 10 отдельных особей для каждого из четырех видов. Был использован PolyA метод и произведен контроль качества секвенируемой библиотеки РНК, включая оценку размера при помощи биоанализа и количественным путем. Секвенирование транскриптомов было произведено при помощи HiSeq v4 1x125bp. Было получено 300 млн. прочтений с общим количеством данных - 37.5 Gb. Транскриптомы видов, просеквенированных в 2016 г. (*An. beklemishevi*, *An. labranchiae*, *An. maculipennis*, *An. freeborni*), транскриптомы видов, просеквенированных в 2015 г. (*An. daciae* Moscow, *An. daciae* Tomsk, *An. messeae* Moscow, *An. quadrimaculatus*), вместе с геномами *An. atroparvus* и *An. sinensis* (как внешней группы) были использованы для последующего филогенетического анализа.