

Сведения о выполненных работах в 2017 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

В данном проекте были разработаны хромосомные карты высокого разрешения для малярийных комаров и картированы геномы с использованием флуоресцентной *in situ* гибридизации (FISH). Нами были разработаны цитогенетические карты высокого разрешения для *An. freeborni* и *An. quadrimaculatus* и были картированы точки разрывов хромосомных перестроек у этих видов. Мы также построили цитогенетическую карту *Anopheles beklemishevi*. Карта была разработана с использованием цифровой обработки изображений высокого разрешения из комаров собранных в природе. Полиморфизм хромосомных инверсий был определен в 13 географически отдаленных популяциях *An. beklemishevi*. Было обнаружено четыре высокополиморфных широко распространенных инверсии. Позиции общих хромосомных инверсий были указаны на карте. Мы построили высококачественную стандартную фотокарту для политенных хромосом из питающих клеток яичников *An. sacharovi* для дальнейшего физического картирования генома. Эта карта поможет осуществить детальную сборку генома на основе хромосом, которая может быть использована для разработки геномных методов контроля комаров.

Были картированы 89.6% генома на хромосомах *An. atroparvus*. Окончательная карта состоит из 56 упорядоченных геномных скэффолдов. Сравнительный геномный анализ с *An. gambiae* и *An. albimanus* обнаружил множественные транслокации генетического материала перичентромерных областей аутосом, которые разрушают целостность хромосомных элементов в эволюции *Anopheles*. Новая сборка генома AatrE2, привязанная к хромосомам *An. atroparvus*, находится в открытом доступе на VectorBase (<https://www.vectorbase.org/organisms/anopheles-atroparvus/ebro/aatre2>). Это уже вторая картированная геномная сборка для малярийных комаров, поддержанная проектом РНФ. Новая геномная сборка *An. albimanus* AalbS2 была выставлена на VectorBase ранее (<https://www.vectorbase.org/organisms/anopheles-albimanus/stecla/aalbs2>).

Для полногеномного мультигенного филогенетического анализа, основанного на множественном выравнивании белок-кодирующих последовательностей, была выделена тотальная РНК и ДНК из нескольких видов из подгруппы *Maculipennis*. Самки и самцы *Anopheles* были зафиксированы либо в Trizol для предотвращения деградации РНК либо в этаноле. Тотальная РНК или ДНК была выделена из 40-50 отдельных особей. РНК была очищена стандартным фенол-хлороформным методом, растворена в свободной от РНКазы воде и хранилась при -80°C. Тотальная РНК и ДНК были секвенированы на платформе Illumina. Был использован PolyA метод и произведен контроль качества секвенируемой библиотеки РНК, включая оценку размера при помощи биоанализа и количественным путем. Контроль качества

прочтений был произведен с использованием Fastqc, а тримминг - программным обеспечением Trimmomatic (Bolger et al. 2014). Сборка транскриптомов осуществлялась с помощью программного обеспечения Trinity (Haas et al. 2013) с опцией цепь-специфичности. Извлечение кодирующих ДНК последовательностей (CDS) из унитигов и их аннотация были произведены с использованием BLASTP против пептидов из 24 геномов комаров из VectorBase (<https://www.vectorbase.org>). Только самые длинные CDS от каждого унитига с BLASTP хитами были сохранены для анализа. Ортологи были выявлены с использованием Orthofinder (Emms et al. 2015). Мы также секвенировали геномы *An. messeae* и *An. daciae* из разных популяций Московской и Томской областей и ITS2 фрагменты видов из северо-Американской подгруппы *Maculipennis*.

Была реконструирована филогения просеквенированных геномов *An. messeae* и *An. daciae* из популяций Московской и Томской областей. Оказалось, что виды группируются по-разному в зависимости от хромосомной локализации сиквенсов. Филогенетическое древо на основе X хромосомы группирует вместе популяции Московской и Томской областей, но разделяет их по видам. Напротив, филогенетическое древо на основе аутосом группирует вместе *An. messeae* и *An. daciae*, но разделяет их по Московской и Томской областям.

Для реконструкции исторической взаимосвязи между Североамериканскими и Евразийскими комарами, провели мультигенный филогенетический анализ 9 Палеарктических и 2 Неарктических видов на основе полученных транскриптомов и геномов, используя 1273 ортологов для каждого плеча аутосомы и X хромосомы. Филогенетический анализ показал, что *An. beklemishevi* ближе к Палеарктическим представителям группы, чем к Неарктическим. Интересно, что высокополиморфные по хромосомным инверсиям виды *An. messeae* и *An. beklemishevi* расположены соответственно в основании и в конце филогенетического древа. В то время как хромосомно-мономорфные виды имеют промежуточное положение на филогенетическом древе. Кроме того, кластер *An. beklemishevi* более близок к *An. freeborni*, обитающему на Западе Соединенных Штатов, чем к *An. quadrimaculatus*, виду с Востока Соединенных Штатов. Наше филогенетическое древо однозначно свидетельствует в пользу единственной миграции комаров группы *Maculipennis* из Северной Америки в Евразию, за чем следовало их дальнейшее разделение на азиатскую и европейскую клады. Таким образом, наш филогенетический анализ обнаружил наличие 4 основных клад в подгруппе *Maculipennis*: 1) *An. beklemishevi*, 2) *An. sacharovi* и *An. martinius*, 3) *An. atroparvus* и *An. labranchiae*, 4) *An. artemievi*, *An. maculipennis*, *An. messeae* и *An. daciae*. Реконструкция филогении и современное распределение видов поддерживают единственную миграцию комаров *Maculipennis* из Северной Америки в Евразию. Филогенетические данные показывают, что *An. beklemishevi* относится к Палеарктической подгруппе *Maculipennis*.