

Федеральное государственное автономное образовательное
учреждение высшего образования
«Национальный исследовательский Томский государственный университет»

На правах рукописи

Соболева Евгения Сергеевна

**МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ТОЧЕК
РАЗРЫВОВ ФИКСИРОВАННЫХ И ПОЛИМОРФНЫХ
ИНВЕРСИЙ В X ХРОМОСОМЕ МАЛЯРИЙНОГО КОМАРА
*ANOPHELES MESSEAE***

1.5.7. – генетика

Диссертация на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель
кандидат биологических наук, доцент
Артемов Глеб Николаевич

Томск – 2025

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	4
1 ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР	14
1.1 Хромосомные перестройки	14
1.2 Хромосомные инверсии и их значение	17
1.3 X-хромосома: роль в эволюции эукариот	24
1.4 Малярийные комары рода <i>Anopheles</i>	41
2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	61
2.1 Материал исследования	61
2.2 Молекулярные и цитогенетические методы исследования	61
2.3 Итеративное картирование генома	65
2.4 Биоинформатические методы	69
3 РЕЗУЛЬТАТЫ	74
3.1 Физическое картирование точек разрывов хромосомных перестроек в X-хромосоме <i>An. messeae</i>	74
3.2 Описание синтенных блоков генов, образованных хромосомными перестройками в X-хромосоме, и реконструкция инверсионных событий	81
3.3 Эволюция линейных порядков ортологов генов, фланкирующих точки разрывов в X-хромосоме, у других представителей <i>Anopheles</i>	86
3.4 Геномный состав окрестностей точек разрывов фиксированных инверсий ..	88
3.5 Функциональная характеристика генов с использованием генной онтологии	91
4 ОБСУЖДЕНИЕ	95
4.1 Актуализация хромосомной карты на основе новых данных картирования ..	96
4.2 Найденные ранее транспозиции подтвердили гипотезу о существовании крупных перестроек	97
4.3 Роль мобильных генетических элементов в формировании фиксированных инверсий у <i>An. messeae</i>	99
4.4 Связь хромосомных перестроек с обогащением GO-терминами	103
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	105
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ	106

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ	108
Приложение А. Перечень маркерных генов, использованных при картировании инверсий	134
Приложение Б. Картирование фланкерных генов фиксированных инверсий в X-хромосоме у <i>An. daciae</i> X1	137
Приложение В. Плотность генов и простых повторов в окрестностях точек разрывов у <i>An. atroparvus</i>	138
Приложение Д. Анализ генной онтологии в инвертированных синтенных блоках	144

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность исследования. Хромосомные перестройки типа инверсий и транслокаций сопровождают эволюцию многих организмов [1, 2]. Среди двукрылых насекомых широко распространены инверсии, вызванные поворотом фрагмента хромосомы на 180 градусов без захвата центромеры [2, 3, 4]. Поскольку инверсии относятся к сбалансированным хромосомным перестройкам они не вызывают снижения приспособленности, однако фертильность особей, гетерозиготных по инверсиям снижена, так как кроссинговер внутри инвертированного района вызывает появление дицентричных хромосом. Другим следствием ограничения обменов внутри инвертированных участков хромосом является накопление в каждом варианте уникального сочетания аллелей, которые наследуются сцеплено как суперген. Такие сочетания могут давать адаптивные преимущества, находясь под действием отбора. Кроме того, инверсии потенциально могут действовать и через эффект положения, и через создание химерных генов, если разрывы происходят внутри кодирующих последовательностей.

Инверсии сопровождают эволюцию малярийных комаров рода *Anopheles* – единственных переносчиков малярийного плазмодия, возбудителя малярии, которая ежегодно уносит больше полумиллиона жизней [5], а также других заболеваний человека, например, дирофиляриоза, распространённого в России [6, 7]. Так, например, в комплексе *Gambiae* близкородственные виды различаются набором фиксированных (эволюционных) и полиморфных инверсий [8]. Межвидовые различия в наборе фиксированных инверсий позволили выделить шесть близкородственных видов подгруппы *Maculipennis*: *Anopheles atroparvus* van Thiel, 1927; *Anopheles maculipennis* Meigen, 1818; *Anopheles messeae* Falleroni, 1926; *Anopheles sacharovi* Favre, 1903; *Anopheles martinius* Shingarev, 1926; *Anopheles beklemishevi* Stegnii & Kabanova, 1976 [9]. Порядок возникновения перекрывающихся инверсий часто можно восстановить, картируя точки разрывов, и поэтому фиксированные инверсии используют для реконструкции

филогенетических отношений между видами. Адаптивная роль инверсий подтверждается многочисленными фактами инверсионного полиморфизма, как правило у видов с обширным ареалом [10]. Например, выявлена ассоциация определенных инверсионных вариантов с адаптивно и эпидемиологически значимыми признаками у *Anopheles gambiae* Giles, 1902, такими как эндофильность, предпочтение хозяина, уровень восприимчивости к малярийному плазмодию, выбор места размножения, устойчивость к инсектицидам [1, 11, 12, 13]. Существует и хромосомная специфика возникновения инверсий. Так для комплекса *Gambiae* наиболее активно полиморфные инверсии возникают в плече 2R, при этом никогда – в X-хромосоме [14]. Напротив, в подгруппе *Maculipennis* хромосомные перестройки затрагивают именно X-хромосому: фиксированные инверсии выявлены только у четырёх видов из одиннадцати, а у двух видов подгруппы (*An. messeae* и *An. beklemishevi*) описаны также и полиморфные инверсии [15, 16]. Изучение фиксированных и полиморфных инверсий важно для понимания эволюции малярийных комаров [17, 18, 19, 20, 21] и позволяет исследователям реконструировать пути миграции и расселения различных видов комаров [22]. Несмотря на имеющиеся данные об ассоциациях инверсий с признаками, роль в формировании адаптаций как связь с видообразованием слабо изучена.

Малярийный комар *An. messeae* считается опасным переносчиком плазмодия среди видов подгруппы *Maculipennis*. Он распространён в умеренной зоне Евразии и имеет один из самых северных (наряду с *An. beklemishevi*) и обширных ареалов среди анофелин. В его кариотипе, состоящим из трёх хромосом встречается по крайней мере четыре полиморфных широко распространённых по ареалу вида инверсий (по одной в X-хромосоме и плечах 2R, 3R, 3L). Криптический вид *Anopheles daciae* (Linton, Nicolescu & Harbach, 2004) был отделен от *An. messeae* на основе комплекса данных популяционно-генетического, экологического [23, 24], и молекулярно-генетического анализов [25, 26, 27]. *An. daciae* обладает схожим инверсионным полиморфизмом с *An. messeae* по аутосомам, однако по X-хромосоме в его популяциях обнаруживается полиморфная инверсия X0,

образующая инверсионный вариант X00, тогда как у *An. messeae* встречается другая полиморфная инверсия – X2, приводящая к инверсионному варианту X22.

Несмотря на то, что хромосомная эволюция в подгруппе *Maculipennis* изучена довольно хорошо, фиксированные хромосомные перестройки в X-хромосоме у *An. messeae*, а также у сравнительно недавно выделенного *An. daciae*, не были определены. Причиной плохой изученности X-хромосомы в подгруппе *Maculipennis* является то, что будучи самой короткой хромосомой набора она не содержит достаточного количества дисков для реконструкции перестроек путём простого сравнения цитогенетических карт политенных хромосом. Это было продемонстрировано в результате физического картирования хромосомных перестроек у пяти видов с помощью FISH 17 ДНК маркеров [22] где было показано, что ранее предложенная схема перестроек в X-хромосоме [9] является неверной. Несмотря на сходство в порядке 14 ДНК-маркеров у видов *An. atroparvus*, *An. maculipennis* и *An. messeae*, порядок трёх маркеров в X-хромосоме *An. messeae* не совпал с наиболее близким ему *An. maculipennis* [28], что могло свидетельствовать в пользу появления хромосомных перестроек в линии *An. messeae* и, возможно, криптического вида *An. daciae*. В связи с этим обстоятельством важно было определить, как происходила эволюция X-хромосомы у близкородственных видов *An. messeae* и *An. daciae* и какой порядок генов является наиболее древним в этой хромосоме, учитывая инверсионный полиморфизм по X-хромосоме у этих видов. Решение этой задачи позволит предположить каким образом происходило распространение *An. messeae* и *An. daciae* на евразийском континенте, а также строить дальнейшие предположения о связи эволюции X-хромосомы с видообразованием в подгруппе *Maculipennis*.

Целью диссертационной работы являлся молекулярно-генетический анализ точек разрывов фиксированных и полиморфных инверсий X-хромосомы для реконструкции хромосомной эволюции малярийного комара *Anopheles messeae* Fall.

Для достижения цели были поставлены следующие **задачи**:

1. Провести физическое картирование точек разрывов фиксированных перестроек и полиморфных инверсий в X-хромосоме *An. messeae* и криптического вида *An. daciae*, используя в качестве референсного геном *An. atroparvus*.

2. Провести молекулярно-генетический анализ районов генома *An. atroparvus* гомеологичных окрестностям точек разрывов фиксированных и полиморфных инверсий *An. messeae* и *An. daciae*.

3. Реконструировать эволюцию X-хромосомы *An. messeae* и криптического вида *An. daciae* для анализа возможных путей миграции и расселения видов на территории Евразии.

Научная новизна. Впервые картированы фиксированные хромосомные перестройки в X-хромосоме *An. messeae* и завершена реконструкция хромосомной эволюции в подгруппе *Maculipennis* [9, 22]. Впервые проведено геномное картирование хромосомных перестроек для криптического вида *An. daciae*, который недавно был выделен из *An. messeae* [25, 26, 27]. Впервые проведён молекулярно-генетический анализ окрестностей точек разрывов инверсий в X-хромосоме *An. messeae* и районов X-хромосомы, которые изменили своё расположение в результате инверсии, а также выявление адаптивно значимых признаков, которые могли бы объяснить фиксацию этих перестроек в эволюции подгруппе *Maculipennis*. В рамках данной диссертационной работы разработан и впервые применён методический подход – итеративное картирование, которое позволяет проводить физическое и геномное картирование хромосомных перестроек видов без геномных сборок или с геномными сборками низкого качества. Разработана программа GIC (аналогичная программе GRIMM [29]), которая недавно перестала поддерживаться), предназначенная для реконструкции порядка возникновения хромосомных перестроек в эволюции.

Теоретическая и практическая значимость исследования. Полученные данные вносят вклад в понимание процессов видообразования, адаптации и векторной компетентности малярийных комаров. Картированные районы, содержащие точки разрывов инверсий позволят быстро получить информацию о

их локализации, когда полногеномные сборки *An. messeae* и *An. daciae* будут получены. В ходе итеративного картирования генов были определены районы локализации многих генов, которые можно использовать в других исследованиях. Филогенетическое древо подгруппы *Maculipennis*, дополненное данными настоящего исследования, будет использовано для реконструкции путей расселения малярийных комаров на евразийском континенте и послужит опорным материалом для дальнейших исследований в области эволюционной цитогенетики и эволюционной генетики малярийных комаров. Описание и публикация метода итеративного картирования может пригодиться для физического и геномного картирования других немодельных организмов. Программа GIC находится в свободном доступе и может быть применена для реконструкции последовательности событий хромосомных перестроек.

Методы исследования, использованные в диссертации. Данная работа была выполнена с использованием классических молекулярно-генетических подходов (выделение ДНК, ПЦР и гель-электрофорез), цитогенетических (приготовление сухо-воздушных препаратов, кариотипирование малярийных комаров, физическое картирование точек разрывов), молекулярно-цитогенетических (разработка праймеров, флуоресцентная *in situ* гибридизация) биоинформатических методов (аннотация мобильных генетических элементов, геномное картирование точек разрывов хромосомных перестроек, итеративное картирование, реконструкция инверсий с помощью GIC, анализ геномной онтологии).

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Появление филогенетической ветви *Anopheles messeae* и *An. daciae* подгруппы *Maculipennis* связано с возникновением инверсий в X-хромосоме.

2. Участки X-хромосомы *Anopheles messeae*, содержащие точки разрывов фиксированных инверсий, обогащенные ДНК-транспозонами и гомеологичные районам хромосомных перестроек у других видов, являются структурно нестабильными, и играют ключевую роль в инициации эволюционных изменений структуры хромосом у недавно дивергировавшей ветви подгруппы *Maculipennis*.

Апробация результатов

Научные результаты, описываемые в данной работе, частично были изложены в 10 тезисах на международных и всероссийских конференциях, в 3 статьях в рецензируемых научных журналах (Q1-Q2). Получено 1 авторское свидетельство.

Тезисы конференций

1. **Соболева Е. С.** Молекулярно-генетический анализ точек разрывов фиксированных и полиморфных инверсий в X хромосоме малярийного комара *Anopheles messeae* / Е. С. Соболева // Наука будущего – наука молодых : сборник тезисов IX Всероссийского молодежного научного форума. Самара, 29 октября – 01 ноября 2024 г. – Москва, 2024. – С. 200. – 0.08 а.л.

2. **Соболева Е. С.** Характеристика точек разрывов инверсий в X хромосоме *Anopheles messeae* Fall. / Е. С. Соболева, К. М. Кириленко, Г. Н. Артемов // Научные чтения, посвященные 60-летию кафедры генетики и клеточной биологии Томского государственного университета : материалы международной конференции. Томск, 23–26 сентября 2024 г. – Томск, 2024. – С. 37–38. – 0.1 / 0.03 а.л.

3. **Соболева Е. С.** Анализ инвертированных синтенных блоков в X хромосоме малярийного комара *Anopheles messeae* / Е. С. Соболева, И. В. Шарахов, Г. Н. Артемов // VIII Съезд Вавиловского общества генетиков и селекционеров, посвященный 300-летию российской науки и высшей школы : сборник тезисов Международного конгресса. Саратов, 14–19 июня 2024 г. – СПб., 2024. – С. 558. – 0.1 / 0.03 а.л.

4. **Соболева Е. С.** Картирование точек разрывов фиксированных и полиморфных инверсий в хромосоме X у малярийного комара *Anopheles messeae* / Е. С. Соболева, Г. Н. Артемов, И. В. Шарахов // Хромосома – 2023 : материалы международной конференции. Новосибирск, 05–10 сентября 2023 г. – Новосибирск, 2023. – С. 182–183. – 0.12 / 0.04 а.л.

5. **Соболева Е. С.** Итеративное картирование – новый подход к геномному картированию точек разрыва инверсий на примере хромосом малярийных комаров

рода *Anopheles* подгруппы *Maculipennis* / Е. С. Соболева, Г. Н. Артемов // Хромосома – 2023 : материалы международной конференции. Новосибирск, 05–10 сентября 2023 г. – Новосибирск, 2023. – С. 184–185. – 0.12 / 0.06 а.л.

6. **Соболева Е. С.** Геномное картирование точки разрыва фиксированной инверсии в X хромосоме *Anopheles messeae* / Е. С. Соболева // МНСК-2021. Биология : материалы 59-й Международной научной студенческой конференции. Новосибирск, 12–23 апреля 2021 г. – Новосибирск, 2021. – С. 160. – 0,06 а.л.

7. **Соболева Е. С.** Инверсионный полиморфизм природных популяций *Anopheles beklemishevi* Stegnii et Kabanova в Западной Сибири / Е. С. Соболева, В. С. Фёдорова, В. А. Бурлак, М. В. Шарахова, Г. Н. Артемов // Концептуальные и прикладные аспекты научных исследований и образования в области зоологии беспозвоночных : сборник статей V Международной конференции. Томск, 26–28 октября 2020 г. – Томск, 2020. – С. 140–144. – 0.2 / 0.04 а.л.

8. Haidara M. Genetic mechanisms of mosquito-parasite interactions: insights from chromosomal rearrangements / M. Haidara, G. Artemov, V. A. Burlak, **E. Soboлева** // VIII Съезд Вавиловского общества генетиков и селекционеров, посвященный 300-летию российской науки и высшей школы : сборник тезисов международного конгресса. Саратов, 14–19 июня 2024 г. – СПб., 2024. – С. 406. – 0.1 / 0.03 а.л.

9. **Soboleva E. S.** Characteristics of the inversion polymorphism of the Siberian natural populations of malaria mosquitoes *Anopheles beklemishevi* using fluorescent *in situ* hybridization / E. S. Soboleva, G. N. Artemov // Modern Achievements in Population, Evolutionary and Ecological Genetics. MAPEEG 11th meeting: Program & Abstracts of the International Symposium. Vladivostok – Vostok Marine Biological Station, September, 08–12, 2022. – Vladivostok, 2022. – P. 70. – 0.09 / 0.05 а.л.

10. **Soboleva E.** Mapping of inversion breakpoints on the X chromosome in the *Maculipennis* subgroup of malaria mosquitoes / E. Soboleva, I. Sharakhov, G. Artemov // 26th International Congress of Entomology : Book of Abstracts. Helsinki, Finland, July 17–22, 2022. – P. 723. – 0.06 / 0.02 а.л.

Авторское свидетельство

11. Свидетельство о государственной регистрации программы для ЭВМ № 2024689915 Genome Inversions Calculator / **Соболева Е. С.** (RU); правообладатель: Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Национальный исследовательский Томский государственный университет» (RU). – Заявка № 2024688591; дата поступления – 27.11.2024; дата государственной регистрации в Реестре программ для ЭВМ – 11.12.2024; Бюл. № 12.

Статьи в рецензируемых научных журналах

12. **Soboleva E.S.** The Species-Specific Inversion Polymorphism of the X Chromosome in *Anopheles messeae* and *Anopheles daciae* Is Based on the Common Ancestral Variant X1 / E.S. Soboleva, M.V. Sharakhova, I.V. Sharakhov, G.N. Artemov // *Genes*. – 2026. – Vol. 17, is. 1. – Article number 5. – 12 p. – URL: <https://www.mdpi.com/2073-4425/17/1/5> (access date: 20.12.2025). – DOI: <https://doi.org/10.3390/genes17010005> – 1.03 / 0.26 а.л. (*Web of Science*).

13. **Soboleva E. S.** Two Nested Inversions in the X Chromosome Differentiate the Dominant Malaria Vectors in Europe, *Anopheles atroparvus* and *Anopheles messeae* / E. S. Soboleva, K. M. Kirilenko, V. S. Fedorova, A. A. Kokhanenko, G. N. Artemov, I. V. Sharakhov // *Insects*. – 2024. – Vol. 15, is. 5. – Article number 312. – 19 p. – URL: <https://www.mdpi.com/2075-4450/15/5/312> (access date: 13.05.2025). – DOI: <https://doi.org/10.3390/insects15050312>. – 1.48 / 0.24 а.л. (*Web of Science*).

14. **Soboleva E. S.** Physical Mapping of Two Nested Fixed Inversions in the X Chromosome of the Malaria Mosquito *Anopheles messeae* / E. S. Soboleva, K. M. Kirilenko, V. S. Fedorova, A. A. Kokhanenko, G. N. Artemov, I. V. Sharakhov // *Comparative Genomics : Proceedings of the 20th International Conference, RECOMB-CG 2023. Istanbul, Turkey, April 14–15, 2023. – 2023. – P. 84–99. – DOI: 10.1007/978-3-031-36911-7_6. – (Lecture Notes in Computer Science. – Vol. 13883). – 1.05 / 0.17 а.л.*

Вклад автора. Автор диссертационной работы самостоятельно провела все этапы лабораторной работы, а также анализ геномной онтологии. Также автором

собственноручно был разработан калькулятор геномных инверсий, с помощью которого была произведена реконструкция инверсий. Материал из природных популяций был собран коллегами из Томского государственного университета: Артемовым Глебом Николаевичем, Бурлаком Владимиром Александровичем, Хайдара Мохамедом Кадером. Работа с данными прочтений *An. atroparvus*, *An. maculipennis*, *An. messeae* и *An. beklemishevi*, а также аннотация повторенных элементов и их статистический анализ были выполнены Кириленко Кириллом Михайловичем (ТГУ, Томск).

Структура и объем работы. Диссертация состоит из введения, четырех глав, выводов, списка литературы и 5 приложений. Работа изложена на 149 страницах, проиллюстрирована 23 рисунками и содержит 7 таблиц.

Благодарности. Автор выражает благодарность своему научному руководителю к.б.н. *Артемову Глебу Николаевичу* (ТГУ); коллегам из лаборатории эволюционной цитогенетики в лице *Хайдара Мохамеда Кадера* и *Апанасевича Максима Владимировича* (ТГУ) за оказанную поддержку, советы и плодотворные дискуссии на разных этапах работы. Так же автор отдельно благодарит д.б.н. *Шарахова Игоря Валентиновича* (Политехнический университет Вирджинии, США) за предоставленную возможность подготовить свою диссертационную работу в рамках его научного проекта (РНФ № 21-14-00182), а также за ценные советы. Отдельное спасибо рецензентам и оппонентам за ценные замечания и рекомендации, способствовавшие улучшению качества данной работы.

Особую признательность автор выражает своему супругу *Николаю* и своей семье, за колоссальную поддержку и веру, которые стали важным ресурсом в период работы над диссертацией. Их участие и забота оказали неоценимое влияние на преодоление жизненных трудностей.

Также автор считает необходимым отметить вклад своего школьного педагога по биологии *Смоленцева Александра Васильевича* (МБОУ «Гимназия №3», г. Рубцовск), под руководством которого был сформирован первоначальный интерес к биологическим наукам (в частности, к генетике), однозначно

предопределивший выбор профессионального направления, научную специализацию и последующую профессиональную реализацию.

1 ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

1.1 Хромосомные перестройки

Под действием биотических или абиотических факторов окружающей среды в геномах живых организмов могут происходить мутации, включающие разнообразные генные и хромосомные перестройки. Генные (или точковые) мутации происходят на уровне отдельных нуклеотидов и могут включать в себя различные замены одного нуклеотида на другой, вставки или потери нуклеотидов. Хромосомные мутации, в свою очередь, приводят к структурным изменениям целых хромосом или их участков. Главными различиями между генными и хромосомными мутациями являются масштаб события и его последствия. Например, замена одного нуклеотида на другой может привести к изменению в конкретном гене и его функции, посредством изменения аминокислотной последовательности белка. Напротив, хромосомные мутации могут затрагивать сразу несколько генов и иметь более широкие последствия. Изменяя структуру хромосом, такая мутация влияет на процессы кроссинговера во время деления клеток, что в свою очередь может приводить к генетическому разнообразию в потомстве.

Хромосомные мутации сопровождаются двухцепочечными разрывами (ДР) ДНК. По оценкам, на одну делящуюся клетку приходится десять ДР [30]. К основным причинам ДР можно отнести повреждение активными формами кислорода во время окислительного метаболизма, ионизирующее излучение и непреднамеренное действие ядерных ферментов [31, 32]. Возникновение хромосомных перестроек нередко сопряжено с такими понятиями как «рекомбинация», «синтенные блоки» и «точки разрывов» [33]. Исследования показывают, что наличие одних и тех же точек разрывов свидетельствует об общем происхождении видов, в то время как сгруппированное местоположение разных точек в относительной близости друг от друга указывает на наличие «горячих точек» и большей склонности этих регионов к перестройкам [34, 35, 36].

Благодаря созданию микроскопа уже более века у человека есть возможность визуализировать крупные хромосомные перестройки, такие как делеции, дупликации, транслокации или инверсии. Делецией называют потерю участка хромосомы. Одной из наиболее изученных делеций у человека является делеция участка пятой хромосомы, которую описал французский педиатр Лежён Жером. В литературе также можно встретить два термина, которые уточняют локализацию потерянного участка – «терминальная делеция» и «интеркалярная делеция», которые представляют собой потерю концевой и срединного участка хромосомы, соответственно. Особи, потерявшие малые участки хромосом в гомозиготном состоянии могут быть жизнеспособными, так же как и особи с крупными делециями в гетерозиготном состоянии [37]. Дупликации представляют собой результат удвоения определённого участка хромосомы. Они могут происходить как внутри одной хромосомы, так и между разными. Фенотипическое проявление небольших дупликаций обычно слабее, чем делеции такого же размера, однако крупные дупликации могут в значительной мере повлиять на фенотип организма [38]. Классическим примером дупликации является мутация *Bar* у мушек рода *Drosophila*, обнаруженная в 1920-х годах Томасом Морганом и Альфредом Стёртевантом в X-хромосоме. Транслокации представляют собой перенос участка одной хромосомы на другую [39]. Самым известным примером является «робертсоновская транслокация» – мутация, при которой происходит слияние двух акроцентрических хромосом в одну мета- или субметацентрическую. Транслокации не изменяют числа генов, и фенотипически не проявляются ни в гомозиготном, ни в гетерозиготном состояниях. Транслокации можно обнаружить по «генетическим последствиям» к которым они приводят, например к изменению числа хромосом или образованию различных «хромосомных фигур» во время мейоза [38].

Однако, ни одна из перечисленных хромосомных перестроек не оказывает столь сильное влияние на эволюцию геномов животных как инверсия. Эта хромосомная перестройка, характеризующаяся разворотом участка на 180° была открыта впервые А. Стёртевантом в начале 20-х годов прошлого столетия во время

сравнения генетических карт близкородственных видов дрозофилы. Позже, это было подтверждено ещё раз Ф. Г. Добржанским и А. Стёртевантом в 1936г. Установлено, что инверсии могут быть пара- и перичентрическими. Если для первых характерен разворот участка по одну сторону от центромеры, то для второго типа точки разрывов расположены на разных плечах хромосомы. Например, у *Drosophila melanogaster* Meigen, 1830 насчитывается более 500 парацентрических инверсий [40]. Схожие паттерны хромосомных перестроек наблюдаются между геномами мух рода *Drosophila* и малярийных комаров рода *Anopheles* [41]. Два подвида мух *Drosophila persimilis* Dobzhansky and Epling, 1944 и *Drosophila pseudoobscura* Frolova, 1929 помимо экологических предпочтений отличаются между собой большими парацентрическими инверсиями на левом плече X-хромосомы и хромосомы 2 [42].

Помимо крупных перестроек, которые можно визуализировать с помощью микроскопии, в геномах встречаются микроперестройки, которые невозможно выявить классическими методами. Подобные изменения были обнаружены при изучении геномов мыши, крысы и человека. Исследования показали, что найденные перестройки могут захватывать как несколько генов, так и фрагмент одного гена [40, 43]. Поэтому выявить такие изменения можно только с помощью физического картирования и качественного секвенирования с длинными прочтениями генома [44]. Например, микроинверсии (менее 100 п.н.) практически невозможно обнаружить, если в ходе эволюции на коротком инвертированном участке дополнительно накопились однонуклеотидные замены или вставки [44, 45].

Стоит подчеркнуть эволюционное значение различных структурных изменений в геноме, таких как дупликации, инверсии и транслокации. Дупликации играют ключевую роль как источник новых генов или комплексов генов, поскольку они могут создавать дополнительные копии генетической информации, которые впоследствии могут подвергаться мутациям и приобретать новые функции. Инверсии и транслокации также имеют своё эволюционное значение, поскольку они могут приводить к изменению структуры хромосом и регулирования

экспрессии генов. Инверсии играют важнейшую роль в создании барьера стерильности между новыми и старыми видами, что влечёт за собой процесс видообразования [46]. Робертсоновские слияния в свою очередь, также сопровождают процесс видообразования, при этом сохраняя плодовитость организмов, но изменяя число хромосом [46, 47]. Эти структурные изменения могут влиять на процессы кроссинговера во время клеточного деления, что, в свою очередь, вносит существенный вклад в разнообразие генетического материала.

1.2 Хромосомные инверсии и их значение

Поворот блока хромосомы на 180° сопряжён с таким процессом как изменение порядка генов, включённых в инверсионный блок и подавлением рекомбинации аллелей у гетерозигот. Такие последствия хромосомных aberrаций дали начало двум гипотезам относительно роли инверсии. Одна из гипотез предполагает что запертие кроссинговера обеспечивает консервацию запертых внутри аллелей, и позволяет им наследоваться совместно, как суперген или блок коадаптивных аллелей [48, 49]. Позднее такой блок был назван «островом видовой дивергенции» [50]. Однако, ещё в 90-ые годы профессор В. Н. Стегний приводил в своей монографии аргументы против данной гипотезы, опираясь на ряд исследований и называя её «исключением из правил» [9]. Вторая гипотеза рассматривает инверсию как регуляторную мутацию, при которой гены изменяют своё положение, начиная функционировать по-новому. После перестройки гены могут инактивироваться полностью или частично, изменяя свой уровень экспрессии [51]. Главным примером подавления рекомбинации может считаться один из важнейших эволюционных процессов – дифференциация половых хромосом путём последовательных инверсий [52].

1.2.1 Инверсии как коадаптивный блок аллелей (суперген)

Известный генетик и энтомолог Феодосий Добржанский являлся сторонником гипотезы «супергена», которую он поддержал в середине прошлого

века, а затем самостоятельно сформулировал и предложил понятие супергена. Его формулировка звучала как: «Коадаптированные комбинации нескольких или множества генов, запертых внутри инвертированного участка хромосомы, наследуемых таким образом, как целостная единица» [53]. Его исследования в тот период подтвердили собственные убеждения, показывая, как инверсии формируют коадаптивные комплексы генов, способные приспосабливаться к определённым условиям окружающей среды [54]. Добржанский использовал скрещивание мух, полученных из экологически и географически отдалённых районов. В результате он выявил, что преимущество гетерозигот сохранялось при скрещивании линий из одного района, но утрачивалось при скрещивании из отдалённых регионов. Это свидетельствовало о том, что коадаптация эффективна только в рамках конкретных генетических комплексов и под конкретными экологическими условиями, что, в свою очередь, способствует приспособлению особей.

Модель видообразования путём расхождения «островов видовой дивергенции» поддерживают результаты исследования малярийных комаров *Anopheles* из комплекса *Gambiae*. Данный комплекс включает в себя несколько видов, которые различаются лишь генетически ограниченными областями геномов, которые можно по-настоящему назвать островками видообразования. Симпатрические виды совместно обитают на одной территории, преимущественно не скрещиваясь друг с другом, хотя изредка и могут давать гибридных потомков. Исследования их геномов позволили понять, что области видовой дивергенции расположены в прицентромерной области половой хромосомы X, а также в левых плечах 2 и 3 аутосомы [55, 56]. Эксперименты по скрещиванию, секвенирование и последующий анализ показали, что гены, входящие в прицентромерную область X-хромосомы, связаны с репродуктивной изоляцией и ассортативным скрещиванием, что может быть связано с механизмом видообразования [57].

Одной из форм адаптации можно считать способность мимикрировать. Такая способность была обнаружена у тропических бабочек *Heliconius numata* Cramer, 1780 [58]. У этого вида в некоторых популяциях совместно обитает до семи форм, каждая из которых мимикрирует под бабочек соответствующих представителей

семейства *Melinaea*. За такую особенность у данных бабочек отвечает супергенный локус «Р», который контролирует различные модификации узора и формы крыльев. По подсчётам исследователей, локус занимает примерно 400 тыс. п. н. и содержит в себе не менее восемнадцати генов. Подобный генный комплекс позволяет создать свой уникальный адаптивный фенотип для каждого подвида бабочек, что в дальнейшем может привести к дивергенции этих форм и видообразованию, в целом.

Супергенный комплекс белогорлового воробья *Zonotrichia albicollis* Gmelin, 1789 стал объектом внимания исследователей благодаря внушительным размерам этого комплекса [59]. Этот вид является одной из ключевых моделей для изучения сцепленных генов среди птиц начиная со второй середины прошлого века [60]. Совместные исследования различных научных групп выявили, что белогорлый воробей имеет фенотипический полиморфизм, связанный с гигантской инверсией в хромосоме 2. Эта инверсия, образовавшаяся в ходе эволюции привела к формированию супергенного комплекса, включающего более тысячи генов, связанных не только с окраской оперения, но также с социальным поведением и репродуктивной стратегией [59, 61, 62]. Ключевой особенностью является наличие отрицательного ассортативного спаривания внутри вида, т. е. каждая спаривающаяся пара имеет одну особь с инверсией, а вторую без. Так, подобный полиморфизм является тем редким случаем, когда не несёт под собой адаптивной роли. Инверсия обуславливает в популяции наличие двух моделей социального поведения: «агрессивных, конкурирующих» и «заботливых, охраняющих» [59, 61, 63, 62]. Результаты показывают, что особи с обеими стратегиями успешно уживаются и имеют репродуктивный успех [64, 65]. Исследователи полагают, что подобная перестройка больше похожа не на адаптацию к среде, а на процесс зарождения новых половых хромосом [66, 67].

1.2.2 Инверсии как регуляторные мутации

Изменение порядка генов в результате инверсионной перестройки может закономерно привести к изменению регуляции этих самых генов. Такое изменение

стало известным в 30-х годах под названием «Эффект положения генов». Эффект положения генов был открыт А. Стёртевантом в 1925 году в работе на дрозофиле, а спустя почти 10 лет, подтверждён отечественными учёными Н. П. Дубининым и Б. Н. Сидоровым [51, 68]. Стёртевант обнаружил, что в ходе неравного кроссинговера оба мутантных аллеля гена *Bar* оказались в одной хромосоме, что оказало значимое влияние на проявление мутантного фенотипа, по сравнению с тем, как если бы аллели оказались в разных гомологах. Исследования Дубинина и Сидорова в 1934 году, проведённые на дрозофиле, также являются ключевыми в понимании эффекта положения гена. Они обнаружили, что ген *cubitus interruptus* (*ci*), находящийся в районе прицентромерного гетерохроматина продолжал функционировать нормально до тех пор, пока не переместился в один из районов эухроматина и не был инактивирован. В дальнейшем это открытие назвали эффектом Дубинина и последующие работы упоминаются с использованием этого термина. Вплоть до конца 90-х годов выходили различные работы по изучению эффекта положения гена, где обнаруживались новые особенности и условия инактивации генов в зависимости от хромосомных перестроек (и не только инверсий) или ионизирующего облучения [69, 70, 71, 72, 73, 74]. Наибольшее число работ посвящено мозаичному эффекту положения - эффекту, при котором инактивация генов происходит лишь в части клеток, сходных по морфологии, а в остальных остаются нормально функционирующие гены. За последние 25 лет эта гипотеза не получила дальнейшей поддержки со стороны научного большинства; современных исследований не было найдено.

1.2.3 Инверсии как механизм полового диморфизма

Исследования на хромосомах человека и открытие «эволюционных слоёв» (или по-другому «страт») показывают возможную картину дивергенции половых хромосом [52]. В своём исследовании Лан и Пейдж представляют идею, что четыре эволюционных слоя образовались, вероятно, в ходе хромосомных инверсий [75]. Детальное картирование X и Y хромосом позволило выявить, что первая инверсия запустила дифференциацию между X- и Y-хромосомами и одновременно

сформировала первую страту. Гены, расположенные в этой первой страте, простираются по всей длине длинного плеча Xq , являются наиболее консервативными и могут быть прослежены у других позвоночных с минимальными изменениями [76, 77]. Исследователи Лан и Пейдж утверждают, что их математические результаты указывают на подавление рекомбинации уже после первой инверсии и усиление с каждой последующей. Они полагают, что инверсии, вероятно, должны были происходить на Y хромосоме, так как именно там обнаружили перемешанные слои. Данные, указывающие на границы псевдоаутосомных областей в X - и Y -хромосомах, поддерживают эту гипотезу. Проксимальная граница этого региона на X заканчивается неповреждённым геном, в то время как на Y этот ген оказался разорван [78].

Перецентрические инверсии являются одним из инструментов пол-специфичной дифференциации у некоторых рыб, например, у *Hoplias malabaricus* Bloch, 1794. На это указывает исследование Роза Р. и соавторов [79]. В своей работе исследователи обнаружили изменение конститутивного гетерохроматина и районов 18S ДНК в Y -хромосоме у рыб. Подавление рекомбинации в прото-половых хромосомах посредством инверсий – является необходимым шагом на пути к цитологическим различиям половых хромосом [79].

Исследование, проведённое группой индо-американских учёных на бабочках-парусниках *Papilio polytes* Linnaeus, 1758 [80], представляет пример влияния хромосомных инверсий на формирование мимикрии и полового диморфизма в естественных условиях. Вид этой бабочки выделяется четырьмя формами, обладающими мимикрией. Уникальную способность к мимикрии обнаруживают только самки, которые характеризуются особым рисунком на крыльях. Самцы всех форм имеют одинаковый узор. Исследование выявило, что генетический локус, ответственный за мимикрию, охватывает всего 30 тысяч пар нуклеотидов и включает в себя пять генов. Один из этих генов, *doublesex (dsx)*, участвует в формировании полового диморфизма у насекомых. Инверсия *dsx* содействует генетическому разнообразию, формируя различные комбинации цветов и рисунков на крыльях. При дальнейших исследованиях этого гена было

установлено, что он подвержен множественным нуклеотидным заменам. Более того, эти полиморфизмы сцеплены с хромосомной инверсией, что разделяет фенотипические особенности самок и самцов, выделяя мимикрирующие формы от обычных.

Две формы европейского кукурузного мотылька *Ostrinia nubilalis* Hübner, 1796 различаются между собой несколькими основными генами, ответственными за производство женских феромонов, а также распознавание мужских поведенческих реакций. Морфологически формы неотличимы, однако при использовании генетических подходов был выявлен участок с подавленной рекомбинацией путём инверсионной перестройки, сцепленный с полом [81, 82].

1.2.4 Инверсии как двигатель видообразования

Хромосомные перестройки типа инверсий сопровождают такой важный эволюционный процесс как видообразование. Инверсии играют важнейшую роль в создании репродуктивного барьера между уже существующими видами и вновь образовавшимися. Так, например, процесс видообразования у мышей рода *Peromyscus* происходил путём фиксации перичентрических инверсий. Это демонстрирует белоногая мышь (*Peromyscus eremicus* Baird, 1858), у которой все 48 хромосом двуплечие, в то время как у её родственного вида (*Peromyscus boylii* Baird, 1858) только 40 из 48 хромосом двуплечие [83]. В результате межвидовые гибриды оказываются полностью стерильными, из-за образования дицентрических и акроцентрических фрагментов [46].

Исследования, проведённые Ф. Г. Добржанским на *D. pseudoobscura* показали, что гетерозиготы по инверсиям имеют повышенную жизнеспособность по сравнению с гомозиготами. Оценка различных показателей выживаемости, исходя из результатов экспериментов, однозначно это подтверждает [84, 85, 86].

Связь между половым отбором и инверсионным полиморфизмом демонстрирует работа Брнчича и Кореф-Сантibanеса [87]. Работа проводилась на *Drosophila pavana* Brncic, 1957 виде, обитающем в Южной Америке. При изучении активности мух во время спаривания были обнаружены следующие результаты:

доля гетерозиготных самцов, спаривающихся в первые минуты после подсадки их к самкам, была значительно выше среднего значения для популяции. Полученные результаты свидетельствуют о том, что и при половом отборе гетерозиготность играет немаловажную роль. Особям, имеющим гетерозиготный кариотип, в природе отдаётся большее предпочтение, и как следствие выше шанс на передачу своих генов, что является одним из важнейших факторов поддержания инверсионного полиморфизма в природе.

Израильский учёный Эвиатар Нево совместно с коллегами проводил множество исследований в 20м веке на тему хромосомного видообразования. Изучение происходило на представителях рода малых слепышей *Nannospalax*. Представителей рода можно разделить на три вида, а виды в свою очередь, делятся на множество хромосомных рас, чем и привлекают учёных-эволюционистов. Каждая раса характеризуется своим диплоидным набором, который может варьироваться от минимального $2n = 38$ до $2n = 62$. Результатом этих исследований стала гипотеза о расширении ареала слепышей путём последовательных хромосомных преобразований [88]. Нево предполагает, что по мере расселения слепышей и изменений условий обитания, увеличивался диплоидный набор. Само увеличение хромосомного набора происходило, преимущественно, путём расщепления одной метацентрической хромосомы на две акроцентрические с последующими сериями перицентрических инверсий и смещением центромеры таким образом, что из нового акроцентрика получалась вновь двуплечая хромосома. В своей теории Нево демонстрирует как коррелирует увеличение отличий от исходного места обитания (т. е. увеличение стрессовых условий) с ростом диплоидного набора. Исследования демонстрировались в пределах Израиля с четырьмя хромосомными расами. Каждая из них живёт в своём климате: от влажного и холодного ($2n = 52$), до жаркого и сухого ($2n = 60$). Корреляция между $2n$ и уровнем аридности ареала была доказана математически. Однако в другой работе Нево на территории южной Турции похожей чёткой закономерностей не обнаружилось, хотя там обитал тот же вид. Авторы связали это с предположительно другой моделью видообразования [89].

Работа, проведённая исследователями из Чикагского университета, подтверждает важную роль инверсий в видообразовании у птиц [90]. Свидетельства того, что у птиц инверсии более распространены у птиц по сравнению с другими хромосомными перестройками [91], а также их влияние на видообразование, поддерживает идею, что структурные изменения в геноме могут играть ключевую роль в эволюции. Внимание учёных привлекли крупные перцентрические инверсии среди 411 видов воробьинообразных. При наложении на эволюционное дерево обнаружилась значительная вариабельность в скорости фиксации инверсий: у некоторых видов за последние 28 миллионов лет не было зафиксировано ни одной инверсии, в то время как у других видов инверсии фиксировались каждые 200–500 тысяч лет. Дополнительный статистический анализ в роду зеленушек (*Chloris*) выявил, что инверсии чаще фиксируются у симпатрических видов, которые либо способны к гибридизации в настоящее время, либо проявляли такую способность в недавнем прошлом. Помимо этого, исследование подтвердило повышенную частоту фиксации инверсий на половой хромосоме Z. Важно отметить, что площадь ареалов видов не оказывала положительного влияния на количество зафиксированных инверсий, в отличие от предположений авторов предыдущих исследований [92].

Хромосомные инверсии оказывают значительное влияние на эволюционные процессы. Благодаря широкому спектру примеров можно увидеть, как именно инверсии вносят свой вклад: создают блоки коадаптивных аллелей, регулируют работу генов при переносе, выступают маркерами полового диморфизма. Кроме того, инверсии играют ключевую роль в процессе видообразования, создавая репродуктивные барьеры и генетическую изоляцию между популяциями.

1.3 X-хромосома: роль в эволюции эукариот

1.3.1 Половые хромосомы и определение пола у животных

Биологический пол организма определяется совокупностью генетических, метаболических и морфофункциональных характеристик, которые могут отличить

его от представителей другого биологического пола своего же вида. Также пол определяет роль этого организма при передаче генетической информации из одного поколения в другое. Половое размножение обеспечивает преемственность наследственной информации от родителей потомкам. Данный тип размножения подразумевает образование половых клеток (гамет), несущих лишь половину генетической информации. Слияние мужских и женских гамет даёт начало новому организму. Большинство организмов обладают системой переключения программы развития эмбриона. Из зиготы может образоваться как раздельнополый организм (мужской или женский), так и обоеполый (гермафродит).

В контексте раздельнополых организмов выделяют различные типы определения пола. Пол некоторых рептилий, земноводных и рыб зависит от температуры окружающей среды, в то время как млекопитающим, птицам, некоторым беспозвоночным животным свойственна хромосомная детерминация пола [93, 94]. Она может зависеть не только от состава половых хромосом, но и от их количества. Так можно выделить *Ligeaus*-тип и *Protenor*-тип определения пола, названные по имени водяных клопов, в чьих хромосомах и были замечены различия [37, 95]. *Ligeaus*-тип, известный как XY (или ZW для птиц, рептилий, рыб, земноводных и некоторых насекомых) – это система, которая характеризуется наличием двух типов хромосом, отличающихся друг от друга. Пол-определяющей хромосомой является Y (или W), наличие которой определяет мужской (или женский в случае W) пол. Такая система встречается у большинства видов животных. *Protenor*-тип (или система X0), встречается среди некоторых насекомых и червей. В этой системе пол определяется количеством X-хромосомы, где XX – это самки, а X0 – это самцы.

1.3.2 Первичное и повторное возникновение половых хромосом

На сегодняшний день считается, что половые хромосомы произошли от аутосом [96, 97]. Предполагается, что в некой предковой популяции, существовавшей ранее, все особи были гермафродитными, либо определение пола осуществлялось в ответ на внешние условия окружающей среды (эпигамно). Все

особи производили мужские и женские гаметы, за которые отвечали два «гена-переключателя»: M - ответственный за мужскую фертильность и f - ответственный за женскую. Случайным образом произошла некая мутация, которая привела к рецессивной мужской стерильности, тем самым ограничив часть особей в производстве мужских типов гамет. Такие особи имели хромосомы прото-женского (прото- X) типа. В гомологичной хромосоме также произошла мутация, которая привела к доминантной женской стерильности, тем самым образовав хромосому прото-мужского (прото- Y) типа. В последующем предполагается, что в участке $M-f$ в результате инверсии произошло подавление рекомбинации между прото- X и прото- Y хромосомами. Последовательные инверсии и другие структурные изменения постепенно усиливали блокировку кроссинговера, распространяясь по всей длине хромосом [97, 98]. Эти процессы, в конечном итоге, привели к уменьшению и деградации прото- Y хромосомы [99], в то время как прото- X сохраняла свободную рекомбинацию с гомологичной хромосомой у гомогаметного пола, сохраняя размеры и укрепляя функциональность генов. В результате появилась обособленная пара половых хромосом, отличающаяся от аутосом и друг от друга по морфологии, составу генов и размерам. Важно отметить, что эволюция половых хромосом у разных представителей эукариот происходила из разных пар аутосом и является независимым процессом [100] (рисунок 1). В большинстве случаев одна из двух хромосом является бóльшего размера и содержит множество функционально значимых генов (X и Z), а вторая представляет собой «генетическую пустыню» – маленькую по размеру хромосому, насыщенную ДНК-повторами (Y и W) [101].

Половые хромосомы дрозофилы, вероятно, являются наиболее изученными среди всех насекомых. В контексте образования повторных половых хромосом, так называемых нео-половых хромосом, нередко рассматривают представителей рода *Drosophila*. Нео-половые хромосомы являются результатом совместной эволюции аутосом и половых хромосом, сопровождающейся перестройками. Известно, что геномы дрозофил состоят из шести хромосомных (мёллеровских) элементов, впоследствии названных по фамилии учёного, описавшего их. Среди них имеется

пять крупных (A, B, C, D, E) и один малый (F), кроме того, у самцов есть дополнительный элемент, эквивалентный Y хромосоме. В частности, X-хромосома *D. melanogaster* соответствует мёллеровскому элементу A, а Y представляет собой отдельно стоящую хромосому.

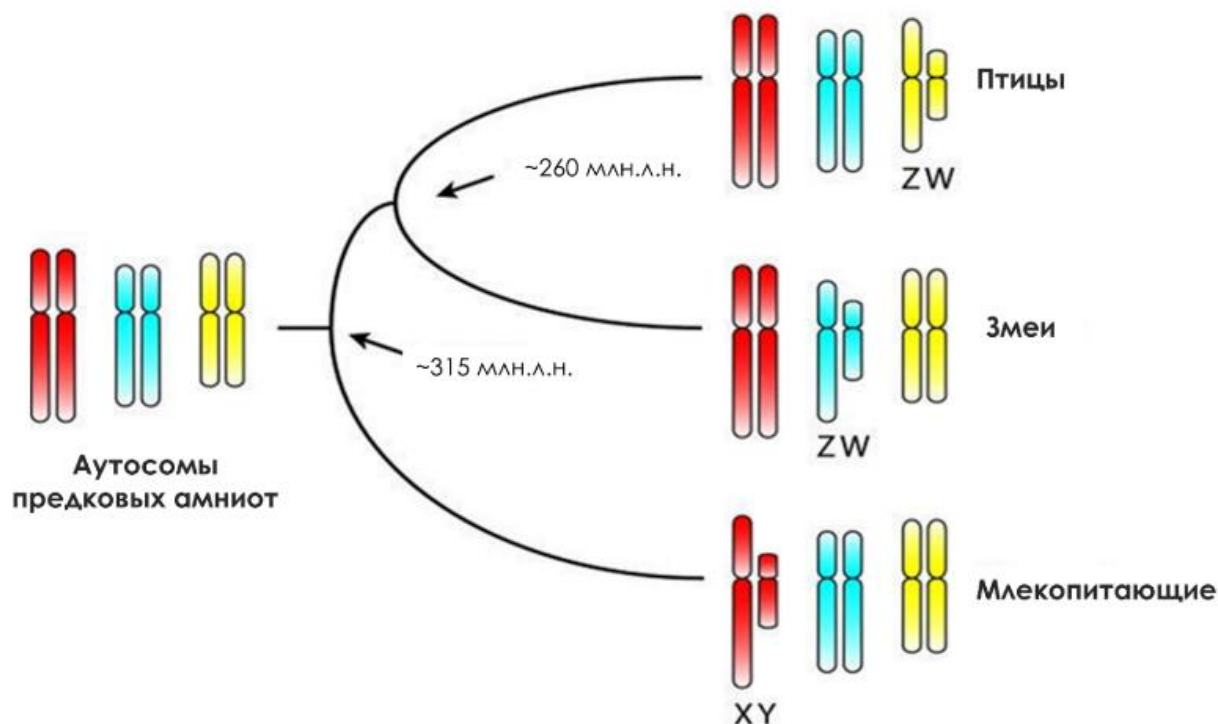


Рисунок 1 – Независимое происхождение половых хромосом у птиц, змей и млекопитающих (из Vallender and Lahn 2006 с модификациями)

Однако с течением эволюции, ветвь, ведущая к *D. pseudoobscura* приобрела нео-X-хромосому, путём слияния A-элемента (предковой X) и D-элемента (аутосомное плечо 3L) [102]. Полагают, что параллельно образовавшаяся нео-Y хромосома полностью деградировала. Хотя, есть свидетельства того, что это может быть все-таки нео-Y, так как гомологи шести Y-генов *D. melanogaster* оказались аутосомными у *D. pseudoobscura*. Обратное картирование Y-генов генов *D. pseudoobscura* показало аутосомное расположение у *D. melanogaster* [103]. Подобные результаты подтверждают гипотезу о том, что в своё время у *D. pseudoobscura* Y-хромосома частично слилась с аутосомой так же, как это сделала X-хромосома.

Дальнейшие преобразования произошли в ходе эволюции в линии *Drosophila Miranda* Dobzhansky, 1935, которая отделилась от *D. pseudoobscura* около двух миллионов лет назад. Мёллеровский аутосомный элемент C слился с

Y-хромосомой таким образом, что половой набор стал выглядеть как X_1X_2Y , где X_1 и Y это нео-половые хромосомы [104].

Гипотетические модели предполагают, что анцестральная прото-XY пара располагалась на F-мёллеровском элементе, после чего эволюция развивалась по трём предполагаемым сценариями, где в конечном счёте F-элемент утрачивал свои генетические свойства половой хромосомы, а A-элемент наоборот, приобретал и развивался [105] (рисунок 2). В пользу этого говорят ранние цитологические исследования, которые показывают, что F-элемент слит как с X- так и с Y-хромосомой у *Drosophila busckii* Coquillett, 1901 [106].

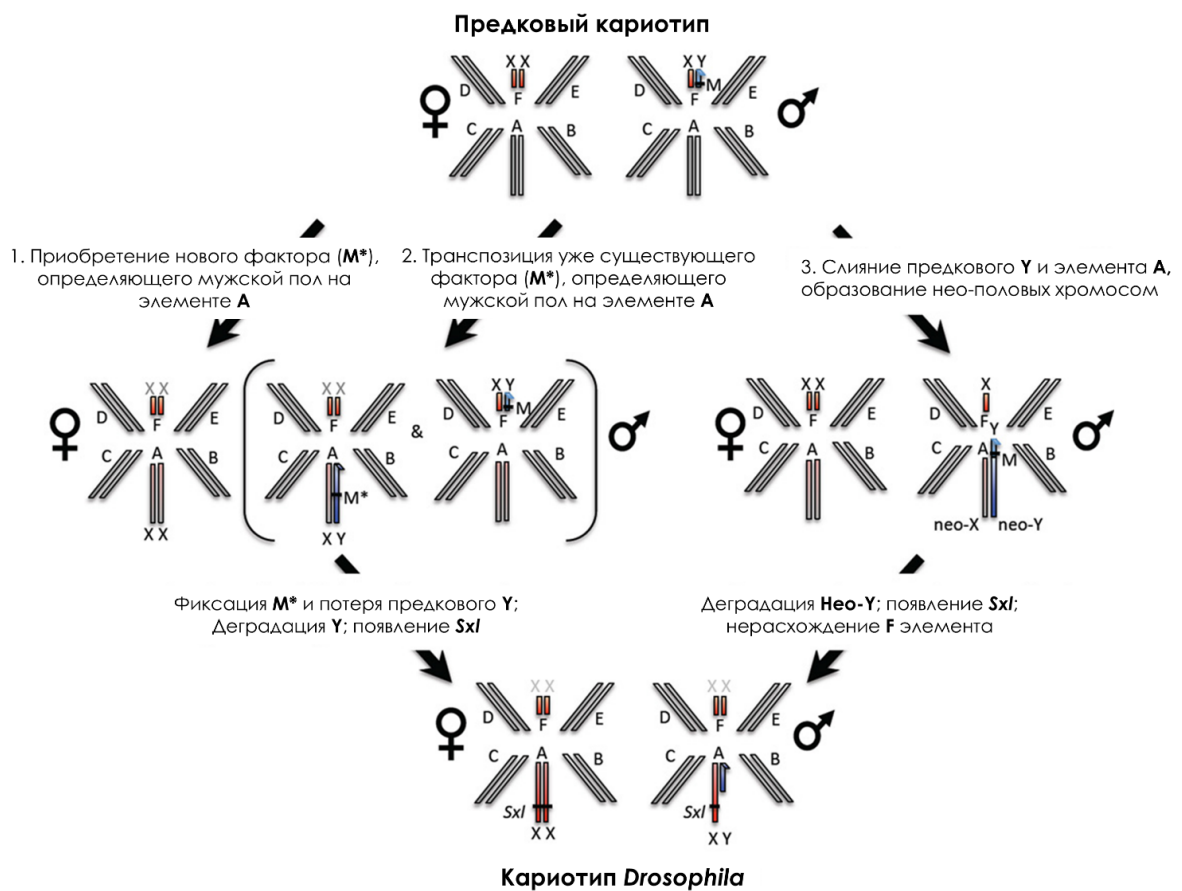


Рисунок 2 – Сценарии развития половых хромосом у *Drosophila* (из Vicoso and Bachtrog 2013 с модификациями)

Известно, что чешуекрылые обладают высокой степенью консерватизма половой пары ZW , которая оставалась по большей части неизменной на протяжении более 230 млн. лет [107]. В то время как у двукрылых наблюдались динамичные преобразования и появление нео-половых хромосом по крайней мере семь раз за последние 300 млн. лет [108]. Для ручейников (близкому отряду к

чешуекрылым) характерны самки Z0, а самцы ZZ. Такой набор принято считать анцестральным среди чешуекрылых. Предполагается, что W хромосома была образована слиянием Z и аутосомы, а затем в некоторых линиях была вторично утрачена [109]. Также рассматривается вариант повторного слияния W и аутосомы, что привело к хромосомному разнообразию у представителей отряда.

Наглядный пример динамичной эволюции половых хромосом демонстрируют тропические рыбы вида *Hoplias malabaricu* Bloch, 1794. Вид известен своим кариотипическим разнообразием внутри популяций, благодаря чему было описано целых семь кариоморфов от А до G [110]. Современные исследования представили подробное описание и схему эволюции половых хромосом кариоморфы D из С [111]. По представлениям авторов, кариоморфа С имеет классическую XY систему, где и X и Y – это метацентрические хромосомы, а кариоморфа D имеет систему X1X2Y, где X1 такая же, как у морфы С, X2 представляет собой маленькую акроцентрическую хромосому, а Y является гигантской нео-Y хромосомой, включающую в себя целиком Y от кариоморфы С и дополнительное соразмерное плечо (рисунок 3).

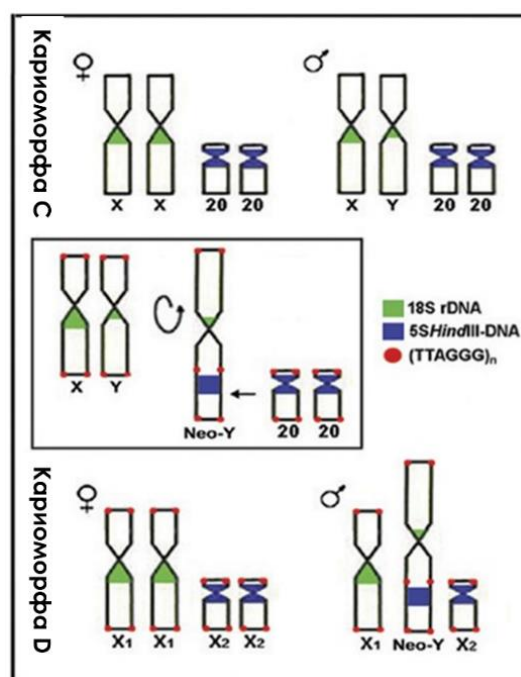


Рисунок 3 – Происхождение кариоморфы D от предковой С (из Cioffi and Bertollo 2010 с модификациями). Изогнутая стрелка используется для обозначения перевёрнутой ориентации Y

Использование зондов 18S рДНК, 5S HindIII-ДНК и теломерных повторов позволило установить, что в эволюции задействована 20-я пара аутосом морфы С.

Эта пара представляет собой маленькие акроцентрические хромосомы, из которых впоследствии и образовалась пара X2 морфы D. Нео-Y в свою очередь образовалась от слияния одной копии 20-й пары и меньшего плеча предковой Y. Второе плечо Y было инвертировано. Подобное исследование помогло распознать эволюционный путь, ведущий к множественной системе половых хромосом.

Примером специфичного возникновения нео-половых хромосом может послужить семейство мокриц *Armadillidiidae*. Исследования показали, что фенотипические самки мокрицы обыкновенной (*Armadillidium vulgare* Latreille, 1804), генетически являющиеся самцами, могут являться следствием интеграции феминизирующего элемента *f*, который встраивается в другую пару аутосом, иницируя процесс дифференциации пола. Ещё сорок лет назад об этом говорили французские исследователи, которые полагали, что этот *f*-элемент ничто иное, как фрагмент генома эндосимбионта *Wolbachia*, интегрированный в ядерный геном мокриц [112]. Исследование 2016 года подтвердило 40-летнюю гипотезу, уточнив, что *f*-элемент встраивается не в W хромосому, а в пару аутосом, иницируя дифференциацию пола. Феминизирующий агент из W-хромосомы удалялся, делая половые хромосомы гомологичными и меняя систему определения пола на цитоплазматическую. Позже горизонтальный перенос генома *Wolbachia* в другую пару аутосом создаёт новую генетически различную половую пару, возвращая генетическую детерминацию пола, как показано на рисунке 4 [113].

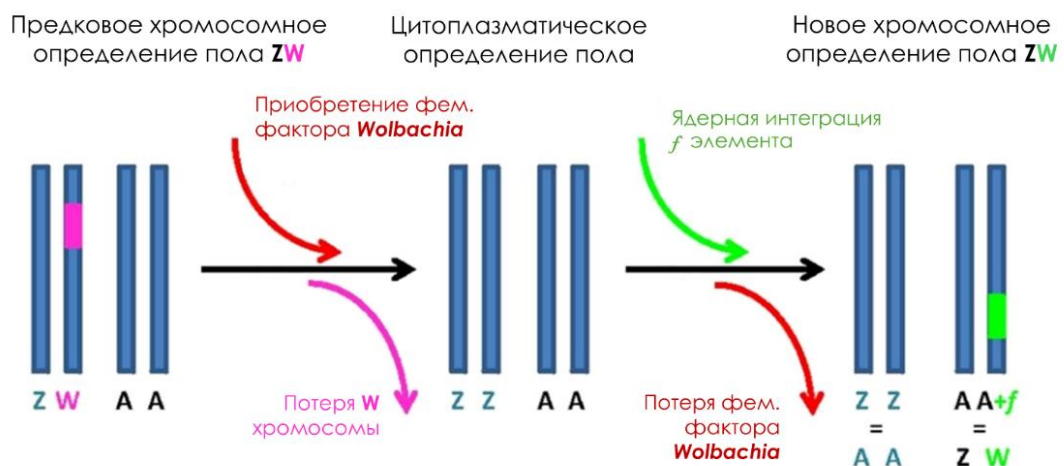


Рисунок 4 – Эволюционный сценарий образования нео-половых хромосом у *A. Vulgare* (из Leclercq et al., 2016 с модификациями)

1.3.3 Происхождение, дифференциация и деградация пол-определяющих хромосом

Эволюция пол-определяющих хромосом из предковой аутосомной пары представляет ключевое событие в определении пола у многих видов. Разделение на X и Y хромосомы началось с появления гена на одной из хромосом, запускающего программу развития по тому или иному типу. Например, у животных с системой XY таким геном является *SRY* (Sex-determining Region Y), запускающий развитие мужских половых признаков. У животных с системой ZW таким геном является *DMRT1* (Doublesex and mab-3 related transcription factor 1). Появление такого различия на прото-Y и прото-W хромосомах вызвало супрессию рекомбинации вокруг этих областей. В свою очередь, супрессия привела к накоплению мутаций и структурных изменений, которые позволили хромосомам начать свою независимую от X и Z эволюцию, соответственно [114]

Происхождение и эволюция W-хромосомы у птиц является важной темой в эволюционной биологии. Исследования, проведённые на курице (*Gallus gallus* Linnaeus, 1758), показало, что их W хромосома значительно деградировала по сравнению с Z хромосомой. Как выявили авторы, в ходе эволюции W хромосома потеряла большую часть своих генов, и вместо них теперь содержит множество повторяющихся последовательностей и псевдогенов. Авторы работы полагают, что на ранних этапах эволюции W хромосома была гомологична Z, однако с течением времени мутации и дрейф генов привели к потере большинства структурных генов или к их замене на псевдогены [114].

Ещё одним примером, иллюстрирующим процесс происхождения Y- и W-хромосом может быть работа по изучению представителей низших змей. Последние пятьдесят лет считалось, что все змеи имеют определение пола по системе ZW и общего предка [115]. Однако, что касается представителей низших змей, например удавов и питонов, то их система определения пола оставалась открытой, в виду гомоморфности их половых хромосом. В недавней работе по изучению специфичной коралловой окраски королевских питонов (*Python regius* Shaw, 1802) было показано, что мутация, определяющая данный тип окраса

находится в обеих половых хромосомах и наследуется по системе XY, а не как у высших змей по ZW [116]. Дальнейшие исследования геномов императорского удава (*Boa imperator* Daudin, 1803), тигрового питона (*Python bivittatus* Kuhl, 1820), с последующим выравниванием на референс представителя высших змей техасского гремучника (*Crotalus atrox* Baird & Girard, 1853), показали принципиальное различие в системах половых хромосом (рисунок 5).

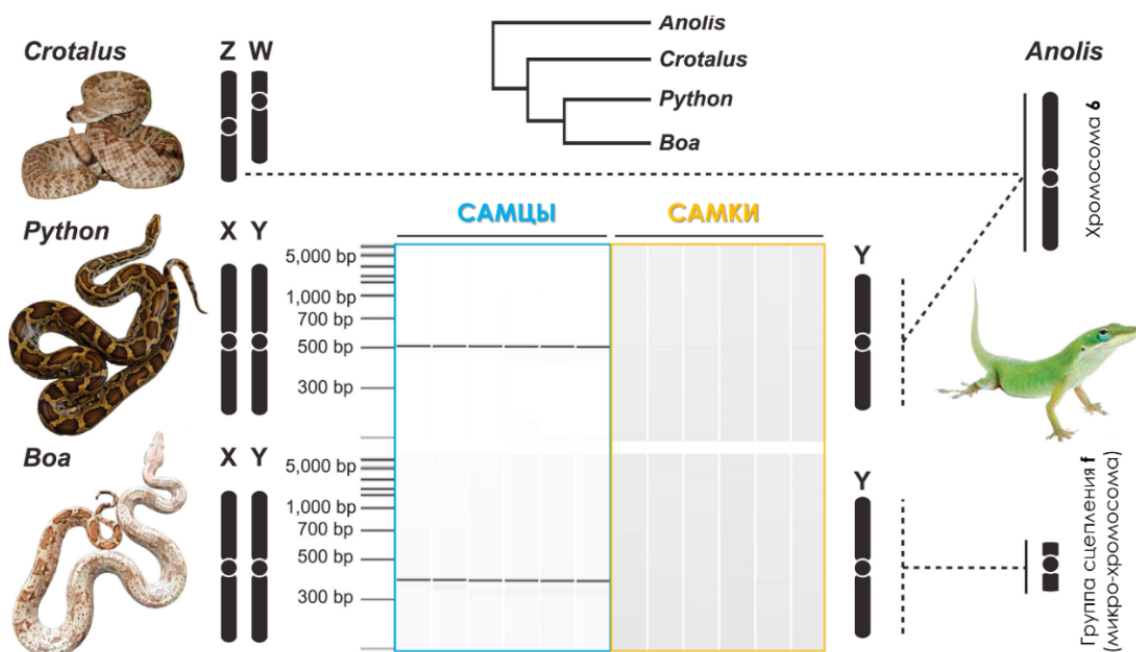


Рисунок 5 – Результат ПЦР амплификации специфичного для самцов локуса, а также предполагаемая синтения с хромосомами *Anolis* (из Gamble et al. 2017 Leclercq et al., 2016)

Для питона и удава это оказалась система XY, а для гремучника ZW, при этом сравнение гоносом между питоном и гремучником показало различия. Было установлено, что они возникли независимо из разных пар аутосом. За предположительный анцестральный вид была взята ящерица *Anolis carolinensis* Voigt, 1832. Для питона и гремучника было показано, что их Y и Z хромосомы произошли от 6-й хромосомы *A. carolinensis*, а Y удава был гомологичен микрохромосоме ящерицы, которая называется «группой сцепления f» (linkage group f). Таким образом, было показано, как одна пара аутосом могла дать начало разным системам определения пола [117].

Процесс Y-дегенерации остаётся незавершённым у млекопитающих, о чём свидетельствует наличие гомологичных генов на X и Y хромосомах, а также

сохранение псевдоаутосомных областей, где частично происходит процесс рекомбинации. W хромосома остаётся по большей части, менее перестроенной по сравнению с Z, но всё ещё гораздо меньших размеров.

1.3.4 Дальнейшая дифференциация половых хромосом и роль инверсий в этом

Дальнейшая дифференциация половой пары привела к разной степени деградации пол-определяющих хромосом (Y и W). Исследователи до сих пор не пришли к консенсусу в вопросе процесса деградации Y-хромосомы: был ли это постепенный процесс накопления различий, или же этому способствовал некий «геномный катаклизм», например в виде инверсии, [76]. Сравнение X- и Y-хромосом млекопитающих свидетельствуют об обоих процессах. Как минимум одну древнюю крупную инверсию видно, как отдельный эволюционный слой на X. Однако также исследователи находят свидетельства более плавных процессов, происходящих внутри небольших генных блоков на Y [76]. Псевдоаутосомные области постепенно сокращались, перемещая гены в нерекombинирующие части. Такие гены изменяли гомологию с генами на X-хромосоме и даже GC состав внутри генов [118]. Тем не менее считается, что деградация Y хромосомы проходила преимущественно за счёт делеций и вставок [119].

В то же время W-хромосома некоторых птиц эму или питонов осталась более-менее нетронутой, хотя при изучении половой пары хромосом у птиц (ZW) чаще всего можно встретить литературу о разной степени деградации W хромосомы [120, 121]. Наиболее частым таксоном для изучения дифференциации половых хромосом птиц является инфракласс бескилевых птиц, как наиболее древний ныне живущий таксон.

Исследование 2009 года показало, как один и тот же высоко консервативный ген *Fem-1C*, ответственный за определение пола начиная от нематод и заканчивая млекопитающими, сцеплен с парой гоносом у разных видов килевых птиц [122, 123]. Результаты исследования показали, что у некоторых совиных и воробьинообразных ген *Fem-1C* был обнаружен как на Z, так и на W, в то время как

у некоторых представителей курообразных, гусеобразных, и попугаев ген был обнаружен лишь на Z-хромосоме. У представителя страусообразных чьи хромосомы считаются одними из древнейших и морфологически не дифференцированными, ген был обнаружен на обеих хромосомах в псевдоаутосомных областях.

Исследование другой группы 2014 года, посвящённое изучению эволюционных траекторий половых хромосом птиц, наглядно продемонстрировало как происходила дифференцировка гоносом от общего предка всех птиц, до конкретных представителей инфроклассов бескилевых (*Palaeognathae*) и новонёбных (*Neognathae*) [124]. Схематическое изображение отчётливо демонстрирует, что не только W-инверсии играли ключевую роль в подавлении рекомбинации, но и Z-инверсии (рисунок 6).

Авторы считают, что в генетическую детерминацию пола был вовлечён ген *DMRT1* (предполагаемый ген определяющий пол), а процесс дифференцировки начался ещё у самого анцестрального вида. Первая Z-сцепленная инверсия небольшого участка произошла не случайным образом, а из-за накопленного «антагонического эпистаза» в районе *DMRT1*, который мог привести к конфликту аллелей.

Множество исследований китопарнокопытных было произведено с использованием различных цитогенетических и молекулярных подходов, и на основе полученных данных в 2017 году вышла работа, которая представляет сравнительную карту X-хромосомы между представителями десять семейств (рисунок 7).

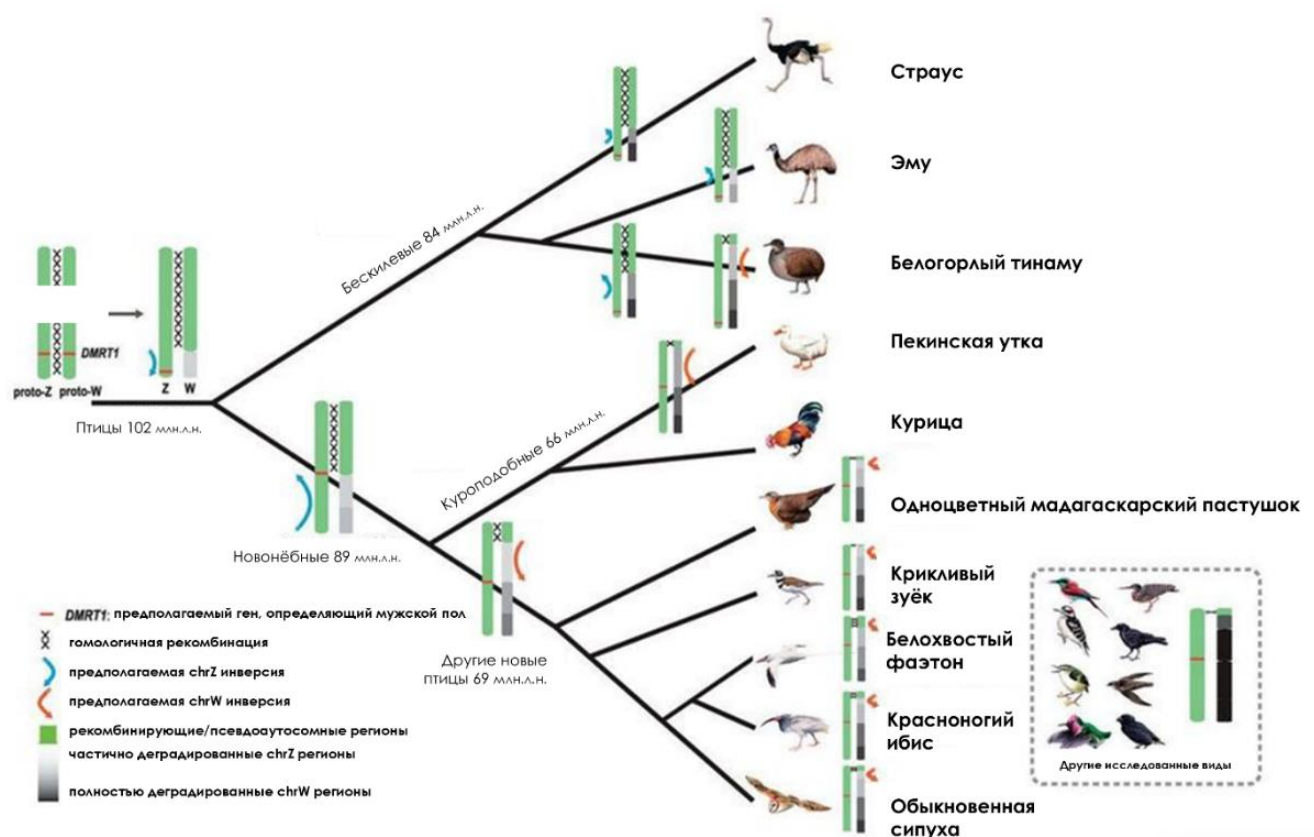


Рисунок 6 – Предполагаемые сценарии формирования эволюционных пластов птиц (из Zhou et al. 2014 с модификациями)

Анализ позволяет реконструировать предковую X-хромосому, а также проследить ключевые перестройки в ней, произошедшие в ходе эволюции отряда *Cetartiodactyla* [125]. Сравнение половых хромосом с использованием ВАС клонов у исследуемых в данной работе видов выявило три наиболее вероятных сценария, по которым могла идти эволюция: сохранение анцестральной структуры, изменение положения центромеры и инверсия синтенных блоков.

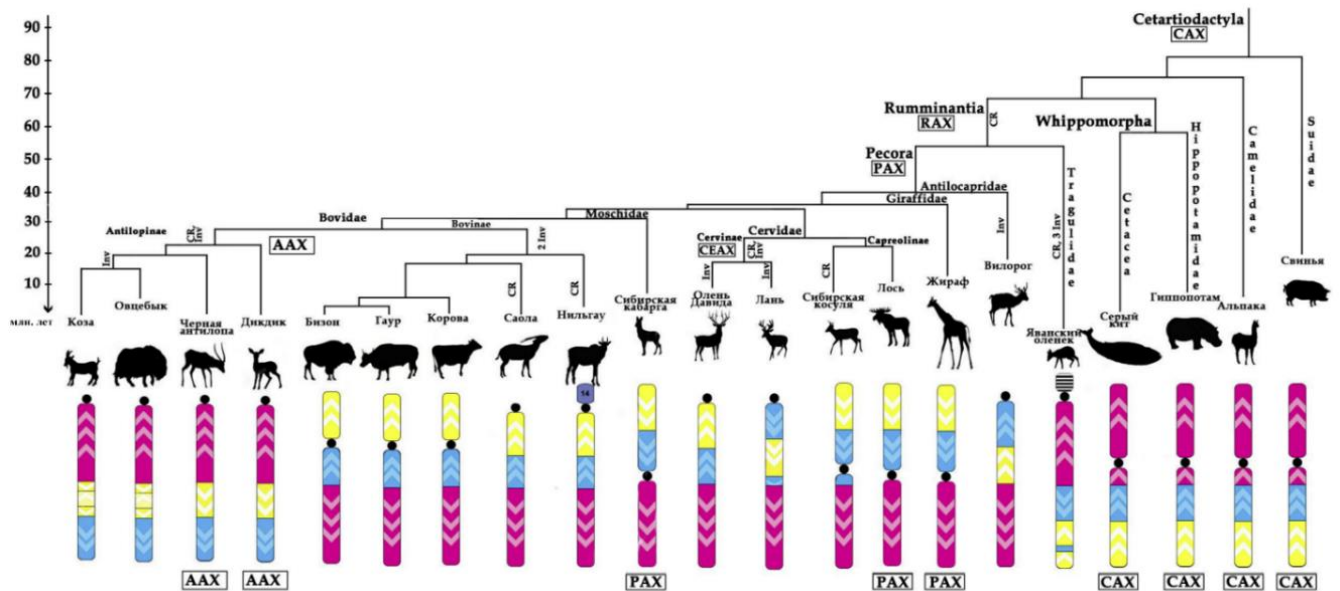


Рисунок 7 – Филогенетическое отображение структуры X-хромосомы у представителей отряда Cetartiodactyla (из Proskuryakova et al. 2017 с модификациями)

У большинства рыб и лягушек половые хромосомы гомоморфны, но не у трёхиглой колюшки (*Gasterosteus aculeatus* Linnaeus, 1758), чья половая пара является модельной системой для изучения структурной эволюции половых хромосом. Эта рыба имеет гетероморфную пару половых хромосом, сформировавшихся относительно недавно (14–26 млн. лет назад), но уже на этой стадии можно заметить различия между Y- и X-хромосомами. Подавленный кроссинговер на большей части длины хромосом привёл к образованию псевдоаутосомных областей [126]. Эта область совпадает с тремя перичесентрическими инверсиями, которые играют роль в дифференциации Y- и X-хромосом [127].

Геном грызунов характеризуется множественными перестройками и сильно отличается от многих плацентарных. Было показано, как сильно эволюционирует X-хромосома мышей, по сравнению с другими млекопитающими [128]. Выравнивание сборок человека, кошки и свиньи показали эволюционное сохранение порядка генов и архитектуры X-хромосомы. Такой же порядок генов был выявлен и для других представителей включая лошадь, собаку и слона [129, 130, 131]. Однако, при сравнении большинства млекопитающих с геномом мыши было выявлено не менее семи инверсий внутри X-хромосомы [35].

Для мышеобразных грызунов (*Myomorpha*) есть множество литературных данных, которые свидетельствуют о высоких темпах кариотипической эволюции половых хромосом. По-видимому, для данной таксономической группы животных половые хромосомы чаще всего подвергались транслокациям, а Y-хромосома так сильно деградировала, что для некоторых видов уже зафиксирован факт её исчезновения [132, 114, 133, 134]. Такие аберрации как перецентрические инверсии, изменение положения (репозиция) центромеры или появление новых центромер являются обычными событиями в эволюции геномов мышеобразных [132, 135, 136, 137]. А среди некоторых представителей хомяковых (*Arvicolinae*) были обнаружены «гигантские половые хромосомы», занимающие до 20% от всего генома. Причиной образования таких хромосом могло стать включение огромных гетерохроматиновых блоков [138, 139].

Однако, не всегда хромосомные перестройки являются причиной дифференциации половых хромосом, иногда они могут быть и следствием такой дифференциации. В исследовании, направленном на изучение эволюции половых хромосом у змей, был проведён анализ нескольких видов из различных семейств, относящихся к высшим и примитивным змеям. Представители высших змей *Elaphe radiata* (Boie, 1827) и *Natrix natrix* (Linnaeus, 1758) демонстрировали наличие значительных участков гетерохроматина в своих W хромосомах. При этом у *E. radiata* была обнаружена специфическая сателлитная ДНК, которая преимущественно локализовалась в W хромосоме, что указывает на возможную роль этих элементов в дифференциации половых хромосом. Аналогичные результаты были получены для *Xenodon merremii* (Wagler, 1824), где также была выявлена консервация сателлитной ДНК в W-хромосоме. Все эти змеи характеризовались гетероморфными парами половых хромосом. В то же время представители примитивных семейств змей, таких как *Boidae*, не демонстрировали наличие аналогичных сателлитных ДНК в своих половых гомоморфных хромосомах. Это свидетельствует о том, что процессы дифференциации половых хромосом у более эволюционно продвинутых змей, возможно, были обусловлены

внедрением транспозонов, а инверсии стали лишь результатом их активности и дальнейших структурных изменений [140].

1.3.5 Другая роль X-хромосомы

Традиционно пол определяется по системе XY / WZ, где Y- или W-хромосомы несут решающие гены для развития самцов или самок соответственно. Однако, существует альтернативный механизм — балансовая теория определения пола, который подчёркивает, что не все так однозначно и пол может определяться соотношением набора половых хромосом к аутосомам. Данная теория была открыта при изучении плодовой мухи (*D. melanogaster*) в 1925 году Бриджесом, став впоследствии одной из важных концепций в эволюции половых хромосом. Согласно балансовой теории, развитие самок и самцов регулируется числом

X-хромосом (от 1 до 3), в то время как наличие Y никак не влияет на процесс определения пола. Самцы без Y-хромосомы фенотипически неотличимы от самцов с Y, однако её наличие определяет фертильность самцов. Если соотношение числа X-хромосом к аутосомам будет равно 1, тогда из эмбрионов развиваются нормальные самки, если соотношение равно 0,5 – тогда появляются нормальные самцы. Другие соотношения являются аномальными и приводят к появлению интерсексов, и сверхдоминированию пола – сверхсамок и сверхсамцов [37, 141].

Помимо своей ключевой роли в определении пола, X-хромосома также регулирует некоторые физиологические, морфологические и поведенческие признаки. Инверсии на X-хромосоме могут значительно влиять на эти процессы, изменяя структуру и функцию генов, расположенных на ней. Недавние исследования обнаружили у бабочки из рода *Ostrina* хромосомную перестройку, охватывающую более четверти половой хромосомы Z [142, 143]. Данная область содержит в себе локусы, ответственные за факторы поведенческой изоляции и разделяет между собой две формы E и Z одного вида *Ostrinia nubilalis* Hübner, 1796. Эти две формы исследователи относят к недавно образовавшимся (примерно 100

тыс. лет назад) и объясняют эволюционную дивергенцию именно сцепленными локусами внутри не рекомбинирующего участка [81, 82].

Среди представителей выюровых (*Taeniopygia guttata* Vieillot, 1817) обнаружена инверсия Z-хромосомы, влияющая на успех отцовства. Как оказалось, инверсия половой хромосомы TguZ влияет на морфологию, скорость и способность к оплодотворению у сперматозоидов. Семенная жидкость самцов, гетерозиготных по инверсии имела самые длинные жгутики и самую высокую скорость перемещения сперматозоидов, в то время как гомозиготные самцы демонстрировали наименьший успех отцовства [144].

1.3.6 Роль X-хромосомы в видообразовании

Видообразование – комплексный процесс, который, очевидно, проходит в каждой эволюционной линии по своему уникальному сценарию. Хромосомные инверсии играют важную роль в видообразовании, способствуя дивергенции и репродуктивной изоляции популяций. Прекращение рекомбинации между X- и Y-хромосомами и накопление мутаций может способствовать видообразованию, поддерживая благоприятные комбинации генов и ускоряя эволюционные процессы [145]. В дополнение к этому параграфу, важно рассмотреть два «правила видообразования», сформулированные Джери Коэном. Он выделил «Правило Холдейна» и «Большой эффект X-хромосомы» [146, 147].

«Правило Холдейна» объясняет, что если у межвидовых гибридов один из биологических полов стерильный, то с вероятностью выше 95% это будет гетерогаметный пол (XY или ZW) [148]. Второе «правило» – большой эффект X-хромосомы – заключается в том, у гибридов замена X-хромосомы одного вида на X-хромосому другого оказывает непропорционально большое влияние на гибридную приспособленность по сравнению с аналогичной заменой аутосомы, ввиду более плотного распределения генов, участвующих в постзиготической изоляции [149, 150]. Концепции, объясняющие эти правила включают «теорию доминантности», «теорию быстрой эволюции X», «гипотезу быстрой эволюции самцов», и некоторые другие аспекты половых хромосом. Исследования показали,

что X-хромосома часто демонстрирует более высокую степень дифференциации между видами по сравнению с аутосомами. По-видимому, это явление связано с тем, что X-хромосома подвергается более сильному отбору против гибридных несовместимостей.

Подкрепление для «Правила Холдейна» можно увидеть в работе, проведённой на примере саранчовых [151]. *Vandiemenna viatica* Erichson, 1842 – вид австралийской саранчи, имеющий ряд особенностей. Несколько популяций *V. viatica*, обитающих вместе, образуют группу хромосомных рас. Две расы отличаются друг от друга перичентрической инверсией половой хромосомы и центрическим слиянием этой инвертированной X-хромосомы с первой парой аутосом. При последующих скрещиваниях изучались гетерозиготные особи, и было установлено, что гетерозиготные самцы имели отклонения в процессе мейоза. Блокирование спаривания гомологичных хромосом иллюстрирует, предположительно, роль хромосомных aberrаций в снижении фертильности гетерозиготных особей, что как следствие, может способствовать начальной дивергенции популяций.

Также это можно проследить у подвигов саппорской кобылки (*Podisma sapporensis* Shiraki, 1910), обитающих вдоль Курильских островов, Сахалина, Хоккайдо и других островов Японии. При сравнении двух хромосомных рас с островов Кунашир и Сахалин были обнаружены хромосомные отличия от стандартной расы, обитающей на о. Хоккайдо. Популяцию с о. Кунашир отличала Робертсоновская транслокация, затрагивающая X-хромосому и пятую пару аутосом. В локальной популяции на о. Сахалин у особей была найдена перичентрическая инверсия небольшого участка X-хромосомы в гомозиготе. Эксперименты по скрещиванию видов из этих популяций в результате дали отсутствие прекопуляционных изолирующих механизмов. Анализ гибридных эмбрионов показал, что вместе с нормальными гетерозиготами были отмечены единичные случаи моно- и трисомии по аутосоме, участвующей в транслокации. Жизнеспособность гетерозигот оказалась резко снижена по сравнению с контролем. Самцы первого поколения гибридов, сохраняя способность к

копуляции, оказались стерильными, а клетки их семенников оказались деформированными [152, 153].

Примером, подкрепляющим большой эффект X-хромосомы, может быть работа, посвящённая интрогрессии X-хромосомы между двумя видами мышей *Mus musculus* Linnaeus, 1758 и *Mus musculus Domesticus* Schwarz & Schwarz, 1943 [154]. Считается, что именно X-хромосома играет роль в изоляции между этими видами, развивая мужскую стерильность у гибридов [155, 156]. Одним из ключевых выводов исследования является то, что X-хромосома может быстрее накапливать несовместимые аллели из-за особенностей гетерогаметности (XY у самцов). Это ведёт к тому, что гены на X-хромосоме оказывают более сильное влияние на фенотипические проявления у гибридов, чем гены на аутосомах. Гемизиготная природа X-хромосомы у самцов делает её уязвимой к накоплению вредных мутаций, что увеличивает вероятность появления стерильности у гибридов.

1.4 Малярийные комары рода *Anopheles*

1.4.1 Обзор классификации комаров рода *Anopheles*

Систематика малярийных комаров сложна [157]. Биоразнообразие малярийных комаров несёт эпидемиологическое значение, так как для правильной организации профилактики и борьбы с трансмиссивными заболеваниями необходимо иметь представление о разнообразии малярийных комаров на всех уровнях жизни - от молекулярного до популяционно-видового. Из почти пятисот видов *Anophelinae* малярийного плазмодия способны передавать не более шестидесяти [158]. Малярийные комары часто относятся к группам видов-двойников, члены которых морфологически неотличимы, а генетические различия не слишком велики, однако виды в этих группах могут существенно различаться по экологической адаптации и способности переносить малярию. Высокая степень генетического сходства между видами-двойниками усложняет реконструкцию филогенетических связей внутри группы [159, 160]. Изучаемый в данной работе род *Anopheles* принадлежит к отряду двукрылых (Diptera), семейству

кровососущих комаров (*Culicidae*), который в свою очередь состоит из трёх родов. Подробная классификация выглядит следующим образом:

Отряд двукрылые

Семейство кровососущие комары

Подсемейство *Culicinae*

Подсемейство *Toxorhynchitinae*

Подсемейство *Anophelinae*

Род *Bironella* Theobald, 1905

Род *Chagasia* Cruz, 1906

Род *Anopheles* Meigen, 1818

Род *Chagasia* встречается исключительно в неотропическом регионе (Южная и Центральная Америка) и считается реликтом некогда более широко распространённой группы. Род *Bironella* ограничен Австралазийской областью (Australasian region) и также представляет собой остаточную группу с узким ареалом распространения [159]. В то же время, род *Anopheles* представляет собой повсеместно распространённый таксон, за счёт чего, большинство видов *Anophelinae* принадлежат именно к роду *Anopheles*. Он же в свою очередь, подразделяется на семь подродов, согласно последней классификации [161]:

Подрод *Anopheles* Meigen, 1818 (182 вида)

Подрод *Baimaia* Harbach, Rattanarithikul & B. Harrisom, 2005 (1 вид)

Подрод *Cellia* Theobald, 1902 (220 видов)

Подрод *Kerteszia* Theobald, 1905 (12 видов)

Подрод *Lophopodomyia* Antunes, 1937 (6 видов)

Подрод *Nyssorhynchus* Blanchard, 1902 (39 видов)

Подрод *Stethomyia* Theobald, 1902 (5 видов)

Подрод *Anopheles* распространён почти повсеместно, за исключением большинства островов Тихого океана (Новая Зеландия, Фиджи, Новая Каледония). Виды именно этого подрода будут рассмотрены далее в литературном обзоре.

Единственный вид подрода *Baimaia* найден лишь в горных лесах на границе Таиланда с Мьянмой и Лаосом и считается реликтовым таксоном с примитивными признаками [162]. Подрод *Cellia* преобладает в афротропической, австралийской и ориентальной областях, проникая также на юг Палеарктики, но отсутствует на большинстве островов Тихого океана. *Kerteszia* характерен для Неотропики от Мексики до юга Бразилии и Аргентины, однако отсутствует на островах Вест-Индии (кроме Тринидада) и большей части Амазонии [163]. Подрод *Lophopodomyia* обитает в Панаме и северной части Южной Америки, а виды подрода *Nyssorhynchus* ограничены Неотропикой, за исключением *Anopheles albimanus* Wiedemann, 1820, ареал которого захватывает север Мексики и южные штаты США. Подрод *Stethomyia* распространён преимущественно от юга Центральной Америки до севера Южной Америки, а отдельные виды достигают островов Тринидад и Тобаго, а также Перу и Боливии.

Таксономическая структура подрода *Anopheles* достаточно запутанная и состоит из нескольких групп, включающих в себя отдельные комплексы видов. Объединять родственные виды в комплексы широко распространённая практика среди учёных, занимающихся комарами [157]. Члены таких комплексов морфологически сходны и частично репродуктивно изолированы друг от друга. Так как данная диссертация сосредоточена на изучении видов супер-комплекса *Masulipennis*, то здесь мы сосредоточимся именно на Палеарктических комплексах видов-двойников малярийных комаров, и вскользь будут упомянуты ключевые виды Неарктического зоорегиона. Данный супер-комплекс преимущественно представлен видами комплекса *Masulipennis* в Палеарктическом регионе, и комплексами *Freeborni* и *Quadrimalatus* в Неарктическом регионе. В отличие от видов Северной Евразии, Неарктические виды имеют более стабильные ареалы обитания и меньшую экологическую пластичность.

Палеарктический комплекс *Masulipennis* был назван по одному из основных представителей – *An. maculipennis*, который, как считалось ранее, просто имеет обширный ареал [9]. Исследователи изначально предполагали, что данный вид распространён как в Палеарктике, так и Неарктике, охватывая территории всей

Европы, Средиземноморья, Азии и части Северной Америки. Однако последующие исследования выявили, что в разных частях ареала этого вида наблюдаются генетические различия, а также разная способность переносить малярию, вариации в поведении и окраске яиц. Так, цитогенетические исследования позволили выявить в Палеарктике восемь видов-двойников, ранее считавшихся одним видом *An. maculipennis* [164, 165]. Последующие популяционно-генетические и молекулярные исследования позволили выявить ещё два вида в Палеарктике [166, 25, 167, 26].

Важно упомянуть, что в некоторых источниках используется неформальная таксономическая единица «комплекс» (*Maculipennis complex*) что, по сути, является устаревшим аналогом другой неформальной таксономической единицы – «подгруппа». Энтомолог и таксономист Ральф Харбах настаивает на соблюдении единых правил написания формальных (семейства, род, вид) и неформальных (группы, подгруппы, секции, комплексы) единиц [168, 159]. Неформальные таксономические единицы следует писать с заглавной буквы без использования курсива (например, комплекс *Maculipennis*), в то время как формальные таксоны необходимо писать курсивом с заглавной (для семейства/рода) или строчной (для вида) буквы. В своей классификации кровососущих насекомых он чётко классифицирует *Maculipennis* как супер-комплекс, называя его неформальной таксономической единицей – т. е. группой, которая включает в себя три подгруппы и четыре вида, не относящихся ни к одной из подгрупп. Таким образом, состав группы *Maculipennis* выглядит так:

Супер-комплекс *Maculipennis* (или группа *Maculipennis*)

Комплекс *Maculipennis* (или подгруппа *Maculipennis*, 11 видов),

Комплекс *Freeborni* (или подгруппа *Freeborni*, 4 вида),

Комплекс *Quadrимaculatus* (или подгруппа *Quadrимaculatus*, 6 видов),

Прочие виды группы *Maculipennis* (4 вида):

Anopheles atropos Dyar & Knab, 1906

Anopheles aztecus Hoffmann, 1935

Anopheles lewisi Ludlow, 1920

Anopheles walkeri Theobald, 1901

Ранее в группу *Maculipennis* также входил американский вид *An. punctipennis* Say, 1823 [169], позднее, молекулярный анализ на основе ITS2 позволил отделить этот и другие виды в отдельную группу [168]. По последним данным в подгруппе *Maculipennis* выделяют десять существующих в настоящее время видов, собранных на основе молекулярно-генетического анализа региона ITS2 [161]:

1. *Anopheles artemievi* Gordeyev, Zvantsov, Goryacheva, Shaikevich & Yezhov, 2005
2. *Anopheles atroparvus* van Thiel, 1927
3. *Anopheles daciae* Linton, Nicolescu & Harbach, 2004
4. *Anopheles labranchiae* Falleroni, 1926
5. *Anopheles maculipennis* Meigen, 1818
6. *Anopheles martinius* Shingarev, 1926
7. *Anopheles melanoon* Hackett, 1934
8. *Anopheles messeae* Falleroni, 1926
9. *Anopheles persiensis* Linton, Sedaghat & Harbach, 2003
10. *Anopheles sacharovi* Favre, 1903

В настоящий момент принято считать, что подгруппа *Maculipennis* включает в себя ещё один вид – *Anopheles beklemishevi* Stegnii & Kabanova, который ранее относился к неарктической подгруппе *Quadrimaculatus* на основании цитогенетического анализа [168, 170]. Однако, недавний филогенетический анализ смог с уверенностью доказать, что *An. beklemishevi* является родственным ранним предковым видам палеарктической подгруппы *Maculipennis* [22]. Таким образом, далее в работе будет считаться, что *An. beklemishevi* является членом подгруппы *Maculipennis*.

1.4.2 Инверсионные перестройки у представителей рода *Anopheles*

Известно, что малярийные комары имеют три пары хромосом: две пары метацентрических (или субметацентрических) аутосом, и одна пара

акроцентрических половых хромосом. Правое плечо X-хромосомы сильно гетерохроматизировано, а Y-хромосома представляет точковую хромосому, которую зачастую не видно на препаратах политенных хромосом [169]. Ключевым преимуществом малярийных комаров как цитогенетических модельных объектов является наличие крупных, чётко оформленных политенных хромосом. Это позволяет создавать цитогенетические карты высокого разрешения и исследовать инверсионные перестройки, как внутри хромосомных плеч, так и между ними [171]. Сравнительное картирование установило гомологию плеч среди видов и подтвердило, что транслокации целых плеч и парацентрические инверсии являются общими перестройками среди множества видов *Anopheles* [171].

На сегодняшний день самым изученным является африканский комплекс *Gambiae*. Степень его изученности напрямую связана с его эпидемиологической значимостью на континенте [5, 172, 173, 174]. Группа учёных в своей недавней работе проанализировали и обобщили почти 30-летний массив данных, состоящий из чуть более чем 35 тысяч особей комплекса *Gambiae*. Исследователи изучали связь инверсий с различными экологическими параметрами среды, в которых обитают данные виды. В результате данной работы было показано, что определённый набор инверсий характерен только для узкой экологической ниши. Такой индивидуальный для вида набор не встретить в других климатических и географических условиях [10].

Исследование распределения полиморфных инверсий у *An. gambiae s.s.* показало, что 67 редко встречаемых инверсий из 82 приходятся на плечо 2R, в то время как на остальных аутосомных плечах обнаружено лишь пятнадцать. На половой хромосоме X не обнаружено ни одной полиморфной инверсии, в отличие от фиксированных перестроек [175]. Подобное распределение подчёркивает склонность плеча 2R к структурным перестройкам и, вероятно, указывает на его вовлеченность в адаптацию вида. Например, такие инверсии как 2Rb, 2Rbc, 2Rcu, 2Ru, 2Rd у *An. gambiae* часто встречаются в засушливых саваннах Сахеля и почти отсутствуют во влажной экваториальной части Африки [4]. Другой важной инверсией, тесно связанной с аридными климатическими условиями в центральной

Африке, является 2La. Исследования указывают на то, что частота этой инверсии увеличивается по мере движения к более засушливым регионам [173].

Полногеномные исследования «не африканских» видов малярийных комаров начали появляться относительно недавно, менее пятнадцати лет назад. Ключевым исследованием прошлого десятилетия стал международный проект «16 *Anopheles* genomes» [14]. Этот проект был посвящён секвенированию и сборке геномов малярийных комаров, обитающих в тех регионах, где проблема малярии также актуальна, как и в Африке (рисунок 8). Секвенирование показало, что инверсионные перестройки тесно сопровождают эволюцию рода *Anopheles* на протяжении всего времени. Кроме того, было установлено, что эволюция половых хромосом внутри рода идёт в 2,7 раза быстрее чем эволюция аутосом по сравнению таковой у представителей *Drosophila*. Так, наличие полногеномных сборок помогло исследователям картировать хромосомные перестройки на новых цитогенетических картах или улучшить уже имеющиеся [176, 177, 178]. Сравнения дисковых рисунков политенных хромосом внутри вида помогают выявить полиморфизмы, а между разными видами фиксированные перестройки.

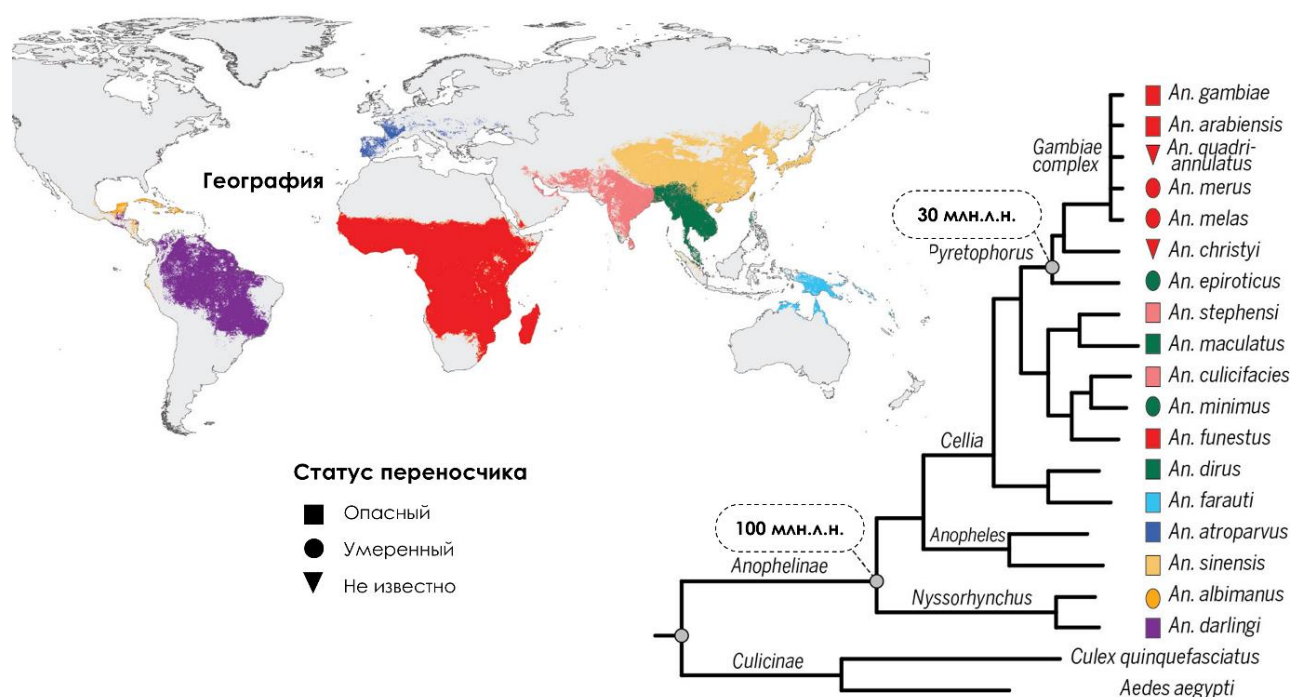


Рисунок 8 – География, статус переносчиков и молекулярная филогения 16 секвенированных видов *Anopheles* и некоторых других двукрылых (из Neafsey et al. 2015 с модификациями)

Инверсионный полиморфизм у малярийных комаров нередкое явление. Чаще всего встречаются полиморфизм по аутосомам. Южноамериканский вид *Anopheles darlingi* Root, 1926 имеет различную степень полиморфности по аутосомам [177, 179, 180], а Шарльвуд заметил связь этих инверсий с поведенческими реакциями [181]. Кроме полиморфизма в аутосомах, у *An. darlingi* встречается один полиморфный вариант половой хромосомы X [177, 180], но влияние полиморфизма не изучено. Примечательно, что степень полиморфности вида снижается ближе к южной части Бразилии. Сравнительное картирование азиатского вида комара *Anopheles sinensis* Wiedemann, 1828 с *An. gambiae* показало, что плечи X, 2L и 3L гомологичны между двумя видами, в то время как плечо 2R *An. sinensis* соответствует плечу 3R *An. gambiae*, что говорит о полной транслокации целого хромосомного плеча в ходе эволюции видов [176]. В ходе исследований был также выявлен единственный полиморфный вариант в 3R, несмотря на то, что *An. sinensis* в целом, гомоморфный вид, как и его близкий родственник *Anopheles stephensi* Liston, 1901 [182].

Для комаров африканской группы инверсионный полиморфизм аутосом является характерной чертой видов. У *Anopheles nili* Theobald, 1904 были обнаружены два высоко полиморфных варианта в плече 2R, однако в плечах 2L, 3R и 3L инверсий не было обнаружено. При сравнительном картировании *An. nili* с *An. gambiae* была установлена гомология X, 2R и 3R плеч, в то время как плечо 2L *An. nili* оказалось гомологичным 3L *An. gambiae*, а 3L *An. nili* гомологично 2L *An. gambiae* [183].

Наиболее изученной группой среди *Anopheles* является африканский комплекс *Gambiae*. Комплекс относится к подроду *Cellia* и состоит из семи родственных видов комаров, которые заметно отличаются географическим распределением, экологической адаптацией и поиском хозяев [10]. В этом комплексе состоят: *An. gambiae*; *Anopheles arabiensis* Patton, 1905; *Anopheles coluzzii* Coetzee & Wilkerson, 2013; *Anopheles funestus* Giles, 1900. Эти виды являются основными переносчиками малярии в Африке [18, 184]. Их можно отнести к высокополиморфным видам, так как их аутосомы содержат множество

вариаций. Например, известно, что кариотип *An. arabiensis* отличается от *An. coluzzii* и *An. gambiae* пятью фиксированными перекрывающимися инверсиями в X-хромосоме (a, b, c, d, и g), а также известной инверсией 2La. Наиболее новые сборки геномов *An. coluzzii* MOPTI и *An. arabiensis* DONGOLA предоставили возможность исследователям идентифицировать геномные координаты регионов разрывов этих инверсий и фланкирующих их гены [185].

Такая высокая степень полиморфности не является чем-то рудиментарным. Множество исследований показало, что каждая из инверсий отвечает за адаптацию к тому или иному ареалу обитания. Например, недавние исследования продемонстрировали географическое распределение полиморфных инверсий этих четырёх видов и установили экологические зависимости [10]. Так, для инверсии 2Rd у *An. gambiae* и *An. coluzzii* была показана связь с высотными регионами, а инверсия 3Ra у *An. arabiensis*, очевидно, связана с переходным лесо-саванным биомом. Однако инверсионные перестройки имеют не только эко-географическую привязку имеют инверсионные перестройки. Ранее сообщалось, о других корреляциях, таких как: предпочтение хозяина, устойчивость к инсектицидам, устойчивость к паразитическому плазмодию (*Plasmodium*) [12, 186].

На основании сравнительных исследований цитогенетических и физических карт малярийных комаров был сделан вывод, что парацентрические инверсии и транслокации целых плеч являются единственными по масштабу перестройками, которые происходили в эволюции геномов малярийных комаров [178]. При сравнении трёх видов *An. atroparvus*, *An. albimanus* и *An. gambiae* с предковым видом было установлено, что хромосомные элементы *An. gambiae* имеют большее сходство с предполагаемым предковым кариотипом, поскольку они различаются всего лишь тремя парацентрическими инверсиями и имеют консервативные целые плечи хромосом. Напротив, хромосомы *An. atroparvus* отличаются от предкового кариотипа двумя транслокациями (часть 2L плеча перешла в плечо 2R) и одной парацентрической инверсией, а *An. albimanus* собрал в своём кариотипе три транслокации (часть плеча 2L ушла в 2R и часть 3L перешла 3R) и одну парацентрическую инверсию после расхождения с предковым видом. Между собой

An. gambiae и *An. atroparvus* отличаются двумя частичными транслокациями и тремя парацентрическими инверсиями, *An. gambiae* и *An. albimanus* отличаются друг от друга тремя частичными транслокациями и тремя парацентрическими инверсиями, а *An. atroparvus* и *An. albimanus* отличаются пятью частичными транслокациями и одной парацентрической инверсией [28].

Большой интерес у учёных вызывает сравнение неарктических видов с палеарктическими. Среди неарктической подгруппы исследовались виды *Anopheles aztecus* Hoffmann, 1935; *Anopheles freeborni* Aitken, 193; *Anopheles occidentalis* Dyar & Knab, 1906; *Anopheles punctipennis* Say, 1823; *Anopheles earlei* Vargas, 1943; *Anopheles quadrimaculatus* Say, 1824. Исследования показали, что только *An. beklemishevi*, единственный из восьми палеарктических видов группы *Maculipennis* имеет наибольшее хромосомное сродство к видам неарктической подгруппы. Важной находкой оказалось то, что *An. earlei* имеет промежуточную структуру хромосом, которая связывает *An. beklemishevi* со стандартным видом (*An. atroparvus*). Вторая хромосома у них оказалось полностью идентичной, однако по правому плечу третьей хромосомы *An. earlei* отличается от стандарта по такой же гигантской фиксированной инверсией, что и *An. beklemishevi*, за исключением того, что у *An. earlei* внутри этой инверсии имеется ещё одна небольшая собственная инверсия [9].

1.4.3 Фиксированные и полиморфные инверсии внутри подгруппы *Maculipennis*

Подгруппа *Maculipennis* включает виды, адаптированные к широкому спектру климатических и ландшафтных условий Палеарктики. Их ареал охватывает как атлантические зоны Западной Европы (Ирландия, Великобритания), так и континентальные районы Евразии, включая Урал, Западную и Восточную Сибирь, вплоть до Амурской области на Дальнем Востоке. В меридиональном направлении представители этой подгруппы встречаются от арктических и субарктических областей до степных, полупустынных и даже пустынных зон Центральной Азии и Ближнего востока [168, 187, 188, 189]. Многие

виды успешно заселяют биотопы Средиземноморского побережья, включая как влажные северные, так и засушливые восточные регионы, что отражает их высокую экологическую пластичность [190]. Присутствие видов *Maculipennis* в таких разнообразных фаунистических зонах, как бореальная тайга, лесостепь, южные степи и маквис, свидетельствует о древнем и эволюционно устойчивом характере ареала, а также об адаптациях к различным режимам влажности, фотопериода и температур.

Большая работа по инверсионному полиморфизму малярийных комаров подгруппы *Maculipennis* была проделана с 60-х годов прошлого столетия и опубликована в 1991 г отечественным профессором Владимиром Николаевичем Стегнием [9]. В. Н. Стегний провёл сравнительный хромосомный анализ для многих видов подгруппы *Maculipennis*. При этом за стандарт был взят вид *An. atroparvus*, исходя из предположений о том, что *An. atroparvus* является эволюционно исходным видом не только для палеарктической подгруппы, но и для всей группы *Maculipennis*. Сравнительный анализ для половой хромосомы будет рассмотрен подробно в следующей главе.

Детальный анализ левого плеча хромосомы 2 не выявил никаких структурных изменений. левое плечо второй хромосомы идентично у всех сравниваемых видов. Правое плечо второй хромосомы также мало изменчиво. Шесть видов имеют идентичную структуру 2R: *An. sacharovi*, *An. atroparvus*, *An. maculipennis*, *An. melanoon*, *An. messeae* и *An. martinius*. Единственный вид, имеющий уникальную структуру 2R – *An. beklemishevi*, который отличается от стандарта фиксированной инверсией в участках 8a-11c [9]. Для *An. messeae* была описана зависимость распространения инверсии 2R1 от широты ареала обитания, причём инвертированный вариант был более распространён на севере ареала. Это позволило авторам предположить наличие вовлечённости этой инверсии в адаптацию к более холодным температурным режимам [166]. Это предположение косвенно подтверждается современным исследованием, проведённым за 40-летний период, которое выявило снижение частоты варианта 2R1 на территории России, сопровождаемое повышением круглогодичных температур по стране [191].

Сравнение правого плеча хромосомы 3 показало, что структура 3R *An. atroparvus*, характерна также для видов *An. sacharovi* и *An. martinius*. Такие виды как *An. maculipennis* и *An. melanoon*, имеющие идентичные между собой хромосомы, отличаются от стандарта по фиксированной инверсии в участках 23с-28а. *An. messeae* имеет идентичную структуру 3R с предыдущими видами. *An. beklemishevi* отличается от стандарта гигантской фиксированной инверсией, локализованной в участках 24в-30с. Сравнение по левому плечу третьей хромосомы показало, что четыре вида имеют идентичную структуру 3L: *An. atroparvus*, *An. maculipennis*, *An. melanoon* и *An. messeae*. От стандартного типа 3L отличается *An. sacharovi*, имеющий фиксированную инверсию в участках 35с-36а, а *An. martinius* отличается от него по инверсии 36в-39в [9].

Исследования демонстрируют, что палеарктические виды отличаются друг от друга фиксированными перестройками в одной, двух или всех трёх хромосомах, и только два вида – *An. maculipennis* и *An. melanoon* – имеют цитогенетически идентичные между собой хромосомы. Идентичность хромосом так же характерна для видов *An. atroparvus* и *An. labranchiae* [9].

Особое внимание в своей работе [9] автор уделяет виду *An. messeae*, используя его как пример географической изменчивости инверсионных частот, так как этот вид имеет гигантский ареал (занимает бореальную часть Палеарктики). *An. messeae*, занимая терминальное положение в филогении палеарктической группы *Maculipennis*, обладает наибольшим инверсионным полиморфизмом и экологической пластичностью [192]. *An. messeae* имеет пять широко распространённых инверсий, существующих в гетеро- и гомозиготных состояниях. Они присутствуют во всех трёх хромосомах и, соответственно, расположены: две – в вариантах половой хромосоме XL1 и XL2, и по одной – в вариантах аутосом 2R1, 3R1, 3L1. Вид был изучен в географически отдалённых пунктах практически по всему ареалу. Для него была составлена впервые цитологическая карта хромосом Стегнием [9], а спустя тридцать лет была опубликована современная карта высокого разрешения [16].

В пределах ареала *An. messeae* нередко можно встретить популяции криптического вида *An. daciae*, также характеризующегося выраженным инверсионным полиморфизмом. В отдельных регионах России, например Западной Сибири, можно выделить отдельные области симпатрии данных видов. В настоящее время существуют три точки зрения относительно существования этих двух видов и их номенклатуры.

Первая точка зрения строится на основании хромосомного анализа, молекулярных маркеров и экологических данных. Было установлено существование двух репродуктивно изолированных видов — условно обозначенных как формы А и В. Изначально их разделение базировалось на комбинациях инверсий политеменных хромосом, которые образовывали устойчивые «ассоциативные группы» и демонстрировали положительную ассортативность скрещивания. Дальнейшие молекулярно-генетические исследования (анализ *EcoRI*-таксопринтов и *ITS2*) подтвердили отсутствие гибридных форм и выявили различия в последовательностях между формами, что, наряду с поведенческими и экологическими особенностями (в том числе разными местами зимовки), указывает на их видовую самостоятельность. Сравнение с ранее описанными таксонами позволило авторам установить, что *An. messeae* А, *An. daciae* и *An. messeae* s.s. являются синонимами одного вида — *An. messeae* Fall., в то время как *An. messeae* В и *An. lewisi* Ludlow, 1920 — другого, ранее недооценённого вида, восстановленного под валидным названием *An. lewisi*. [24, 23, 25, 193].

Вторая точка зрения основана на результатах сравнения последовательностей внутреннего транскрибируемого спейсера рибосомальной ДНК (*ITS2*). Результаты указывают на различие длин последовательностей у *An. daciae* и *An. messeae*, что свидетельствует о том, что это два различных вида [26, 27, 16, 22].

Третья точка зрения утверждает, что *An. daciae* не представляет собой отдельный вид, а является всего лишь разновидностью *An. messeae*, у которого наблюдается крайне обширный хромосомный полиморфизм [191]. На сегодняшний день научное сообщество не достигло консенсуса по данному вопросу, так как нет

в достаточном количестве набора доказательств ни для подтверждения, ни для опровержения любого из вышеперечисленных мнений.

Другим высоко полиморфным видом можно назвать *An. beklemishevi*. Этот вид имеет самый северный ареал распространения среди других видов группы. Он занимает территорию от западного побережья Балтийского моря до бассейна реки Лены с запада на восток, и от лесотундровой зоны до горных систем Алтая и Саян с севера на юг. *An. beklemishevi* характеризуют такие черты как уникальный кариотип, состав внутривидовых хромосомных инверсий, окраска и морфология яиц, приуроченность к определённым климатическим зонам, репродуктивная изоляция от *An. messeae* [194]. Сравнительный анализ хромосом показал, что *An. beklemishevi* резко отличается от собственно *An. maculipennis* целым рядом сложных фиксированных перестроек, что позволяет эту форму рассматривать как самостоятельный вид. В исследованных популяциях *An. beklemishevi* было найдено десять типов парацентрических гетерозиготных инверсий: две перекрывающиеся инверсии в X-хромосоме, три в правом плече второй хромосомы, пять в правом плече третьей хромосомы; также было найдено по одной инверсии в каждом из левых плеч второй и третьей хромосомы [9].

1.4.4 Межвидовые различия X-хромосомы в подгруппе *Maculipennis*

Благодаря своим особенностям малярийные комары имеют в некоторых тканях организма (например, в мальпигиевых сосудах, слюнных железах или питательных клетках яичников) набор политенных хромосом, что делает их чрезвычайно удобным объектом для исследований. Хромосомный набор комаров рода *Anopheles* содержит по две двуплечие аутосомы и одну сравнительно малую X-хромосому, в которой политенизация происходит только в левом плече, из-за чего в литературе можно встретить обозначение XL, а не просто X. Считается, что правое плечо полностью гетерохроматизировано, поэтому, на хромосомных препаратах оно не визуализируется, а физическое картирование не представляется возможным технически.

Специфика научных работ по видам палеарктического комплекса показывает, что сравнительный анализ политенных хромосом в подгруппе *Maculipennis* начинается на цитогенетическом уровне, который подразумевает сопоставление дискового рисунка исследуемого вида относительно вида, принятого за стандарт. Для данного комплекса за стандарт был принят европейский вид *An. atroparvus*, а главное крупномасштабное межвидовое сравнение было проведено В. Н. Стегнием в прошлом столетии [9].

Согласно этому анализу, для трёх видов *An. atroparvus*, *An. melanoon* и *An. maculipennis* характерна идентичная структура плеча XL. *An. sacharovi* имеет так же инверсионное отличие от стандарта в участках 1с-3а, а у *An. martinus* происходит инверсия этого района с небольшим сдвигом на 1–2 диска. У *An. messeae* участок 2в-3в переходит в центральную область, изменяя своё направление на противоположное по сравнению со стандартным видом. Для *An. beklemishevi* отмечалось наличие сложных перестроек инверсионного типа в области 2с-3с, отличающихся от стандарта (рисунок 9) [9].

Ввиду того, что анализ был проведён достаточно давно, в условиях отсутствия современного оснащения и методологий, некоторые из данных впоследствии оказались не точными. Недавнее исследование повторило сравнительный анализ половой хромосомы в группе *Maculipennis*, используя современные методы и полный геном для *An. atroparvus* [22, 28]. В работе сравнили хромосомы семи видов: *An. atroparvus*, *An. labbranchiae*, *An. maculipennis*, *An. messeae*, *An. sacharovi*, *An. beklemishevi* из Палеарктической фауны и *An. quadrimaculatus* из Неарктической фауны. Были разработаны генетические маркеры с интервалом в 1 млн п.н. вдоль всей X-хромосомы *An. atroparvus* и локализованы на хромосомах исследуемых видов. Маркеры условно делили хромосомы на синтенные блоки, а данные об их порядке и ориентации давали информацию о перестройках. Результаты показали, что исследуемые виды так или иначе отличались от стандарта перестановками ДНК-маркеров. Авторы работы также указали на наличие необычных транспозиций у *An. messeae*, которые могли бы под собой скрывать несколько крупных внутрихромосомных перестроек.

Современная реконструкция филогении согласуются с данными 2018 года, за исключением *An. beklemishevi*, который, как оказалось, отличался от стандарта шестью перестройками.

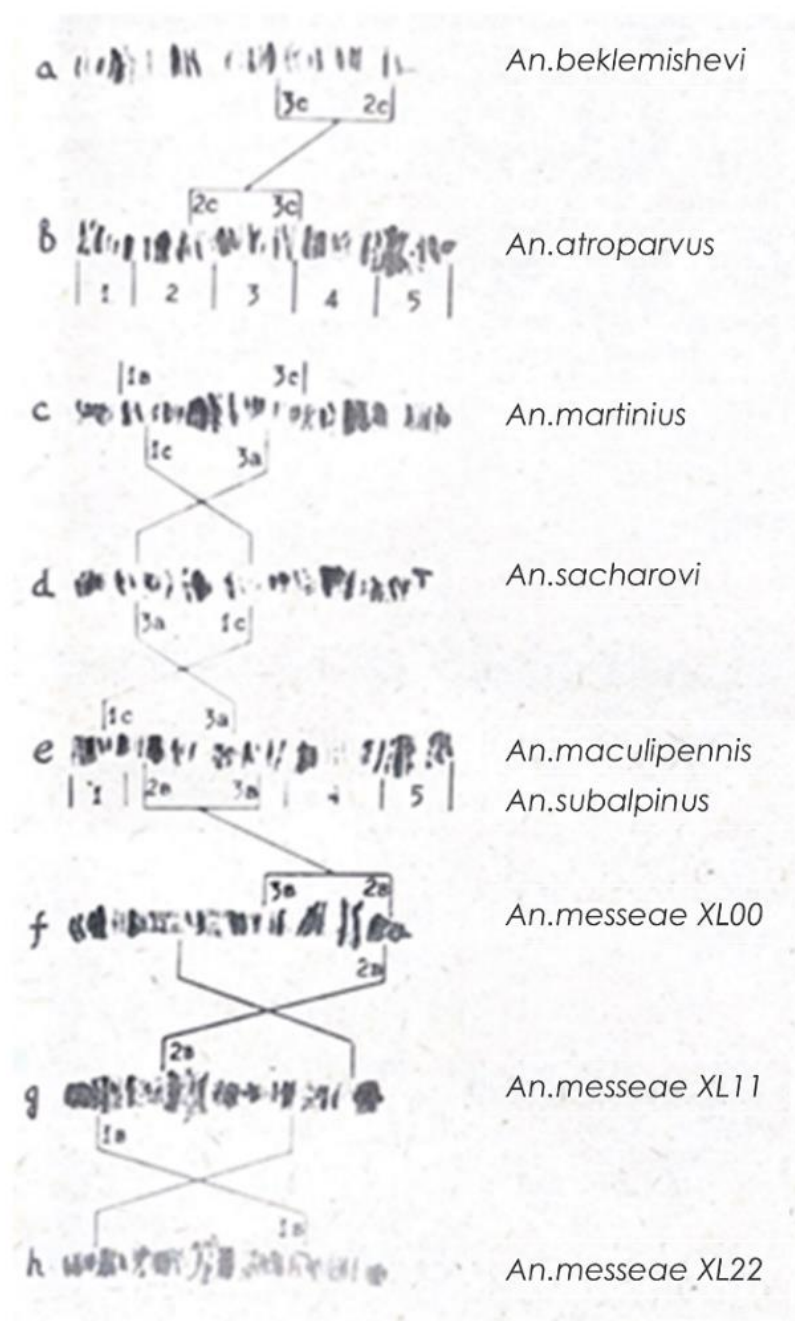


Рисунок 9 – схематическое сравнение половой хромосомы X у видов комплекса *Maculipennis*, (из Стегний В. Н., 1991 с модификациями)

На текущий момент только три вида подгруппы считаются высокополиморфными: *An. messeae* и *An. daciae* имеют хромосомный полиморфизм как по аутосомам, так и по X-хромосоме, в то время как *An. beklemishevi* полиморфен лишь по X. Для изучения *An. beklemishevi* была

разработана оригинальная цитогенетическая карта на основе окрашенных поличенных хромосом слюнных желёз [166]. Ранее сообщалось, что этот вид имеет стандартный вариант X0, а также полиморфные X1 и X2. Полиморфизмы были найдены лишь в гетерозиготных состояниях: X01 и X02, предположительно связывая это с летальным эффектом гомозиготы [9, 15]. Однако, недавние исследования, опираясь на современную цитогенетическую карту высокого разрешения свидетельствуют о широком распространении жизнеспособных гомозиготных особей с полиморфными инверсиями X1 и X2 в природных популяциях, по меньшей мере, на территории Западной Сибири [Artemov et al., 2018a; Соболева и др., неопубл].

Для *An. messeae* в ранних исследованиях сообщалось, что X-хромосома была найдена в двух вариантах X1 (стандарт) и X0 (полиморфизм). Сейчас установлено, что *An. messeae* имеет два варианта половой хромосомы – стандартный X1 и менее распространённый полиморфный вариант X2. Для этих вариантов также опубликована цитогенетическая карта высокого разрешения [16]. Кроме того, известны упоминания вариантов X4 [166, 195] и неопубликованные единичные находки исследователей с вариантами X7 и др. Полиморфный вариант X0, ранее относящийся к *An. messeae*, является на самом деле распространённым в степной зоне вариантом для *An. daciae*, в то время как X1 более распространён в таёжной зоне. Для варианта полиморфного варианта X0 так же имеется современная цитогенетическая карта [16].

1.4.5 Молекулярная организация точек разрывов у *Anopheles* и роль мобильных элементов

Изучение молекулярной природы точек разрывов хромосомных инверсий у комаров рода *Anopheles* даёт ключ к пониманию механизмов их возникновения, стабильности и возможной адаптивной значимости. Накопленные к настоящему времени данные демонстрируют значительное разнообразие структурных особенностей внутри таких точек, включая участие повторяющихся

последовательностей, мобильных элементов, а также сегментных дупликаций, что указывает на мультифакторный характер их формирования.

Точки разрывов инверсий у *Anopheles* демонстрируют широкий спектр молекулярной архитектуры. В одних случаях они представляют собой простые перестройки в уникальных последовательностях [196, 197, 198], в других — более сложные структуры, включая инвертированные дупликации и ступенчатые разрывы [199]. Эти вариации влияют на техническую возможность их обнаружения и аннотации при сборке генома. Особую трудность вызывает картирование точек разрывов и их окрестностей, содержащих многочисленные повторы или пробелы в сборке генома. Например, для *An. gambiae* с помощью нескольких геномных сборок (PEST, Pimperena и Mali-NIH) и секвенирования клонов ВАС смогли идентифицировать лишь часть точек разрывов для инверсий 2Rb и 2Rbc. Обнаруженные участки оказались насыщены повторяющимися последовательностями и содержали недостающие фрагменты [200].

Инверсия 2Rb длиной около 7,5 Мб является общей для видов-близнецов *An. gambiae* и *An. arabiensis*, что свидетельствует об их общем эволюционном происхождении. Молекулярное исследование структуры точек разрывов данной инверсии выявило, что как в производном (2Rb), так и в стандартном (2R⁺ b) расположении, внешние фланкирующие участки содержат tandemно выстроенные копии одного и того же повтора длиной около 30 п.н. (ACTTTTGCGATTGTGCGCAAAACTTCTGCGA)_n [200]. Наличие таких упорядоченных повторов у обеих границ инверсии предполагает их возможное участие в механизме перестройки.

Повторное использование точек разрывов в эволюции *Anopheles* не редкое явление. Это было показано при анализе инверсий 2Rb, 2Rc и 2Rd у *An. coluzzii* методом Hi-C [201]. Из шести точек разрывов только четыре оказались уникальными, а две — были задействованы в нескольких инверсиях. В трёх из них обнаружены массивы одного и того же сателлитного повтора, имеющего характерную последовательность размером так же около 30 п.н. (TTTTGCGATTGTGCGCAAAACTTYTGCGAC)_n, что предполагает участие

данного мотива в образовании инверсий [200]. Вероятно, такие повторы действительно способствуют структурной нестабильности генома в этих участках. Даже в тех инверсиях, где данный сателлит отсутствует, например в 2La и 2Rj, в точках разрывов выявлены другие некодирующие повторяющиеся последовательности, что подтверждает более общий паттерн участия повторов в этих перестройках [199, 202].

Примером связи сегментных дупликаций с перестройками является инверсия 2Rj у *An. gambiae*, ассоциированная с хромосомной формой *Bamako*. Обе точки разрывов фланкированы идентичными вставками размером 14,6 Кб. Описываемые вставки содержали терминальные инвертированные повторы (TIRs) по 5,3 Кб, разделённые спейсером в 4 Кб, и остатки мобильных элементов, лишённые своей кодирующей функции и подвижности. Хотя они и содержали остаточные фрагменты мобильных элементов I и II классов, включая ретротранспозоны и ДНК-транспозоны, данные структуры не обладали кодирующим потенциалом и мобильностью. Кроме того, подобных последовательностей не было обнаружено в других участках генома *An. gambiae*, что указывает на их уникальность и отсутствие типичных признаков транспозонов. Эти вставки были охарактеризованы как низкокопийные повторы (low copy repeats, LCRs), участвующие в образовании инверсии через неаллельную гомологичную рекомбинацию (Non-allelic homologous recombination, NAHR) [202]. В одной из полевых популяций *An. gambiae* была зафиксирована неточная эксцизионная репарация случайной вставки LCR, что позволило авторам исследования говорить о продолжающейся структурной нестабильности этого участка генома.

Скопления транспозонов и других мобильных элементов также хорошо задокументированы вблизи точек разрывов у видов *Anopheles*. Наиболее распространённый пример — идентификация ретроэлемента *Odysseus* в точке разрыва инверсии 2Rd у *An. arabiensis* [203, 204]. Кроме того, транспозоны семейств *Mariner*, T1, Q, а также MITE-элемент *Pegasus* демонстрируют предрасположенность к локализации в прицентромерных участках и хромоцентре, где нередко наблюдаются инверсии [205, 206]. Накопление транспозонов может не

только инициировать двойные разрывы ДНК, но и способствовать подавлению рекомбинации, поддерживая гетерозиготность по инверсии и тем самым фиксируя её в популяции.

Попарное сравнение гомологичных инверсий между *An. gambiae* и *An. merus* показало существенные различия в размере и структуре точек разрывов инверсий. В частности, две точки разрывов для инверсии $2R^{+o}$ у *An. gambiae* были в 2,6 и 5,9 раза крупнее, чем соответствующие участки точек $2Ro$ у *An. merus*, что связано с накоплением мобильных элементов в геноме у первого [17].

В совокупности описанные находки в литературе складываются в устойчивое предположение исследователей о роли мобильных элементов в хромосомных перестройках. Авторы сходятся во мнении, что мобильные генетические элементы играют не только пассивную, но и активную роль в формировании инверсий, выступая потенциальными триггерами двойных разрывов цепочек ДНК, а также способствуя дальнейшей фиксации инверсий в популяциях путём подавления рекомбинации в гетерозиготах.

2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Материал исследования

Материалом для исследования послужили личинки (4-го возраста) малярийных комаров рода *Anopheles*, собранные в природных популяциях на территории Томской области в период с 2018 по 2021 в следующих населённых пунктах: с. Майково (57°35'38" с. ш., 83°40'27" в. д., дата сбора 19.08.2021), с. Коларово (56°19'36.7" с. ш., 84°56'43.2" в. д., дата сбора 03.07.2018), с. Тегульдет (57°18'50,6" с. ш., 88°11'40,3" в. д., дата сбора 29.05.2020). Личинки были зафиксированы в фиксаторе Карнуа (96 % этанол: ледяная уксусная кислота, в пропорциях 3:1) и хранились при температуре минус 20 °С. В общей сложности, для проведения этапа картирования было использовано 118 личинок, заранее отсортированных по видам с помощью ПЦР-ПДРФ анализа.

2.2 Молекулярные и цитогенетические методы исследования

2.2.1 Приготовление суховоздушных препаратов

Для приготовления суховоздушных препаратов политенных хромосом слюнных желёз личинок использовались предметные и покровные стекла Thermo Scientific (Thermo Fisher, США). Для начала выделяли одну из двух слюнных желёз в капле фиксатора Карнуа, а затем переносили её в большую каплю 45 % уксусной кислоты, не допуская пересыхания материала. Затем железу накрывали покровным стеклом (не раздавливая) и оставляли на 5–10 минут. После этого мацерировали материал кончиком препаровальной иглы; накрывали препарат фильтровальной бумагой и стучали по покровному стеклу тупым концом препаровальной иглы с умеренной силой, а затем оказывали давление на это стекло с помощью большого пальца в течение 5 секунд. Впоследствии препараты помещались в тару с жидким азотом до полного исчезновения «кипения». С замороженного препарата с помощью бритвенного лезвия удаляли покровное стекло резким движением. Дегидратацию проводили в серии этанола повышающейся концентрации (50 %, 70 %, 80 %, 90 %, 100 %).

70 %, 96 %). После всего препараты высушивали на воздухе при комнатной температуре. Перед непосредственным использованием полученные препараты хранились при комнатной температуре не менее семи дней.

2.2.2 Видовая идентификация малярийных комаров

Видовая идентификация проводилась путём анализа длин амплифицированных фрагментов ITS2 с помощью классической ПЦР. Для амплификации региона ITS2 были использованы праймеры с модификацией, представленные в таблице 1, на основе литературных данных [207].

Таблица 1 – Нуклеотидная последовательность праймеров для участка ITS2

Последовательность нуклеотидов 5'-3'	Вид	Длина ПЦР продукта ITS2	Длина продукта после рестрикции
Прямой праймер: TGTGAAC TGCAGGACACAT Обратный праймер: TATGCTTAAATTCAGGGGGT	<i>An. messeae</i>	432 п.н.	235 п.н.
	<i>An. daciae</i>		307 п.н.
	<i>An. beklemishevi</i>	782 п.н.	—

Разделения видов *An. messeae*, *An. daciae* и *An. beklemishevi* проводилось в два этапа: сначала нарабатывался продукт участка ITS2, который позволял отделить *An. messeae* и *An. daciae* (с длиной фрагмента 432 п.н.) от *An. beklemishevi* (с длиной фрагмента 782 п.н.), а затем проводилась рестрикция малого фрагмента с помощью рестриктазы RSAI, чтобы отделить *An. messeae* от *An. daciae*. Длина фрагментов рестрикции составляет для *An. messeae* 235 п.н., а для *An. daciae* 307 п.н. Условия ПЦР реакции были взяты из предыдущих работ [16, 208]: предварительная денатурация: 95 °C, 6 мин; денатурация: 94 °C, 30 сек; отжиг праймеров 57 °C, 1 мин; элонгация 72 °C, 1 мин; финальная элонгация 72 °C, 5 мин. Амплификация составляла 30 циклов. Рестрикция проводилась 2 часа при температуре 37 °C.

2.2.3 Электрофорез в агарозном геле

Для того чтобы провести анализ видовой идентификации по длинам амплифицированных фрагментов ITS2, рестрикционных фрагментов, а также провести оценку амплифицированных участков генов для будущих ДНК-проб, проводили электрофорез в 1,5 % агарозном геле. Для приготовления геля брали агарозу и буферный раствор 1× TAE (20 мкМ уксусная кислота, 1 мкМ ЭДТА, 40 мкМ Tris), и 1 мкл SYBR Green I 10000× (Lumiprobe, Россия) для детекции ДНК. Приготовленный гель помещали в камеру для электрофореза, заполненную буферным раствором для электрофореза. Анализируемые образцы загружали в лунки с помощью загрузочного буфера 6× (Биолабмикс, Россия). Определение размеров ПЦР-продукта проводили путём сравнения с длиной набора фрагментов ДНК известной длины – 1 Кб ДНК-маркера (Евроген, Россия). Электрофорез проводили в течение 35 мин, при напряжении 90 Вт. Электрофореграмму получали с помощью трансиллюминатора с системой гель-документирования DocPrint Vilber Lourmat. Видовые различия по длинам ITS2 представлены на рисунке 10.

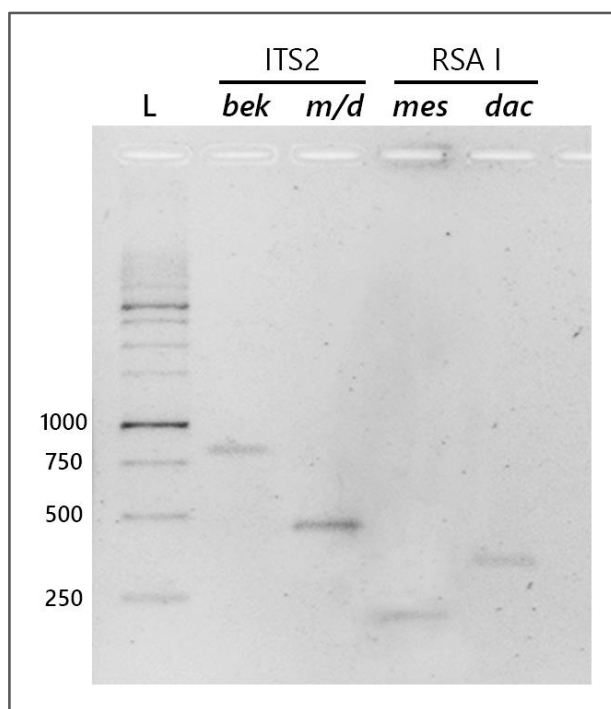


Рисунок 10 – Электрофореграмма результатов ПЦР-ПДРФ анализа фрагментов ITS2 *An. messeae* (mes), *An. daciae* (dac) и *An. beklemishevi* (bek). Примечание: L – маркер длин ДНК (размер продукта в п.н.); m/d – неразделённый ПЦР продукт фрагмента ITS2, общий для *An. messeae* и *An. daciae*

2.2.4 Выделение тотальной ДНК

Выделение геномной ДНК производилось с применением фенол-хлороформного метода. Личинок малярийных комаров, зафиксированных в растворе Карнуа предварительно дегидратировали в 96 % этаноле для удаления остатков уксусной кислоты. Затем материал высушивали на фильтровальной бумаге и подвергали быстрой заморозке в жидком азоте. Производили измельчение с помощью пестика в 1.5 мл пробирке и незамедлительно добавляли 300 мкл лизирующего буфера (0,02 М ЭДТА; 0,1 М NaCl; 1% Triton X100; 0,5 М Гуанидин-HCl; 0,01 М Трис). К полученной смеси добавляли 1 мкл РНКазы А (10 мг/мл) и оставляли в термошейкере (Eppendorf, Германия) на 30 минут при температуре 56 °C и 700 об/мин. Далее в эту же пробирку добавляли 6 мкл Протеиназы К (20 нг/мкл), и инкубировали при температуре 37 °C от 2 до 8 часов.

После инкубации пробирку центрифугировали для осаждения не растворившегося хитина и прочих веществ в течении 15 мин при комнатной температуре. Собирали супернатант и перемещали в чистую 1.5 мл пробирку. Добавляли фенол-хлороформную (соотношение 1:1) смесь в равном объеме к супернатанту. Для лучшего разделения фракций использовали силиконовую вакуумную смазку Molycote Dow Corning (DuPont, США) примерно 2 мм³. Центрифугировали в центрифуге с охлаждением при 4 °C в течение 15 минут. Отделяли водную фракцию с растворенной ДНК и переносили в чистую пробирку. Повторяли этап с центрифугированием для достижения лучшего очищения. Очищенную ДНК вновь помещали в чистую пробирку и добавляли хлороформ-изоамиловую смесь (соотношение 24:1) в равном объеме к оставшейся после очистки фракции с ДНК, без использования смазки. Финальное центрифугирование проводилось при таких же условиях. На конечном этапе переносили очищенную ДНК в чистую пробирку, добавляли 96% этанол и 3М ацетат натрия. Оставляли для переосаждения минимум на 24 часа при температуре минус 20 °C. Определение концентрации и чистоты выделенной ДНК проводили на спектрофотометре ND-1000 Spectrophotometer V3.5 (NanoDrop, США).

2.2.5 Приготовление флуоресцентных ДНК зондов

Мечение проводилось методом Клёнова с использованием праймеров со случайной последовательностью (Random Primer). Реакционная смесь содержала: 50 нг/мкл ДНК матрицы, 1× буфер Клёнова (Thermo Fisher Scientific, США), 44 нг/мкл Exo-Resistant Random Primer (Thermo Fisher Scientific, США), 5 нг фрагмента Клёнова (Thermo Fisher Scientific, США), 1 мкМ dATP, dCTP, dGTP; 0,3 мкМ dTTP; а также модифицированные трифосфаты 0,016 мкМ TAMRA-5-dUTP и Биотин-11-dUTP (Biosan, Россия). Буфер, случайные праймеры и ДНК смешивали в 0,2 мл ПЦР-пробирке и помещали в амплификатор для денатурации (96 °C, 5 мин). После денатурации пробирку с содержимым ставили в ледяной штатив на 5 мин. Затем, на следующем этапе смешивали нуклеотиды, фрагмент Клёнова и модифицированные трифосфаты. Реакционную смесь инкубировали при 37 °C в течение 12 часов, а затем переосаждали амплификат в 96 % спирте с использованием раствора спермальной ДНК лосося (10 мг/мкл) не менее 24 часов при температуре минус 20 °C. Для дальнейшего использования продукта очищали осадок от спирта, а затем растворяли в 60 мкл гибридизационной смеси (50 % формамид, 10 % декстран сульфат натрия, 4× SSC, 0,1 % Tween 20).

2.3 Итеративное картирование генома

2.3.1 Подбор праймеров

В данной работе представлен метод итеративного картирования, который состоит из выбора маркеров, физического картирования ортологичных генов и идентификации областей точек разрывов [209] (рисунок 11). Основой для итеративного картирования стали 17 маркеров, локализованных на расстоянии 1 Мб друг от друга на X-хромосоме *An. atroparvus*, которые подробно описывались в ранее опубликованной статье [22]. Часть из этих маркеров показала перемещение, тем самым обозначив кандидатные регионы для поиска точек разрывов. Затем были разработаны собственные ДНК-маркеры (приложение А). Далее, если один или несколько маркеров из этого картирования изменили локализацию по сравнению с

An. atroparvus, выбирались следующие 3–4 генных маркера, расположенных рядом с интактными и транслоцированными (в пределах инверсии) маркерами. Выбранные маркеры картировали на хромосомах *An. messeae*. Затем процедуру отбора и картирования маркеров повторяли до тех пор, пока в геноме не осталось генов, находящихся на расстоянии между интактными и транслоцированными маркерами.

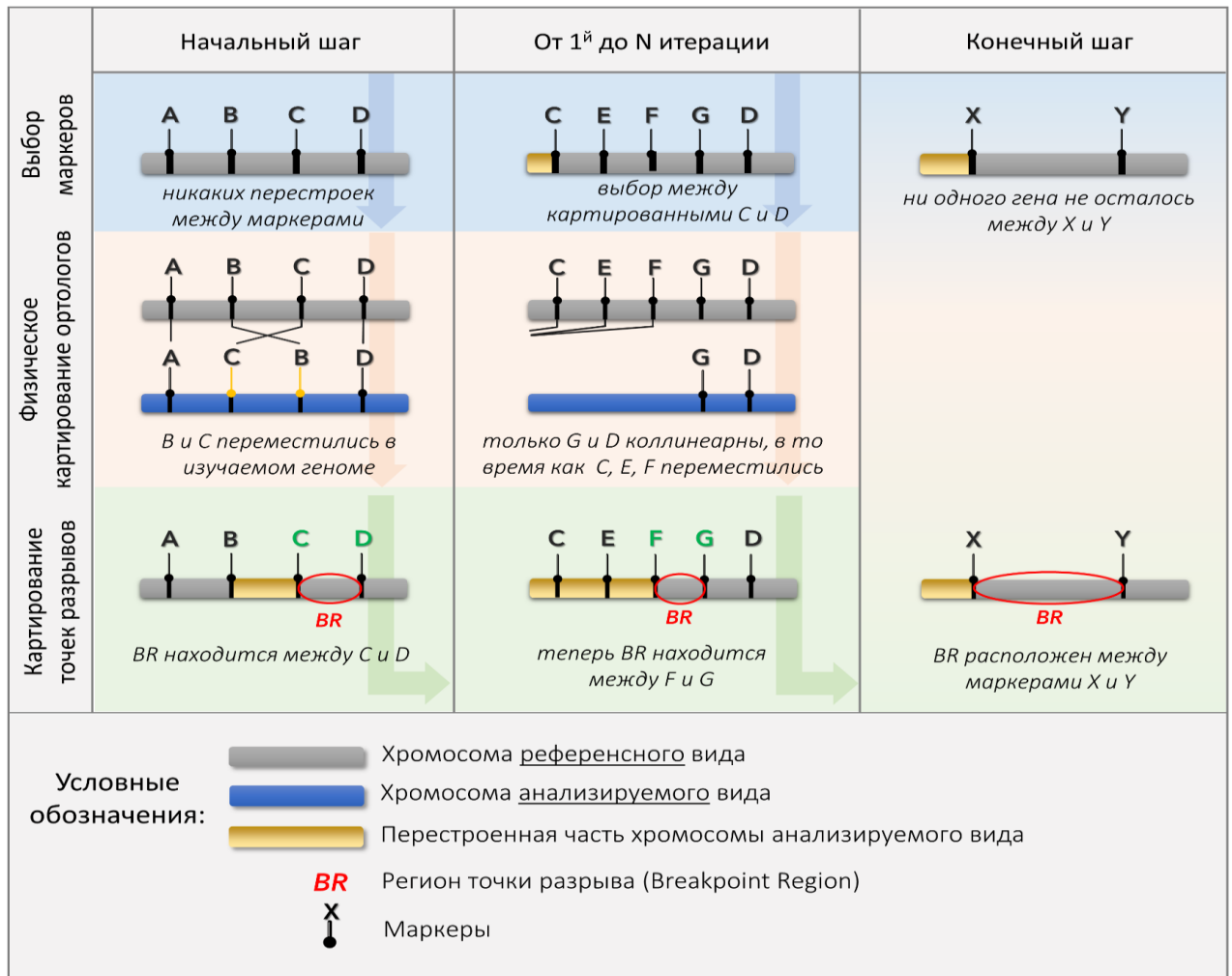


Рисунок 11 – Пошаговая схема итеративного картирования [209], (с модификациями)

Нуклеотидные последовательности генов *An. atroparvus* были взяты из сборки генома AatrE3 для разработки специфических праймеров для картирования точек разрывов инверсий. Разработка праймеров для количественной ПЦР в режиме реального времени была произведена с использованием нуклеотидных последовательностей *An. maculipennis* (NCBI BioProject: PRJNA861430) и *An. messeae* (неопубл.). Праймеры моделировали с помощью онлайн-программы Primer-BLAST (Ye et al. 2012). Ожидаемые продукты ПЦР длиной 0,5-1 тыс.п.н.

проверяли с помощью инструмента BLAST в составе VectorBase [210] на предмет неспецифичных участков генома, чтобы гарантировать отсутствие сходства с нецелевыми последовательностями. Подробный список использованных праймеров представлен в приложении А.

2.3.2 Полимеразная цепная реакция

ПЦР проводили с геномной ДНК *An. atroparvus* в качестве матрицы. Для проведения реакции амплификации сначала готовили смесь общим объемом в 25 мкл, состоящую из: БиоМастер HS-Taq PCR 2× (Биолабмикс, Россия), матричной ДНК (50 нг/мкл) и пары праймеров (по 0,1 мкМ каждый). Амплификация проводилась с учётом особенностей температур плавления каждого из праймеров, в полипропиленовых пробирках, объёмом 0,2 мл, на амплификаторе MJ mini (BIO-RAD, Франция). Условия ПЦР реакции были подобраны эмпирическим путём: предварительная денатурация: 95 °С, 5 мин; денатурация: 94 °С, 30 сек; отжиг праймеров длился 30 сек, а температура была для каждой пары индивидуальная от 50 до 56 °С; элонгация 72 °С, 1 мин; финальная элонгация 72 °С, 10 мин. Амплификация составляла 30 циклов.

2.3.3 Флуоресцентная *in situ* гибридизация

На первом этапе суховоздушные давленные препараты хромосом слюнных желёз личинок помещали в раствор 1× PBS (0,137 М NaCl; 2,7 мкМ KCl; 10 мкМ Na₂HPO₄; 1,8 мкМ KH₂PO₄) при КТ в течение 20 минут. Затем перемещали стекло в раствор формальдегида (4% в 1× PBS) на 1 минуту при КТ. Далее проводили препарат через серию этиловых спиртов возрастающей концентрации (50 %, 70 %, 80 %, 96 %) по 5 минут каждый при КТ. Следующим шагом стало погружение стекла в заранее разогретый на водяной бане раствор 70 % формамида в 2× SSC (0,3 М NaCl; 0,03 М цитрат натрия) на 3 минуты при температуре 72 °С. Затем стекло незамедлительно перемещали в ледяной этиловый спирт 70 % концентрации, с

последующей дегидратацией в 80 % и 90 % этаноле при КТ в течение 5 минут каждый. Конечным этапом было высушивание стекла на фильтровальной бумаге.

На высушенные препараты наносили меченые ДНК-пробы, предварительно растворенные в гибридизационной смеси и денатурированные при 96° С, из расчёта 10 мкл на каждый препарат. Предметные стекла накрывали покровными стёклами и герметично заклеивали клеем Moment (Henkel, Германия), во избежание испарения смеси. Препараты помещались в гибридизационную камеру ThermoBrite (StatSpin, США) с режимом работы: денатурация 5 мин при 72 °С и гибридизация 18 ч при 37 °С.

На втором этапе происходит серия отмывок от не связавшейся ДНК-пробы и лишней гибридизационной смеси. Первые отмывки происходили после удаления клея и покровного стекла в растворе 0,2×SSC при 39 °С на водяной бане, и чистом растворе 0,2×SSC при КТ, по 20 мин каждая. Затем в случае, если ДНК-зонд был мечен прямым красителем TAMRA, то на препарат добавляли каплю среды для иммунофлуоресценции DAPI (Abcam, США) и накрывали покровным стеклом, подготавливая тем самым к микроскопическому анализу. Если ДНК-зонд был мечен с использованием Биотина, требующего процесса дополнительной детекции, то после отмывки в растворе SSC шли дополнительные детектирующие отмывки. Первая отмывка в блокирующем буфере (1% BSA, растворенный в промывочном буфере) при температуре 37 °С в течение 15 мин. Следующая отмывка с использованием очищенного куриного белка авидина, конъюгированного с флуоресцеином – Avidin-FITC (Sigma Aldrich, США), для детекции биотина производилась при температуре 37 °С в течение 60 минут. От излишка флуоресцеина препарат отмывали в промывочном буфере трёхкратно при комнатной температуре, по 5 минут каждый в тёмном месте, во избежание попадания света на флуорохром. После отмывки препарат частично высушивали и подготавливали к микроскопическому анализу с помощью заливочной среды с DAPI и покровного стекла.

2.3.4 Микроскопический анализ

Препараты анализировали на флуоресцентном микроскопе AxioImager Z1 (Zeiss, Германия). Фиксацию и обработку изображений осуществляли с помощью AxioVision 4.7.1 (Zeiss, Германия) и Adobe Photoshop. Физическое картирование маркеров *An. atroparvus* на политенных хромосомах *An. messeae* проводили с использованием цитогенетической карты высокого разрешения *An. messeae* [16].

Во время микроскопического анализа было важно детектировать сигнал и определить его локализацию не только относительно теломерного или центромерного конца, но и относительно друг друга (с использованием двухцветного FISH). Если исследуемый ген на хромосомах *An. messeae* менял свою локализацию противоположно той, что наблюдалась у референсного *An. atroparvus*, тогда этот ген отмечался как часть синтенного блока (СБ), входящего в инверсионную перестройку. В данной работе понятие синтенный блок определяется как область, содержащая не менее двух генов в том же порядке независимо от их ориентации или коллинеарности.

2.4 Биоинформатические методы

2.4.1 Вычислительный анализ геномных перестроек

Для анализа минимального числа событий, необходимых для преобразования одной геномной последовательности в другую, был разработан интерактивный веб-интерфейс GIC – Genome Inversion Calculator, реализованный на платформе Visual Studio Code (версия 1.95.2) с использованием Python и Flask (версия 3.0.1). Основой инструмента является алгоритм сортировки инверсий, аналогичный подходу, применяемому в недоступной в настоящее время программе GRIMM - Genome Rearrangements In Man and Mouse [29]. Алгоритм последовательно применяет операции инверсии к выбранным сегментам последовательности, приводя их в соответствие с целевой последовательностью с минимальным числом шагов. На каждом этапе осуществляется выбор индекса, где начинается инверсия, чтобы достичь соответствия с целевым состоянием. Последовательности представляют

собой синтенные блоки (интервалы геномных регионов), обозначенные целыми числами, где инверсия блока обозначается отрицательным целым значением. В свою очередь, алгоритм возвращает набор последовательностей, показывающих промежуточные шаги перестроек, и вычисляет их минимальное количество. В отличие от GRIMM, который имел более широкий функционал, пользователю в GIC будет доступно лишь числовое значение с указанием минимального числа перестроек.

Интерфейс позволяет пользователю вводить исходную и целевую последовательности синтенных блоков. Также предусмотрена возможность добавления дополнительных промежуточных последовательностей для пошагового анализа. Интерфейс предоставляет кнопки для отправки данных и отображения результатов, включая последовательные преобразования последовательностей и конечное количество инверсий.

Инструмент прошёл государственную регистрацию как результат интеллектуальной деятельности и зарегистрирован под номером №2021688591 в Федеральной службе по интеллектуальной собственности.

Полная инструкция по работе с инструментом содержится в файле README.md, опубликованном в репозитории на GitHub <https://github.com/janesable/gic.git>.

2.4.2 Аннотация мобильных генетических элементов и простых tandemных повторов

Используя конвейер программ (пайплайн) Extensive de novo TE Annotator (EDTA) [211] была разработана пользовательская библиотека МГЭ. Кроме того, был запущен RepeatModeler (<http://www.repeatmasker.org/RepeatModeler/>) для расширения библиотеки дополнительными мобильными элементами. Эта библиотека была использована для аннотации МГЭ и простых tandemных повторов в сборке *An. atroparvus* AatrE3 с использованием программы RepeatMasker (версия 4.1.2) [212]. Инструмент rnsk2bed из пакета BEDOPS (версия 2.4.41) был использован для преобразования файлов формата .out, полученных с помощью

RepeatMasker, в удобные файлы формата .bed [211]. Полученные файлы.bed содержали информацию о начале и конце каждого повторяющегося ДНК-элемента и информацию о его типе. Для дальнейшего анализа все типы повторяющейся ДНК были разделены в соответствии с аннотацией RepeatMasker на четыре группы в соответствии с таблицей 3.

Таблица 3 – Группы МГЭ, созданные на основе сводного файла от EDTA

Семейства МГЭ	Названия МГЭ
МГЭ класс I: Ретротранспозоны	LTRs: Gypsy, Copia, Unknown; LINEs
МГЭ класс II: ДНК транспозоны	TIRs: CACTA, Mutator, PIF_Harbinger, Tc1_Mariner, hAT; helitron
Неизвестные транспозоны	Repeat_region
Простые повторы	Low_complexity, Simple_repeat

Для каждого региона точек разрывов было выполнено количественное определение повторяющихся ДНК-элементов, принадлежащих к различным группам. Полученные результаты были систематизированы и визуализированы отдельно по категориям повторяющихся элементов. Для визуализации использовались геномные области длиной 50 Кб, прилегающие непосредственно к каждому BR в геноме *An. atroparvus*, включая саму точку разрывов. Количество повторяющихся элементов каждой группы представлено в виде столбчатых диаграмм, в которых ширина столбцов пропорциональна размеру соответствующего BR. Данные по количеству генов в каждом из анализируемых регионов были извлечены из файла аннотации генома AatrE3 (.gff3-файл), доступного в базе данных VectorBase [213], и визуализированы аналогичным образом, что и повторяющиеся ДНК-элементы.

2.4.3 Статистический анализ

Для оценки статистической значимости различий в плотности повторяющихся элементов и генов между районами точек разрывов и другими участками X-хромосомы был проведён соответствующий статистический анализ.

Для интерпретации полученных данных было выбрано распределение Пуассона, поскольку плотность повторяющихся элементов или генов представляет собой дискретную величину. Длина каждого из исследуемых BR была измерена (от 7 Кб до 12 Кб) и использована в качестве интервала для вычисления среднего значения λ (средней плотности повторяющихся ДНК-элементов).

На основе вычисленного среднего значения λ и наблюдаемой плотности χ (плотности повторяющихся элементов ДНК в каждом отдельном BR) были рассчитаны вероятности $P(\chi)$ для каждого BR. Кроме того, кодирующие области были исключены из анализа с использованием координат, полученных из аннотации генома AatrE3 (.gff3-файл). После этого плотность повторяющихся элементов была пересчитана с использованием λ в качестве средней плотности элементов в не кодирующих областях, а χ – в качестве плотности элементов в каждом отдельном BR без кодирующих участков. Вычисленные значения $P(\chi)$ использовались для оценки статистической значимости различий в плотности повторяющихся элементов ДНК между BR и не кодирующими областями X-хромосомы.

Дополнительно была выполнена оценка плотности генов в каждом синтенном блоке с использованием размера бина, равного 100 Кб, который является оптимальным для расчёта плотности генов с соответствующим разрешением. Для оценки вариабельности плотности генов между разными СБ использовался однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA). Для статистического анализа использовался пакет `scipy` (версия 1.10) языка программирования Python.

2.4.4 Анализ генной онтологии (GO)

Для анализа генной онтологии использовались встроенные инструменты базы данных Gene Ontology (<https://geneontology.org>), интегрированные в биоинформатическую платформу VectorBase (<https://vectorbase.org>). Анализ был проведён с использованием референсного генома *An. atroparvus*. Для выделения генов, расположенных внутри инвертированных синтенных блоков, применялся

инструмент «стратегии», где были заданы координаты начала и конца исследуемых СБ. Полученные списки генов были подвергнуты дальнейшему анализу с использованием инструмента «Gene Ontology Enrichment», позволяющего провести обогащение по одному из трёх словарей (онтологий): молекулярная функция, клеточный компонент или биологический процесс.

Для контроля ложноположительных результатов был установлен порог статистической значимости ($p < 0,05$), а также выполнена коррекция на множественные сравнения по методам Бенджамини и Бонферрони. Коэффициент обогащения (Fold Enrichment, FE) рассчитывался как отношение частоты встречаемости каждого ГО-термина в исследуемом наборе генов к его частоте в фоновом наборе. Дополнительно вычислялся коэффициент шансов (odds ratio), отражающий вероятность обнаружения определённого ГО-термина в исследуемом наборе по сравнению с фоном.

Результаты анализа включали идентификаторы ГО-терминов (GO ID), их наименования, количество генов, связанных с каждым термином как в исследуемом, так и в фоновом наборах, процент обогащения, коэффициент обогащения и коэффициент шансов для каждого термина. Для более ясной интерпретации результатов использовались дополнительные инструменты визуализации платформы VectorBase, в частности графическое представление данных при помощи сервиса Revigo, что позволило выявить ключевые термины и облегчило восприятие наиболее значимых результатов анализа.

3 РЕЗУЛЬТАТЫ

3.1 Физическое картирование точек разрывов хромосомных перестроек в X-хромосоме *An. messeae*

3.1.1 Картирование точек разрывов фиксированных хромосомных перестроек

Был разработан метод итеративного картирования для локализации точек разрывов хромосомных перестроек у видов, чьи полногеномные сборки не доступны [209]. В данной работе этот метод применялся для последовательной локализации маркерных генов *An. atroparvus* на политенной X-хромосоме *An. messeae* с целью выявления и сокращения области поиска точек разрывов инверсий, так как полный геном *An. messeae* не секвенирован.

Исходной точкой стали три ДНК-пробы *An. atroparvus*, которые показали изменение своего местоположения у *An. messeae* в X-хромосоме, в отличие от других ДНК-проб. Эти маркеры соответствовали экзонам генов ААТЕ017741, ААТЕ005236, ААТЕ010434, которые потенциально могли участвовать в хромосомных перестройках.

Для дальнейшего картирования точек разрывов фиксированных хромосомных перестроек потребовалось гибридизировать тридцать четыре ДНК-маркера, соответствующих последовательностям экзонов ортологичных генов *An. atroparvus* (приложение А.1). На каждую итерацию требовалось не более 3–4 ДНК-маркеров. Такое число позволяет эффективно локализовать перестроенные участки генома, избегая избыточного использования маркеров и при этом не снижая точность анализа. На последних итерациях выбор маркеров был более аккуратным и достаточно было 1–2 маркеров. Суммарно, всеми итерациями было «пройдено по хромосоме» около 4 млн. п.н., что составляет примерно 23,5% от общей длины X-хромосомы. Впервые для видов подгруппы *Maculipennis* были получены координаты с высоким разрешением для генов, фланкирующих хромосомные перестройки (рисунок 12 а).

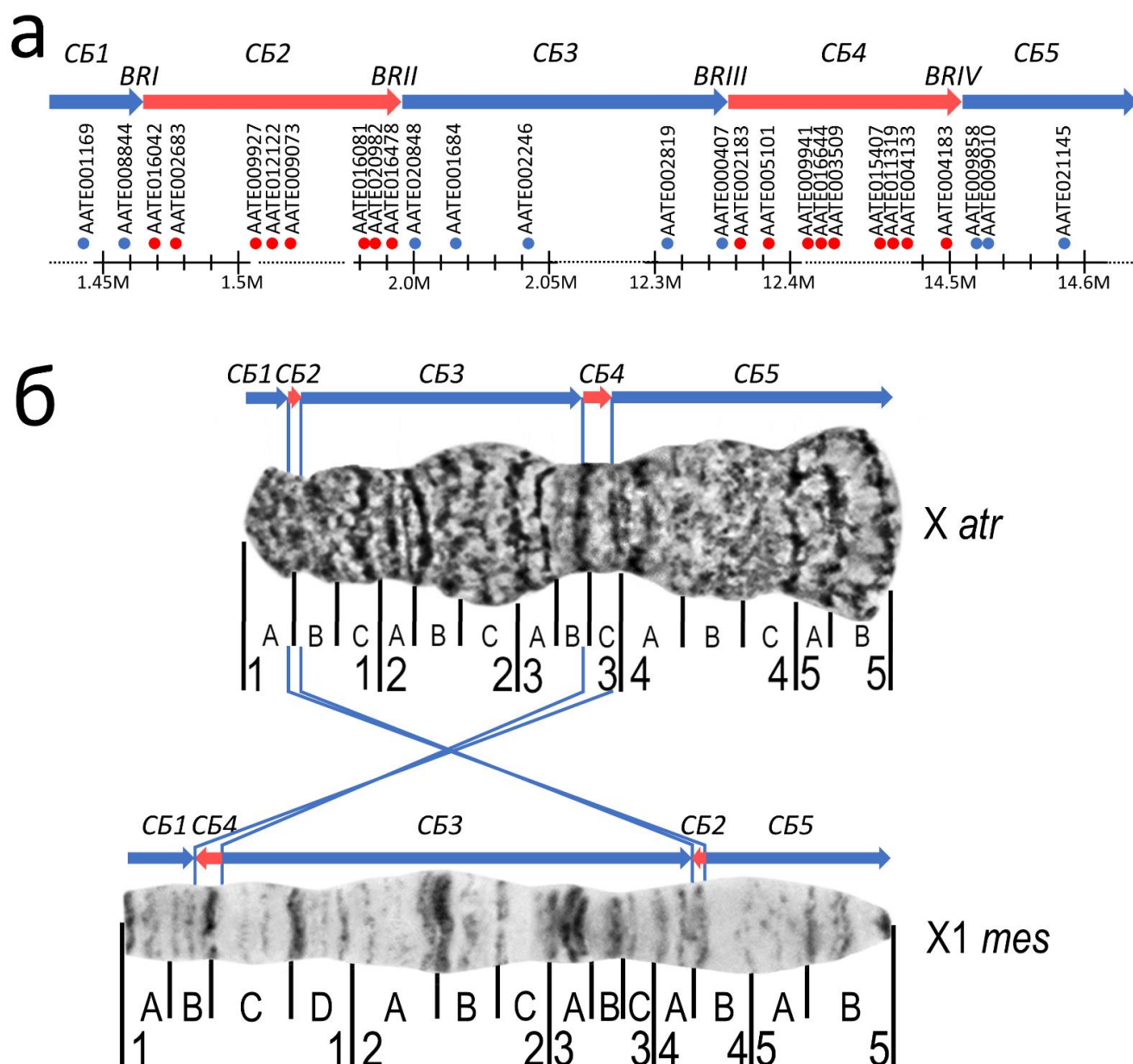


Рисунок 12 – Физическая карта генных маркеров, синтенных блоков (СБ) и окрестностей точек разрывов (BR) фиксированных инверсий на X-хромосоме между *An. atroparvus* и *An. messeae*. (а) Геномная позиция генов, СБ и BRs у *An. atroparvus*. Синие и красные точки обозначают гены, локализованные в коллинеарных и инвертированных областях, соответственно. (б) Хромосомные позиции СБ и BRs у *An. atroparvus* (X atr) и *An. messeae* (X1 mes). Синие и красные стрелки представляют коллинеарные и инвертированные области, соответственно

Длины между фланкерными генами составили от 7,4 до 12,1 тыс. п.н., при общей длине геномной сборки X-хромосомы *An. atroparvus* (AatrE3) в 17,5 млн п.н (таблица 4). Восемь генов, фланкирующих хромосомные перестройки, были локализованы в дистальном и проксимальном конце X-хромосомы, по четыре в каждом. Положение фланкеров в дистальном конце соответствует хромосомным районам 1A-1B у *An. atroparvus* и 1B-1C у *An. messeae*. Положение генов в

проксимальном конце соответствует районам 3В-3С и 4А-4В у *An. atroparvus* и *An. messeae*, соответственно (рисунок 12 б).

Таблица 4 – Координаты фланкирующих генов точек разрывов фиксированных инверсий в X-хромосоме *An. messeae* на хромосомной сборке *An. atroparvus*

BR	Дистальный ДНК маркер			Проксимальный ДНК маркер			Длина BR, п.н.
	Координаты	ID гена	Экзон*	Координаты	ID гена	Экзон*	
I	1,447,542... 1,458,895(+)	ААТЕ008844	7	1,465,925... 1,468,608(-)	ААТЕ016042	2-3	7,395
II	1,988,001... 1,992,840(-)	ААТЕ016478	1	1,999,834... 2,001,318(+)	ААТЕ020848	1-2	7,475
III	12,347,972... 12,350,706(-)	ААТЕ000407	4-5	12,360,652... 12,374,345(-)	ААТЕ002183	8	12,152
IV	14,480,893... 14,510,197(+)	ААТЕ004183	10	14,520,988... 14,521,746(+)	ААТЕ009858	1	11,543
Примечание – BR – точки разрывов; ID – идентификатор, согласно базе VectorBase; * – номер экзона, к которому была разработана ДНК-проба							

Результаты двухцветного FISH подтверждают, что пары фланкерных генов, которые находились рядом друг с другом у *An. atroparvus*, расположены на значительном расстоянии, превышающем половину хромосомы у *An. messeae*. Так, например, ААТЕ008844 из хромосомного района *An. atroparvus* 1А локализуется вблизи гена ААТЕ004183 из района 3С на X-хромосоме *An. messeae*, что указывает на то, что эти гены были перемещены в результате хромосомной перестройки. Точно так же ААТЕ016042 из региона *An. atroparvus* 1А тесно локализуется с ААТЕ009858 из района 3С. Ген ААТЕ016478, находящийся в хромосомном районе *An. atroparvus* 1В локализуется вблизи гена ААТЕ000407 из района 3В, а ген ААТЕ020848 из района 1В тесно локализуется с геном ААТЕ002183 из района 3В (рисунок 13).

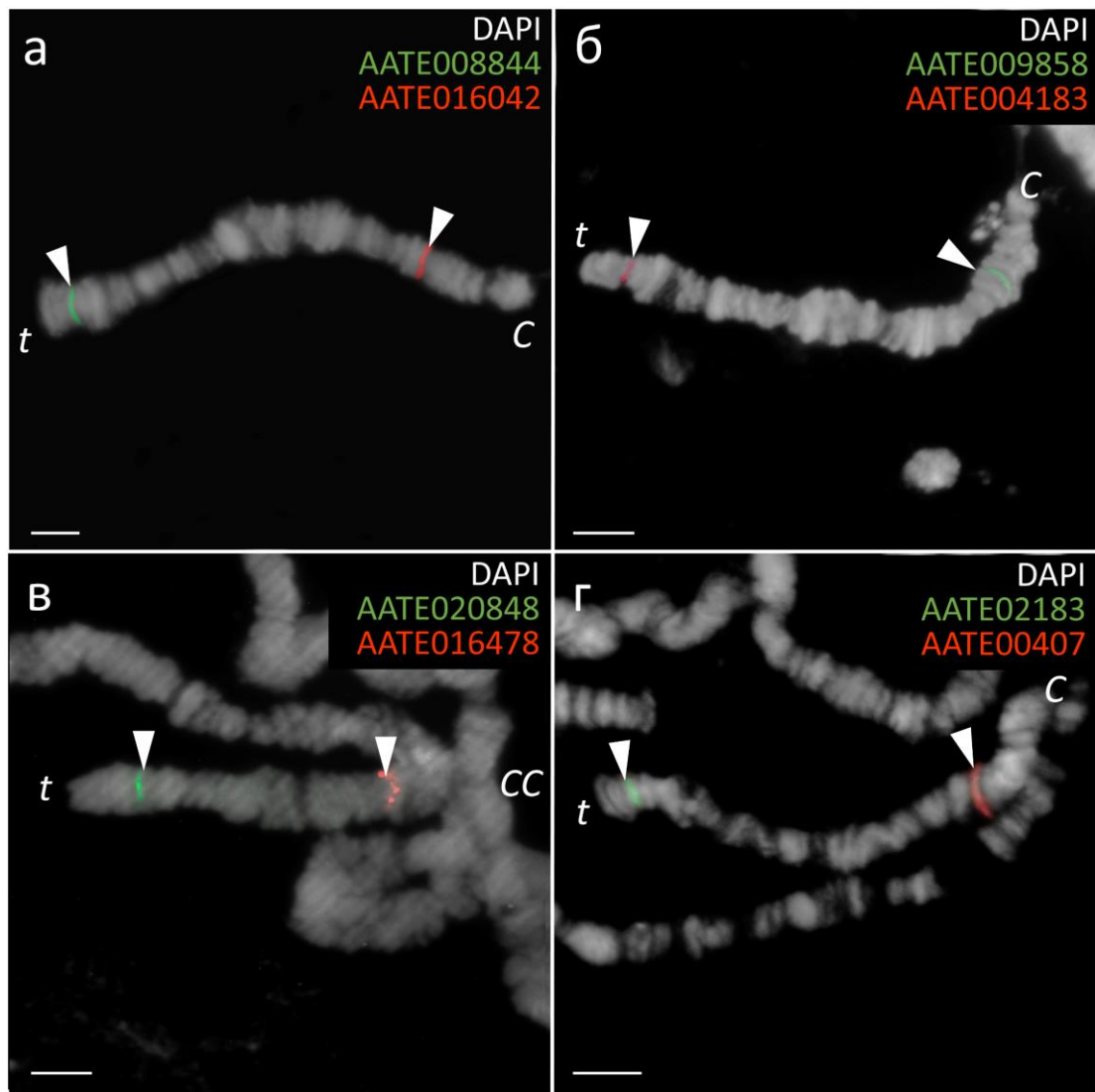


Рисунок 13 – FISH ДНК-проб, разработанных на основе генов *An. atroparvus*, фланкирующих BR фиксированных перестроек на политенных X-хромосомах *An. messeae*. (а) Маркерные гены BRI; (б) Маркерные гены BRIV; (в) Маркерные гены BRII; (г) Маркерные гены BRIII. Позиции генов на хромосомах указаны белыми стрелками. C – центромерный конец хромосомы, CC – хромоцентр, t – теломеры. Масштаб – 10 мкм.

3.1.2 Картирование полиморфных инверсий

Полиморфные инверсии в X-хромосоме у *An. messeae* широко распространены в природе. Основанием для картирования точек разрывов двух полиморфных инверсий *An. messeae* X2 и *An. daciae* X0 послужили данные картирования фиксированных перестроек внутри X-хромосомы между *An. atroparvus* и *An. messeae*, а также маркеры предыдущих исследований [22]. Это позволило дополнительно картировать 22 генетических маркера [214] (приложение А.2).

Район, содержащий дистальную точку разрыва инверсии X2 *An. messsae* был прокартирован с разрешением 26,6 тыс. п. н., тогда как район, содержащий проксимальную точку разрыва – 14,8 тыс. п. н.. Для инверсии X1 *An. daciae* проксимальная точка была картирована с разрешением 8,5 тыс. п. н., в то время как протяженность района, содержащего дистальную точку разрыва составила 171,5 тыс. п. н. (таблица 5).

Таблица 5 – Координаты фланкирующих генов точек разрывов полиморфных инверсий на хромосомной сборке *An. atroparvus*

BR	Дистальный ДНК маркер			Проксимальный ДНК маркер		
	Координаты	ID гена	Экзон*	Координаты	ID гена	Экзон*
X2 _{дист}	13,261,242... 13,265,420(+)	AATE009941	2–3	13,236,449... 13,246,292(–)	AATE005475	3
X2 _{прокс}	1,465,925... 1,468,608(–)	AATE016042	2–3	14,520,988... 14,521,746(+)	AATE009858	1
X0 _{дист}	4,398,009... 4,404,032(–)	AATE021012	4	4,571,860... 4,577,721(–)	AATE013154	3
X0 _{прокс}	17,252,047... 17,256,383(+)	AATE003340	2	17,260,494... 17,265,377(–)	AATE018776	2–4
Примечание – BR – точки разрывов; дист – дистальная точка разрывов; прокс – проксимальная точка разрывов; ID – идентификатор, согласно базе VectorBase; * – номер экзона, к которому была разработана ДНК-проба						

Регион протяженностью 171,5 тыс. п. н., содержащий дистальную точку разрыва полиморфной инверсии X1, содержит лишь 10 аннотированных генов, которые картировать на X-хромосоме *An. daciae* не удалось (рисунок 14). Ортолог гена AATE013223 локализовался в 3R плече *An. daciae*, тогда как для других ортологов (AATE009672, AATE006112), разработанные ДНК-пробы не гибридизовались на хромосомах *An. daciae*.

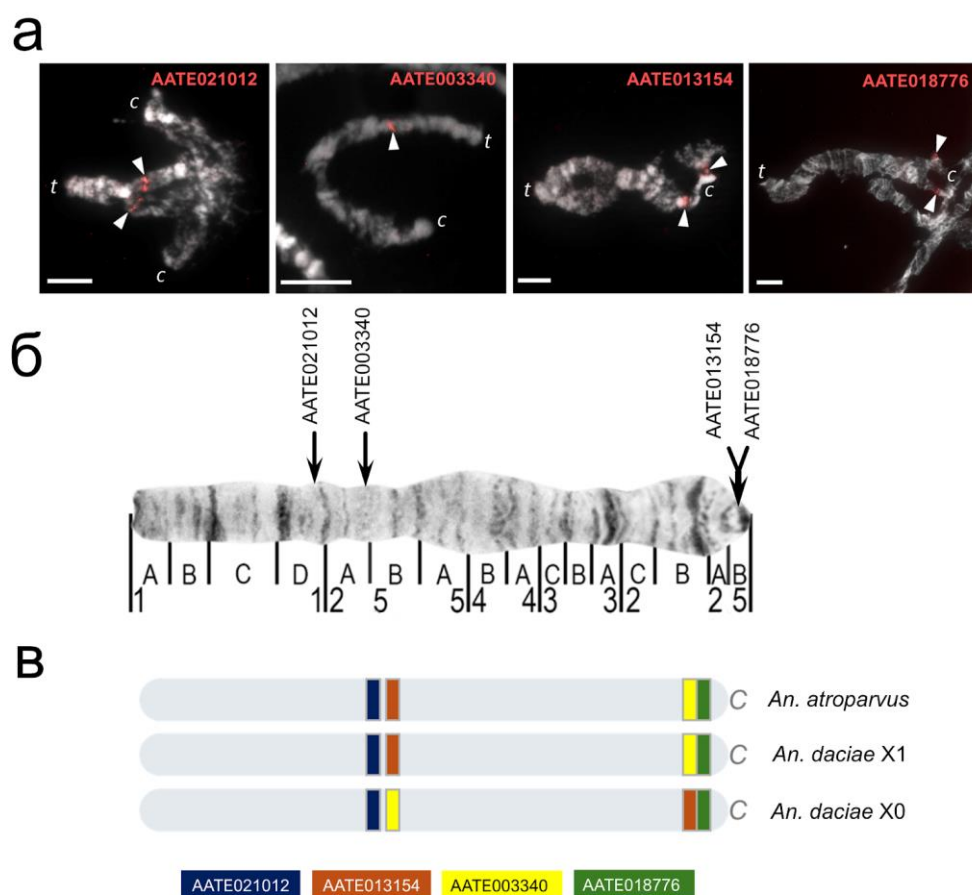


Рисунок 14 – Расположение ДНК-маркеров, фланкирующих регионы разрывов инверсии X1.
Примечание: (а) - локализация ДНК-маркеров на политенных хромосомах клеток слюнных желез особей с генотипом X00 (и X01 для ААТЕ021012); (б) - физическая карта ДНК-маркеров на хромосоме X00; (в) - схема сравнения положения ДНК-маркеров относительно референсного генома *An. atroparvus*, а также порядка генов в X1 и X0 у *An. daciae*; С- центромера; масштабная линейка - 10 мкм.

Картирование дистальной точки разрыва инверсии X2 показало, что она локализована в интервале между точками разрыва двух фиксированных инверсий, описанных ранее [209]. При этом район, содержащий проксимальную точку разрыва инверсии X2 полностью совпадает с точкой разрыва фиксированной инверсии BRIV, где в качестве маркеров использовались те же гены ААТЕ016042 и ААТЕ009858 (рисунок 2). Физическое картирование генетических маркеров на цитогенетической карте политенных хромосом клеток слюнных желез подтвердило расположение точек разрыва инверсии X2 в районах 1В-С и 4В, и проксимальной точки разрыва инверсии X1 в районе 5В [16]. Точность определения положения дистальной точки разрыва инверсии X1 оказалась ниже цитогенетической (1D-2А).

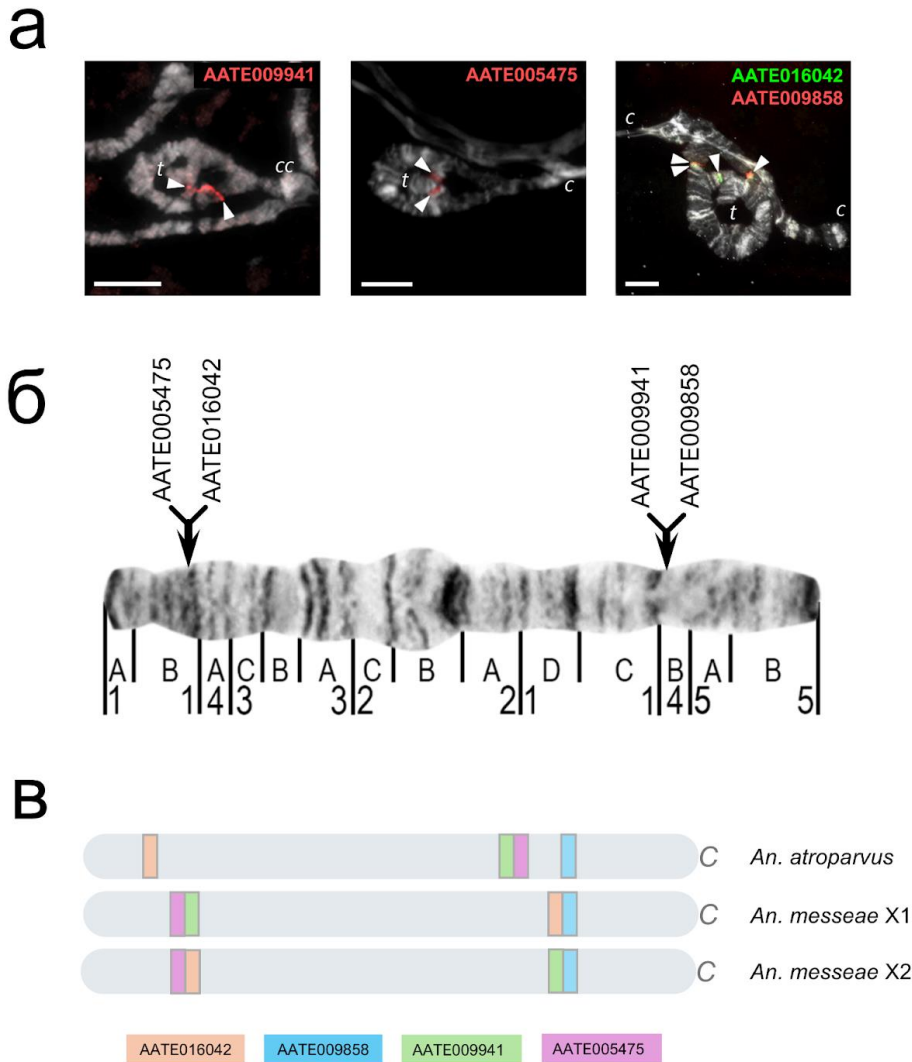


Рисунок 15 – Расположение ДНК-маркеров, фланкирующих регионы разрывов инверсии X2. Примечание: **(а)** - локализация ДНК-маркеров на политенных хромосомах клеток слюнных желез особей с генотипом X12; **(б)** - физической карта ДНК-маркеров на хромосоме X22; **(в)** - схема сравнения положения ДНК-маркеров относительно референсного генома *An. atroparvus*, а также порядка генов в X1 и X2 у *An. messeae*; C- центромера; CC-хромоцентр; масштабная линейка - 10 мкм.

Для того, чтобы подтвердить или опровергнуть гипотезу о том, что варианты *An. messeae* X1 и *An. daciae* X1 имеют сходный порядок генов, и являются исходным вариантом для полиморфных вариантов X2 и X0, было проведено дополнительное картирование фланкерных генов фиксированных инверсий на политенных хромосомах *An. daciae* X1. Результаты подтвердили гипотезу, что

варианты *An. messeae* X1 и *An. daciae* X1 имеют сходный порядок генов (приложение Б).

3.2 Описание синтенных блоков генов, образованных хромосомными перестройками в X-хромосоме, и реконструкция инверсионных событий

Четыре региона фиксированных точек разрывов, идентифицированные в X-хромосоме *An. atroparvus*, позволили разделить хромосому на пять синтенных блоков (СБ1-5) различного размера от 0,5 млн. п.н до 10,3 млн. п.н. (рисунок 12а). Учитывая данные картирования полиморфных инверсий, следует сделать поправку в количестве блоков. При нанесении полиморфных точек разрывов на хромосому *An. atroparvus* можно выделить дополнительно ещё три синтенных блока. Таким образом, с учетом и фиксированных и полиморфных инверсий предковый порядок генов можно разделить на восемь синтенных блоков (рисунок 16).

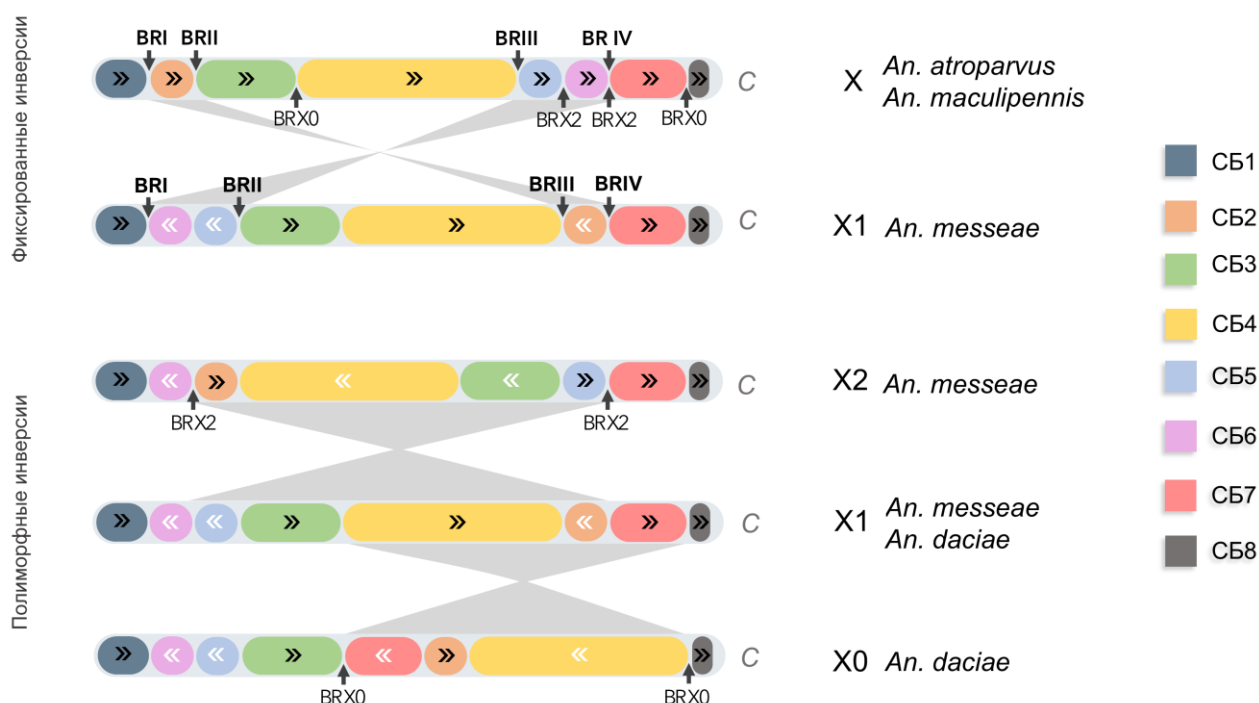


Рисунок 16 – Порядок расположения и ориентация синтенных блоков, образованных точками разрыва фиксированных и полиморфных инверсий у *An. messeae* и *An. daciae*. Примечание – С – центромерный конец хромосомы; СБ – синтенный блок; стрелками указано изменение порядка генов синтенных блоков.

При формировании новых синтенных блоков изменения претерпели «бывшие» СБ3, СБ4 и СБ5. Из СБ3 образовались новые СБ3 и СБ4, за счёт нанесения дистальной точки разрыва инверсии Х0. СБ4 распался на новые СБ5 и СБ6 за счёт участия в инверсии Х2. СБ5 был разделён проксимальной точкой разрыва инверсии Х0 на два новых СБ7 и СБ8.

У СБ1-7 не было найдено существенных различий в плотности генов (приложение В); *p*-value ANOVA составляло 0,65, а *F*-value составляло 0,61. Средняя плотность генов в Х-хромосоме составила $7,31 \pm 3,68$ на 100 тыс.п.н. при максимальном значении 20 генов на 100 тыс.п.н. (таблица 6).

Таблица 6 – Характеристики синтенных блоков

№ СБ	Длина СБ, п.н.	Кол-во генов в СБ	Сред. плотность генов в СБ
1	1 458 895	122	8,36
2	526 550	42	7,97
3	2 401 223	179	7,45
4	7 775 450	533	7,11
5	902 442	53	5,87
6	1 272 996	86	6,76
7	2 733 670	193	7,06
8	нет точных данных		
Примечание – средняя плотность указана на 100 Кб			

Самым протяжённым блоком является СБ4 и составляет 7,7 Мб, а самым коротким СБ2 длиной около 0,5 Мб. Длину СБ8 точно оценить оказалось невозможно, поскольку расположение центромерного района в геноме *An. atroparvus* не определено, однако улучшенная сборка генома AatrE4 [215] позволяет оценить СБ8 не менее чем в 8,5 млн. п. н.. СБ1, СБ3, СБ4, СБ7, СБ8 сохраняли предковый порядок генов в Х1 *An. messeae* (*An. daciae*), тогда как СБ2, СБ5 и СБ6 меняли как расположение на хромосоме, так и порядок генов. Инверсия Х2 захватывает четыре синтенных блока (СБ2, СБ3, СБ4 и СБ5), а инверсия Х1 – три (СБ2, СБ4, СБ7). Если представить длины полиморфных инверсий как сумму длин синтенных блоков из генома *An. atroparvus*, то протяженность обеих инверсий окажется приблизительно одинаковой: длина инверсии Х2 составит

приблизительно 11,7 млн.п.н (45% от всей длины X), а длина инверсии X1 составит 11,2 млн.п.н (43% от всей длины X).

СБ1, СБ3, СБ4, СБ7 и СБ8 имели одинаковую последовательность и ориентацию генов как у *An. atroparvus*, так и у *An. messeae* X1, в то время как СБ2, СБ5 и СБ6 отличались по последовательности и ориентации генов у обоих видов. Среди полиморфных инверсий *An. messeae*-*An. daciae* также наблюдались крупные перестройки: СБ4 варианта X1 имеет инвертированную последовательность генов в обоих полиморфных вариантах X2 и X0. СБ1, СБ6 и СБ8 во всех трех вариантах имели одинаковое расположение и ориентацию. Полиморфная инверсия X2 отличается от стандарта X1 инверсией участка хромосомы, включающей в себя четыре синтенных блока: СБ2, СБ4, СБ3 и СБ5. Вариант *An. daciae* X0 отличается от *An. messeae* X1 приблизительно таким же по размеру участком, но с другим содержанием синтенных блоков: СБ7, СБ2, СБ4. Во всех случаях фиксированных и полиморфных перестроек СБ1 и СБ8 не меняли своего положения и ориентации.

Для подтверждения гипотезы о перегруппировке восьми СБ в результате двух вложенных инверсий и одной полиморфной, был разработан собственный инструмент для реконструкции событий перестроек (GIC), которые могли вызвать наблюдаемые различия. Так как предполагается, что варианты хромосомы X0 и X2 произошли независимо друг от друга, то для реконструкции инверсий потребовалось два сценария: «*An. atroparvus*-*An. messeae* X1-*An. messeae* X2» и «*An. atroparvus*-*An. messeae* X1-*An. daciae* X0». Для проведения реконструкции СБ были обозначены целыми числами от 1 до 8, а инверсия блока обозначалась теми же числами, но со знаком минус. В качестве входных данных использовались следующие порядки и ориентации СБ, указанные на рисунках 17 и 18.

а

б

Genome Inversions Calculator

An. atroparvus 1 2 3 4 5 6 7 8

An. messeae X11 1 -6 -5 3 4 -2 7 8

An. messeae X22 1 -6 2 -4 -3 5 7 8

Add genome Remove genome Count

Results:

Transformation from An. atroparvus to An. messeae X11:
 Step 1: 1 -6 -5 -4 -3 -2 7 8 0
 ⇓
 Step 2: 1 -6 -5 3 4 -2 7 8 0
 Minimum inversions required: 2

Transformation from An. messeae X11 to An. messeae X22:
 Step 1: 1 -6 2 -4 -3 5 7 8
 Minimum inversions required: 1

Genome Inversions Calculator

An. atroparvus 1 2 3 4 5 6 7 8

An. messeae X11 1 -6 -5 3 4 -2 7 8

An. daciae X00 1 -6 -5 3 -7 2 -4 8

Add genome Remove genome Count

Results:

Transformation from An. atroparvus to An. messeae X11:
 Step 1: 1 -6 -5 -4 -3 -2 7 8 0
 ⇓
 Step 2: 1 -6 -5 3 4 -2 7 8 0
 Minimum inversions required: 2

Transformation from An. messeae X11 to An. daciae X00:
 Step 1: 1 -6 -5 3 -7 2 -4 8
 Minimum inversions required: 1

Рисунок 17 – Интерфейс программы GIC в действии на примере реконструкций хромосомных перестроек для полиморфных инверсий X2 (а) и X0 (б).

Результатом этих перестановок стал обмен позициями СБ2, СБ5 и СБ6, и изменение их ориентации на противоположную. Эти три СБ составили 16% эухроматической части X-хромосомы и 15% длины всей X-хромосомы *An. atroparvus*. Как минимум 181 аннотированный ген, расположенный в СБ2 и СБ5-СБ6, изменили своё положение и ориентацию между X-хромосомами *An. atroparvus* и *An. messeae*.

Реконструкция отчётливо показала, что оба сценария имеют одинаковые шаги при изменении последовательности СБ во время фиксированных инверсий. Для преобразования последовательности из *An. atroparvus* в вариант X1 потребовалось два инверсионных события, которые отличались по длине и задействовали разные BR. Большая инверсия (~13 Мб) включала СБ2, СБ3, СБ4, СБ5 и СБ6, используя BRI и BRIV *An. atroparvus*, тогда как меньшая инверсия (~10 Мб) задействовала только СБ3 и СБ4, и использовала BRII и BRIII *An. atroparvus*. Таким образом, меньшая инверсия была вложена в большую инверсию, что соотносится с полученными результатами картирования фиксированных инверсий. Теоретически, возможны два сценария событий перестроек: либо сначала произошла малая инверсия, а затем большая, либо они произошли в обратном порядке (рисунок 18).

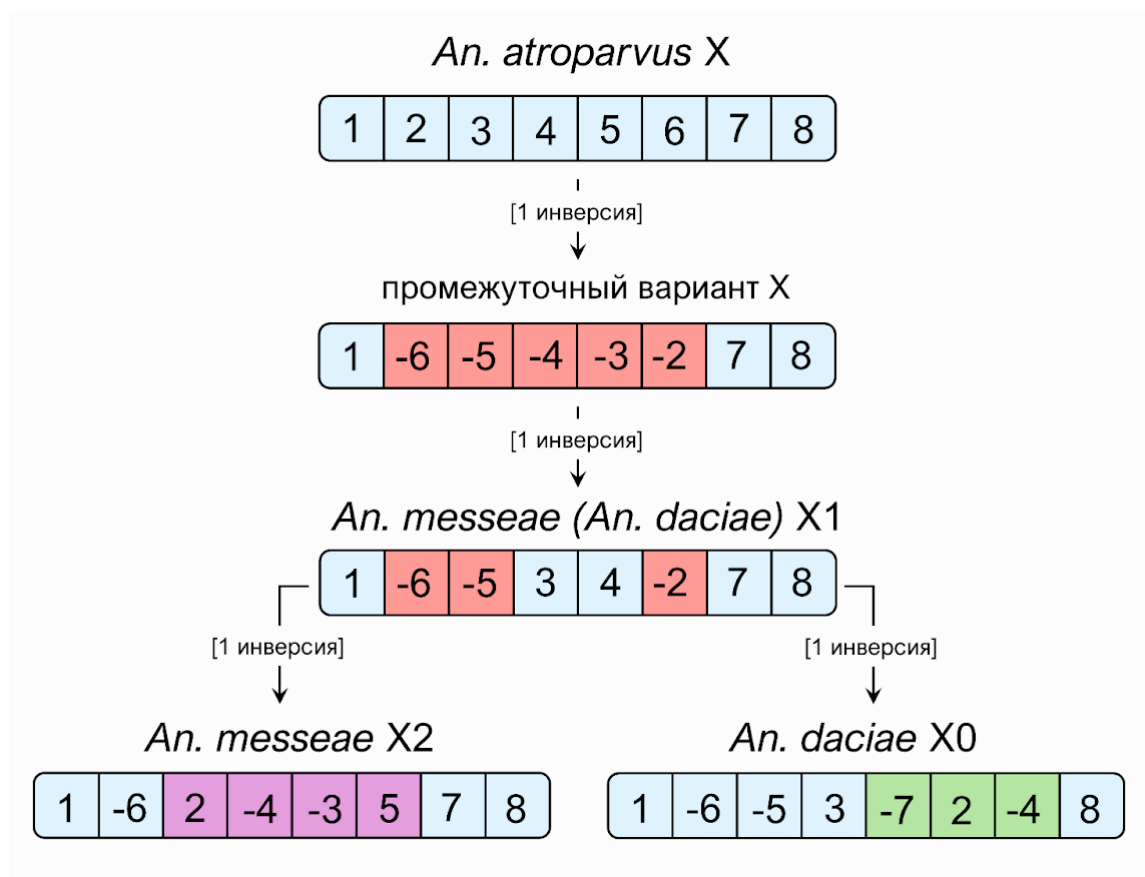


Рисунок 18 – Эволюция порядка генов в X-хромосоме *An. messeae* и *An. daciae* по результатам анализа GIC. Красным цветом обозначены синтенные блоки, затронутые фиксированными инверсиями, пурпурным и зеленым цветами – полиморфные инверсии *An. messeae* и *An. daciae* соответственно.

Оба события равновероятны, но реальный порядок событий восстановить не представляется возможным. В поддержку этой реконструкции выступают результаты физического картирования фланкерных ДНК-маркеров, задействованных в фиксированных инверсиях, на хромосомах *An. daciae* X1 (приложение Б).

Воссозданные полиморфные варианты инверсий X2 и X0 отличались по числу задействованных СБ - по четыре и три, соответственно. Тем не менее, в обоих случаях алгоритм представил их появление в один шаг, в отличие от фиксированных инверсий, что также подтверждает наблюдаемые результаты картирования. Инвертированные блоки полиморфных перестроек занимают 67% и 64% длины всей X-хромосомы *An. atroparvus* для вариантов X2 и X0, соответственно.

3.3 Эволюция линейных порядков ортологов генов, фланкирующих точки разрывов в X-хромосоме, у других представителей *Anopheles*

В работе было использовано филогенетическое древо для некоторых видов *Anopheles*, для которых имеются хромосомные сборки геномов, чтобы визуализировать эволюцию хромосомных локализаций и линейных порядков ортологов генов, фланкирующих BR у *An. atroparvus* и *An. messeae* (приложение Г). В соответствии с филогенетическим древом, *Culex* и *Aedes* являются видами внешней группы, а американские виды *An. albimanus* и *An. darlingi* представляют базальную линию рода *Anopheles*. Наиболее близким видом к подгруппе *Maculipennis* является азиатский вид *An. sinensis* из одноименного комплекса, а представители африканского континента были выбраны из-за широкого распространённого полиморфизма. Чтобы реконструировать расположение предкового порядка X-хромосом подгруппы *Maculipennis*, мы сравнили порядок генов в BR у видов внутри группы (*An. atroparvus* и *An. messeae*) с порядком генов у видов, не входящих в подгруппу *maculipennis*. Если порядок генов в BR был таким же, как и вне группы, то этот порядок генов считался предковым. Основными факторами, влияющими на сохранение порядка генов в анализе, являлись эволюционная удалённость от подгруппы *Maculipennis* и качество сборок генома.

Результаты анализа порядка ортологичных генов во всех четырёх точках разрывов фиксированных инверсий представлены в виде схемы на рисунке 19. На основе филогенетического дерева, аналогичного представленному в приложениях Г.1–Г.4, с добавлением некоторых видов подгруппы *Maculipennis*, был выполнен подсчёт случаев повторного использования тех же точек разрывов, что и у *An. atroparvus*. Согласно полученной схеме, точка разрывов BRIV является наиболее часто используемой (так называемой «горячей») в эволюции *Anopheles* и выявлена у 12 из 18 исследованных видов. При этом анцестральным состоянием следует считать раздельное расположение ортологичных генов, фланкирующих данную точку разрывов, поскольку именно такое состояние характерно как для внешней группы, так и для базальной линии. С помощью FISH не удалось однозначно определить локализацию генов, фланкирующих точку разрывов BRIV

у видов *An. maculipennis*, *An. sacharovi* и *An. beklemishevi*, предположительно вследствие отсутствия ортологов в этом регионе, что подтверждается схемой, приведённой в приложении Г.1. Тем не менее для *An. beklemishevi* нами была проведена попытка выравнивания с использованием новой геномной сборки, представленной крупными контигами (Кириленко К. М., неопубл.). Выравнивание фланкирующих генов BRIV на эту сборку показало, что гены AATE004183 и AATE009858 расположены в одном контиге на расстоянии примерно 6,2 Кб, что сопоставимо с аналогичным расстоянием между этими генами у *An. atroparvus* (около 11,5 Кб).

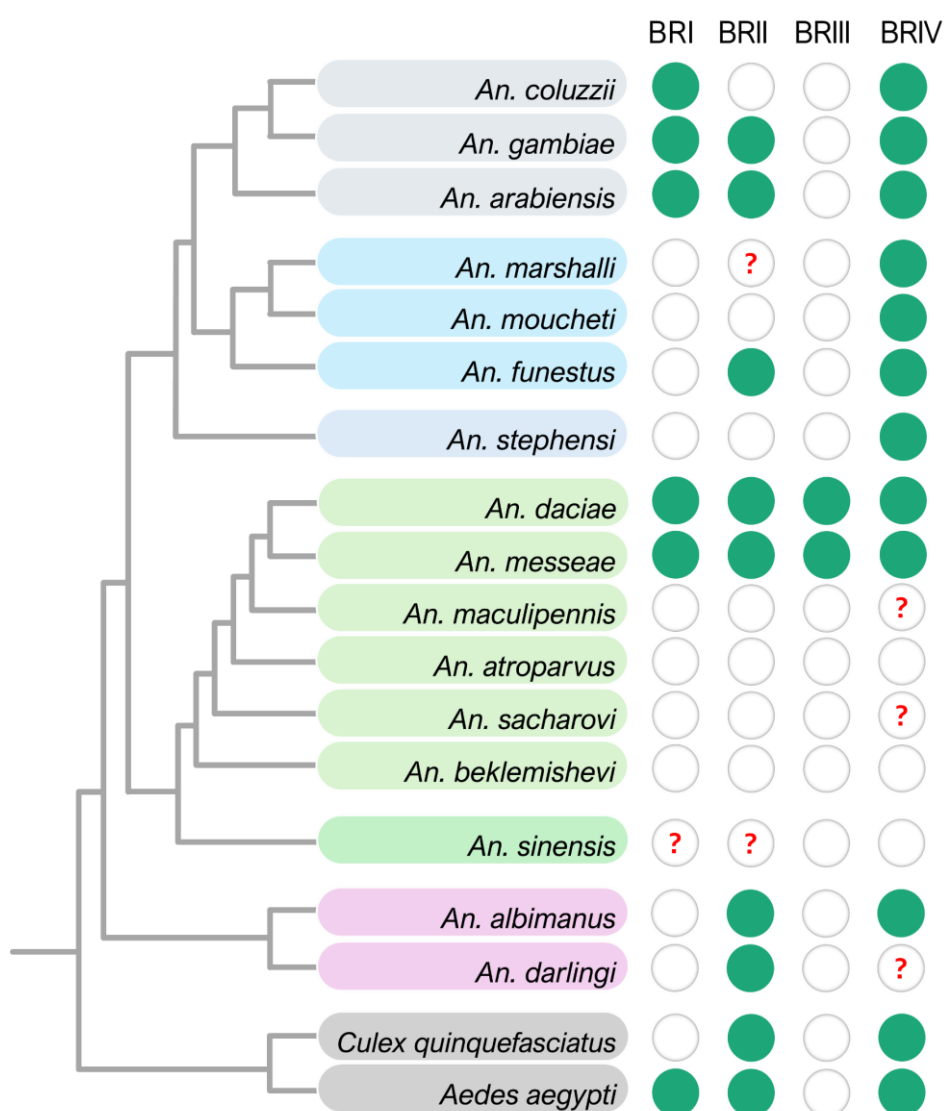


Рисунок 19 – Схематическая визуализация использования BRs у некоторых представителей *Anopheles* и видов внешней группы. Зелёными кружками отмечены регионы разрывов, чьи фланкерные гены локализуются в геноме не рядом друг с другом. Белыми кружками обозначены регионы разрывов с порядком генов как у *An. atroparvus*. Вопросом отмечены регионы разрывов, в которых не удалось установить расстояние между фланкерными генами.

Анализ порядка генов в районе точки разрывов BRIII выявил наибольшую эволюционную консервативность среди всех исследованных точек разрывов (приложение Г). В качестве фланкирующих генов были выбраны AATE000407 и AATE002183, однако между ними, согласно геномному браузеру, расположены ещё два гена (AATE001433 и AATE020008), которые не удалось картировать на хромосомах видов подгруппы *Maculipennis* с помощью метода FISH. В эволюции рода *Anopheles* данная точка разрывов впервые использовалась у *An. messeae* и позднее возникла лишь у родственного вида *An. daciae*.

Точки разрывов BRI и BRII оказались менее активно вовлечены в эволюционные перестройки. Для видов подгруппы *Maculipennis* отдельное положение фланкирующих генов в точке BRII, как и в BRIV, не является анцестральным, однако у *An. messeae* и *An. daciae* отмечается возврат к этому эволюционно исходному положению. Для видов *An. sinensis* и *An. marshalli* порядок ортологичных генов установить не удалось из-за малой длины опубликованных контигов. Большинство ортологичных генов, фланкирующих разрыв BRII, было обнаружено в аутосомах у других видов, однако прилегающие к ним генные окружения сохраняли своё положение на X-хромосоме, что подтверждается данными в приложении Г.

Для точки разрывов BRI однозначно определить эволюционно исходное состояние затруднительно без вовлечения дополнительных маркеров, поскольку виды внешней группы демонстрируют как вариант, аналогичный *An. atroparvus*, так и противоположный ему. Для вида *An. sinensis* порядок генов также не удалось достоверно установить.

3.4 Геномный состав окрестностей точек разрывов фиксированных инверсий

Поскольку последовательность генома *An. messeae* пока недоступна, был проанализирован геномный состав в окрестностях BR, используя референсную последовательность генома AatrE3 *An. atroparvus*. Эти окрестности были определены как геномные области размером 50 Кб, расположенные

непосредственно до и после каждого BR. Каждая геномная область была разделена на одинаковые интервалы, равные длине каждого BR в отдельности (т.н. бин/bin).

Анализ данной хромосомной сборки показал, что плотность ретро-транспозонов (МГЭ I класса) в X-хромосоме *An. atroparvus* оказалась ниже примерно в четыре раза по сравнению с ДНК-транспозонами (МГЭ II класса). Так, единственный ретроэлемент был обнаружен лишь в близи BRI, в то время как в других регионах разрывов они полностью отсутствовали. В то же время плотность ДНК-транспозонов была значительно выше в BRII, BRIII и BRIV по сравнению со средней плотностью для X-хромосомы. Примечательным оказалось, что для BRI не было зафиксировано ни одного ДНК-транспозона (рисунок 20).

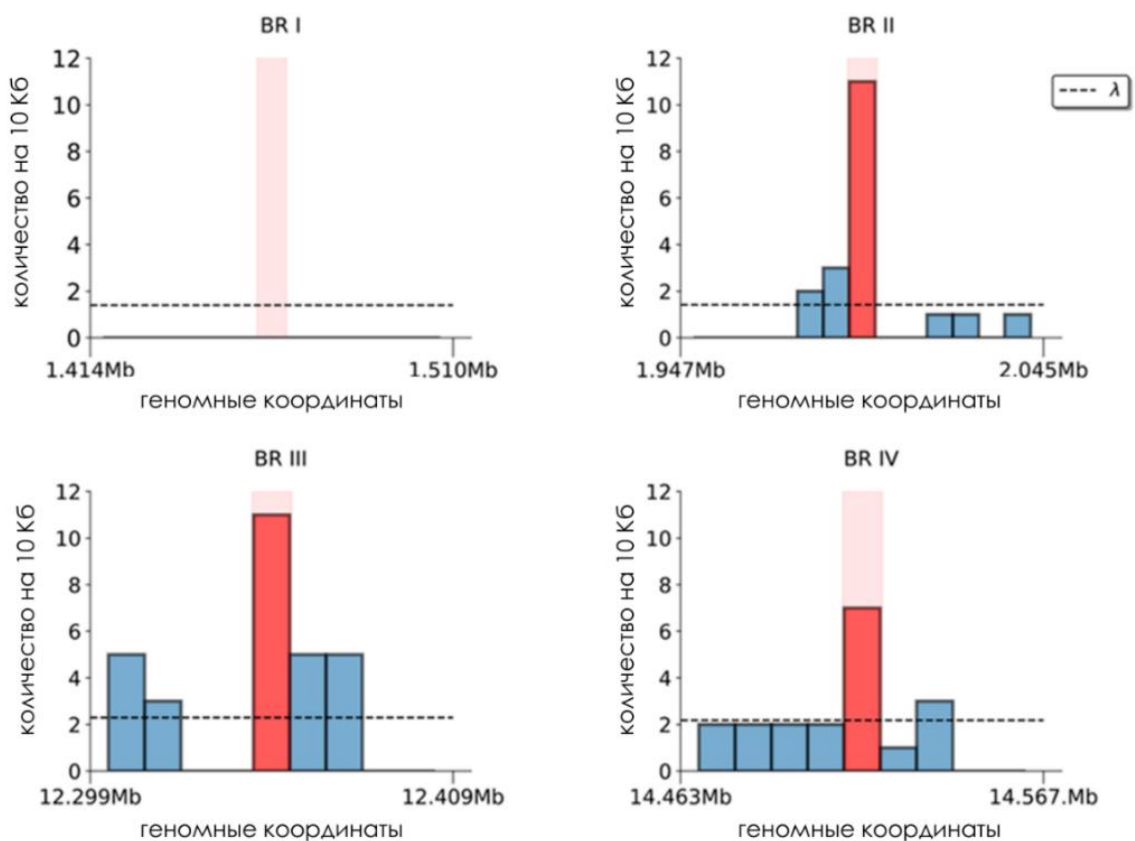


Рисунок 20 – Плотность ДНК-транспозонов (Класс II) в точках разрывов инверсий и их окрестностей в X-хромосоме *An. atroparvus*. По оси X отмечены геномные координаты, по оси Y число транспозонов в каждом участке длиной по 10 Кб. Светло розовые столбцы показывают положение BR внутри геномных окрестностей. Красные и синие столбцы показывают плотность МГЭ в BR и геномных окрестностях, соответственно. Геномные окрестности определены как геномные отрезки длиной 50 Кб до и после каждого BR. λ означает среднюю плотность ДНК-транспозонов по всей хромосоме с размером интервала равным соответствующему размеру BR

Анализ показал, что характер накопления ДНК-транспозонов в этих участках существенно варьирует. В точке BRI плотность ДНК-транспозонов составляла 0 элементов/бин, а в её окрестностях также не наблюдалось значимого накопления. Напротив, в точке BRII наблюдается выраженный пик накопления ДНК-транспозонов – 11 элементов/бин ($p = 2,7 \times 10^{-7}$), в то время как окрестности точки разрыва демонстрировали умеренное накопление приблизительно на уровне среднего. В точке BRIII плотность достигала так же 11 элементов/бин ($p = 2,3 \times 10^{-5}$), а окрестности демонстрировали повышенное содержание ДНК-транспозонов приблизительно в два раза по сравнению со средним значением. BRIV характеризовался повышенной плотностью по сравнению со средней по хромосоме (но при этом ниже, чем для BRII и BRIII) – 7 элементов/бин ($p = 5,2 \times 10^{-3}$); плотность мобильных элементов в окрестностях была ниже и распределялась равномерно.

Дополнительный анализ состава МГЭ в разных BRs позволил более детально охарактеризовать структуру каждого региона (таблица 7). В частности, BRI не содержал мобильных элементов, однако демонстрировал высокое содержание простых повторов: различные вариации моно-, ди- и тетрануклеотидных последовательностей (например, $(CAG)_8$, $(AC)_{25}$, $(TATTTA)_8$ и др.), с общей долей покрытия повторов в BR, составляющей 7,4%. BRII, напротив, содержал повышенное количество мобильных элементов, включая CACTA-TIR (DNA/DTC), hAT-DNA/DTA, PIF-Harbinger (MITE/DTH), *Helitron* и неизвестные элементы, при этом простые повторы были представлены относительно монотонно ($((TTC)_{12})$), а общее покрытие повторами достигало 18,6%. Для BRIII была выявлена высокая насыщенность как простыми повторами (например, $(CGATGC)_9$, $(TGC)_{30}$), так и разнообразными МГЭ, среди которых также преобладали CACTA-TIR, PIF-Harbinger и *Helitron*, а совокупное покрытие составило чуть меньше, чем в предыдущем регионе разрыва. BRIV оказался наименее гомогенным по составу: здесь были найдены CACTA-TIR, Mutator-TIR, а также 6 неизвестных МГЭ и один простой повтор ($((C)_{24})$), с общим покрытием, составляющим 23,9% — самым высоким среди всех проанализированных регионов разрывов. Графики,

иллюстрирующие плотность генов во всех BRs и их окрестностях, а также распределение простых повторов дополнительно приведены в приложении В.

Таблица 7 – Содержание повторяющейся ДНК и покрытие в регионах точек разрывов инверсий в соответствии с аннотацией RepeatMasker

BR	Простые повторы	Мобильные генетические элементы	Общее покрытие повторами в BR
I	(CAG) ₈ , (CAG) ₁₀ , (AC) ₂₅ , (GA) ₁₁ , (CTC) ₉ , (TTC) ₁₃ , (CCAGC) ₅ , (TATTTA) ₈ , A-rich ₉₃ , A-rich ₃₉ , A-rich ₄₂ , A-rich ₃₆	нет	7,4%
II	(TTC) ₁₂	CACTA TIR transposon DNA/DTC (1); DNA hAT DNA/DTA (1); DNA PIF Harbinger MITE/DTH (8); Helitron (1); Неизвестно (1)	18,6%
III	(CGATGC) ₉ , (GCCACC) ₇ , (TGC) ₃₀ , (TAT) ₉ , (CT) ₁₄ , (GGATT) ₆ , (C) ₂₇	CACTA TIR transposon DNA/DTC (3); DNA PIF Harbinger MITE/DTH (2); hAT TIR transposon DNA; MITE/DTA (2); hAT TIR transposon; DNA/DTA (1), DNA/DTT (1); Helitron (2)	14,4%
IV	(C) ₂₄	CACTA TIR transposon DNA/DTC (2), Mutator TIR transposon (1); неизвестно (4); неизвестно (2)	23,9%
Примечание – число мобильных элементов указано в скобках после каждого наименования			

3.5 Функциональная характеристика генов с использованием генной онтологии

Поскольку СБ2 и СБ5-СБ6 изменили своё положение и ориентацию между X-хромосомами *An. atroparvus* и *An. messeae* было проанализировано суммарное обогащение генов терминами генной онтологии (GO) в СБ2 и СБ5-СБ6, чтобы понять возможную функциональную значимость перестроек. Результаты выявленных терминов биологического процесса и их коэффициент обогащения (Fold Enrichment, FE) показаны на рисунке 21 и в приложении Д. Значимое *p*-value

по точному критерию Фишера ($p < 0,05$) было обнаружено для 58 из 345 терминов. Значимое скорректированное p -value (Benjamini–Hochberg FDR $< 0,05$) было обнаружено для 13 из этих 58 GO-терминов, включая «антибактериальный гуморальный ответ», «противомикробный гуморальный ответ», «гуморальный иммунный ответ», «иммунный ответ», «процесс иммунной системы», «защитная реакция на другой организм», «ответ на другой организм», «ответ на внешний биотический раздражитель», «биологический процесс, участвующий в межвидовом взаимодействии между организмами», «ответ на биотический стимул», защитная реакция», «защитная реакция на бактерию», и «реакция на бактерию».

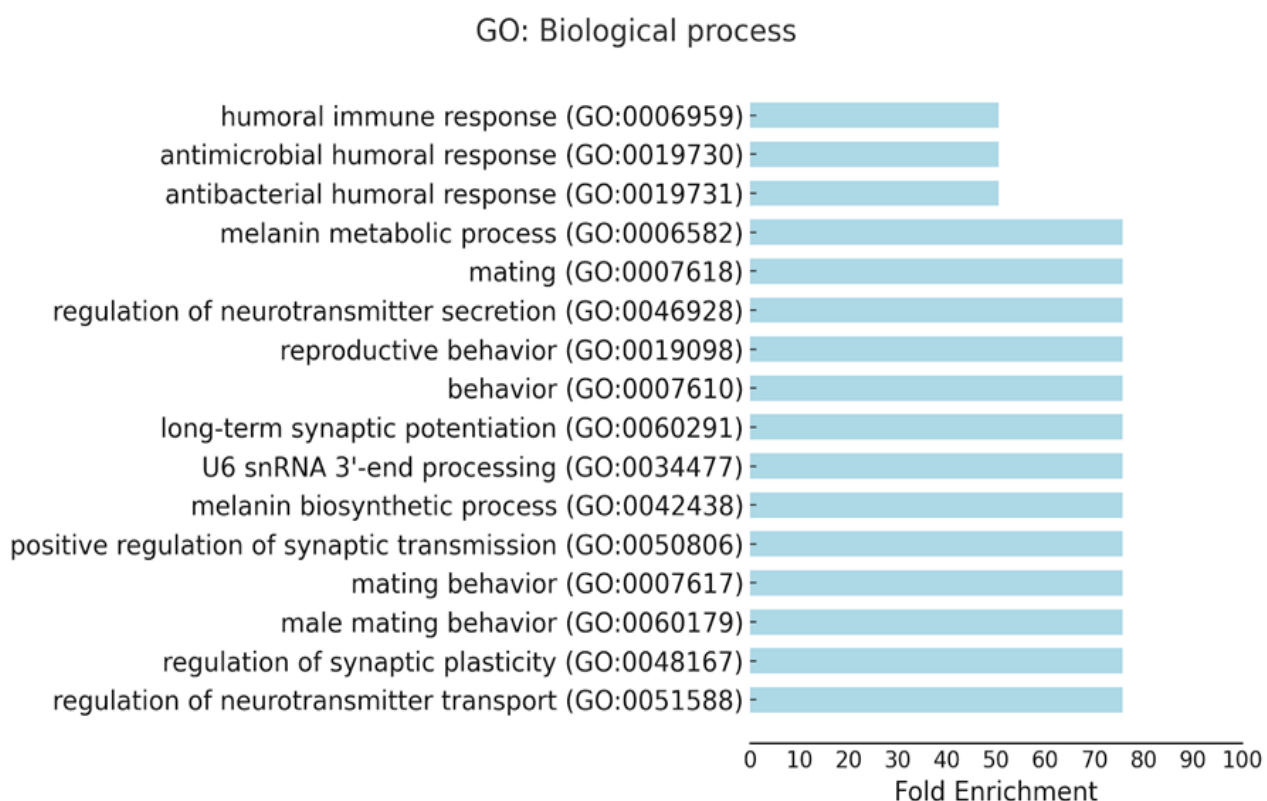


Рисунок 21 – Обогащение GO-терминами, ассоциированными с биологическими процессами для генов, расположенных в СБ2 и СБ5-СБ6 X-хромосомы *An. atroparvus*. На рисунке представлены только термины с FE > 50

Однако скорректированное значение p -value по Бонферрони для всех 58 GO-терминов было незначимым ($p_{adj} > 0,05$). Поэтому следует проявлять осторожность при интерпретации этих результатов, хотя они все же могут предполагать биологическую значимость, учитывая, что обогащение является сильным и биологически правдоподобным. Коэффициент обогащения и отношение

шансов количественно определяют, насколько более вероятно появление определенного GO-термина в списке генов по сравнению с тем, что можно было бы ожидать случайно. Для GO-терминов «антибактериальный гуморальный ответ» и «гуморальный иммунный ответ» было показано большое кратное обогащение ($FE > 50$) и отношение шансов (> 151), что указывает на сильную связь между списком генов и GO-термином. Аналогичным образом, большое кратное обогащение ($FE > 75$) и отношение шансов («бесконечность») было показано для GO-терминов «регуляция транспорта нейротрансмиттеров», «регуляция синаптической пластичности», «мужское брачное поведение» и «брачное поведение», что указывает на сильную связь между этими генами и GO-терминами. Так же было отмечено, что гены в обоих СБ были обогащены идентичными GO-терминами, что ещё раз указывает на биологическую значимость генов, расположенных в инверсиях. Например, гены AATE021908 (СБ2) и AATE021906 (СБ5) были связаны с GO-терминами «антибактериальный гуморальный ответ», «противомикробный гуморальный ответ» и «гуморальный иммунный ответ».

Результаты анализа GO-терминов в словаре «молекулярных функций» показаны в приложении Д.2. Из 189 идентифицированных GO-терминов 29 из них имели значимые p -value по точному критерию Фишера ($p < 0,05$). Однако скорректированные значения не были значимыми. Тем не менее, этот анализ предоставил информацию о возможных молекулярных функциях генов, которые мы обнаружили среди тех, которые связаны с обогащёнными условиями биологического процесса. Например, AATE019391 (СБ6), участвующий в «иммунном ответе» и «защитном ответе», имеет молекулярную функцию «связывание пептидогликана». Кроме того, гены AATE017047 (СБ2) и AATE021788 (СБ2), участвующие в «сигнальном пути ионотропного глутаматного рецептора», имеют молекулярную функцию «активность ионотропного глутаматного рецептора».

Из 73 идентифицированных GO-терминов, связанных со словарём «клеточных компонентов», 19 GO-терминов имели значимые p -value по точному критерию Фишера ($p < 0,05$) (приложение Д.3). Как и ожидалось, ген AATE011784

(СБ2), участвующий в передаче сигналов TOR, имел клеточные компоненты «комплекс TORC1» и «комплекс TORC2». Ген AATE005672 (СБ2), участвующий в «позитивной регуляции процесса клеточного цикла», имел клеточные компоненты «супрамолекулярный полимер/волокно» и «супрамолекулярный комплекс».

В соответствии с рисунком 15 видно, что СБ2 принимает участие в каждой из полиморфной инверсий, а СБ5 возвращается в изначальное положение при инверсии X2, но не X0. Было важно оценить также обогащение GO-терминами в каждом из этих участков генома и понять, какую роль они могли сыграть в эволюции комаров.

Анализ обогащения терминами биологических функций GO для СБ2 показал обогащение для 75 терминов (приложение Д.1), 18 из которых имеют наибольшее значение (>140) и поддержку по скорректированному значению Benjamini, но не Bonferroni. Большая часть GO-терминов связана с регуляцией нейромедиаторов и синаптической пластичностью. Также были встречены GO-термины, связанные с переработкой (спасением) пуриновых и пиримидиновых оснований. Анализ биологических функций в СБ5 (приложение Д.1), который подвергается перестановке при инверсии X2 выявил две группы, включающие 18 GO-терминов: биосинтез UDP-N-ацетилглюкозамина (азотсодержащий сахар), и иммунные процессы, включающие как антимикробный ответ, так и обработку N-гликанов (иммунитет-связанные углеводы). Несмотря на значение $p\text{-value} < 0,05$ у этих терминов, поддержки со стороны корректирующих значений они не получили.

4 ОБСУЖДЕНИЕ

Инверсионный полиморфизм у малярийных комаров представляет собой значимое, но недостаточно изученное явление. На сегодняшний день не существует ясного понимания о том, как именно инверсионный полиморфизм влияет на физиологические и генетические характеристики этих насекомых. Существует предположение, что он может играть ключевую роль в адаптации к изменяющимся условиям окружающей среды, влияя на такие аспекты, как иммунитет или другие физиологические функции, однако эти связи остаются плохо исследованными и неоднозначными. Изучение инверсионного полиморфизма у малярийных комаров представляет особую нишу для дальнейших исследований. Необходимо углублённо изучать влияние инверсий на адаптивные механизмы комаров, в частности, в контексте изменяющихся климатических условий и устойчивости к патогенам.

Растущее количество исследований показывает, что хромосомные перестройки являются важными факторами эволюции и адаптации видов [216, 217, 218]. Данные, полученные на различных видах, позволяют предположить, что хромосомный полиморфизм является механизмом, который виды используют для быстрой адаптации к изменениям климата [219, 220]. Цитогенетические исследования малярийных комаров так же показали неравномерное распределение инверсий среди видов и хромосомных плеч [4, 221, 175, 8]. В свою очередь эволюционный геномный анализ видов *Anopheles* показал, что фиксированные инверсии накапливаются примерно в три раза быстрее на X-хромосоме, чем на аутосомах [222, 223, 14]. Показано, что скорость фиксации не доминантных и выгодных частично или полностью рецессивных перестроек должна быть выше для X-хромосомы (из-за гемизиготности самцов), чем для аутосом [224].

4.1 Актуализация хромосомной карты на основе новых данных картирования

В фундаментальной научной работе 1991 года, авторством которой является профессор В. Н. Стегний, был проведён подробный анализ хромосомных инверсий, наблюдаемых у представителей подгруппы *Maculipennis* [9]. В анализе X-хромосомы профессор ориентируется на регион 2b-3b *An. atroparvus*, который был принят за стандарт (рисунок 9). Несмотря на высокую точность методологии того времени в пределах доступных технологий, исследование было сосредоточено в основном на крупных маркерах, что ограничивало разрешающую способность работы и оставляло вне внимания ряд мелких структурных элементов. Однако, в контексте современных исследований, можно выделить несколько важных пробелов в его работе. В частности, упущенное ключевое событие, произошедшее в ветви *An. atroparvus* – *An. messeae*, которое оказало значительное влияние на формирование молодой ветви (рисунок 22). Регион 2b-3b демонстрирует склонность к перемещению и изменению ориентации в полиморфных вариантах у *An. messeae*, при этом оставаясь неизменным внутри фиксированной инверсии, что подтверждают результаты картирования (рисунок 12). Стоит отметить, что профессор Стегний также не отразил перемещения небольших фрагментов 1a-1b и 3c в данной линии, что указывало на существование двух вложенных инверсий между видами. Учитывая относительно небольшие размеры инвертированных участков X-хромосомы (около 0,5 Мб и 2 Мб), данные Стегния о полиморфных инверсиях можно считать верными, за исключением некоторых незначительных отклонений, что подтверждается результатами картирования в настоящем исследовании.

Кроме того, Стегний отмечает в своей работе, что X-хромосома у *An. maculipennis* и *An. subalpinus* (современно известный как *An. melanoon*) идентична хромосоме *An. atroparvus*. Это утверждение, в некоторой степени, находит подтверждение в настоящем исследовании, где картирование фланкерных генов точек разрывов фиксированных инверсий не выявило существенных перестроек в 3 из 4 точках у *An. maculipennis*.

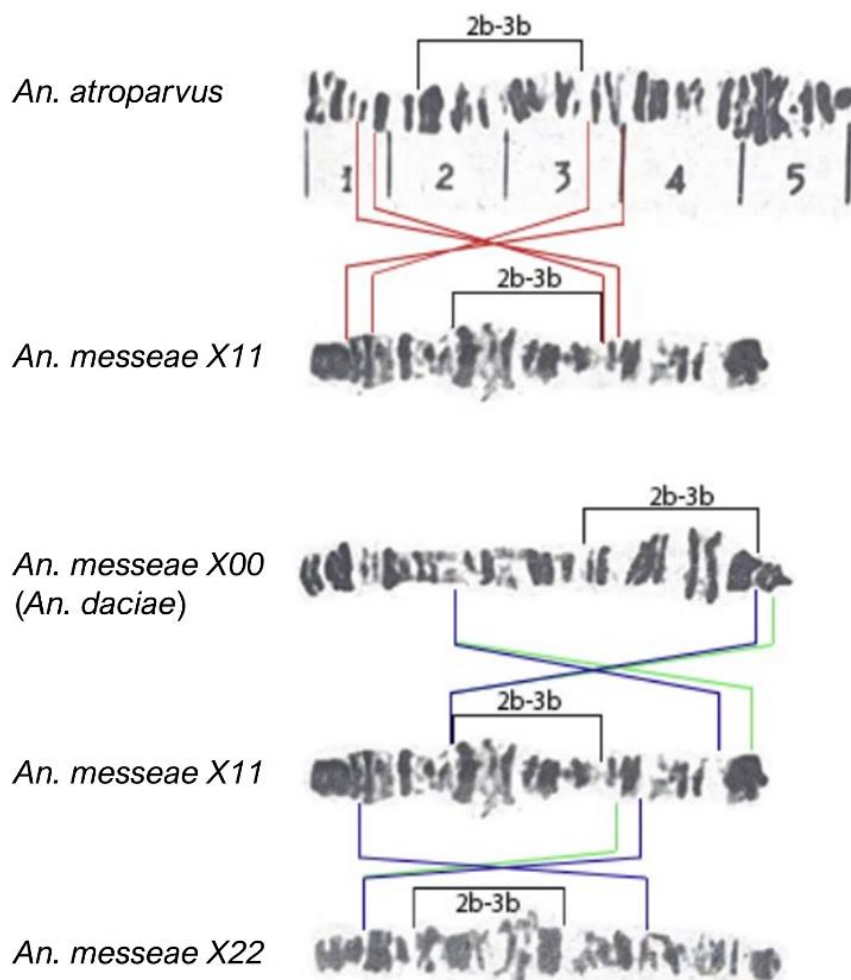


Рисунок 22 – Актуализация различий инверсионных перестроек в X-хромосоме между *An. atroparvus* и *An. messeae*. На основе данных 1991 года с модификациями и новыми данными 2024 года. Красными линиями отмечены фиксированные инверсии; синим – полиморфные (Стегний, 1991), зелёным – по представленным данным картирования. Скобкой сверху отмечен регион 2b-3b, на который опирается Стегний в своей работе

4.2 Найденные ранее транспозиции подтвердили гипотезу о существовании крупных перестроек

В ходе настоящего исследования в X-хромосоме были выявлены две вложенные инверсии, зафиксированные в геноме *An. messeae* и *An. daciae* после их отделения от других видов подгруппы *Maculipennis* примерно 7,9 млн. лет назад [22]. Эти две инверсии являются характерными только для линии *An. messeae*-*An. daciae*, поскольку они не были обнаружены у родственного вида *An. maculipennis*. В ранее исследованных аутосомах у *An. messeae*, после его

отделения от *An. maculipennis* и *An. melanoon*, инверсий не было выявлено. Единственная аутосомная инверсия была обнаружена после раскола европейской и североазиатской клады около 10,5 млн лет назад [22]. Согласно реконструкции, представленной в этой работе, X-хромосома *An. messeae* претерпела два инверсионных события, которые могли произойти либо одновременно, либо последовательно, однако порядок этих событий не может быть определён без детального анализа BRs в секвенированном геноме *An. messeae*. Порядок генов варианта X1 условно закреплено как «стандартное» у *An. messeae*, и его сестринского вида *An. daciae* [195, 210]. Ранее опубликованная цитогенетическая карта гомозигот по инверсиям X0 и X1 у *An. daciae* показала, что BR полиморфной инверсии X0 визуально не совпадают с BRs фиксированных или полиморфных инверсий у *An. messeae* [16]. Следовательно, порядок генов в X0 возник независимо в *An. daciae* на основе порядка X1, общего для обоих видов. Однако в рамках этого исследования было показано, что стандартный вариант X1 и полиморфный X2 имеют один общий регион разрывов. Это может косвенно указывать либо на повышенный уровень рекомбинации в данном участке генома среди других *Anopheles* (что в целом, согласуется с рисунком 17), либо на общий источник мутации, который привёл к образованию и закреплению инверсии (что соответствует гипотезе мутации точки разрывов [225]). Тем не менее, достоверное утверждение о причине формирования инверсий можно сделать лишь после получения полного генома *An. messeae* и проведения детализированного биоинформатического анализа окрестностей точек разрывов инверсий.

Анализ предложенной схемы миграционных путей видов подгруппы *Maculipennis*, предложенной в статье Юрченко с соавторами [22], позволяет рассуждать об узкой специализации инверсионного варианта X2. При повороте инверсия изменяет положение большей части хромосомы и возвращает СБ2 и СБ6 в анцестральное положение. Согласно результатам исследования, *An. messeae* и *An. daciae* окончательно дивергировали и расширили свой ареал около 3 млн. лет назад [22]. Известно, что в Плейстоцене за последние 1,8 млн. лет на территории современной России было по меньшей мере шесть крупных оледенений, ледяные

щиты которых могли покрывать средние широты России, а зона вечной мерзлоты растягивалась до южных границ. По-видимому, оледенения оказывали глобальное влияние на климат Евразии своими циклами ледникового-межледникового. К сожалению, достоверно нельзя сказать в какой момент происходила миграция линии *An. messeae* и *An. daciae*, а главное по какой траектории. Ледниковые щиты могли сдвигать климатические зоны далеко на юг, заставляя комаров мигрировать по южной части России и Северному Казахстану, или наоборот миграция могла происходить в один из периодов межледникового, когда равнины были покрыты заливными лугами, болотами, а в северных широтах процветала древесная флора [226]. Современный кариотипический анализ малярийных комаров в популяциях верхнего Приобья показывает, что есть статистически значимая зависимость распространения кариотипов X-хромосомы (а также аутосом) в зависимости от экологической зоны. Так, например, частота общих кариотипов для *An. messeae* и *An. daciae* (кариотип X11) уменьшалась с севера на юг – от с. Большая Саровка (58° С.Ш.) к с. Коларово (56° С.Ш.). Особи с гомозиготным кариотипом X22 распространены в узкой, ограниченной территории средней тайги Западной Сибири, а при движении на юг частота этого варианта значительно снижается, вытесняясь другим полиморфным кариотипом – X00 (М.К. Хайдара, неопубл.)

4.3 Роль мобильных генетических элементов в формировании фиксированных инверсий у *An. messeae*

В настоящий момент принято считать, что инверсии генерируются двумя распространёнными механизмами: путём эктопической рекомбинации и ступенчатыми разрывами [198, 227, 225]. Оба механизма могут вызывать важные фенотипические изменения, влияя на уровень экспрессии генов, однако наибольшую роль МГЭ играют во время эктопической рекомбинации. Наличие двух одинаковых последовательностей внутри МГЭ и их ориентации «голова–к голове», может являться своего рода «приглашением» для рекомбинационных механизмов, однако триггеры для перестроек остаются все ещё малоизученными [228]. Обилие МГЭ в окрестностях точек разрывов типично для видов комплекса

An. gambiae и *An. stephensi* [199, 229]. В данной работе было обнаружено обогащение ДНК-транспозонами у *An. atroparvus* в трех из четырёх точках разрывов, однако содержание ретротранспозонов не было выявлено вовсе, что резко контрастирует с литературными данными, например по *An. gambiae*, у которого ретроэлементы LTR-Gypsy были идентифицированы вблизи точек разрывов инверсии 2La [230]. При анализе всей длины доступной сборки X-хромосомы *An. atroparvus* была заметна разница между содержанием МГЭ I и II класса (рисунок 23). На графике видно, что содержание ретротранспозонов увеличивается ближе к району ПГХ, что в целом, соотносится с их наиболее предпочтительным нахождением в некодирующих участках генома [205, 206]. Примечательно, что точка разрыва BRI у *An. atroparvus* не содержит МГЭ, но при этом характеризуется высоким содержанием простых повторов. Это может косвенно указывать на альтернативные механизмы формирования инверсий, не связанные с транспозонами, такие как неаллельная гомологичная рекомбинация за счёт низкокопийных простых повторов, как было предложено ранее для других видов [202].

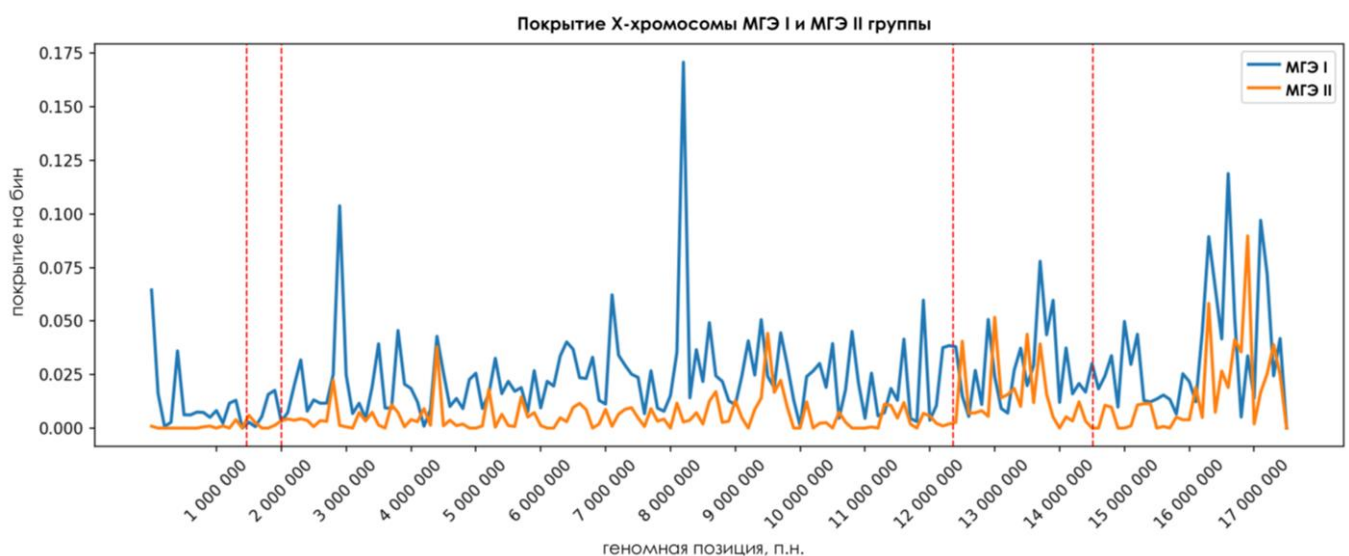


Рисунок 23 – Распределение МГЭ I и II класса по всей длине X-хромосомы на основании сборки AatrE3 *An. atroparvus*. Оранжевый график отображает МГЭ I класса (ретротранспозоны), а синий МГЭ II класса (ДНК-транспозоны). Вертикальными пунктирными линиями отмечены локализации каждого из регионов разрывов фиксированных инверсий. Размер бина равен 12 Кб.

Для регионов разрывов BRII и BRIII, относящихся к внутренней инверсии, в данной работе было выявлено сходство по наличию МГЭ. Оба региона разрывов содержат такие типы повторов как: MITE, CACTA и *Helitron*, последний из которых характеризуется уникальным механизмом репликации, отличающим его от других транспозонов [231, 232]. Наличие подобных элементов может косвенно свидетельствовать в пользу эктопической рекомбинации как механизма возникновения по крайней мере одной из инверсий в линии *An. messeae*. В свою очередь, BRIV оказался наименее обогащённым ДНК-транспозонами, несмотря на его участие не только в фиксированной, но и в полиморфной инверсии [200]. Подобная ситуация может указывать на повторное использование одних и тех же точек разрывов (в англоязычной литературе - evolutionary breakpoint regions) в процессе эволюции геномов *Anopheles* [233, 234]. Повторно используемые разрывы могут отражать структурную нестабильность регионов, в которых они происходят. Однако результаты текущего анализа не представляют убедительных доказательств структурной нестабильности региона BRIV. Как показано в литературе, именно наличие ДНК-транспозонов типа *Helitron* и CACTA, ретротранспозонов, а также регионов, богатых AT, CCG повторами или палиндромными последовательностями вблизи точек разрывов может указывать на повышенную нестабильность региона [232]. Тем не менее, высокое содержание простых повторов в этой области, по сравнению с другими точками разрывов, может создавать препятствия для репликационного аппарата, что увеличивает вероятность ошибок копирования и, как следствие, создаёт структурную нестабильность.

Следует учитывать, что нередко при использовании геномных сборок, основанных на коротких прочтениях, может происходить алгоритмическое «сглаживание» участков со сложной структурой. В этом случае выявленные простые повторы могут быть артефактами сборки, скрывающими под собой более сложные геномные структуры. Для получения более точных и достоверных результатов в дальнейших исследованиях целесообразно применять технологии секвенирования третьего поколения, позволяющие определить, действительно ли

данные регионы состоят исключительно из простых повторов или есть более сложные структуры, которые могли бы на самом деле способствовать нестабильности ДНК.

В литературе существуют примеры, подтверждающие закономерность накопления МГЭ в районах точек разрывов хромосомных перестроек в геномах двукрылых насекомых [235]. Так, например, для малярийного комара *An. stephensi* были обнаружены вставки длиной в несколько тысяч пар оснований, представленные короткими повторами [229]. Для *An. gambiae* ранее сообщалось о накоплении ретротранспозонов вблизи точек разрывов инверсии 2La [199, 230]. Для рода *Drosophila* также известно множество случаев, когда возникновение инверсий связано с эктопической рекомбинацией между различными повторами [236, 237, 238, 239]. В целом, подобные находки исследователей иллюстрируют как структурные повторы, происходящие от деградировавших транспозонов, могут служить «молекулярными шрамами», указывающими на пути формирования хромосомных инверсий, и представляют собой значимое звено между молекулярной архитектурой генома и эволюцией кариотипа.

В отличие от *An. gambiae*, геном которого характеризуется высокой концентрацией ретротранспозонов в окрестностях инверсий, у *An. atroparvus* преобладают ДНК-транспозоны (К. М. Кириленко, неопубл.). Подобные различия могут объясняться особенностями самих транспозонов: ДНК-транспозоны чаще перемещаются на короткие дистанции, формируя локальные кластеры МГЭ, вблизи исходной позиции, то есть демонстрируя явление локального перемещения. Подобное распределение создаёт благоприятные условия для альтернативных событий транспозиции [240, 241]. Однако в случае с *An. atroparvus*, размеры инверсий между фланкерами достигают значительных размеров — около 13 Мб и 10,3 Мб, что затрудняет объяснение их происхождения исключительно локальной транспозицией. Согласно литературным данным, в формировании крупных внутривнутрихромосомных и межхромосомных перестроек, более активную роль играют ретротранспозоны [242, 243]. Таким образом, отсутствие ретротранспозонов в зонах точек разрывов и большие размеры инверсий у *An. atroparvus* не позволяет

объяснить их возникновение исключительно локальной активностью ДНК-транспозонов.

4.4 Связь хромосомных перестроек с обогащением GO-терминами

Несмотря на значительные размеры вложенных инверсий в X-хромосоме, порядок и ориентация генов между видами *An. atroparvus* и *An. messeae* X1/*An. daciae* X1 различаются лишь в трех небольших синтенных блоках (СБ2, СБ5 и СБ6), которые занимают чуть более чем 15%, от общей длины X-хромосомы *An. atroparvus*. Указанные синтенные блоки включают в себя в общей сложности 181 ген, что составляет примерно 10% от общего числа генов в X-хромосоме. Анализ обогащения GO-терминами, проведённый для этих блоков позволил предположить возможную функциональную значимость данных хромосомных перестроек для биологии малярийных комаров. В данной работе результаты показали, что инвертированные синтенные блоки в большей степени содержат гены, вовлечённые в иммунный ответ насекомых, синоптическую передачу сигналов, а также в брачное поведение самцов. Полученные результаты не находят сходства с работами, проведёнными на других модельных объектах.

Ранее аналогичный анализ GO-терминов, проведённый в X-хромосоме у *An. gambiae*, выявил гены, вовлечённые в процессы предкопуляционной изоляции [219]. Данные гены кодируют белки, с молекулярной и сигнальной трансдукционной активностью, являющиеся важными компонентами обонятельной системы, которая играет ключевую роль в распознавании особей противоположного пола. Например, гены белков сигнальной трансдукции, локализованные на X-хромосоме, продемонстрировали различия в уровне экспрессии у девственных самок двух недавно разделившихся видов *An. gambiae*, характеризующихся различиями в поведении во время роения [244]. Полученные результаты указывают на то, что быстрое возникновение и фиксация инверсий в X-хромосоме могут способствовать процессам видообразования у комаров рода *Anopheles*, аналогично тому, как это было ранее продемонстрировано для рода *Drosophila* [245].

Так как в рамках настоящего исследования не стояла задача проверить связь выявленных генов с различными кариотипами непосредственно на видах *An. messeae* или *An. daciae*, то закономерным продолжением данной работы может стать проверка гипотезы о функциональных различиях генов между изученными видами в виде анализа дифференциальной экспрессии генов, которыми обогащены выявленные инвертированные СБ.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

По итогам полученных результатов можно сделать следующие выводы:

1. Итеративное картирование районов, содержащих точки разрывов хромосомных перестроек на геномной карте *An. atroparvus*, подтвердило наличие двух фиксированных инверсий в X-хромосомах *An. messeae* и *An. daciae* на основе ранее обнаруженных единичных транспозиций. Установлено, что районы локализации точек разрывов фиксированных инверсий не различаются для *An. messeae* X1 и *An. daciae*.

2. Районы X хромосомы, гомеологичные содержащим точки разрывов фиксированных инверсий *An. messeae* (и *An. daciae*), в геноме *An. atroparvus* обогащены ДНК-транспозонами и генами, связанными с иммунным ответом, нейрорегуляцией и половым поведением, что могло способствовать возникновению хромосомных перестроек в геноме предкового вида, репродуктивной изоляции и дальнейшей адаптации молодой ветви видов.

3. Реконструкция эволюции X-хромосомы *An. messeae* и *An. daciae* на основе порядка и ориентации синтенных блоков показала, что исходный порядок генов в ветви *An. messeae* и *An. daciae* соответствует инверсионному варианту X1, который, сформирован двумя вложенными одна в другую парацентрическими инверсиями, тогда как полиморфные инверсионные варианты X0 и X2 возникли независимо в ветвях соответственно *An. daciae* и *An. messeae*.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

Итеративное картирование

XL/X – левое плечо половой хромосомы

2L – левое плечо 2-ой хромосомы

2R – правое плечо 2-ой хромосомы

3L – левое плечо 3-ей хромосомы

3R – правое плечо 3-ей хромосомы

BR – сокр. от англ. «breakpoint region», регион точек разрывов инверсий (нумерация в тексте римскими цифрами)

dNTP – сокр. от англ. «deoxyribose nucleoside triphosphate», дезоксинуклеозид трифосфат

FISH – сокр. от англ. «fluorescence *in situ* hybridization», флуоресцентная *in situ* гибридизация

ITS2 – сокр. от англ. «Internal transcribed spacer 2», внутренний транскрибируемый спейсер 2 рДНК

PBS – сокр. от англ. «phosphate-buffered saline», натрий-фосфатный буфер

SSC – сокр. от англ. «saline-sodium citrate buffer», солевой раствор хлорида натрия и цитрата натрия

ПДРФ – сокр. от «полиморфизм длин рестрикционных фрагментов»

СБ – сокр. от «синтенный блок» (нумерация в тексте арабскими цифрами)

Биоинформатические методы

AatrE3 – референсная сборка генома *An. atroparvus* (основная)

AatrE4 – улучшенный вариант сборки AatrE3 (дополненная)

bin – участок фиксированной длины, на который разбивается хромосома для упрощения подсчёта каких-либо объектов (например, мобильных элементов) по всей её длине

LCR – сокр. от англ. «low copy repeats», низкокопийные повторы

LTR – сокр. от англ. «long tail repeats», длинные концевые повторы

TIR – сокр. от англ. «terminal inverted repeats», терминальные инвертированные повторы

Кб – сокр. от «килобаза», равна 1000 пар нуклеотидов

Мб – сокр. от «мегабаза», равна 1 000 000 пар нуклеотидов

МГЭ – сокр. от «мобильные генетические элементы»

п.н. – сокр. от «пар нуклеотидов»

спейсер – от англ. «spacer» — участки некодирующей ДНК, расположенные между тандемно повторяющимися генами

λ – средняя плотность повторяющихся элементов ДНК

χ – плотность повторяющихся элементов ДНК в одном BR

Прочие сокращения

FE – сокр. от англ. «Fold Enrichment», кратность обогащения (например, конкретными генами в геноме)

GO – сокр. от англ. «gene ontology», генная онтология

NAHR – сокр. от англ. «non-allelic homologous recombination», неаллельная гомологичная рекомбинация

TOR – сокр. от англ. «target of rapamycin», мишень захвата рапамицина

ДР – сокр. от «двуцепочечные разрывы»

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ayala, F. J. Chromosome speciation: Humans, *Drosophila* , and mosquitoes / F. J. Ayala, M. Coluzzi // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2005. – Vol. 102, № suppl. 1. – P. 6535-6542.
2. Kirkpatrick, M. Chromosome Inversions, Local Adaptation and Speciation / M. Kirkpatrick, N. Barton // *Genetics*. – 2006. – Vol. 173, № 1. – P. 419-434.
3. Brehm, A. Inversion polymorphism in *Drosophila obscura* / A. Brehm, C. B. Krimbas // *The Journal of Heredity*. – 1991. – Vol. 82, № 2. – P. 110–117.
4. A polytene chromosome analysis of the *Anopheles gambiae* species complex / M. Coluzzi, A. Sabatini, A. della Torre [et al.] // *Science*. – 2002. – Vol. 298, № 5597. – P. 1415–1418.
5. Venkatesan P. WHO world malaria report 2024 // *The Lancet Microbe*. – 2025. – Vol. 6, № 4. – P. 101073.
6. Spread of *Dirofilariae* (Spirurida, *Onchocercidae*) in the Natural Populations of Malaria Mosquitos (Diptera, *Culicidae*) in Tomsk Ob River Region / V. S. Fedorova, V. A. Burlak, G. N. Artemov // *Vestnik Tomskogo gosudarstvennogo universiteta. Biologiya*. – 2022. – № 58. – P. 128–152.
7. Global Climate Change and Human *Dirofilariasis* in Russia / A. V. Kondrashin, L. F. Morozova, E. V. Stepanova [et al.] // *International Journal of Environmental Research and Public Health*. – 2022. – Vol. 19, № 5. – P. 3096.
8. Xia A. Reconstructing Ancestral Autosomal Arrangements in the *Anopheles gambiae* Complex / A. Xia, M. V. Sharakhova, I. V. Sharakhov // *Journal of Computational Biology*. – 2008. – Vol. 15, № 8. – P. 965–980.
9. Стегний В. Н. Популяционная генетика и эволюция малярийных комаров / В. Н. Стегний. – Томск : Издательство Томского университета, 1991. – 136 с.
10. Chromosome inversions and ecological plasticity in the main African malaria mosquitoes: ecology of inversions in *Anopheles* / D. Ayala, P. Acevedo, M. Pombi [et al.] // *Evolution*. – 2017. – Vol. 71, № 3. – P. 686–701.

11. Ayala D. Adaptation through chromosomal inversions in *Anopheles* / D. Ayala, A. Ullastres, J. González // *Frontiers in Genetics*. – 2014. – Vol. 5. – P. 1–10. – URL: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fgene.2014.00129/abstract> (access date: 21.04.2025).
12. Petrarca V. Intraspecific Chromosomal Polymorphism in the *Anopheles* Gambiae Complex as a Factor Affecting Malaria Transmission in the Kisumu Area of Kenya / V. Petrarca, J. C. Beier // *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. – 1992. – Vol., 46, № 2. – P. 229–237.
13. A test of the chromosomal theory of ecotypic speciation in *Anopheles gambiae* / N. C. Manoukis, J. R. Powell, M. B. Touré [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2008. – Vol. 105, № 8. – P. 2940–2945.
14. Highly evolvable malaria vectors: The genomes of 16 *Anopheles* mosquitoes / D. E. Neafsey, R. M. Waterhouse, M. R. Abai [et al.] // *Science*. – 2015. – Vol. 347, № 6217. – P. 1258522.
15. A standard photomap of ovarian nurse cell chromosomes and inversion polymorphism in *Anopheles beklemishevi* / G. N. Artemov, M. I. Gordeev, A. A. Kokhanenko [et al.] // *Parasites & Vectors*. – 2018. – Vol. 11, № 1. – P. 211.
16. New Cytogenetic Photomap and Molecular Diagnostics for the Cryptic Species of the Malaria Mosquitoes *Anopheles messeae* and *Anopheles daciae* from Eurasia / G. N. Artemov, V. S. Fedorova, D. A. Karagodin [et al.] // *Insects*. – 2021. – Vol. 12, № 9. – P. 835.
17. A New Chromosomal Phylogeny Supports the Repeated Origin of Vectorial Capacity in Malaria Mosquitoes of the *Anopheles gambiae* Complex / M. Kamali, A. Xia, Z. Tu, I. V. Sharakhov // *PLoS Pathogens*. – 2012. – Vol. 8, № 10. – P. e1002960.
18. Sharakhov I. V. Chromosome phylogenies of malaria mosquitoes // *Tsitologiya*. – 2013. – Vol. 55, № 4. – P. 238–240.
19. Extensive introgression in a malaria vector species complex revealed by phylogenomics / M. C. Fontaine, J. B. Pease, A. Steele [et al.] // *Science*. – 2015. – Vol. 347, № 6217. – P. 1258524.

20. Phylogenetic signal from rearrangements in 18 *Anopheles* species by joint scaffolding extant and ancestral genomes / Y. Anselmetti, W. Duchemin, E. Tannier [et al.] // *BMC Genomics*. – 2018. – Vol. 19, № S2. – P. 96.
21. Population genetic structure and phylogenetic analysis of *Anopheles hyrcanus* (Diptera: *Culicidae*) inferred from DNA sequences of nuclear ITS2 and the mitochondrial COI gene in the northern part of Iran / F. Askari, A. Paksa, S. Shahabi [et al.] // *BMC Infectious Diseases*. – 2024. – Vol. 24, № 1. – P. 724.
22. Phylogenomics revealed migration routes and adaptive radiation timing of Holarctic malaria mosquito species of the *Maculipennis* Group / A. A. Yurchenko, A. N. Naumenko, G. N. Artemov [et al.] // *BMC Biology*. – 2023. – Vol. 21, № 1. – P. 63.
23. Новиков Ю. М. Адаптивная ассоциация инверсий в природной популяции малярийного комара *Anopheles messeae* Fall / Ю. М. Новиков, В. М. Кабанова // *Генетика*. – 1979. – Т. 15. – № 6. – С. 1033–1045.
24. Новиков Ю. М. *Anopheles messeae* Fall. (Diptera, *Culicidae*) – два вида *In Statu Nascendi* // Макроэволюция : материалы I Всесоюзной конф. по проблемам эволюции. – М. : Наука, 1984. – С. 13–14.
25. Новиков Ю. М. Инверсионный полиморфизм и дивергенция двух криптических форм таксона *Anopheles messeae* (Diptera, *Culicidae*) на уровне повторяющихся элементов геномной ДНК / Ю. М. Новиков, А. И. Шевченко // *Генетика*. – 2001. – Т. 37, № 7. – С. 915–925.
26. Mosquitoes of the *Anopheles maculipennis* group (Diptera: *Culicidae*) in Romania, with the discovery and formal recognition of a new species based on molecular and morphological evidence / G. Nicolescu, Y. M. Linton, A. Vladimirescu [et al.] // *Bulletin of Entomological Research*. – 2004. – Vol. 94, № 6. – P. 525–535.
27. Kronefeld M. PCR identification and distribution of *Anopheles daciae* (Diptera, *Culicidae*) in Germany / M. Kronefeld, D. Werner, H. Kampen // *Parasitology Research*. – 2014. – Vol. 113, № 6. – P. 2079–2086.
28. Partial-arm translocations in evolution of malaria mosquitoes revealed by high-coverage physical mapping of the *Anopheles atroparvus* genome / G. N. Artemov,

S. M. Bondarenko, A. N. Naumenko [et al.] // *BMC Genomics*. – 2018b. – Vol. 19, № 1. – P. 278.

29. Tesler G. GRIMM: genome rearrangements web server // *Bioinformatics*. – 2002. – Vol. 18, № 3. – P. 492–493.

30. Lieber M. R. The Mechanism of Double-Strand DNA Break Repair by the Nonhomologous DNA End-Joining Pathway // *Annual Review of Biochemistry*. – 2010. – Vol. 79, № 1. – P. 181–211.

31. Hypersensitivity of Nonhomologous DNA End-joining Mutants to VP-16 and ICRF-193 / N. Adachi, H. Suzuki, S. Iiizumi, H. Koyama // *Journal of Biological Chemistry*. – 2003. – Vol. 278, № 38. – P. 35897–35902.

32. A Pathway of Double-Strand Break Rejoining Dependent upon ATM, Artemis, and Proteins Locating to γ -H2AX Foci / E. Riballo, M. Kühne, N. Rief et al. // *Molecular Cell*. – 2004. – Vol. 16, № 5. – P. 715–724.

33. Precise detection of rearrangement breakpoints in mammalian chromosomes / C. Lemaitre, E. Tannier, C. Gautier, M. F. Sagot // *BMC Bioinformatics*. – 2008. – Vol. 9, № 1. – P. 286.

34. Divergent patterns of breakpoint reuse in Muroid rodents / E. E. Mlynarski, C. J. Obergfell, M. J. O'Neill, R. J. O'Neill // *Mammalian Genome*. – 2010. – Vol. 21, № 1-2. – P. 77–87.

35. Pevzner P. Genome Rearrangements in Mammalian Evolution: Lessons From Human and Mouse Genomes / P. Pevzner, G. Tesler // *Genome Research*. – 2003. – Vol. 13, № 1. – P. 37–45.

36. Comparative architectures of mammalian and chicken genomes reveal highly variable rates of genomic rearrangements across different lineages / G. Bourque, E. M. Zdobnov, P. Bork [et al.] // *Genome Research*. – 2005. – Vol. 15, № 1. – P. 98–110.

37. Жимулев И. Ф. Общая и молекулярная генетика : учеб. пособие / И. Ф. Жимулев. – Новосибирск : Сибирское университетское издательство, 2003. – 479 с.

38. Гершензон С. М. Основы современной генетики / С. М. Гершензон. – Киев : Наукова думка, 1979. – 508 с.
39. Коряков Д. Е. Хромосомы : структура и функции / Д. Е. Коряков, И. Ф. Жимулёв. – Новосибирск : Изд-во Сибирского отделения Российской академии наук, 2009. – 258 с.
40. Mitotic and Polytene Chromosomes: Comparisons Between *Drosophila Melanogaster* and *Drosophila Simulans* / S. Aulard, L. Monti, N. Chaminade, F. Lemeunier // *Genetica*. – 2004. – Vol. 120, № 1-3. – P. 137–150.
41. Comparative Genome and Proteome Analysis of *Anopheles gambiae* and *Drosophila melanogaster* / E. M. Zdobnov, C. V. Mering, I. Letunic [et al.] // *Science*. – 2002. – Vol. 298, № 5591. – P. 149–159.
42. Moore B. C. *Drosophila* of Southern California: III. Gene arrangements of *Drosophila persimilis* / B. C. Moore, C. E. Taylor // *Journal of Heredity*. – 1986. – Vol. 77, № 5. – P. 313–323.
43. Bourque G. Reconstructing the genomic architecture of ancestral mammals: lessons from human, mouse, and rat genomes / G. Bourque, P. A. Pevzner, G. Tesler // *Genome Research*. – 2004. – Vol. 14, № 4. – P. 507–516.
44. Identifying micro-inversions using high-throughput sequencing reads / F. He, Y. Li, Y. H. Tang [et al.] // *BMC genomics*. – 2016. – Vol. 17. № Suppl 1. – P. 4.
45. Chaisson M. J. Microinversions in mammalian evolution / M. J. Chaisson, B. J. Raphael, P. A. Pevzner // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2006. – Vol. 103, № 52. – P. 19824–19829.
46. Ohno S. Evolution by Gene Duplication / S. Ohno. – Berlin, Heidelberg : Springer Berlin Heidelberg, 1970. – 175 p. – URL: <http://link.springer.com/10.1007/978-3-642-86659-3> (access date accessed: 17.04.2025).
47. Heck H. Chromosome study of members of the subfamilies *Caprinae* and *Bovinae*, family *Bovidae*; the Musk Ox, Ibex, Aoudad, Congoj buffalo and Gaur / H. Heck, D. Wurster, K. Benirschke // *Zeitschrift fur Saugetierkunde*. – 1968. – Vol. 33. – P. 172–179.

48. Mayr E. in Symposium on age of the distribution pattern of the gene arrangements in *Drosophila pseudoobscura* / E. Mayr, G. L. Stebbins, G. G. Simpson. – Ohio : Lloydia, 1945. – Vol. 8. – P. 69–108.
49. Darlington C. D. The Biology of Crossing-over // *Nature*. – 1937. – Vol. 140. № 3548. – P. 759–761.
50. Wu C. I. The genic view of the process of speciation / C. I. Wu // *Journal of Evolutionary Biology*. – 2001. – Vol. 14, № 6. – P. 851–865.
51. Sturtevant, A. H. The Effects of Unequal Crossing over at the Bar Locus in *Drosophila* // *Genetics*. – 1925. – Vol. 10, № 2. – P. 117–147.
52. Lahn B. T. Four Evolutionary Strata on the Human X Chromosome / B. T. Lahn, D. C. Page // *Science*. – 1999. – Vol. 286, № 5441. – P. 964–967.
53. Dobzhansky T. Genetics of Natural Populations. XVIII. Experiments on Chromosomes of *Drosophila Pseudoobscura* from Different Geographic Regions // *Genetics*. – 1948. – Vol. 33, № 6. – P. 588–602.
54. Dobzhansky T. Genetics of natural populations. XIX. Origin of heterosis through natural selection in populations of *Drosophila pseudoobscura* / T. Dobzhansky // *Genetics*. – 1950. – Vol. 35, № 3. – P. 288–302.
55. Turner T. L. Genomic Islands of Speciation in *Anopheles gambiae* / T. L. Turner, M. W. Hahn, S. V. Nuzhdin // *PLoS Biology*. – 2005. – Vol. 3, № 9. – P. e285.
56. Genetic association of physically unlinked islands of genomic divergence in incipient species of *Anopheles gambiae* / B. J. White, C. Cheng, F. Simard [et al.] // *Molecular Ecology*. – 2010. – Vol. 19, № 5. – P. 925–939.
57. Experimental Swap of *Anopheles gambiae*'s Assortative Mating Preferences Demonstrates Key Role of X-Chromosome Divergence Island in Incipient Sympatric Speciation / F. Aboagye-Antwi, N. Alhafez, G. D. Weedall [et al.] // *PLOS Genetics*. – 2015. – Vol. 11, № 4. – P. e1005141.
58. Chromosomal rearrangements maintain a polymorphic supergene controlling butterfly mimicry / M. Joron, L. Frezal, R. T. Jones [et al.] // *Nature*. – 2011. – Vol. 477, № 7363. – P. 203–206.

59. Tuttle E. M. Alternative reproductive strategies in the white-throated sparrow: behavioral and genetic evidence // *Behavioral Ecology*. – 2003. – Vol. 14, № 3. – P. 425–432.
60. Thorneycroft H. B. A Cytogenetic study of the white-throated sparrow, *zonotrichia albicollis* (Gmelin) // *Evolution*. – 1975. – Vol. 29, № 4. – P. 611–621.
61. The Chromosomal Polymorphism Linked to Variation in Social Behavior in the White-Throated Sparrow (*Zonotrichia albicollis*) Is a Complex Rearrangement and Suppressor of Recombination / J. W. Thomas, M. Cáceres, J. J. Lowman [et al.] // *Genetics*. – 2008. – Vol. 179, № 3. – P. 1455–1468.
62. Horton B. M. New insights into the hormonal and behavioural correlates of polymorphism in white-throated sparrows, *Zonotrichia albicollis* / B. M. Horton, I. T. Moore, D. L. Maney // *Animal Behaviour*. – 2014. – Vol. 93. – P. 207–219.
63. Maney D. L. Endocrine and genomic architecture of life history trade-offs in an avian model of social behavior // *General and Comparative Endocrinology*. – 2008. – Vol. 157, № 3. – P. 275–282.
64. Divergence and Functional Degradation of a Sex Chromosome-like Supergene / E. M. Tuttle, A. O. Bergland, M. L. Korody [et al.] // *Current Biology*. – 2016. – Vol. 26, № 3. – P. 344–350.
65. Disruptive selection on plumage coloration across genetically determined morphs / A. S. Grunst, M. L. Grunst, N. A. Rathbun [et al.] // *Animal Behaviour*. – 2017. – Vol. 124. – P. 97–108.
66. Thompson M. J. Supergenes and their role in evolution / M. J. Thompson, C. D. Jiggins // *Heredity*. – 2014. – Vol. 113, № 1. – P. 1–8.
67. Inside the supergene of the bird with four sexes / D. L. Maney, J. R. Merritt, M. R. Prichard [et al.] // *Hormones and Behavior*. – 2020. – Vol. 126. – P. 104850.
68. Дубинин Н. П. Зависимость действия гена от его положения в системе / Н. П. Дубинин, Б. Н. Сидоров // *Биологический журнал*. – 1934. – Т. 3, № 2. – С. 304–331.
69. Lewis E. B. The Phenomenon of Position Effect // *Advances in Genetics*. – 1950. – Vol. 3. – P. 73–115. – URL:

<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0065266008600838> (access date: 17.04.2025).

70. Baker W. K. Position-effect variegation // *Advances in Genetics*. – 1968. – Vol. 14. – P. 133–169.
71. Cytogenetic and molecular aspects of position effect variegation in *Drosophila melanogaster*: I. Morphology and genetic activity of the 2AB region in chromosome rearrangement T(1;2)dor var7 / I. F. Zhimulev, E. S. Belyaeva, O. V. Fomina [et al.] // *Chromosoma*. – 1986. – Vol. 94, № 6. – P. 492–504.
72. Eissenberg J. C. Boundary functions in the control of gene expression / J. C. Eissenberg, S. C. Elgin // *Trends in genetics*. – 1991. – Vol. 7, № 10. – P. 335–340.
73. Wu C. T. Transvection, nuclear structure, and chromatin proteins. / C. T. Wu // *The Journal of cell biology*. – 1993. – Vol. 120, № 3. – P. 587–590.
74. Демакова О. В. Цитогенетический анализ эффекта положения мозаичного типа и эффекта Дубинина у *Drosophila melanogaster* : дис. ... канд. биол. наук / О. В. Демакова. – Новосибирск, 1998. – 130 с.
75. Silver L. M. The peculiar journey of a selfish chromosome: mouse t haplotypes and meiotic drive // *Trends in Genetics*. – 1993. – Vol. 9, № 7. – P. 250–254.
76. Graves J. A. M. Sex Chromosome Specialization and Degeneration in Mammals // *Cell*. – 2006. – Vol. 124, № 5. – P. 901–914.
77. Wide genome comparisons reveal the origins of the human X chromosome / M. Kohn, H. Kehrer-Sawatzki, W. Vogel [et al.] // *Trends in genetics*. – 2004. – Vol. 20, № 12. – P. 598–603.
78. New Insights into the Man-Mouse Comparative Map of the X Chromosome / H. J. Blair, V. Reed, S. H. Laval, Y. Boyd // *Genomics*. – 1994. – Vol. 19, № 2. – P. 215–220.
79. Differentiation of Y Chromosome in the X₁X₁X₂X₂/X₁X₂Y Sex Chromosome System of *Hoplias malabaricus* (Characiformes, Erythrinidae) / R. Da Rosa, A. L. Laforga Vanzela, M. Rubert [et al.] // *Cytogenetic and Genome Research*. – 2009. – Vol. 127, № 1. – P. 54–60.

80. Doublesex is a mimicry supergene / K. Kunte, W. Zhang, A. Tenger-Trolander [et al.] // *Nature*. – 2014. – Vol. 507, № 7491. – P. 229–232.
81. Dopman E. B. Genetic mapping of sexual isolation between E and Z pheromone strains of the european corn Borer (*Ostrinia nubilalis*) / E. B. Dopman, S. M. Bogdanowicz, R. G. Harrison // *Genetics*. – 2004. – Vol. 167, № 1. – P. 301–309.
82. Dopman E. B. Components of reproductive isolation between North American pheromone strains of the European corn borer / E. B. Dopman, P. S. Robbins, A. Seaman // *Evolution; International Journal of Organic Evolution*. – 2010. – Vol. 64, № 4. – P. 881–902.
83. Hsu T. C. Chromosomal Evolution in the Genus *Peromyscus* (*Cricetidae*, *Rodentia*) / T. C. Hsu, F. E. Arrighi // *Cytogenetic and Genome Research*. – 1966. – Vol. 5, № 5. – P. 355–359.
84. Anderson W. W. Mating Pattern and Mating Success of *Drosophila pseudoobscura* Karyotypes in Large Experimental Populations / W. W. Anderson, P. R. McGuire // *Evolution*. – 1978. – Vol. 32, № 2. – C. 416.
85. Parsons P. A. Behavioural and ecological genetics : a study in *Drosophila*. Behavioural and ecological genetics / P. A. Parsons. – Oxford : Clarendon Press, 1973. – 223 p.
86. Wright S. Genetics of natural populations. XII. Experimental reproduction of some of the changes caused by natural selection in certain populations of *Drosophila pseudoobscura* / S. Wright, T. Dobzhansky // *Genetics*. – 1946. – Vol. 31, № 2. – P. 125–156.
87. Brncic D. Mating Activity of Homo- and Heterokaryotypes in *Drosophila Pavani* / D. Brncic, S. Koref-Santibañez // *Genetics*. – 1964. – Vol. 49, № 4. – P. 585–591.
88. Nevo E. Adaptive radiation of blind subterranean mole rats: naming and revisiting the four sibling species of the *spalax ehrenbergi* superspecies in Israel *spalax galili* (2n=52), *s. golani* (2n=54), *s. carmeli* (2n=58) and *s. judaei* (2n=60). Adaptive radiation of blind subterranean mole rats / E. Nevo, E. Ivanitskaya, A. Beiles. – Leiden : Backhuys, 2001. – 198 p.

89. Speciation and adaptive radiation of subterranean mole rats, *Spalax ehrenbergi* superspecies, in Jordan / E. Nevo, E. Ivanitskaya, M. G. Filippucci, A. Beiles // *Biological Journal of the Linnean Society*. – 2000. – Vol. 69, № 2. – P. 263–281.
90. Hooper D. M. Chromosomal inversion differences correlate with range overlap in passerine birds / D. M. Hooper, T. D. Price // *Nature Ecology & Evolution*. – 2017. – Vol. 1. № 10. – P. 1526–1534.
91. Price T. Speciation in birds / T. Price. – Greenwood Village : Roberts and Co, 2008. – 470 p.
92. Hooper D. M. Rates of karyotypic evolution in Estrildid finches differ between island and continental clades: chromosome inversions in finches / D. M. Hooper, T. D. Price // *Evolution*. – 2015. – Vol. 69, № 4. – P. 890–903.
93. Смирнов А. Ф. Молекулярно-генетические механизмы первичной детерминации пола у млекопитающих // *Соросовский образовательный журнал*. – 1997. – Т. 14, № 1. – С. 26–34.
94. Pieau C. Temperature variation and sex determination in reptiles // *BioEssays*. – 1996. – Vol. 18, № 1. – P. 19–26.
95. Wilson E. B. The Chromosomes in Relation to the Determination of Sex in Insects // *Science*. – 1905. – Vol. 22, № 564. – P. 500–502.
96. Muller H. J. A gene for the fourth chromosome of *Drosophila* // *Journal of Experimental Zoology*. – 1914. – Vol. 17, № 3. – P. 325–336.
97. Ohno S. Sex Chromosomes and Sex-Linked Genes : Monographs on Endocrinology / S. Ohno. – Berlin ; Heidelberg : Springer Berlin Heidelberg, 1967. – Vol. 1. – 192 p. – URL: <http://link.springer.com/10.1007/978-3-642-88178-7> (access date: 17.04.2025).
98. Nei M. Linkage modification and sex difference in recombination // *Genetics*. – 1969. – Vol. 63, № 3. – P. 681–699.
99. Charlesworth B. The degeneration of Y chromosomes / B. Charlesworth, D. Charlesworth // *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*. – 2000. – Vol. 355, № 1403. – P. 1563–1572.

100. Vallender E. J. Multiple independent origins of sex chromosomes in amniotes / E. J. Vallender, B. T. Lahn // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2006. – Vol. 103, № 48. – P. 18031–18032.
101. Bull J. J. Evolution of sex determining mechanisms : Evolution series / J. J. Bull. – London : Benjamin-Cummings, 1983. – Vol. 1. – 316 p.
102. Bone J. R. Dosage compensation regulatory proteins and the evolution of sex chromosomes in *Drosophila* / J. R. Bone, M. I. Kuroda // *Genetics*. – 1996. – Vol. 144, № 2. – P. 705–713.
103. Carvalho A. B. Y Chromosome of *D. pseudoobscura* Is Not Homologous to the Ancestral *Drosophila* Y / A. B. Carvalho, A. G. Clark // *Science*. – 2005. – Vol. 307, № 5706. – P. 108–110.
104. Yi S. Contrasting Patterns of Molecular Evolution of the Genes on the New and Old Sex Chromosomes of *Drosophila miranda* / S. Yi, B. Charlesworth // *Molecular Biology and Evolution*. – 2000. – Vol. 17, № 5. – P. 703–717.
105. Vicoso B. Reversal of an ancient sex chromosome to an autosome in *Drosophila* / B. Vicoso, D. Bachtrog // *Nature*. – 2013. – Vol. 499, № 7458. – P. 332–335.
106. Krivshenko J. New Evidence for the Homology of the Short Euchromatic Elements of the X and Y Chromosomes of *Drosophila Busckii* with the Microchromosome of *Drosophila Melanogaster* / J. Krivshenko // *Genetics*. – 1959. – Vol. 44, № 6. – P. 1027–1040.
107. Fraïsse C. The deep conservation of the Lepidoptera Z chromosome suggests a non-canonical origin of the W / C. Fraïsse, M. A. L. Picard, B. Vicoso // *Nature Communications*. – 2017. – Vol. 8, № 1. – P. 1486.
108. Vicoso B. Numerous Transitions of Sex Chromosomes in Diptera / B. Vicoso, D. Bachtrog // *PLOS Biology*. – 2015. – Vol. 13, № 4. – P. e1002078.
109. Traut W. Sex Chromosomes and Sex Determination in Lepidoptera / W. Traut, K. Sahara, F. Marec // *Sexual Development*. – 2007. – Vol. 1, № 6. – P. 332–346.
110. A biodiversity approach in the neotropical erythrinidae fish, *Hoplias malabaricus*. Karyotypic survey, geographic distribution of cytotypes and cytotaxonomic

considerations / L. A. Bertollo, G. G. Born, J. A. Dergam [et al.] // *Chromosome Research: An International Journal on the Molecular, Supramolecular and Evolutionary Aspects of Chromosome Biology*. – 2000. – Vol. 8, № 7. – P. 603–613.

111. Cioffi M. B. Initial steps in XY chromosome differentiation in *Hoplias malabaricus* and the origin of an X(1)X(2)Y sex chromosome system in this fish group / M. B. Cioffi, L. C. Bertollo // *Heredity*. – 2010. – Vol. 105, № 6. – P. 554–561.

112. Nouvelles données sur le déterminisme génétique et épigénétique de la monogénie chez le crustacé isopode terrestre *Armadillidium vulgare* Latr / J. J. Legrand, P. Juchault, G. Heily, C. Le Bote // *Genetics Selection Evolution*. – 1984. – Vol. 16, № 1. – P. 57.

113. Birth of a W sex chromosome by horizontal transfer of *Wolbachia* bacterial symbiont genome / S. Leclercq, J. Thézé, M. A. Chebbi [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2016. – Vol. 113, № 52. – P. 15036–15041.

114. The process of a Y-loss event in an XO/XO mammal, the Ryukyu spiny rat / A. Kuroiwa, Y. Ishiguchi, F. Yamada [et al.] // *Chromosoma*. – 2010. – Vol. 119, № 5. – P. 519–526.

115. Evidence for different origin of sex chromosomes in snakes, birds, and mammals and step-wise differentiation of snake sex chromosomes / K. Matsubara, H. Tarui, M. Toriba [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2006. – Vol. 103, № 48. – P. 18190–18195.

116. Mallery C. S. Um estudo de caso ligado ao sexo em *Python regius* (Serpentes: *Boidae*), com novas ideias sobre a determinação sexual em *Henophidia* / C. S. Mallery, M. M. Carrillo // *Phyllomedusa: Journal of Herpetology*. – 2016. – Vol. 15, № 1. – P. 29–42.

117. The Discovery of XY Sex Chromosomes in a Boa and Python / T. Gamble, T. A. Castoe, S. V. Nielsen [et al.] // *Current Biology*. – 2017. – Vol. 27, № 14. – P. 2148–2153.

118. Marais G. Sex chromosomes: how X-Y recombination stops / G. Marais, N. Galtier // *Current Biology*. – 2003. – Vol. 13, № 16. – P. R641–R643.

119. Genome sequence, comparative analysis and haplotype structure of the domestic dog / K. Lindblad-Toh, C. M. Wade, T. S. Mikkelsen [et al.] // *Nature*. – 2005. – Vol. 438, № 7069. – P. 803–819.
120. Ellegren H. The avian genome uncovered // *Trends in Ecology & Evolution*. – 2005. – Vol. 20, № 4. – P. 180–186.
121. Graves J. A. M. Avian sex, sex chromosomes, and dosage compensation in the age of genomics // *Chromosome Research: An International Journal on the Molecular, Supramolecular and Evolutionary Aspects of Chromosome Biology*. – 2014. – Vol. 22, № 1. – P. 45–57.
122. The molecular basis of chromosome orthologies and sex chromosomal differentiation in palaeognathous birds / C. Nishida-Umehara, Y. Tsuda, J. Ishijima [et al.] // *Chromosome Research*. – 2007. – Vol. 15, № 6. – P. 721–734.
123. Itoh Y. Disruption of FEM1C-W gene in zebra finch: evolutionary insights on avian ZW genes / Y. Itoh, K. Kampf, A. P. Arnold // *Chromosoma*. – 2009. – Vol. 118, № 3. – P. 323–334.
124. Complex evolutionary trajectories of sex chromosomes across bird taxa / Q. Zhou, J. Zhang, D. Bachtrog [et al.] // *Science*. – 2014. – Vol. 346, № 6215. – P. 1246338.
125. X Chromosome Evolution in Cetartiodactyla / A. Proskuryakova, A. Kulemzina, P. Perelman [et al.] // *Genes*. – 2017. – Vol. 8, № 9. – P. 216.
126. Roesti M. Recombination in the threespine stickleback genome—patterns and consequences / M. Roesti, D. Moser, D. Berner // *Molecular Ecology*. – 2013. – Vol. 22, № 11. – P. 3014–3027.
127. Ross J. A. Molecular Cytogenetic Evidence of Rearrangements on the Y Chromosome of the Threespine Stickleback Fish / J. A. Ross, C. L. Peichel // *Genetics*. – 2008. – Vol. 179, № 4. – P. 2173–2182.
128. Brashear W. A. Genomic architecture constrained placental mammal X Chromosome evolution / W. A. Brashear, K. R. Bredemeyer, W. J. Murphy // *Genome Research*. – 2021. – Vol. 31, № 8. – P. 1353–1365.
129. Exceptional conservation of horse–human gene order on X chromosome revealed by high-resolution radiation hybrid mapping / T. Raudsepp, E. J. Lee, S. R. Kata

[et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2004. – Vol. 101, № 8. – P. 2386–2391.

130. Dynamics of Mammalian Chromosome Evolution Inferred from Multispecies Comparative Maps / W. J. Murphy, D. M. Larkin, A. E. D. Wind [et al.] // *Science*. – 2005. – Vol. 309, № 5734. – P. 613–617.

131. Physical mapping of the elephant X chromosome: conservation of gene order over 105 million years / C. L. R. Delgado, P. D. Waters, C. Gilbert [et al.] // *Chromosome Research: An International Journal on the Molecular, Supramolecular and Evolutionary Aspects of Chromosome Biology*. – 2009. – Vol. 17, № 7. – C. 917–926.

132. Reorganization of the X chromosome in voles of the genus *Microtus* / N. B. Rubtsov, N. V. Rubtsova, O. V. Anopriyenko [et al.] // *Cytogenetic and Genome Research*. – 2002. – Vol. 99, № 1-4. – P. 323–329.

133. Chromosomal Evolution in Mole Voles *Ellobius* (*Cricetidae*, Rodentia): Bizarre Sex Chromosomes, Variable Autosomes and Meiosis / S. Matveevsky, O. Kolomiets, A. Bogdanov [et al.] // *Genes*. – 2017. – Vol. 8, № 11. – P. 306.

134. Turnover of mammal sex chromosomes in the Sry -deficient Amami spiny rat is due to male-specific upregulation of Sox9 / M. Terao, Y. Ogawa, S. Takada [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2022. – Vol. 119, № 49. – P. e2211574119.

135. Centromere repositioning in the X chromosome of XO/XO mammals, Ryukyu spiny rat / T. Kobayashi, F. Yamada, T. Hashimoto [et al.] // *Chromosome Research: An International Journal on the Molecular, Supramolecular and Evolutionary Aspects of Chromosome Biology*. – 2008. – Vol. 16, № 4. – P. 587–593.

136. Romanenko S. A. Non-Sciuriform Rodent Karyotypes in Evolution / S. A. Romanenko, V. Volobouev // *Cytogenetic and Genome Research*. – 2012. – Vol. 137, № 2-4. – P. 233–245.

137. Chromosome Polymorphism in *Microtus* (*Alexandromys*) *mujanensis* (Arvicolinae, Rodentia) / N. A. Lemskaya, I. V. Kartavtseva, N. V. Rubtsova [et al.] // *Cytogenetic and Genome Research*. – 2015. – Vol. 146, № 3. – P. 238–242.

138. Extensive Sex Chromosome Polymorphism of *Microtus thomasi*/*Microtus atticus* Species Complex Associated with Cryptic Chromosomal Rearrangements and Independent Accumulation of Heterochromatin / M. T. Rovatsos, J. A. Marchal, I. Romero-Fernández [et al.] // *Cytogenetic and Genome Research*. – 2017. – Vol. 151, № 4. – P. 198–207.
139. Evolutionary rearrangements of X chromosomes in voles (*Arvicolinae*, Rodentia) / S. A. Romanenko, Y. E. Fedorova, N. A. Serdyukova [et al.] // *Scientific Reports*. – 2020. – Vol. 10, № 1. – P. 13235.
140. Singh L. Satellite DNA and evolution of sex chromosomes / L. Singh, I. F. Purdom, K. W. Jones // *Chromosoma*. – 1976. – Vol. 59, № 1. – P. 43–62.
141. Bridges C. B. Sex in Relation to Chromosomes and Genes // *The American Naturalist*. – 1925. – Vol. 59, № 661. – P. 127–137.
142. Wadsworth C. B. A recombination suppressor contributes to ecological speciation in *OSTRINIA* moths / C. B. Wadsworth, X. Li, E. B. Dopman // *Heredity*. – 2015. – Vol. 114, № 6. – P. 593–600.
143. A combination of sexual and ecological divergence contributes to rearrangement spread during initial stages of speciation / G. M. Kozak, C. B. Wadsworth, S. C. Kahne [et al.] // *Molecular Ecology*. – 2017. – Vol. 26, № 8. – P. 2331–2347.
144. A sex-chromosome inversion causes strong overdominance for sperm traits that affect siring success / U. Knief, W. Forstmeier, Y. Pei [et al.] // *Nature Ecology & Evolution*. – 2017. – Vol. 1, № 8. – P. 1177–1184.
145. Charlesworth B. The evolution of sex chromosomes // *Science*. – 1991. – Vol. 251, № 4997. – P. 1030–1033.
146. Haldane J. B. S. Sex ratio and unisexual sterility in hybrid animals // *Journal of Genetics*. – 1922. – Vol. 12, № 2. – P. 101–109.
147. Coyne J. A. «Two Rules of Speciation» revisited // *Molecular Ecology*. – 2018. – Vol. 27, № 19. – P. 3749–3752.
148. Presgraves D. C. Sex chromosomes and speciation in *Drosophila* // *Trends in Genetics*. – 2008. – Vol. 24, № 7. – P. 336–343.

149. Masly J. P. High-Resolution Genome-Wide Dissection of the Two Rules of Speciation in *Drosophila* / J. P. Masly, D. C. Presgraves // *PLoS Biology*. – 2007. – Vol. 5, № 9. – P. e243.
150. Presgraves D. C. Evaluating genomic signatures of “ the large X- effect” during complex speciation // *Molecular Ecology*. – 2018. – Vol. 27, № 19. – P. 3822–3830.
151. Mrongovius M. J. Cytogenetics of the hybrids of three members of the grasshopper genus *Vandiemenella* (Orthoptera: *Eumastacidae*: *Morabinae*) // *Chromosoma*. – 1979. – Vol. 71, № 1. – P. 81–107.
152. Bugrov A. G. Interpopulation sex-chromosomes polymorphism in the grasshopper *Podisma sapporensis* Shir. from Sakhalin and the Kurile Islands // *Folia Biologica*. – 1995 – Vol. 43. – C. 51–53.
153. Chromosome polymorphism and C-banding variation of the brachypterous grasshopper *Podisma sapporensis* Shir. (Orthoptera, *Acrididae*) in Hokkaido, northern Japan / A. G. Bugrov, E. Warchałowska-Sliwa, H. Tatsuta, S. Akimoto // *Folia Biologica*. – 2001. – Vol. 49, № 3-4. – P. 137–152.
154. Good J. M. A complex genetic basis to X-linked hybrid male sterility between two species of house mice / J. M. Good, M. D. Dean, M. W. Nachman // *Genetics*. – 2008. – Vol. 179, № 4. – P. 2213–2228.
155. Payseur B. A. Differential patterns of introgression across the x chromosome in a hybrid zone between two species of house mice / B. A. Payseur, J. G. Krenz, M. W. Nachman // *Evolution*. – 2004. – Vol. 58, № 9. – P. 2064–2078.
156. Genetic analysis of X-linked hybrid sterility in the house mouse / R. Storchov, S. Gregorov, D. Buckiov [et al.] // *Mammalian Genome*. – 2004. – Vol. 15, № 7. – 515–524. – URL: <http://link.springer.com/10.1007/s00335-004-2386-0> (access date: 17.04.2025).
157. Krzywinski J. Molecular systematics of *Anopheles*: from subgenera to subpopulations / J. Krzywinski, N. J. Besansky // *Annual Review of Entomology*. – 2003. – Vol. 48. – P. 111–139.

158. Manguin S. Biodiversity of malaria in the world / S. Manguin. – Paris : John Libbey Eurotext, 2008. – 428 p.
159. Harbach R. E. The Phylogeny and Classification of *Anopheles* // *Anopheles* mosquitoes : New insights into malaria vectors / ed. S. Manguin. – London : InTech, 2013. – P. 1–55. – URL: <http://www.intechopen.com/books/anopheles-mosquitoes-new-insights-into-malaria-vectors/the-phylogeny-and-classification-of-anopheles> (access date: 17.04.2025).
160. Harbach R. E. Phylogeny and classification of the *Culicidae* (Diptera) / R. E. Harbach, I. J. Kitching // *Systematic Entomology*. – 1998. – Vol. 23, № 4. – P. 327–370.
161. Harbach R. E. Subgenus *Anopheles* classification // Mosquito Taxonomic Inventory. – [S. l.], 2022. – URL: http://mosquito-taxonomic-inventory.info/sites/mosquito-taxonomic-inventory.info/files/Subgenus%20Anopheles%20classification_18.pdf (access date: 10.01.2023).
162. Harbach R. E. Reconsideration of anopheline mosquito phylogeny (Diptera: *Culicidae: Anophelinae*) based on morphological data / R. E. Harbach, I. J. Kitching // *Systematics and Biodiversity*. – 2005. – Vol. 3, № 4. – P. 345–374.
163. Zavortink T. J. Mosquito studies (Diptera, *Culicidae*) XXIX. A review of the subgenus *Kerteszia* of *Anopheles* // *Contributions of the American Entomological Institute*. – 1973. – Vol. 9, № 3. – P. 1–54.
164. White G. B. Systematic reappraisal of the *Anopheles maculipennis* complex // *Mosquito Systematics*. – 1978. – Vol. 10, № 1. – P. 13–44.
165. Linton Y. M. Observations on the taxonomic status of *Anopheles subalpinus* Hackett & Lewis and *An. melanoon* Hackett / Y. M. Linton, L. Smith, R. E. Harbach // *European Mosquito Bulletin*. – 2002. – № 13. – P. 1–7.
166. Инверсионный полиморфизм у малярийного комара *Anopheles Messiae* . I. Распространение инверсий по ареалу вида / В. Н. Стегний, В. М. Кабанова, Ю. М. Новиков, Г. Н. Плешкова // *Генетика*. – 1976. – Т. 12. – С. 47–55.

167. The *Anopheles maculipennis* complex (Diptera: *Culicidae*) in Iran: molecular characterization and recognition of a new species / M. M. Sedaghat, Y. M. Linton, M. A. Oshaghi [et al.] // *Bulletin of Entomological Research*. – 2003. – Vol. 93, № 6. – P. 527–535.
168. Harbach R. E. The classification of genus *Anopheles* (Diptera: *Culicidae*): a working hypothesis of phylogenetic relationships // *Bulletin of Entomological Research*. – 2004. – Vol. 94, № 6. – P. 537–553.
169. Kitzmiller J. B. Genetics, Cytogenetics, and Evolution of Mosquitoes // *Advances in Genetics*. – 1976. – Vol. 18. – P. 315–433. – URL: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0065266008604411> (access date: 17.04.2025).
170. Kitzmiller J. B. The Salivary Chromosomes Of *Anopheles earlei* / J. B. Kitzmiller, R. H. Baker // 5. – 1965. – Vol. 7, № 2. – P. 275–283.
171. Sharakhov I. V. Chromosome evolution in malaria mosquitoes inferred from physically mapped genome assemblies / I. V. Sharakhov, G. N. Artemov, M. V. Sharakhova // *Journal of Bioinformatics and Computational Biology*. – 2016. – Vol. 14, № 02. – P. 1630003.
172. Complexities in the genetic structure of *Anopheles gambiae* populations in west Africa as revealed by microsatellite DNA analysis / G. C. Lanzaro, Y. T. Touré, J. Carnahan [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 1998. – Vol. 95, № 24. – P. 14260–14265.
173. Ecological niche partitioning between *Anopheles gambiae* molecular forms in Cameroon: the ecological side of speciation / F. Simard, D. Ayala, G. Kamdem [et al.] // *BMC Ecology*. – 2009. – Vol. 9, № 1. – P. 17.
174. Inversion 2La is associated with enhanced desiccation resistance in *Anopheles gambiae* / E. M. Gray, K. A. C. Rocca, C. Costantini, N. J. Besansky // *Malaria Journal*. – 2009. – Vol. 8. – P. 215.
175. Chromosomal plasticity and evolutionary potential in the malaria vector *Anopheles gambiae sensu stricto*: insights from three decades of rare paracentric

inversions / M. Pombi, B. Caputo, F. Simard [et al.] // *BMC Evolutionary Biology*. – 2008. – Vol. 8, № 1. – P. 309.

176. A standard cytogenetic map for *Anopheles sinensis* and chromosome arm homology between the subgenera *Anopheles* and *Cellia* / J. Liang, M. V. Sharakhova, Q. Lan [et al.] // *Medical and Veterinary Entomology*. – 2014. – Vol. 28, № S1. – P. 26–32.

177. *Anopheles darlingi* polytene chromosomes: revised maps including newly described inversions and evidence for population structure in Manaus / A. J. Cornel, K. K. Brisco, W. P. Tadei [et al.] // *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*. – 2016. – Vol. 111, № 5. – P. 335–346.

178. The Physical Genome Mapping of *Anopheles albimanus* Corrected Scaffold Misassemblies and Identified Interarm Rearrangements in Genus *Anopheles* / G. N. Artemov, A. N. Peery, X. Jiang [et al.] // *G3 Genes/Genomes/Genetics*. – 2017. – Vol. 7, № 1. – P. 155–164.

179. Kreutzer R. D. Inversion polymorphism in the salivary gland chromosomes of *Anopheles darlingi* Root. / R. D. Kreutzer, J. B. Kitzmiller, E. Ferreira // *Mosquito News*. – 1972. – Vol. 32. – P. 555–565.

180. Salivary Polytene Chromosome Map of *Anopheles darlingi*, the Main Vector of Neotropical Malaria / M. S. Rafael, C. Rohde, L. C. Bridi [et al.] // *The American Society of Tropical Medicine and Hygiene*. – 2010. – Vol. 83, № 2. – P. 241–249.

181. Charlwood J. Biological variation in *Anopheles darlingi* root // *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. – 1996. – Vol. 91, № 4. – P. 391–398.

182. A Physical Map for an Asian Malaria Mosquito, *Anopheles stephensi* / M. V. Sharakhova, A. Xia, Z. Tu [et al.] // *The American Society of Tropical Medicine and Hygiene*. – 2010. – Vol. 83, № 5. – P. 1023–1027.

183. Cytogenetic map for *Anopheles nili*: Application for population genetics and comparative physical mapping / M. V. Sharakhova, C. Antonio-Nkondjio, A. Xia [et al.] // *Infection, Genetics and Evolution*. – 2011. – Vol. № 4. – P. 746–754.

184. A global map of dominant malaria vectors / M. E. Sinka, M. J. Bangs, S. Manguin [et al.] // *Parasites & Vectors*. – 2012. – Vol. 5, № 1. – P. 69.
185. Chromosome-level genome assemblies of the malaria vectors *Anopheles coluzzii* and *Anopheles arabiensis* / A. Zamyatin, P. Avdeyev, J. Liang [et al.] // *GigaScience*. – 2021. – Vol. 10, № 3. – P. 1–16.
186. Stable Chromosomal Inversion Polymorphisms and Insecticide Resistance in the Malaria Vector Mosquito *Anopheles gambiae* (Diptera: *Culicidae*) / B. D. Brooke, R. H. Hunt, F. Chandre [et al.] // *Journal of Medical Entomology*. – 2002. – Vol. 39, № 4. – P. 568–573.
187. Molecular identification of Palearctic members of *Anopheles maculipennis* in northern Iran / N. D. Djadid, S. Gholizadeh, E. Tafsiri [et al.] // *Malaria Journal*. – 2007. – Vol. 6, № 1. – P. 6.
188. The dominant *Anopheles* vectors of human malaria in Africa, Europe and the Middle East: occurrence data, distribution maps and bionomic précis / M. E. Sinka, M. J. Bangs, S. Manguin [et al.] // *Parasites & Vectors*. – 2010. – Vol. 3, № 1. – P. 117.
189. [The distribution of the mosquitoes of the *Anopheles maculipennis* complex (Diptera, *Culicidae*, *Anophelinae*) in Central Asia] / A. B. Zvantsov, M. I. Gordeev, I. I. Goriacheva, M. N. Ezhov // *Meditssinskaia Parazitologiya i Parazitarnye Bolezni*. – 2014. – № 4. – P. 19–23.
190. Distribution of *Anopheles daciae* and other *Anopheles maculipennis* complex species in Serbia / M. Kavran, M. Zgomba, T. Weitzel [et al.] // *Parasitology Research*. – 2018. – Vol. 117, № 10. – P. 3277–3287.
191. Пространственно-временные изменения частот хромосомных инверсий по ареалу малярийного комара *Anopheles messeae* Fall. (*Culicidae*) за 40-летний период мониторинга / В. Н. Стегний, А. О. Пищелко, А. К. Сибатаев, Г. Абылкасымова // *Генетика*. – 2016. – Т. 52, № 6. – С. 664–671.
192. Стегний В. Н. Реорганизация видовых геномов при эволюционной специализации таксонов // *Успехи современной биологии*. – 2017. – Т. 137, № 3. – С. 227–236.

193. Novikov Y. M. Cryptic species of *Anopheles messeae sensu lato* (Diptera: Culicidae), their identification, features and nomenclature / Y. M. Novikov, A. I. Shevchenko // *Vestnik Tomskogo gosudarstvennogo universiteta. Biologiya*. – 2020. – № 51. – P. 69–85.
194. Stegnyy V. N. Cytogenetic analysis and distribution of *Anopheles beklemishevi* / V. N. Stegnyy, I. M. Novikov, V. M. Kabanova // *Zoological Journal*. – 1978. – Vol. 57, № 6. – P. 873–876.
195. Chromosome and Genome Divergence between the Cryptic Eurasian Malaria Vector-Species *Anopheles messeae* and *Anopheles daciae* / A. N. Naumenko, D. A. Karagodin, A. A. Yurchenko [et al.] // *Genes*. – 2020. – Vol. 11, № 2. – P. 165.
196. Andolfatto P. Unusual Haplotype Structure at the Proximal Breakpoint of In(2L)t in a Natural Population of *Drosophila melanogaster* / P. Andolfatto, J. D. Wall, M. Kreitman // *Genetics*. – 1999. – Vol. 153, № 3. – P. 1297–1311.
197. Corbett-Detig R. B. Sequence-Based Detection and Breakpoint Assembly of Polymorphic Inversions / R. B. Corbett-Detig, C. Cardeno, C. H. Langley // *Genetics*. – 2012. – Vol. 192, № 1. – P. 131–137.
198. Principles of Genome Evolution in the *Drosophila melanogaster* Species Group / J. M. Ranz, D. Maurin, Y. S. Chan [et al.] // *PLoS Biology*. – 2007. – Vol. 5, № 6. – P. 152.
199. Breakpoint structure reveals the unique origin of an interspecific chromosomal inversion (2La) in the *Anopheles gambiae* complex / I. V. Sharakhov, B. J. White, M. V. Sharakhova [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2006. – Vol. 103, № 16. – P. 6258–6262.
200. Breakpoint structure of the *Anopheles gambiae* 2Rb chromosomal inversion / N. F. Lobo, D. M. Sangaré, A. A. Regier [et al.] // *Malaria Journal*. – 2010. – Vol. 9, № 1. – P. 293.
201. Fine-Mapping Complex Inversion Breakpoints and Investigating Somatic Pairing in the *Anopheles gambiae* Species Complex Using Proximity-Ligation Sequencing / R. B. Corbett-Detig, I. Said, M. Calzetta [et al.] // *Genetics*. – 2019. – Vol. 213, № 4. – P. 1495–1511.

202. Segmental Duplication Implicated in the Genesis of Inversion 2Rj of *Anopheles gambiae* / M. B. Coulibaly, N. F. Lobo, M. C. Fitzpatrick [et al.] // *PLoS ONE*. – 2007. – Vol. 2, № 9. – P. e849.
203. Cloning of inversion breakpoints in the *Anopheles gambiae* complex traces a transposable element at the inversion junction / K. D. Mathiopoulos, A. Della Torre, V. Predazzi [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 1998. – Vol. 95, № 21. – P. 12444–12449.
204. Are chromosomal inversions induced by transposable elements? A paradigm from the malaria mosquito *Anopheles gambiae* / K. D. Mathiopoulos, A. Torre, F. Santolamazza [et al.] // *Parassitologia*. – 1999. – Vol. 41, № 1-3. – P. 119–123.
205. Pegasus, a small terminal inverted repeat transposable element found in the white gene of *Anopheles gambiae* / N. J. Besansky, O. Mukabayire, J. A. Bedell, H. Lusz // *Genetica*. – 1996. – Vol. 98. – № 2. – P. 119–129.
206. The Genome Sequence of the Malaria Mosquito *Anopheles gambiae* / R. A. Holt, G. M. Subramanian, A. Halpern [et al.] // *Science*. – 2002. – Vol. 298, № 5591. – P. 129–149.
207. Beebe N. W. Discrimination of all Members of the *Anopheles punctulatus* Complex by Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis / N. W. Beebe, A. Saul // *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. – 1995. – Vol. 53, № 5. – P. 478–481.
208. Dynamics of Malaria Mosquito Species Composition in Siberian Populations Detected by Restriction Analysis / O. V. Vaulin, D. A. Karagodin, I. K. Zakharov, E. M. Baricheva // *Russian Journal of Genetics*. – 2018. – Vol. 54, № 7. – P. 838–847.
209. Two Nested Inversions in the X Chromosome Differentiate the Dominant Malaria Vectors in Europe, *Anopheles atroparvus* and *Anopheles messeae* / E. S. Soboleva, K. M. Kirilenko, V. S. Fedorova [et al.] // *Insects*. – 2024. – Vol. 15, № 5. – P. 312.

210. VEuPathDB: the eukaryotic pathogen, vector and host bioinformatics resource center / B. Amos, C. Aurrecoechea, M. Barba et al. // *Nucleic Acids Research*. – 2022. – Vol. 50, № D1. – P. D898–D911.
211. BEDOPS: high-performance genomic feature operations / S. Neph, M. S. Kuehn, A. P. Reynolds [et al.] // *Bioinformatics*. – 2012. – Vol. 28, № 14. – P. 1919–1920.
212. RepeatModeler2 for automated genomic discovery of transposable element families / J. M. Flynn, R. Hubley, C. Goubert [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2020. – Vol. 117, № 17. – P. 9451–9457.
213. VectorBase.org updates: bioinformatic resources for invertebrate vectors of human pathogens and related organisms / G. I. Giraldo-Calderón, O. S. Harb, S. A. Kelly [et al.] // *Current Opinion in Insect Science*. – 2022. – Vol. 50. – P. 100860.
214. The Species-Specific Inversion Polymorphism of the X Chromosome in *Anopheles messeae* and *Anopheles daciae* Is Based on the Common Ancestral Variant X1 / E. S. Soboleva, M. V. Sharakhova, I. V. Sharakhov, G. N. Artemov // *Genes*. – 2025. – Vol. 17, № 1. – P. 5.
215. *Anopheles* mosquitoes reveal new principles of 3D genome organization in insects / V. Lukyanchikova, M. Nuriddinov, P. Belokopytova [et al.] // *Nature Communications*. – 2022. – Vol. 13, № 1. – P. 1960.
216. Ayala D. Reproductive isolation and local adaptation quantified for a chromosome inversion in a malaria mosquito: quantifying selection on an inversion / D. Ayala, R. F. Guerrero, M. Kirkpatrick // *Evolution*. – 2013. – Vol. 67, № 4. – P. 946–958.
217. The Impact of Chromosomal Rearrangements in Speciation: From Micro- to Macroeolution / K. Lucek, M. D. Giménez, M. Joron [et al.] // *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. – 2023 – Vol. 15, № 11. – P. a041447.
218. Complex evolutionary processes maintain an ancient chromosomal inversion / P. Nosil, V. Soria-Carrasco, R. Villoutreix [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2023. – Vol. 120, № 25. – P. e2300673120.

219. Climatic adaptation of chromosomal inversions in *Drosophila subobscura* / M. Galludo, J. Canals, L. Pineda-Cirera [et al.] // *Genetica*. – 2018. – Vol. 146, № 4-5. – P. 433–441.
220. Rapid and Repeated Climate Adaptation Involving Chromosome Inversions following Invasion of an Insect / L. J. Ma, L. J. Cao, J. C. Chen [et al.] // *Molecular Biology and Evolution*. – 2024. – Vol. 41, № 3. – P. 1–15.
221. Inversions and Gene Order Shuffling in *Anopheles gambiae* and *A. funestus* / I. V. Sharakhov, A. C. Serazin, O. G. Grushko [et al.] // *Science*. – 2002. – Vol. 298, № 5591. – P. 182–185.
222. Genome Landscape and Evolutionary Plasticity of Chromosomes in Malaria Mosquitoes / A. Xia, M. V. Sharakhova, S. C. Leman [et al.] // *PLoS ONE*. – 2010. – Vol. 5, № 5. – P. e10592.
223. Genome analysis of a major urban malaria vector mosquito, *Anopheles stephensi* / X. Jiang, A. Peery, A. B. Hall [et al.] // *Genome Biology*. – 2014. – Vol. 15, № 9. – P. 459.
224. Charlesworth B. The Relative Rates of Evolution of Sex Chromosomes and Autosomes / B. Charlesworth, J. A. Coyne, N. H. Barton // *The American Naturalist*. – 1987. – Vol. 130, № 1. – P. 113–146.
225. Inversion breakpoints and the evolution of supergenes / R. Villoutreix, D. Ayala, M. Joron [et al.] // *Molecular Ecology*. – 2021. – Vol. 30, № 12. – P. 2738–2755.
226. Астахов В. И. Начала четвертичной геологии : учеб/ пособие / В. И. Астахов. – СПб. : СПбГУ, 2008. – 222 с.
227. Ling, A. Insertion Sequence Inversions Mediated by Ectopic Recombination between Terminal Inverted Repeats / A. Ling, R. Cordaux // *PLoS ONE*. – 2010. – Vol. 5. – № 12. – P. e15654.
228. Segmental duplication, microinversion, and gene loss associated with a complex inversion breakpoint region in *Drosophila* / O. Calvete, J. González, E. Betrán, A. Ruiz // *Molecular Biology and Evolution*. – 2012. – Vol. 29, № 7. – P. 1875–1889.
229. The genome trilogy of *Anopheles stephensi*, an urban malaria vector, reveals structure of a locus associated with adaptation to environmental heterogeneity /

A. Thakare, C. Ghosh, T. Alalamath [et al.] // *Scientific Reports*. – 2022. – Vol. 12, № 1. – P. 3610.

230. Evolutionary Dynamics of the Ty3/Gypsy LTR Retrotransposons in the Genome of *Anopheles gambiae* / J. M. C. Tubio, M. Tojo, L. Bassaganyas [et al.] // *PLoS ONE*. – 2011. – Vol. 6, № 1. – P. e16328.

231. Kapitonov V. V. Rolling-circle transposons in eukaryotes / V. V. Kapitonov, J. Jurka // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2001. – Vol. 98, № 15. – P. 8714–8719.

232. Feschotte C. DNA transposons and the evolution of eukaryotic genomes / C. Feschotte, E. J. Pritham // *Annual Review of Genetics*. – 2007. – Vol. 41. – P. 331–368.

233. Ruiz-Herrera A. Is mammalian chromosomal evolution driven by regions of genome fragility? / A. Ruiz-Herrera, J. Castresana, T. J. Robinson // *Genome Biology*. – 2006. – Vol. 7, № 12. – P. R115.

234. Evolution of gene regulation in ruminants differs between evolutionary breakpoint regions and homologous synteny blocks / M. Farré, J. Kim, A. A. Proskuryakova [et al.] // *Genome Research*. – 2019. – Vol. 29, № 4. – P. 576–589.

235. Structural variants exhibit widespread allelic heterogeneity and shape variation in complex traits / M. Chakraborty, J. J. Emerson, S. J. Macdonald, A. D. Long // *Nature Communications*. – 2019. – Vol. 10, № 1. – P. 4872.

236. Cáceres M. Molecular characterization of two natural hotspots in the *Drosophila buzzatii* genome induced by transposon insertions / M. Cáceres, M. Puig, A. Ruiz // *Genome Research*. – 2001. – Vol. 11, № 8. – P. 1353–1364.

237. Casals F. The foldback-like transposon Galileo is involved in the generation of two different natural chromosomal inversions of *Drosophila buzzatii* / F. Casals, M. Cáceres, A. Ruiz // *Molecular Biology and Evolution*. – 2003. – Vol. 20, № 5. – P. 674–685.

238. The Structure and Population Genetics of the Breakpoints Associated With the Cosmopolitan Chromosomal Inversion In(3R)Payne in *Drosophila melanogaster* /

L. M. Matzkin, T. J. S. Merritt, C. T. Zhu, W. F. Eanes // *Genetics*. – 2005. – Vol. 170, № 3. – P. 1143–1152.

239. Comparative genome sequencing of *Drosophila pseudoobscura* : Chromosomal, gene, and cis -element evolution / S. Richards, Y. Liu, B. R. Bettencourt [et al.] // *Genome Research*. – 2005. – Vol. 15, № 1. – P. 1–18.

240. Preferential transposition of *Drosophila* P elements to nearby chromosomal sites. / J. Tower, G. H. Karpen, N. Craig, A. C. Spradling // *Genetics*. – 1993. – Vol. 133, № 2. – P. 347–359.

241. Gray Y. H. It takes two transposons to tango: transposable-element-mediated chromosomal rearrangements // *Trends in genetics*. – 2000. – Vol. 16, № 10. – P. 461–468.

242. Kidwell M. G. Perspective: transposable elements, parasitic DNA, and genome evolution / M. G. Kidwell, D. R. Lisch // *Evolution; International Journal of Organic Evolution*. – 2001. – Vol. 55, – № 1. – P. 1–24.

243. Feschotte C. Plant transposable elements: where genetics meets genomics / C. Feschotte, N. Jiang, S. R. Wessler // *Nature Reviews. Genetics*. – 2002. – Vol. 3, № 5. – P. 329–341.

244. Kirkpatrick M. How and Why Chromosome Inversions Evolve // *PLoS Biology*. – 2010. – Vol. 8, № 9. – P. e1000501.

245. Schwander T. Supergenes and Complex Phenotypes / T. Schwander, R. Libbrecht, L. Keller // *Current Biology*. – 2014. – Vol. 24, № 7. – P. R288–R294.

Приложение А

Перечень маркерных генов, использованных при картировании инверсий

Таблица А.1 – Маркерные гены *An. atroparvus*, использованные для картирования точек разрывов фиксированных перестроек X-хромосомы у *An. messeae*

№	ID гена	Последовательность праймеров (5' - 3')	Геномные координаты в AatrE3_X:		Хромосомный район	
			начало	конец	<i>An. atroparvus</i>	<i>An. messeae</i>
1	AATE008844	agttcgtgactcgtcagggtg tgctgttgctgtcgttttcg	1,447,542	1,458,895(+)	1B	1B
2	AATE011784	tgtttaacctcgtcgttg ggtacttcgagtcgttg	1,463,880	1,465,754(+)	1B	MC*
3	AATE016042	ttgctcttaggttcggaatg gggctatgttactgggtcta	1,465,925	1,468,608(-)	1B	4B
4	AATE002683	tctcacttttcgttaagccc cagctcgtggtagtagaaca	1,474,565	1,477,429(-)	1B	4B
5	AATE009927	caggctaggcgtgaaaaat catactggcgtcttatgcac	1,503,333	1,512,052(+)	1B	4B
6	AATE012122	tgtgacgaactttaccggg gcgactgatgacgatga	1,514,581	1,519,283(-)	1B	4B
7	AATE009073	acttcgatcgcgtcctc cttcggcgacggagta	1,564,139	1,566,618(+)	1B	4B
8	AATE013780	ccagtgaggcggagctaaatc ggatggactgtatcggctgt	1,629,871	1,633,254(+)	1B	4B
9	AATE016081	tcgagtgccggtgatataag agggagtatcacatgacgg	1,978,577	1,981,869(+)	1B	4B
10	AATE020982	tgcatagtgaagacaccctc agacctagcatatgccag	1,983,088	1,985,780(+)	1B	4B
11	AATE016478	cctctcatcatgcggaaaaa catacgacatgctggatcg	1,988,001	1,992,840(-)	1B	4B
12	AATE020848	tcacaagcgtacgagtacat cattgctcagtaaaccggag	1,999,834	2,001,318(+)	1B	1C
13	AATE001684	acgggtgtgaactcctaatac cagaatgtcctcgatcgtct	2,012,649	2,015,622(-)	1B	1C
14	AATE002246	agaaagggaggctactacga ggaaatcgtcgtagcggaaa	2,028,585	2,041,909(-)	1B	1C
15	AATE017108	gatcgtgcaggcacagtcta tgcgtagatcgaacaagtcg	2,352,907	2,358,255(+)	1C	1C
16	AATE008369	ggtttctccagcccgtactc gatgggtgctgcagggtgtag	11,111,502	11,114,625(+)	3B	3B
17	AATE002004	atgtcctccctgatacagag taacgtggcattaccattg	12,042,801	12,043,277(-)	3C	4A
18	AATE005108	aagtgtgtcggtcacgagtc ggacggcacgatctaagagg	12,069,346	12,075,734(+)	3C	MC*
19	AATE002819	cgcagcttaacatctcgtc ccattggaagccattggtag	12,312,468	12,315,265(-)	3C	4A
20	AATE000407	gtcatctcgcacatactgtt tatcactaaggtaggcggtt	12,347,972	12,350,706(-)	3C	4A
21	AATE002183	catcagcgtgttctcgttac cagtagcgactccttgagac	12,360,652	12,374,345(-)	3C	1C
22	AATE005101	ctgcctagagacgatccg gctagcgttcacaacatcc	12,383,120	12,391,835(+)	3C	1C

Продолжение таблицы А1

23	AATE016801	cgctcagaagctcgatccat tattctgccgatccagcgac	13,084,169	13,097,940(+)	3C	3C
24	AATE009941	cgctgttccgtgattttctac cttctcccaccgttcgag	13,261,242	13,265,420(+)	4A	1C
25	AATE016644	gctgttcaacctgatcgac gaagtgccttataggagtcgtg	13,405,667	13,414,963(+)	4A	1C
26	AATE003509	catatcgccgagcatcac ccgacttgaccgtttctatg	13,604,821	13,616,218(-)	4A	1B
27	AATE015407	gtacaacctggacgtgtttg gcattcgttggaagaagt	14,122,043	14,125,830(+)	4A	1B
28	AATE011319	cctgttgcaatggcttact tttgatccatggacgacgg	14,267,272	14,271,819(+)	4A	1B
29	AATE004133	cttctatcaactcgactcgg tacttcgggaagagctagg	14,442,250	14,444,588(-)	4A	1B
30	AATE004183	agaataacaagagtgcggc ggatgagcgagaggaaaaa	14,480,893	14,510,197(+)	4A	1B
31	AATE009858	gcaccgcgcaagaaga gcacgaagctgcggaa	14,520,988	14,521,746(+)	4A	4B
32	AATE021145	gtgaagaaccagacgcttac aggaagtacggatagttcgg	14,584,043	14,588,240(-)	4A	4B
33	AATE007306	ccatgtcgttgctgattagg tcgttcgtgtactgctctat	14,680,861	14,684,961(+)	4A	4B
34	AATE005256	gactacgtgatacagatcgc tggtccttgccgtagtag	14,795,318	14,811,135(-)	4A	4B

Таблица А.2 – Маркерные гены *An. atroparvus*, использованные для картирования точек разрывов полиморфных перестроек X-хромосомы у *An. messeae* и *An. daciae*, с использованием сборки AatrE3

№	ID гена	Последовательность праймеров (5' - 3')	Геномные координаты в AatrE3 X:		Хромосомный район	
			начало	конец	An. messeae X1	An. mes/dac X2/X0
ДНК-маркеры для An. messeae X2						
1	AATE020937	ttttcttgcgcgaagctgac gaacaggcagcacaaccag	13,164,49	13,186,382(+)	1C	4B
2	AATE005475	cccgtccttttctcctaca ttgattttctgtcgtgccg	13,236,449	13,246,292(-)	1C	4B
ДНК-маркеры для An. daciae X0						
3	AATE021012	ctgaatgggttcgactgt gagtgcgctatcggaaa	4,398,009	4,404,032(-)	2A	2A
4	AATE006112	ctctcaagaactgcctaac tcagttttccgttgactcg	4,410,821	4,414,953(+)	2A	не удалось картировать
5	AATE013223	gagaagcgaaggacgaga ctcgcggtagagcctataa	4,528,886	4,534,883(+)	2A	переместился в 3R плечо
6	AATE009672	gatcgacatgggtgctgtc gtcaccttctcgtctgt	4,539,552	4,546,364(+)	2A	не удалось картировать
7	AATE013154	actgagaacgcgaacatga tatatggcgcaaggagtcg	4,571,860	4,577,721(-)	2A	5B
8	AATE000878	ctcgagcaaccttagcagg gctgcagctcgtgtagaat	4,584,281	4,586,634(+)	2A	5B
9	AATE006100	agattacacgttgccatcc cttaatagtgccagccgtt	4,594,775	4,596,266(+)	2A	5B
10	AATE012020	acattctgcatctgcacag catcacgtcgggaagtagt	4,602,182	4,608,814(-)	2A	5B

Продолжение таблицы А2

11	AATE011508	gtcgtgatgagagtcaatgg cgatgttgttgcttacgtg	4,609,127	4,610,269(-)	2A	5B
12	AATE014810	gttcacggaagactcacaaa tcaatatcctctcgaagctga	4,611,080	4,611,919(+)	2A	5B
13	AATE000727	ggagtacgtctcgtcgg tgcgtacctacctgacac	4,728,774	4,729,577(+)	2A	5B
14	AATE010388	gagttggctgtctaagaagg ctgaatagtccttcactgc	4,804,797	4,811,215(-)	2A	5B
15	AATE009337	aatccaccactacgctaaa ctagcccgatgaacgaaaag	4,874,801	4,878,654(-)	2A	5B
16	AATE020637	tttctaagggccagtttg tcaacctgaactgcacc	4,986,904	4,993,021(+)	2A	5B
17	AATE011314	caaccgtacagtctgaacc tcattcaatcgctcatcg	5,022,538	5,034,112(+)	2A	5B
18	AATE020602	caagaagatcacgagcac gtcgcgatcgagtactcac	5,125,625	5,130,866(+)	2A	5B
19	AATE004697	Tgctagaactacagtcaagt ccaactatcataagcgagtg	17,057,247	17,066,579(-)	5B	2A
20	AATE003340	gcgggtatcttttctgttg gtcgaagccgatgtagatta	17,252,047	17,256,383(+)	5A	2A
21	AATE018776	ttcccgtggacagaatctac ccttcacctatttcgctcg	17,260,494	17,265,377(-)	5A	не удалось картировать
22	AATE010837	ataaagcatctgaggacgag tttgcttgctgatcttgag	17,409,992	17,412,127(+)	5A	переместился в 3L плечо

Приложение Б

Картирование фланкерных генов фиксированных инверсий в X-хромосоме у
An. daciae X1

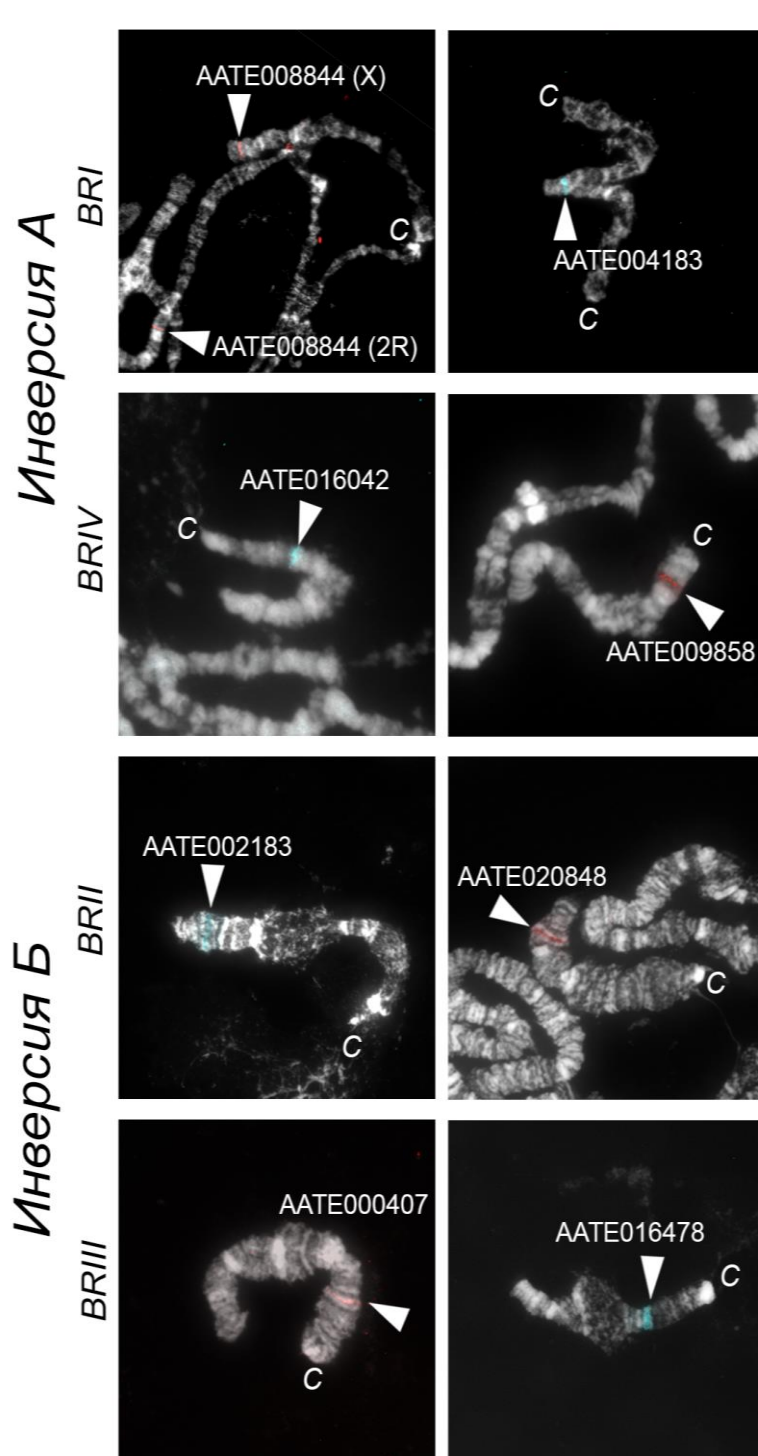


Рисунок Б.1 – FISH ДНК-проб, разработанных на основе генов *An. atroparvus*, фланкирующих BR фиксированных перестроек на политенных X-хромосомах *An. daciae* X1. Красным указаны ДНК-пробы (TAMRA), которые не изменили своего положения относительно генов *An. atroparvus*; голубым ДНК-пробы (TAMRA), которые оказались задействованы в фиксированных инверсиях и соответствуют таковому положению у *An. messeae* X1

Приложение В

Плотность генов и простых повторов в окрестностях точек разрывов у *An. atroparvus*

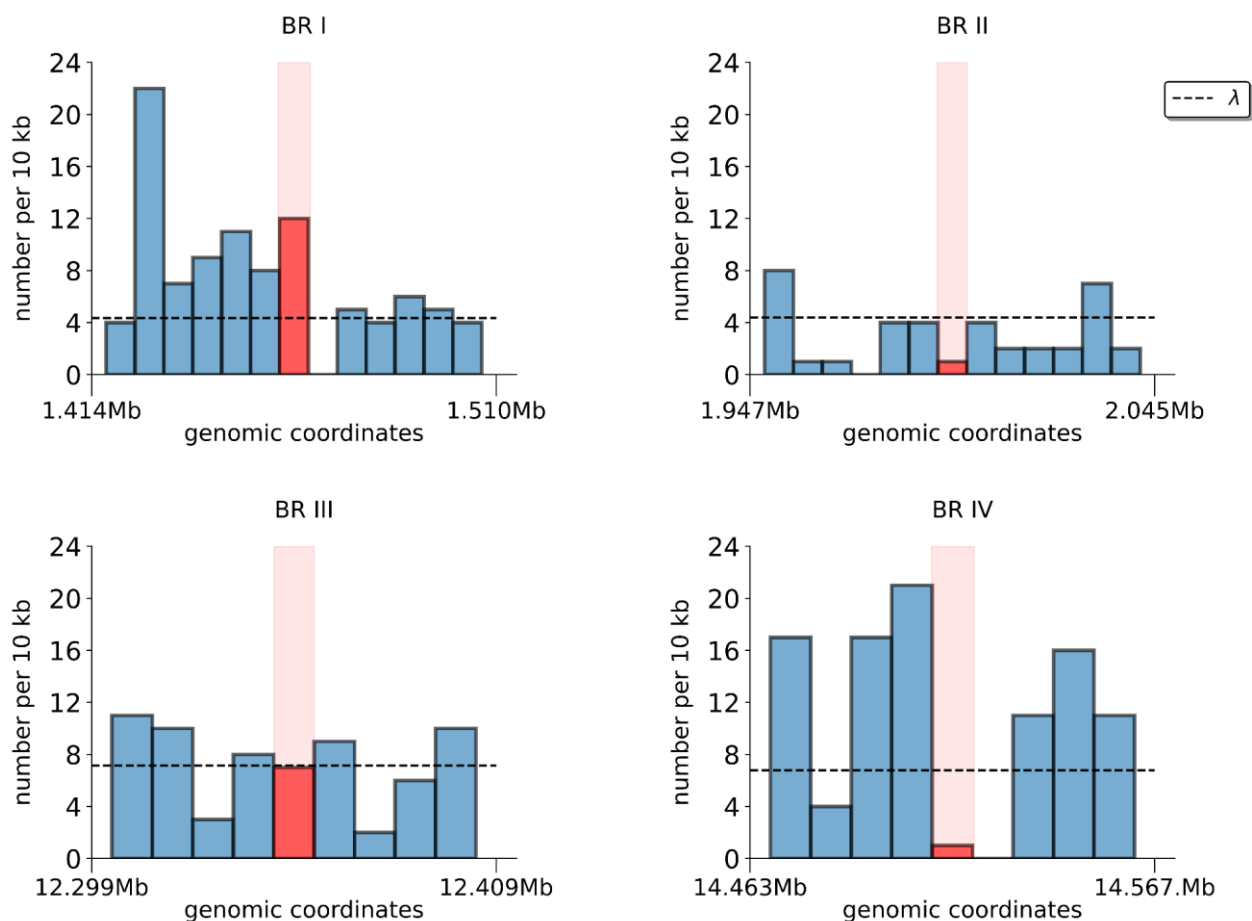


Рисунок В.1 – Плотность простых повторов в BR и геномные окрестности BR размером около 100 тыс.п.н. в X-хромосоме *An. atroparvus*. Светло-розовые столбцы показывают положение BR внутри геномных кварталов. Красные и синие столбцы показывают плотность простых повторов в BR и геномных окрестностях соответственно. Геномные окрестности определяются как геномные области размером 50 кб, расположенные непосредственно выше и ниже каждого BR. λ — средняя плотность простых повторов по всей хромосоме с размером бина, равным соответствующему размеру BR

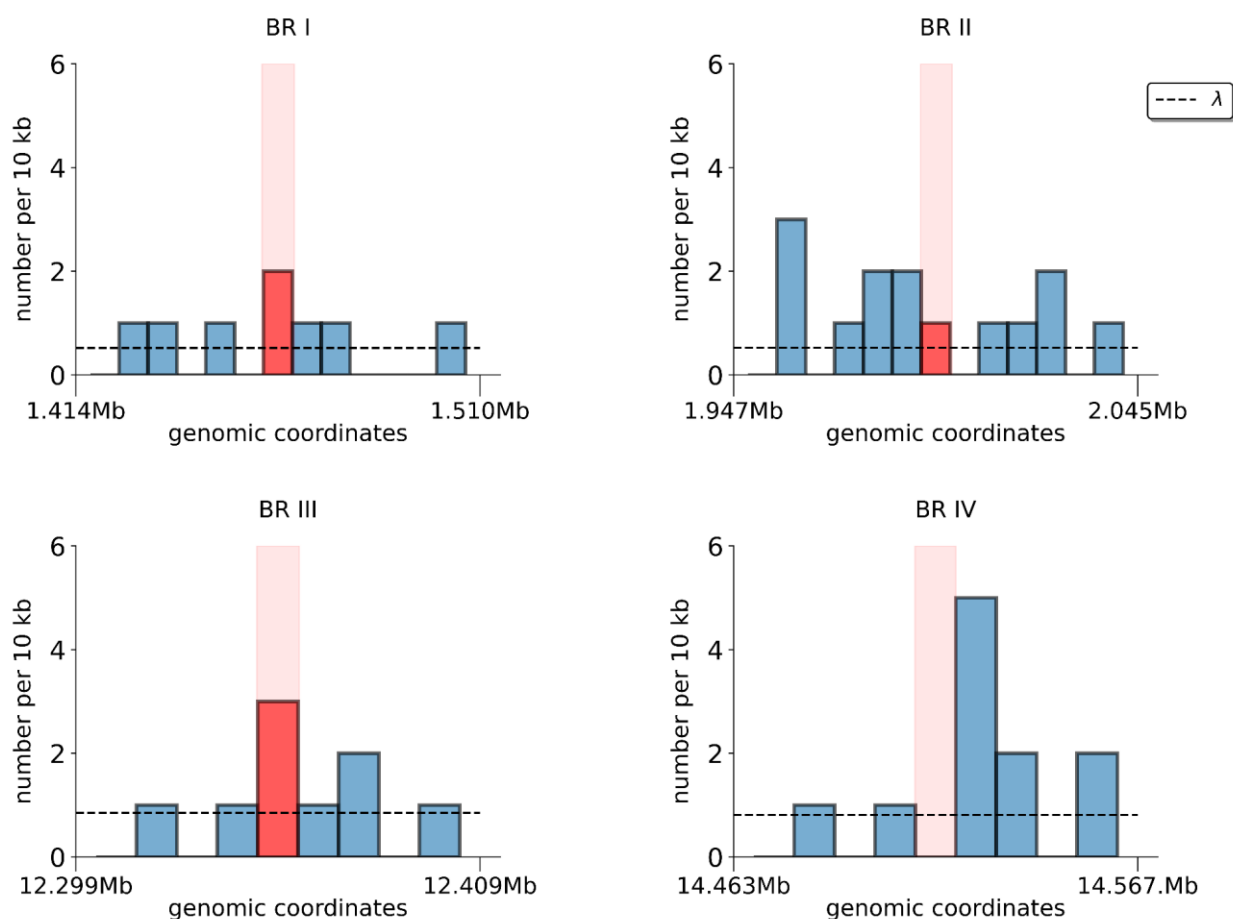
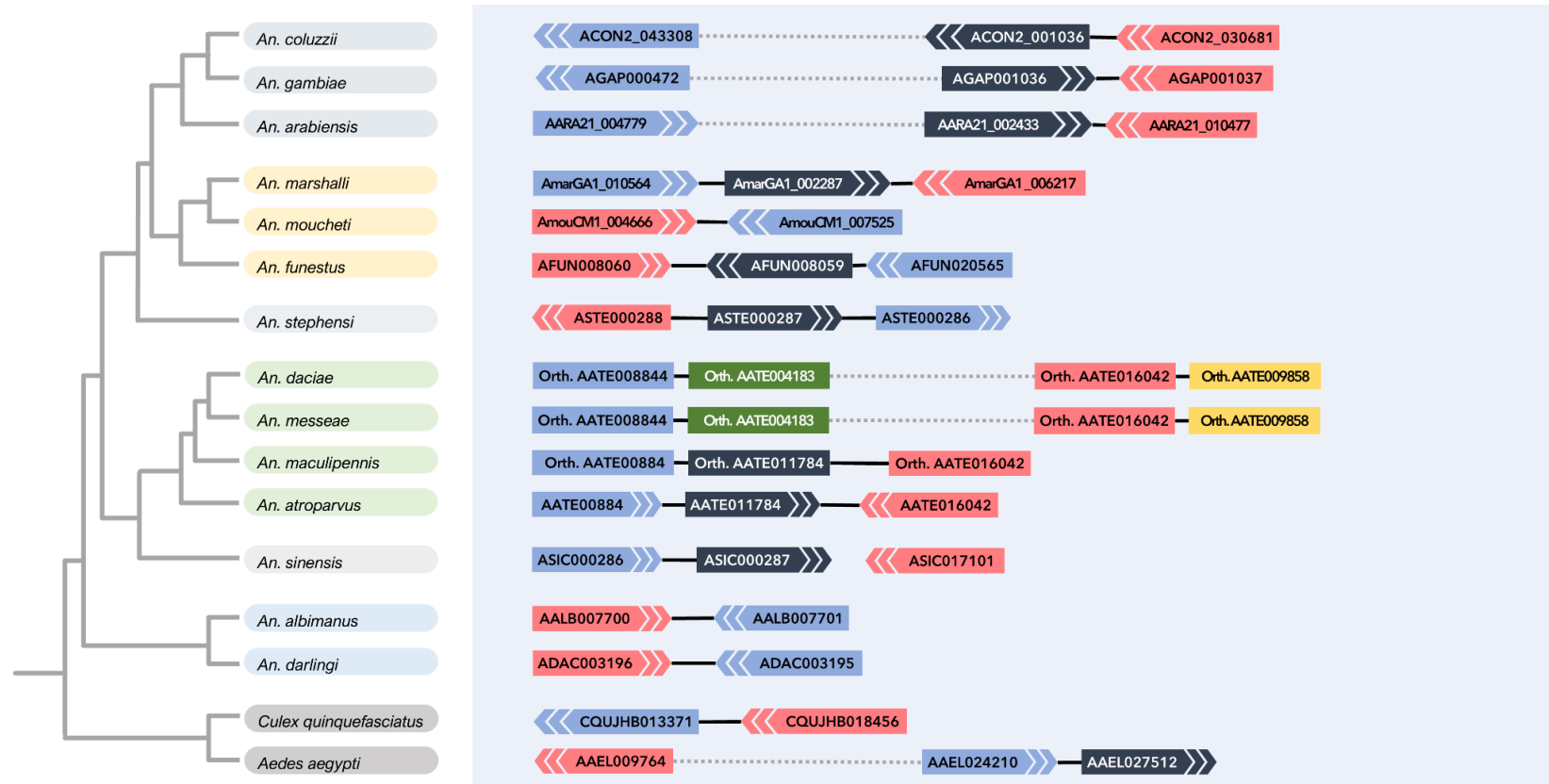


Рисунок В.2 – Плотность генов в BR и геномные окрестности BR размером около 100 тыс.п.н. в X-хромосоме *An. atroparvus*. Светло-розовые столбцы показывают положение BR внутри геномных окрестностей. Красные и синие столбцы показывают плотность генов в BR и геномных окрестностях соответственно. Геномные окрестности определяются как геномные регионы размером 50 кб, расположенные непосредственно левее и правее от каждого BR. λ – средняя плотность генов по всей хромосоме с размером бина, равным соответствующему размеру BR

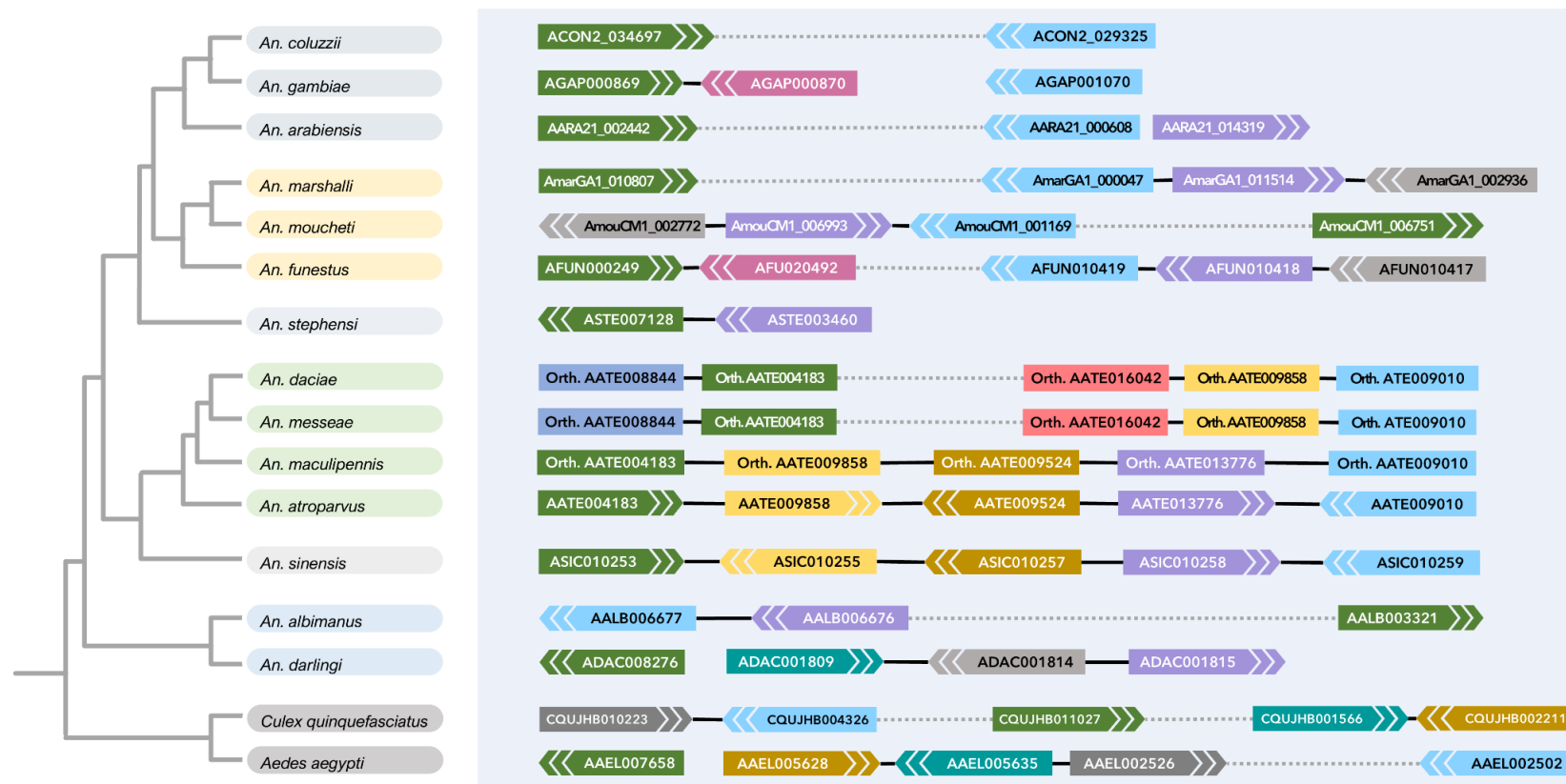
Приложение Г

Сравнение порядка фланкирующих генов в точках разрывов инверсий у разных представителей *Anopheles*



BREAKPOINT REGION I

Рисунок Г.1 – Геномный линейный порядок ортологов генов, фланкирующих BRI. Ортологичные гены обозначены одинаковыми цветами. Идентификаторы генов сборкам генома Vector Base. Гены, фланкирующие точку разрывов у *An. atroparvus*: AATE008844 и AATE016042. Сплошная черная линия указывает на близость между генами (<10 Кб), а пунктирная линия указывает на расстояние более 1 миллиона пар оснований. Положение гена на плюс цепи ДНК указано стрелкой, указывающей вправо, а положение на минус цепи ДНК указано стрелкой, указывающей влево. Гены без какой-либо связи находятся в неизвестном контиге вне хромосомной сборки



BREAKPOINT REGION IV

Рисунок Г.2 – Геномный линейный порядок ортологов генов, фланкирующих BRIV. Ортологичные гены обозначены одинаковыми цветами. Идентификаторы генов сборкам генома Vector Base. Гены, фланкирующие точку разрывов у *An. atroparvus*: AATE004183 и AATE009858. Сплошная черная линия указывает на близость между генами (<10 Кб), а пунктирная линия указывает на расстояние более 1 миллиона пар оснований. Положение гена на плюс цепи ДНК указано стрелкой, указывающей вправо, а положение на минус цепи ДНК указано стрелкой, указывающей влево. Гены без какой-либо связи находятся в неизвестном контиге вне хромосомной сборки

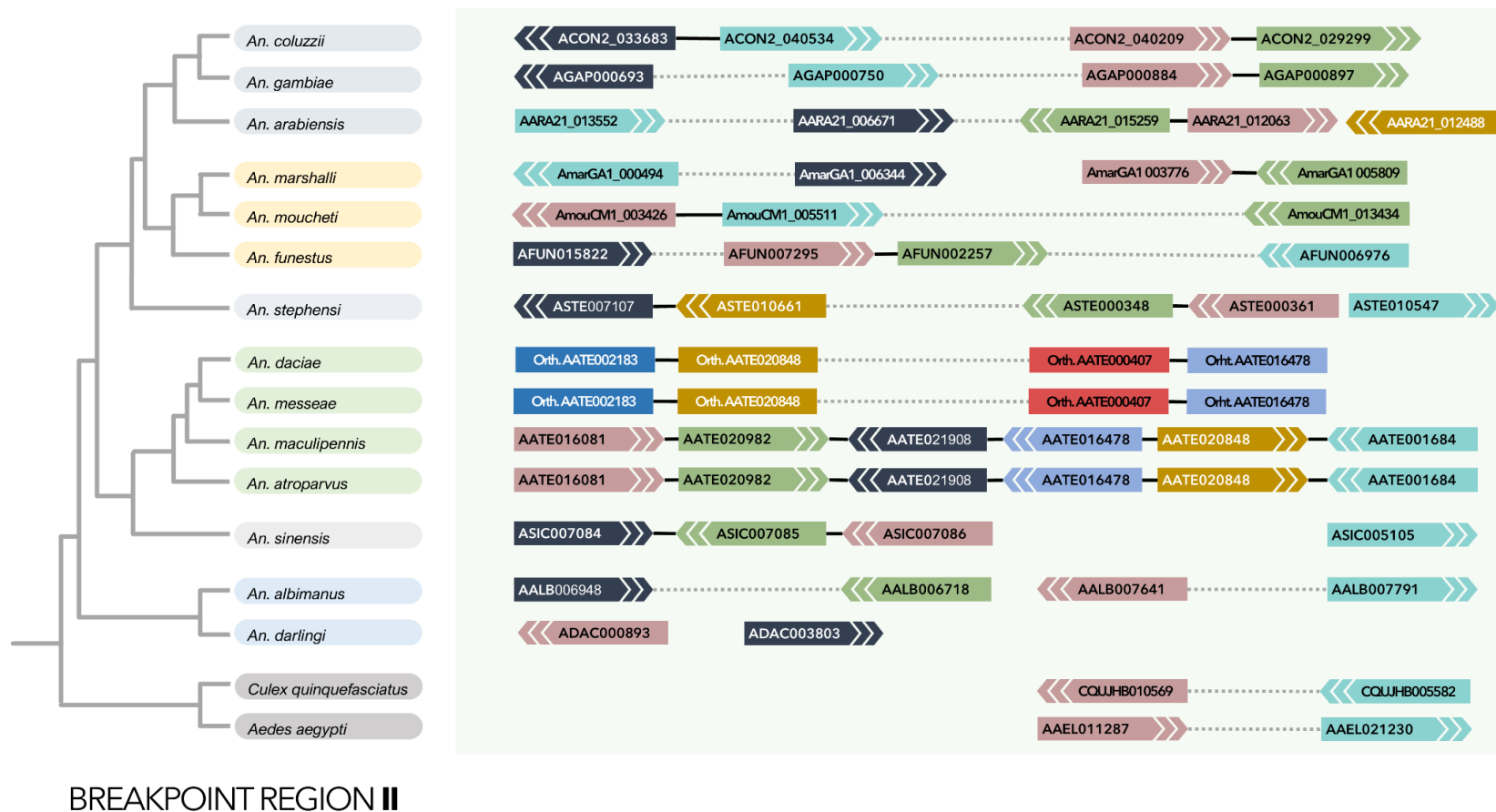


Рисунок Г.3 –Геномный линейный порядок ортологов генов, фланкирующих BR11. Ортологичные гены обозначены одинаковыми цветами. Идентификаторы генов сборкам генома Vector Base. Гены, фланкирующие точку разрывов у *An. atroparvus*: AATE00016478 и AATE020848. Сплошная черная линия указывает на близость между генами (<10 Кб), а пунктирная линия указывает на расстояние более 1 миллиона пар оснований. Положение гена на плюс цепи ДНК указано стрелкой, указывающей вправо, а положение на минус цепи ДНК указано стрелкой, указывающей влево. Гены без какой-либо связи находятся в неизвестном контиге вне хромосомной сборки

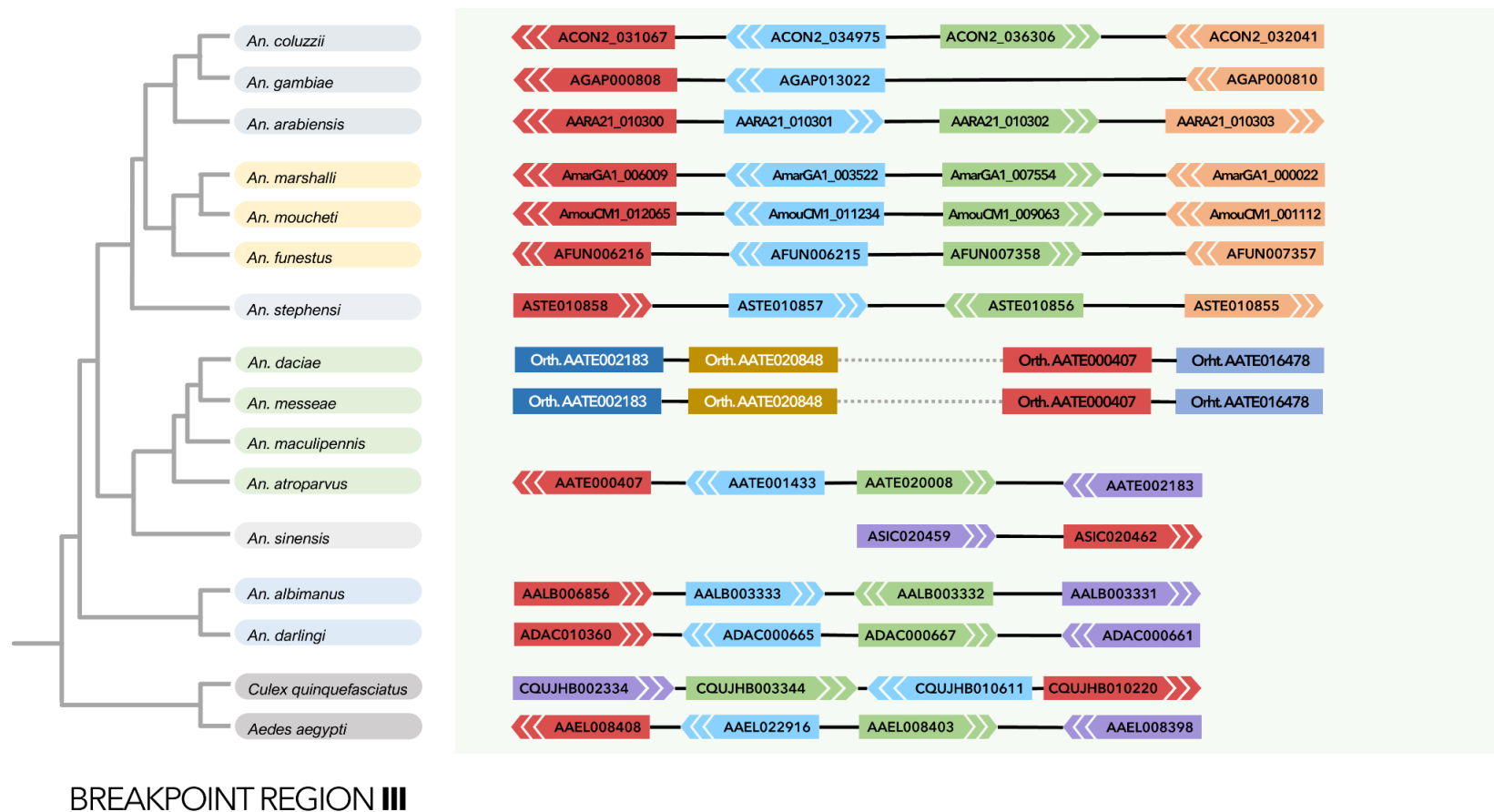


Рисунок Г.4 – Геномный линейный порядок ортологов генов, фланкирующих BRIII. Ортологичные гены обозначены одинаковыми цветами. Идентификаторы генов сборкам генома Vector Base. Гены, фланкирующие точку разрывов у *An. atroparvus*: AATE000407 и AATE002183. Сплошная черная линия указывает на близость между генами (<10 Кб), а пунктирная линия указывает на расстояние более 1 миллиона пар оснований. Положение гена на плюс цепи ДНК указано стрелкой, указывающей вправо, а положение на минус цепи ДНК указано стрелкой, указывающей влево. Гены без какой-либо связи находятся в неизвестном контиге вне хромосомной сборки.

Приложение Д

Анализ генной онтологии в инвертированных синтенных блоках

Таблица Д.1 – Обогащение GO-терминами биологических процессов в СБ2, СБ5 и СБ6 у *An. atroparvus*

GO ID	Название терминов	ФЧГ	ГЗД	ID генов	% ФЧГ	FE	OR	P-value	Benjamini	Bonferroni
GO:0051588	regulation of neurotransmitter transport	1	1	AATE016581	100	75,67	inf	0,01321	0,17505	1,0
GO:0048167	regulation of synaptic plasticity	1	1	AATE016581	100	75,67	inf	0,01321	0,17505	1,0
GO:0060179	male mating behavior	1	1	AATE016644	100	75,67	inf	0,01321	0,17505	1,0
GO:0007617	mating behavior	1	1	AATE016644	100	75,67	inf	0,01321	0,17505	1,0
GO:0050806	positive regulation of synaptic transmission	1	1	AATE016581	100	75,67	inf	0,01321	0,17505	1,0
GO:0042438	melanin biosynthetic process	1	1	AATE016644	100	75,67	inf	0,01321	0,17505	1,0
GO:0034477	U6 snRNA 3'-end processing	1	1	AATE012218	100	75,67	inf	0,01321	0,17505	1,0
GO:0060291	long-term synaptic potentiation	1	1	AATE016581	100	75,67	inf	0,01321	0,17505	1,0
GO:0007610	behavior	1	1	AATE016644	100	75,67	inf	0,01321	0,17505	1,0
GO:0019098	reproductive behavior	1	1	AATE016644	100	75,67	inf	0,01321	0,17505	1,0
GO:0046928	regulation of neurotransmitter secretion	1	1	AATE016581	100	75,67	inf	0,01321	0,17505	1,0
GO:0007618	mating	1	1	AATE016644	100	75,67	inf	0,01321	0,17505	1,0
GO:0006582	melanin metabolic process	1	1	AATE016644	100	75,67	inf	0,01321	0,17505	1,0
GO:0019731	antibacterial humoral response	3	2	AATE021906, AATE021908	66,7	50,45	151,8	0,00051	0,02542	0,17772
GO:0019730	antimicrobial humoral response	3	2	AATE021906, AATE021908	66,7	50,45	151,8	0,00051	0,02542	0,17772
GO:0006959	humoral immune response	3	2	AATE021906, AATE021908	66,7	50,45	151,8	0,00051	0,02542	0,17772
GO:0006266	DNA ligation	2	1	AATE013780	50	37,84	75,28	0,02625	0,18486	1,0
GO:0099177	regulation of trans-synaptic signaling	2	1	AATE016581	50	37,84	75,28	0,02625	0,18486	1,0
GO:0006491	N-glycan processing	2	1	AATE013897	50	37,84	75,28	0,02625	0,18486	1,0

Продолжение таблицы Д.1

GO:0051781	positive regulation of cell division	2	1	AATE005672	50	37,84	75,28	0,02625	0,18486	1,0
GO:0051103	DNA ligation involved in DNA repair	2	1	AATE013780	50	37,84	75,28	0,02625	0,18486	1,0
GO:0050804	modulation of chemical synaptic transmission	2	1	AATE016581	50	37,84	75,28	0,02625	0,18486	1,0
GO:0046349	amino sugar biosynthetic process	2	1	AATE002677	50	37,84	75,28	0,02625	0,18486	1,0
GO:0036092	phosphatidylinositol-3-phosphate biosynthetic process	2	1	AATE012984	50	37,84	75,28	0,02625	0,18486	1,0
GO:0010138	pyrimidine ribonucleotide salvage	2	1	AATE011973	50	37,84	75,28	0,02625	0,18486	1,0
GO:0019748	secondary metabolic process	2	1	AATE016644	50	37,84	75,28	0,02625	0,18486	1,0
GO:0032262	pyrimidine nucleotide salvage	2	1	AATE011973	50	37,84	75,28	0,02625	0,18486	1,0
GO:0006048	UDP-N-acetylglucosamine biosynthetic process	2	1	AATE002677	50	37,84	75,28	0,02625	0,18486	1,0
GO:0006047	UDP-N-acetylglucosamine metabolic process	2	1	AATE002677	50	37,84	75,28	0,02625	0,18486	1,0
GO:0051046	regulation of secretion	2	1	AATE016581	50	37,84	75,28	0,02625	0,18486	1,0
GO:0044550	secondary metabolite biosynthetic process	2	1	AATE016644	50	37,84	75,28	0,02625	0,18486	1,0
GO:0044206	UMP salvage	2	1	AATE011973	50	37,84	75,28	0,02625	0,18486	1,0
GO:0008655	pyrimidine-containing compound salvage	2	1	AATE011973	50	37,84	75,28	0,02625	0,18486	1,0
GO:0032467	positive regulation of cytokinesis	2	1	AATE005672	50	37,84	75,28	0,02625	0,18486	1,0
GO:1903530	regulation of secretion by cell	2	1	AATE016581	50	37,84	75,28	0,02625	0,18486	1,0
GO:0042742	defense response to bacterium	5	2	AATE021906, AATE021908	40	30,27	50,59	0,00168	0,04478	0,58221
GO:0009617	response to bacterium	5	2	AATE021906, AATE021908	40	30,27	50,59	0,00168	0,04478	0,58221
GO:0046189	phenol-containing compound biosynthetic process	3	1	AATE016644	33,3	25,22	37,64	0,03912	0,23529	1,0
GO:0006275	regulation of DNA replication	3	1	AATE005324	33,3	25,22	37,64	0,03912	0,23529	1,0
GO:0034472	snRNA 3'-end processing	3	1	AATE012218	33,3	25,22	37,64	0,03912	0,23529	1,0
GO:0031929	TOR signaling	3	1	AATE011784	33,3	25,22	37,64	0,03912	0,23529	1,0

Продолжение таблицы Д.1

GO:0043628	ncRNA 3'-end processing	3	1	AATE012218	33,3	25,22	37,64	0,03912	0,23529	1,0
GO:0018958	phenol-containing compound metabolic process	3	1	AATE016644	33,3	25,22	37,64	0,03912	0,23529	1,0
GO:0043173	nucleotide salvage	3	1	AATE011973	33,3	25,22	37,64	0,03912	0,23529	1,0
GO:0090068	positive regulation of cell cycle process	3	1	AATE005672	33,3	25,22	37,64	0,03912	0,23529	1,0
GO:0006955	immune response	13	3	AATE019391, AATE021906, AATE021908	23,1	17,46	22,94	0,00058	0,02542	0,20169
GO:0002376	immune system process	14	3	AATE019391, AATE021906, AATE021908	21,4	16,22	20,85	0,00073	0,02542	0,25423
GO:0098542	defense response to other organism	14	3	AATE019391, AATE021906, AATE021908	21,4	16,22	20,85	0,00073	0,02542	0,25423
GO:0051707	response to other organism	14	3	AATE019391, AATE021906, AATE021908	21,4	16,22	20,85	0,00073	0,02542	0,25423
GO:0043207	response to external biotic stimulus	14	3	AATE019391, AATE021906, AATE021908	21,4	16,22	20,85	0,00073	0,02542	0,25423
GO:0044419	biological process involved in interspecies interaction between organisms	14	3	AATE019391, AATE021906, AATE021908	21,4	16,22	20,85	0,00073	0,02542	0,25423
GO:0009607	response to biotic stimulus	14	3	AATE019391, AATE021906, AATE021908	21,4	16,22	20,85	0,00073	0,02542	0,25423
GO:0006952	defense response	18	3	AATE019391, AATE021906, AATE021908	16,7	12,61	15,28	0,00158	0,04478	0,54836
GO:0035235	ionotropic glutamate receptor signaling pathway	14	2	AATE017047, AATE021788	14,3	10,81	12,63	0,01420	0,17505	1,0
GO:0007215	glutamate receptor signaling pathway	14	2	AATE017047, AATE021788	14,3	10,81	12,63	0,01420	0,17505	1,0
GO:0007015	actin filament organization	18	2	AATE005959, AATE008512	11,1	8,41	9,47	0,02308	0,18486	1,0
GO:0097435	supramolecular fiber organization	24	2	AATE005959, AATE008512	8,3	6,31	6,88	0,03955	0,23529	1,0
GO:0009605	response to external stimulus	42	3	AATE019391, AATE021906, AATE021908	7,1	5,41	5,86	0,01777	0,18486	1,0
Примечание – ФЧГ – фоновое число генов; ГЗД – генов в заданном диапазоне; FE – коэффициент обогащения; OR – odds ratio; Benjamini и Bonferroni – методы поправок на множественную проверку гипотез										

Таблица Д.2 – Обогащение GO терминами молекулярных функций в СБ2, СБ5 и СБ6 у *An. atroparvus*

GO ID	Название терминов	ФЧГ	ГЗД	ID генов	% ФЧГ	FE	OR	P-value	Benjamini	Bonferroni
GO:0004850	uridine phosphorylase activity	1	1	AATE011973	100	75,67	inf	0,01321	0,20655	1,0
GO:0016316	phosphatidylinositol-3,4-bisphosphate 4-phosphatase activity	1	1	AATE012984	100	75,67	inf	0,01321	0,20655	1,0
GO:0004343	glucosamine 6-phosphate N-acetyltransferase activity	1	1	AATE002677	100	75,67	inf	0,01321	0,20655	1,0
GO:1990838	poly(U)-specific exoribonuclease activity, producing 3' uridine cyclic phosphate ends	1	1	AATE012218	100	75,67	inf	0,01321	0,20655	1,0
GO:0106017	phosphatidylinositol-3,4-bisphosphate phosphatase activity	1	1	AATE012984	100	75,67	inf	0,01321	0,20655	1,0
GO:0030151	molybdenum ion binding	4	2	AATE012954, AATE020065	50	37,84	75,89	0,00102	0,19304	0,19304
GO:0042834	peptidoglycan binding	2	1	AATE019391	50	37,84	75,28	0,02625	0,27388	1,0
GO:0034596	phosphatidylinositol phosphate 4-phosphatase activity	2	1	AATE012984	50	37,84	75,28	0,02625	0,27388	1,0
GO:0003910	DNA ligase (ATP) activity	2	1	AATE013780	50	37,84	75,28	0,02625	0,27388	1,0
GO:0003909	DNA ligase activity	2	1	AATE013780	50	37,84	75,28	0,02625	0,27388	1,0
GO:0070006	metalloaminopeptidase activity	6	2	AATE012122, AATE016042	33,3	25,22	37,94	0,00250	0,20655	0,47429
GO:0036374	glutathione hydrolase activity	3	1	AATE005125	33,3	25,22	37,64	0,03912	0,27388	1,0
GO:0034593	phosphatidylinositol bisphosphate phosphatase activity	3	1	AATE012984	33,3	25,22	37,64	0,03912	0,27388	1,0
GO:0016802	trialkylsulfonium hydrolase activity	3	1	AATE006610	33,3	25,22	37,64	0,03912	0,27388	1,0
GO:0004013	adenosylhomocysteinase activity	3	1	AATE006610	33,3	25,22	37,64	0,03912	0,27388	1,0
GO:0004089	carbonate dehydratase activity	12	2	AATE012318, AATE020937	16,7	12,61	15,17	0,01048	0,20655	1,0
GO:0004970	ionotropic glutamate receptor activity	14	2	AATE017047, AATE021788	14,3	10,81	12,63	0,01420	0,20655	1,0
GO:0008066	glutamate receptor activity	14	2	AATE017047, AATE021788	14,3	10,81	12,63	0,01420	0,20655	1,0
GO:0004177	aminopeptidase activity	21	2	AATE012122, AATE016042	9,5	7,21	7,97	0,03087	0,27388	1,0

Продолжение таблицы Д.2

GO ID	Название терминов	ФЧГ	ГЗД	ID генов	% ФЧГ	FE	OR	P-value	Benjamini	Bonferroni
GO:0070279	vitamin B6 binding	33	3	AATE012954, AATE015238, AATE020065	9,1	6,88	7,63	0,00920	0,20655	1,0
GO:0030170	pyridoxal phosphate binding	33	3	AATE012954, AATE015238, AATE020065	9,1	6,88	7,63	0,00920	0,20655	1,0
GO:0022824	transmitter-gated ion channel activity	22	2	AATE017047, AATE021788	9,1	6,88	7,57	0,03367	0,27388	1,0
GO:0022835	transmitter-gated channel activity	22	2	AATE017047, AATE021788	9,1	6,88	7,57	0,03367	0,27388	1,0
GO:0030594	neurotransmitter receptor activity	23	2	AATE017047, AATE021788	8,7	6,58	7,21	0,03657	0,27388	1,0
GO:0036459	thiol-dependent ubiquitinyl hydrolase activity	25	2	AATE009719, AATE016081	8	6,05	6,58	0,04263	0,28777	1,0
GO:0008235	metalloexopeptidase activity	38	3	AATE012122, AATE015377, AATE016042	7,9	5,97	6,54	0,01356	0,20655	1,0
GO:0016836	hydro-lyase activity	26	2	AATE012318, AATE020937	7,7	5,82	6,31	0,04579	0,29682	1,0
GO:0019842	vitamin binding	48	3	AATE012954, AATE015238, AATE020065	6,3	4,73	5,08	0,02529	0,27388	1,0
GO:0016829	lyase activity	87	4	AATE012318, AATE015238, AATE018478, AATE020937	4,6	3,48	3,69	0,02789	0,27388	1,0
Примечание – ФЧГ – фоновое число генов; ГЗД – генов в заданном диапазоне; FE – коэффициент обогащения; OR – odds ratio; Benjamini и Bonferroni – методы поправок на множественную проверку гипотез										

Таблица Д.3 – Обогащение ГО терминами клеточных компонентов в СБ2, СБ5 и СБ6 у *An. atroparvus*

GO ID	Название терминов	ФЧГ	ГЗД	ID генов	% ФЧГ	FE	OR	P-value	Benjamini	Bonferroni
GO:0031201	SNARE complex	1	1	AATE005905,	100	75,67	inf	0,01321	0,15032	0,96465
GO:0005868	cytoplasmic dynein complex	1	1	AATE009138,	100	75,67	inf	0,01321	0,15032	0,96465
GO:0031932	TORC2 complex	2	1	AATE011784,	50	37,84	75,28	0,02625	0,15032	1,0
GO:0043292	contractile fiber	2	1	AATE014682,	50	37,84	75,28	0,02625	0,15032	1,0
GO:0036379	myofilament	2	1	AATE014682,	50	37,84	75,28	0,02625	0,15032	1,0
GO:0030016	myofibril	2	1	AATE014682,	50	37,84	75,28	0,02625	0,15032	1,0
GO:0031931	TORC1 complex	2	1	AATE011784,	50	37,84	75,28	0,02625	0,15032	1,0
GO:0030017	sarcomere	2	1	AATE014682,	50	37,84	75,28	0,02625	0,15032	1,0
GO:0005865	striated muscle thin filament	2	1	AATE014682,	50	37,84	75,28	0,02625	0,15032	1,0
GO:0005861	troponin complex	2	1	AATE014682,	50	37,84	75,28	0,02625	0,15032	1,0
GO:0038201	TOR complex	3	1	AATE011784,	33,3	25,22	37,64	0,03912	0,15032	1,0
GO:0034707	chloride channel complex	3	1	AATE011937,	33,3	25,22	37,64	0,03912	0,15032	1,0
GO:0072487	MSL complex	3	1	AATE002626,	33,3	25,22	37,64	0,03912	0,15032	1,0
GO:0000123	histone acetyltransferase complex	21	2	AATE002626, AATE019759	9,5	7,21	7,97	0,03087	0,15032	1,0
GO:0031248	protein acetyltransferase complex	22	2	AATE002626, AATE019759	9,1	6,88	7,57	0,03367	0,15032	1,0
GO:1902493	acetyltransferase complex	22	2	AATE002626, AATE019759	9,1	6,88	7,57	0,03367	0,15032	1,0
GO:0099081	supramolecular polymer	45	3	AATE005672, AATE009138, AATE014682	6,7	5,04	5,44	0,02135	0,15032	1,0
GO:0099512	supramolecular fiber	45	3	AATE005672, AATE009138, AATE014682	6,7	5,04	5,44	0,02135	0,15032	1,0
GO:0099080	supramolecular complex	50	3	AATE005672, AATE009138, AATE014682	6	4,54	4,86	0,02813	0,15032	1,0

Примечание – ФЧГ – фоновое число генов; ГЗД – генов в заданном диапазоне; FE – коэффициент обогащения; OR – odds ratio; Benjamini и Bonferroni – методы поправок на множественную проверку гипотез