

Филогенетические связи между палеоарктическими видами *Anopheles maculipennis* (Diptera: Culicidae), установленные при использовании разных методов. Проблема консенсуса

О.В. Ваулин¹✉, Ю.М. Новиков²

¹ Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», Новосибирск, Россия

² Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Национальный исследовательский Томский государственный университет», кафедра цитологии и генетики, Томск, Россия

Выяснение филогенетических отношений в близкородственных группах эпидемиологически значимых организмов – важная задача паразитологии и эволюционной теории. Одной из таких групп является комплекс видов *Anopheles maculipennis*, распространенных в Евразии, Северной Африке и Северной Америке. Изучены опубликованные схемы филогенеза палеоарктической части этого комплекса, построенные на основе скрещиваемости видов, исследования политенных хромосом, изоферментов, кутикулярных углеводов и ITS2 генов рРНК. Отсутствие высокого соответствия между ними обусловило идею создания консенсусной схемы филогенетических связей указанной группы видов. С помощью различных алгоритмов (Neighbor-joining, Minimum Evolution, Maximum Parsimony и Maximum Likelihood) построены филогенетические схемы по последовательностям фрагмента гена COI, варибельного участка D2 28S рДНК и ITS2 генов рРНК. Обоснованы, построены и обсуждены две консенсусные схемы филогении палеоарктических видов *maculipennis*. Одна из них опирается в основном на результаты молекулярно-генетического анализа. Вторая создана на основе исследования политенных хромосом, географического распространения и экологии. Филогенетические связи *An. beklemishevi* противоречивы. По молекулярным маркерам *An. beklemishevi* близок к другим палеоарктическим видам, однако далек от них по фиксированному хромосомному инверсиям. Показана удаленность этого вида от группы неарктических видов ветви *An. quadrimaculatus*. Предложенные схемы отображают два возможных сценария эволюции комплекса *maculipennis*. Различия между ними обусловлены как принятыми в качестве аргументов фактами и рассуждениями, так и допущениями различных методов реконструкции филогенеза. Выдвинута идея о существенной роли несоответствия астрономического и биологического времени в интерпретации эволюционных процессов. Для более детального решения проблемы филогенеза палеоарктической ветви комплекса *maculipennis* требуется расширение знаний о видах, его составляющих.

Ключевые слова: комплекс видов *Anopheles maculipennis*; виды-двойники; экологическая ниша; географическое распространение; филогения; эволюция; хромосомные инверсии; ITS2; варибельный участок D2 28S рДНК; ПЦР.

Phylogenetic relationships between Palaearctic species of the *Anopheles maculipennis* complex (Diptera: Culicidae) revealed by different approaches and markers. The problem of consensus

O.V. Vaulin¹✉, Yu.M. Novikov²

¹ Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia;
² Tomsk State University, Department of Cytology and Genetics, Tomsk, Russia

A study of phylogenetic relationships in closely related groups of epidemically important species is an important task of parasitology and evolutionary theory. One of these species groups is the *maculipennis* complex, with its members widespread in Eurasia, North Africa and North America. We studied phylogenetic schemes of the Palaearctic part of this Complex, which are based on crossability of species, polytene chromosomes, isoenzymes, cuticular hydrocarbons and ITS2 of rRNA genes. The lack of high compliance between them prompted us to create a consensus scheme of phylogenetic relationships in the Palaearctic part of this Complex. We constructed phylogenetic schemes on the sequences of a COI gene fragment, the D2 variable region of 28S rDNA and ITS2 of rRNA genes using various algorithms (Neighbor-joining, Minimum Evolution, Maximum parsimony and Maximum likelihood). Two consensus schemes of the Palaearctic branch of the *maculipennis* complex were constructed, validated and discussed. The first scheme was based mostly on molecular genetics data. The second scheme relies on polytene chromosome, geographical spread and ecological data. Phylogenetic relationships of *An. beklemishevi* are contradictory. This species is similar to other Palaearctic species by molecular markers but it is far from them by fixed chromosome inversions. It was shown that this species is distant from Neoarctic species of the *An. quadrimaculatus* branch. The proposed schemes show two possible scenarios of the *maculipennis* complex evolution. Differences between them are explained by facts and associated speculations as

well as by assumptions made under different phylogenetic reconstruction methods. A hypothesis about a significant role of the disparity between the astronomical and biological times in the interpretation of evolutionary processes was proposed. To address the phylogeny problem of the Palaearctic branch of the maculipennis complex at a more detailed level, it is required to increase our knowledge about the underlying species.

Key words: *Anopheles maculipennis* complex; sibling species; ecological niche; geographic distribution; phylogeny; evolution; chromosomal inversions; ITS2; D2 variable region of 28S rDNA; PCR.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Ваулин О.В., Новиков Ю.М. Филогенетические связи между палеоарктическими видами *Anopheles* комплекса *maculipennis* (Diptera: Culicidae), установленные при использовании разных методов. Проблема консенсуса. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2016;20(5):695-703. DOI 10.18699/VJ16.189

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Vaulin O.V., Novikov Yu.M. Phylogenetic relationships between Palaearctic species of the *Anopheles maculipennis* complex (Diptera: Culicidae) revealed by different approaches and markers. The problem of consensus. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2016;20(5):695-703. DOI 10.18699/VJ16.189

Особенностью рода *Anopheles*, свидетельствующей о его эволюционной динамичности, является обилие групп близкородственных видов, в частности видов-двойников. Соответственно задачам систематики, состав групп и филогенетические связи между видами пересматривают и уточняют с появлением новых методов и маркеров, позволяющих выявлять хиатусы. Уточнение классификации *Anopheles* актуально в связи с тем, что многие представители рода являются эффективными переносчиками малярийных плазмодиев (Gentile et al., 2004; Marrelli et al., 2006).

Комплекс *Anopheles maculipennis* является группой в высокой степени сходных видов. Многие из них не удается идентифицировать ни морфологическим, ни цитогенетическим методами. Виды этого комплекса населяют северное полушарие от Британии и Средиземноморья до Дальнего Востока (палеоарктическая группа) и от восточного до западного побережья США и Канады (неоарктическая группа) (Kitzmiller et al., 1967; White, 1978; Стегний, 1991; Ramsdale, Snow, 2000). Эти виды отличаются между собой, равно как и от других видов рода *Anopheles*, по климатическим условиям обитания, степени тяготения к среде обитания человека и пищевым предпочтениям.

В соответствии с их физиологическими и поведенческими особенностями они имеют разное эпидемиологическое значение. Так, из двух сосуществующих отдаленно родственных видов *An. sacharovi* и *An. superpictus* к переносу *Plasmodium vivax* более способен первый (Kasap, 1990). Из двух членов палеоарктической группы комплекса *maculipennis* там, где они симпатричны, *An. atroparvus* имеет большую склонность быть переносчиком *P. vivax*, чем *An. messeae* (Takken et al., 2002). Таким образом, восприимчивость разных видов комаров к возбудителям малярии не демонстрирует зависимости от их филогенетической близости. Возникает вопрос о природе и качестве тех характеристик, которые будут адекватно отражать степень родства между ними. Пищевое поведение комаров, их ассоциация с человеческим окружением или природными местообитаниями и другие экологические особенности

могут быть перспективными в качестве элементов таких характеристик (Lanzaro, Lee, 2013).

К настоящему времени предложено несколько схем филогенеза палеоарктической группы видов комплекса *maculipennis* (White, 1978; Bianchi et al., 1980; Стегний, 1991; Marinucci et al., 1999; Новиков и др., 2004). Высокого соответствия между ними нет. Сложность в установлении филогенетических связей между видами, составляющими комплекс, возрастает и в связи с выделением его новых членов (Новиков, 1984; Новиков, Шевченко, 2001; Sedaghat et al., 2003; Гордеев и др., 2004).

Цель настоящего исследования – сравнительный анализ схем филогенеза, как представленных в литературных источниках, так и построенных авторами настоящей работы (экспериментальная часть исследования приведена в Доп. материалах 1–3*), и создание консенсусной схемы филогенеза палеоарктической ветви комплекса *maculipennis*.

Филогения палеоарктической ветви комплекса *maculipennis*

Варианты реконструкций и отсутствие согласия между ними

Первая попытка выявить и систематизировать филогенетические связи видов комплекса *maculipennis* была предпринята J.B. Kitzmiller с коллегами (1967). Исследователи провели целый ряд опытов по гибридизации видов, параллельно изучая политенные хромосомы особей, принадлежащих к скрещиваемым видам и гибридам F₁, а также оценивая жизнеспособность гибридов. По результатам исследования в комплексе были выделены четыре ветви: 1. палеоарктическая (*An. atroparvus*, *An. labbranchiae*, *An. sacharovi*, *An. maculipennis*, *An. subalpinus* (в настоящее время – синоним вида *An. melanoon*) и *An. messeae*); 2. freeborni (*An. freeborni*, *An. aztecus*, *An. occidentalis*, *An. earlei*); 3. *An. quadrimaculatus*; 4. *An. punctipennis*.

* Дополнительные материалы см. в Приложении 1 по адресу: <http://www.bionet.nsc.ru/vogis/download/pict-2016-20/appx4.pdf>

J.B. Kitzmiller с коллегами (1967) сделали вывод о низкой степени постзиготической репродуктивной изоляции между гомосеквентными видами *An. atroparvus* и *An. labranchiae* и несколько более высокой изоляции между гомосеквентными *An. maculipennis* и *An. subalpinus*. Самки, полученные от скрещиваний ♀ *An. labranchiae* × ♂ *An. atroparvus*, давали потомство от беккроссов с самцами *An. atroparvus*. По мнению авторов, к скрещиваниям с неарктическими видами комплекса наиболее способен *An. atroparvus*. Это стало аргументом для его помещения в основание филогенетического древа палеоарктических видов. Порядок, отражающий расстояние видов от *An. atroparvus*, был следующий: *atroparvus* (*labranchiae*) → *maculipennis* → *subalpinus* → *sacharovi* → *messeae*. Авторы отметили, что схема показывает не последовательность происхождения видов, а лишь степень их сходства.

В работе J.B. Kitzmiller с коллегами (1967) не были изучены прекопулятивные изолирующие механизмы; для палеоарктической группы видов степень родства была оценена главным образом на основе скрещиваний с самцами *An. atroparvus*. Результаты реципрокных скрещиваний при гибридизации видов часто различаются (Lewontin, 1974). Аллопатричные виды скрещиваются легче, чем симпатричные, что и наблюдали J.B. Kitzmiller с коллегами (1967), но не придали этому значения. Так, *An. subalpinus* легче скрещивался с *An. messeae*, чем с *An. maculipennis*. Более эффективная репродуктивная изоляция симпатричных видов, наиболее вероятно, связана с их физиологической и экологической, нежели генетической дивергенцией. Следовательно, сама по себе степень репродуктивной изоляции не может быть аргументом для вывода о родственных связях видов. Очевидно, что филогенетическая близость видов связана со степенью сходства их генетического аппарата, в частности рисунка дисков политенных хромосом.

Анализ политенных хромосом в палеоарктической ветви комплекса позволил выявить новый вид – *An. beklemishevi* – и доказать валидность таксона *An. martinius* (Стегний, 1976; Стегний, Кабанова, 1976). Цитогенетические данные позволили построить схему филогенеза (см. рис. 6 в (White, 1978)), отличающуюся от схемы в работе J.B. Kitzmiller с коллегами (1967).

По мнению G.B. White (1978), ветвь североамериканских членов комплекса дифилетична: группа *freeborni* наиболее близка к *An. beklemishevi*, а *An. punctipennis* более родственна с *An. atroparvus*. Присутствующий в схеме *An. sicaulti* оказался группой североафриканских популяций, конспецифичных с *An. labranchiae* (Zulueta, 1983; Laboudi et al., 2011).

В.Н. Стегний (1991) высказал точку зрения о происхождении большинства палеоарктических видов *maculipennis* от *An. freeborni*, независимом отделении *An. beklemishevi* от *An. earlei* и его проникновении в Северную Евразию. Постулировано *a priori*, что «генераторами видообразования» являются мономорфные виды с небольшими ареалами (Стегний, 1991), что, вероятно, является результатом замещения идеи о ключевой роли в процессе видообразования **мономорфной части геномов** видов (Алтухов, 1974; Carson, 1975) идеей о более высоких видообразовательных потенциях **мономорфных видов**.

Следует отметить, что для хорошо изученного высоко полиморфного по хромосомным инверсиям комплекса *Anopheles gambiae* эволюционные события, связанные с преобразованиями кариотипов, исследователи представляли себе по-разному. Так, в одном из первых исследований предковой формой назван *An. quadriannulatus* (Coluzzi et al., 1979). Позже цитогенетические реконструкции были признаны малоэффективными в сравнении с результатами анализа ДНК, в связи с возможностью интрогрессии и параллельного возникновения идентичных инверсий (Besansky et al., 1994). М. Kamali с коллегами (2012) на основе молекулярного анализа районов, прилегающих к инверсиям, пришли к выводу, что предковой формой является *An. melas*.

Проблемой филогенетических построений на основе хромосомных перестроек является проблематичность представлений об их возникновении. Так, реконструируя филогенез, исследователи традиционно опирались на идею о монофилетичности возникновения хромосомных инверсий (Kitzmiller et al., 1967; Dobzhansky, 1970; White, 1978; Стегний, 1991). Вместе с тем это допущение противоречит мутационной теории, согласно которой любая мутация может возникать неоднократно, а также фактам обнаружения реинверсии в природной популяции *Chironomus plumosus* (Ильинская, 1977) и повторного возникновения идентичных хромосомных перестроек у *Drosophila melanogaster* (Коваленко и др., 2006). Следовательно, филогенетические построения, основанные на различиях между видами только по фиксированным хромосомным инверсиям, могут быть далеки от действительности. Факты и соображения, приведенные выше, позволяют сделать вывод о возможности существования инверсионных полиморфизмов, общих для разных видов, что соответствует представлениям о том, что полиморфизмы к видообразованию прямого отношения не имеют (Алтухов, 1974; Carson, 1975).

Следующий этап в изучении филогении палеоарктической группы наступил с привлечением метода анализа полиморфизма растворимых белков и ферментов. Этим методом было исследовано семь видов комплекса: *An. sacharovi*, *An. labranchiae*, *An. atroparvus*, *An. messeae*, *An. melanoon*, *An. maculipennis* и *An. subalpinus* (Bianchi et al., 1980). Авторы заключили, что ранее всех от предковой формы отделился *An. sacharovi*, затем *An. atroparvus* и *An. labranchiae*, после чего предковая форма разделилась на две ветви, одна из которых содержала *An. messeae* и *An. subalpinus*, другая – *An. maculipennis* и *An. melanoon*.

Эта филогенетическая схема противоречит ряду других схем. Наиболее существенным противоречием является помещение конспецифичных форм *An. subalpinus* и *An. melanoon* (Стегний и др., 1984) в разные кластеры. Внутривидовая изменчивость изоферментов оказалась сопоставимой с межвидовой, что существенно снижает надежность схем, построенных на основе изоферментного анализа. Отмеченное противоречие и аналогичные данные по другим группам близких видов (Lewontin, 1974) выступают дополнительными аргументами в пользу идеи о том, что внутривидовой полиморфизм не имеет отношения к видообразованию (Алтухов, 1974; Carson, 1975).

Еще одна схема филогении палеоарктической ветви комплекса *maculipennis* была основана на результатах анализа кутикулярных углеводов (Phillips et al., 1990). Таксономический статус анцестральной формы, как и в статье А.Р. Bianchi с коллегами (1980), в этой работе также не ясен. По мнению авторов, от предковой формы ранее всех остальных видов отделился *An. atroparvus*, после чего исходная форма последовательно дала начало *An. labranchiae*, *An. messeae* и разделилась на *An. maculipennis* и *An. melanoon*. Критическое отношение к этой схеме вызывают наличие в ней только пяти видов и отсутствие кластера *An. atroparvus*/*An. labranchiae*, уверенно выделяющегося в схемах, построенных с использованием других маркеров.

Новый этап в изучении таксономии и филогении палеоарктической ветви комплекса *maculipennis* начался с применением методов молекулярной генетики. С помощью таксопринтного анализа (Новиков, Шевченко, 2001) был подтвержден сделанный ранее вывод о том, что таксон *An. messeae* s.l. не является единым полиморфным видом, а состоит из двух критических видов (А и В) с параллельными инверсионными полиморфизмами (Новиков, 1984).

Другим эффективным подходом к диагностике видов комплекса *maculipennis* стал анализ последовательности ITS2. На его основе дифференциация между критическими видами А и В *An. messeae* была также установлена (Новиков и др., 2004). Кроме того, он позволил выявить новые палеоарктические виды: *An. persiensis* (Sedaghat et al., 2003), *An. artemievi* (Гордеев и др., 2004) и *An. daciae* (Nicolescu et al., 2004). Отсутствие между *An. messeae* А и *An. daciae* существенных морфологических отличий, идентичность их последовательностей ITS2, а также тот факт, что последовательности ITS2 *Anopheles messeae* s.l. из северной Италии, исследованные и предоставленные в базу данных ДНК EMBL М. Di Luca с коллегами (2004), могут быть отнесены только к *An. messeae* А и *An. daciae*, стали основой вывода о конспецифичности *An. daciae* и *An. messeae* А (Ваулин, Новиков, 2010). Так как северная Италия – это типовое местообитание *An. messeae* (Falleroni, 1926), то *An. messeae* А и *An. daciae* соответствуют этому виду по исходному описанию.

Определенные сложности сопровождали описание *An. artemievi*. Цитогенетический анализ среднеазиатской формы *An. sacharovi* показал ее самостоятельность и валидность ранее описанного вида *An. martinius* (Стегний, 1976). Позже была определена нуклеотидная последовательность ITS2 образцов, в соответствии с ареалогией и окраской яиц, отнесенных к *An. martinius* (Marinucci et al., 1999). М.И. Гордеев с коллегами (2004) по результатам анализа ITS2 в популяциях этого региона описали новый вид – *An. artemievi*. Установлено, что *An. artemievi* обитает в северном Таджикистане (Habirov et al., 2012), где ранее находили *An. martinius*. О находках *An. martinius* в Таджикистане в работах последних лет сообщений нет. Последовательности ITS2 *An. martinius* [EMBL: AJ224329 и AY238406] и *An. artemievi* [EMBL: AJ849886] очень сходны (различия по четырем позициям, из которых две – мононуклеотидные делеции). Авторы, описавшие *An. artemievi*, представили последовательность ITS2

An. martinius [EMBL: AJ849885], резко отличающуюся от последовательности ITS2 *An. artemievi*. Учитывая все обстоятельства, можно заключить, что М. Marinucci с коллегами (1999) исследовали ITS2 существующего в тех местах вида *An. artemievi*, но ошибочно отнесли его к *An. martinius*.

Таким образом, к настоящему времени выявлено 11 палеоарктических видов комплекса *maculipennis*: *An. atroparvus*, *An. labranchiae*, *An. maculipennis*, *An. melanoon* (syn. *subalpinus*), *An. persiensis*, *An. artemievi*, *An. sacharovi*, *An. martinius*, *An. messeae* А (*An. daciae*), *An. messeae* В и *An. beklemishevi*.

P.D. Hebert с коллегами (2003) предложили метод описания видов по последовательности митохондриального гена цитохромоксидазы (COI), основанный на допущении равномерного накопления замен нуклеотидов в процессе дивергенции вариантов мтДНК. Критерием видовой самостоятельности авторы приняли дивергенцию COI в 2 %, что, по их расчетам, может произойти за 1 млн лет. Эта точка зрения не нашла подтверждения в ряде работ (Thelwell et al., 2000; Ваулин, Новиков, 2012; Храброва и др., 2013). В частности, последовательности COI близкородственных видов *An. messeae* А и *An. messeae* В образуют единый кластер. Генетическое расстояние между наиболее различающимися вариантами COI в пределах *An. messeae* s.l. сопоставимо с таковым между ним и *An. beklemishevi* (Ваулин, Новиков, 2012). Таксон *An. quadrimaculatus* был давно поделен на пять критических видов (А, В, С, D и E) (Cornel et al., 1996), однако вся эта группа была идентифицирована как один вид при изучении последовательностей COI (Cywinska et al., 2006). Следовательно, использование этой последовательности требует подкрепления другими данными для подтверждения межвидовой дифференциации. Афротропические виды *An. gambiae* и *An. arabiensis* (комплекс *Anopheles gambiae*) имеют перекрывающиеся полиморфизмы по мтДНК, но эти виды четко отличаются на уровне картины дисков политенных хромосом (Besansky et al., 1994).

Важным отличием генов рРНК от митохондриального гена COI является их согласованная эволюция (Dover, Flavell, 1984; Ganley, Kobayashi, 2007). В результате этого процесса может наблюдаться идентичность последовательностей генов рРНК и спейсеров или же стабильный (сходный у всех представителей вида) внутригеномный полиморфизм. По этой причине фрагменты генов рРНК, и в первую очередь ITS2, широко применяются для установления филогенетических связей и типирования видов *Anopheles* (Collins, Paskewitz, 1996; Beebe et al., 1999, 2001; Marinucci et al., 1999; Fanello et al., 2002; Wilkerson et al., 2004; Jariyapan et al., 2005; Ваулин, Новиков, 2012).

Особенностью дендрограмм, построенных на основе ITS2 палеоарктических видов комплекса *maculipennis*, является существенное различие их топологий, часто противоречащих результатам цитогенетического и гибридологического анализа (Marinucci et al., 1999; Гордеев и др., 2004; Новиков и др., 2004; Djadid et al., 2007). В частности, *An. atroparvus* может кластеризоваться с *An. messeae*, но не с гомосеквентным видом *An. labranchiae* (Kampen, 2005). *An. atroparvus* и *An. labranchiae* могут оказаться наиболее удаленными от неоарктических видов

(Djadid et al., 2007), несмотря на то что сколько-нибудь результативное скрещивание *An. freeborni* осуществлено только с этими двумя видами (Kitzmillier et al., 1967). Относительно высокое сходство отмечено между дендрограммами, построенными М. Marinucci с коллегами (1999) и Ю.М. Новиковым с коллегами (2004). Обе они в существенной степени соответствуют представлениям о филогении комплекса, сложившимся ранее.

Три филогенетических построения были сделаны с использованием последовательности ITS2 *An. beklemishevi*. В первой работе (Новиков и др., 2004) этот вид кластеризовался с *freeborni/hermsi/occidentalis*, во второй (Гордеев и др., 2004) – так же, как и в обзоре R.E. Harbach (2004), – с *An. quadrimaculatus*, в третьей (Kampen, 2005) – или с *freeborni/hermsi/occidentalis* или с остальными палеоарктическими видами. В первой и во второй работах была использована последовательность [EMBL: AJ511876] с многочисленными нестрогими прочитанными нуклеотидными позициями. Это обстоятельство и обилие инсерций/делений в ITS2, обуславливающее многообразие вариантов выравнивания сравниваемых последовательностей ITS2 разных видов, могли оказать влияние на топологию ветвления.

Поиск консенсуса

В нашей работе проведены филогенетические исследования по последовательностям ITS2, COI, варибельного участка D2 28S рДНК и митохондриального гена 16S рРНК, результаты которых вынесены в Доп. материалы 1–3 и которые также были вовлечены в сравнительный анализ и использованы при построении консенсусной схемы филогенетических связей между видами.

Сравнительный анализ различных подходов позволяет заключить, что наибольшую ценность для филогенетических реконструкций рассматриваемой группы видов имеют результаты цитогенетических и молекулярно-генетических исследований. Гибридологические исследования менее значимы, так как выполнены не в полном объеме, а результаты трудно интерпретировать из-за сложности связей между экологией, степенью репродуктивной изоляции и генетической дифференциации видов. Совокупность данных об отличии видов по политенным хромосомам и молекулярным маркерам позволяет уверенно говорить о наличии внутри палеоарктической ветви комплекса *maculipennis* трех пар близкородственных видов: *An. atroparvus/An. labranchiae*, *An. maculipennis/An. melanoon* и *An. messeae A/An. messeae B*. *Anopheles artemievi* гомосеквентен с *An. maculipennis*, но не образует с ним и с *An. melanoon* кластера на дендрограммах, построенных по ITS2. *Anopheles sacharovi* и *An. martinius* также близки и незначительно различаются по политенным хромосомам.

Принимая во внимание отсутствие соответствия между рассмотренными схемами филогенетических связей палеоарктических видов *maculipennis*, мы выдвигаем две эволюционные гипотезы. Одна из них в основном опирается на молекулярно-генетические, вторая – на цитогенетические, экологические и ареалогические исследования.

В соответствии с результатами цитогенетического и гибридологического анализов кластер *An. maculipennis/*

An. melanoon занимает промежуточное положение между парами видов *An. atroparvus/An. labranchiae* и *An. messeae A/An. messeae B*. М. Marinucci с коллегами (1999) установили, что кластер *An. maculipennis/An. melanoon* по ITS2 близок к *An. messeae*, а результаты нашего исследования последовательности фрагмента гена 16S рРНК свидетельствуют о его близости к *An. atroparvus*. Если анализировать структуру ITS2 и не учитывать *An. beklemishevi*, то *An. sacharovi/An. martinius* – наиболее древняя ветвь группы (Marinucci et al., 1999; Новиков и др., 2004), однако, по результатам цитогенетического анализа, *An. sacharovi* произошел от *An. atroparvus*, а *An. martinius* – от *An. sacharovi* (White, 1978; Стегний, 1991). Генетические расстояния (Kimura, 1980), рассчитанные для последовательности фрагмента гена COI *An. sacharovi*, *An. messeae* s.l., *An. labranchiae* и *An. maculipennis*, показали наибольшую удаленность *An. sacharovi* от рассматриваемых видов: между самыми распространенными вариантами фрагмента гена COI *An. messeae* s.l., *An. labranchiae* и *An. maculipennis* они имели значения в пределах 0,027–0,034, а между этими видами и *An. sacharovi* – 0,054–0,057.

Топология дендрограмм, построенных на основе последовательностей COI палеоарктических видов без учета *An. beklemishevi*, может варьировать в случае применения разных алгоритмов и включения/исключения видов из анализа, и, как вариант, наиболее ранняя дивергенция *An. sacharovi* от предковой палеоарктической формы возможна. Ранняя дивергенция *An. sacharovi* не противоречит результатам анализа изоферментов (Bianchi et al., 1980). Можно допустить, что кластер *An. sacharovi/An. martinius* обособился ранее кластера *An. atroparvus/An. labranchiae* и обрел значительные особенности при независимой эволюции. Отметим, что *An. artemievi* и *An. persiensis* относительно близки к кластеру *An. sacharovi/An. martinius* по экологии и географическому распространению. Все четыре вида приспособлены к климату восточного Средиземноморья и Средней Азии. *Anopheles artemievi* гомосеквентен с *An. maculipennis*, но сходен с *An. sacharovi* и *An. martinius* по морфологии яиц (Гордеев и др., 2004).

Учитывая экологические особенности видов и последовательности ITS2, можно обоснованно полагать, что этапы адаптивной радиации анцестральной формы были следующими: кластер *An. sacharovi/An. martinius* отделился раньше других, *An. persiensis* был вторым, *An. artemievi* – третьим. Все другие палеоарктические виды, за исключением *An. beklemishevi*, дивергировали от предка, общего с *An. artemievi*, позже. На основании приведенных выше результатов и соображений в попытке найти консенсус построена обобщенная схема филогенеза палеоарктической ветви комплекса *maculipennis* (рисунок, а и Доп. материалы 2 (рис. 5), где дано обоснование приведенной кластеризации видов). В пользу того, что именно *An. beklemishevi* первым дивергировал от предковой формы палеоарктической ветви комплекса *maculipennis*, свидетельствуют результаты анализа 16S рДНК, гена COI и варибельного участка D2 28S рДНК. Однако по структуре политенных хромосом *An. beklemishevi* значительно отличается от «стандартной» для палеоарктических видов картины дисков (Стегний, 1991).

Объяснением этого противоречия отчасти может быть отбор, направленный в данном случае в сторону увеличения сходства нуклеотидных последовательностей (Новиков и др., 2004).

Можно взглянуть на филогению группы и с другой точки зрения. В качестве критерия филогенетической близости нередко применяют степень репродуктивной изоляции между видами, которая зависит от физиологических, экологических и поведенческих особенностей вида. Эти свойства генетически детерминированы сегментами генома, имеющими адаптивное выражение, а не нейтральными, используемыми в молекулярно-генетических исследованиях в качестве маркеров. Причем степени генетических отличий по каждому из указанных свойств вида могут быть совершенно несоизмеримыми. По этой причине для выяснения направления видообразования необходимо исследовать названные особенности видов и степень генетических различий между видами дифференциально.

На наш взгляд, в случае если географическое распространение видов хорошо известно, его закономерности также могут быть серьезным аргументом в установлении истории группы. Наиболее вероятно, что палеоарктическая ветвь комплекса *maculipennis* имеет североамериканское происхождение, а ее миграция в Евразию происходила через Берингийский мост. Относительно отдаленное родство *An. beklemishevi* с остальными палеоарктическими видами позволяет предполагать, что было две волны такой миграции. Предок всей палеоарктической группы, кроме *An. beklemishevi*, мигрировал в первой волне, а предок *An. beklemishevi* или собственно этот вид – во второй.

Географическое распространение видов палеоарктической ветви меняется закономерно. Ареалы видов комплекса – наибольшие на северо-востоке и севере Евразии и последовательно уменьшаются в юго-западном и южном направлении. Широко распространенные виды генетически более вариабельны и экологически менее специализированы, чем виды, обладающие небольшими ареалами. Виды с большими ареалами, скорее всего, являются предковыми для видов с малыми ареалами, но не наоборот (Lewontin, 1974). Основным фактор, влияющий на продолжительность жизненного цикла комаров, – температура окружающей среды, а она существенно возрастает в направлении с северо-востока на юго-запад Евразии. Следовательно, биологический возраст видов (число поколений и, соответственно, репликаций ДНК) в разных регионах Евразии не имеет прямого соответствия астрономическому времени. Например, *An. messeae* В имеет одну-две генерации в год в Восточной Сибири, а *An. sacharovi* имеет пять-семь генераций за год в Малой Азии. По этой причине *An. sacharovi* может эволюционировать примерно в пять раз быстрее. Следовательно, при учете нейтральных нуклеотидных замен, число которых в основном зависит от числа актов репликации и рекомбинации, самый молодой в астрономическом исчислении вид может оказаться биологически довольно старым и наиболее удаленным генетически, если он обитает в регионах с большой продолжительностью сезонов размножения. В целях проверки этого утверждения для

последовательности фрагмента гена COI нами была дополнительно построена методом UPGMA дендрограмма (Доп. материалы 2 (рис. 4)). Метод UPGMA основан на гипотезе молекулярных часов (Вейр, 1995). В соответствии с дендрограммой, *An. sacharovi* отделился от предковой формы раньше, чем неарктический *An. earlei*. Отклонение от принципа молекулярных часов влияет на топологию дендрограмм, построенных методом максимальной экономии. Последствия такого отклонения для других методов конструирования дендрограмм не ясны (Лукашов, 2009).

Филогенетические схемы, в которых кластеры *An. atroparvus*/*An. labranchiae* или *An. sacharovi* помещены в основание палеоарктической ветви, вызывают вопрос, какие причины заставили предковый палеоарктический вид переместиться на 5–7 тыс. км с северо-востока Евразии на юго-запад, чтобы начать адаптивную радиацию в Предкавказье или Центральной Европе, и почему исчез этот вид? Маловероятно, что *An. sacharovi* мог возникнуть в Сибири (т. е. на середине миграционного пути предковой формы), а затем переместиться на юго-запад через огромные пространства, в дальнейшем занятые произошедшими от него видами. Это противоречит идее о физиологической константности видов, обусловленной возникновением дискретных различий в теплоустойчивости клеток при видообразовании (Ушаков, 1957), а также феномену дискретности экологических ниш.

Опираясь на географическое распространение всех палеоарктических видов комплекса *maculipennis* (исключая *An. beklemishevi*), сходство политенных хромосом и высказанные выше соображения, мы выдвигаем вторую гипотезу об истории этой группы. Согласно ей, форма, мигрировавшая из Северной Америки в Евразию по Берингийскому мосту, по экологическим потребностям была близка *An. messeae* В или тождественна ему, т. е. холодоустойчива и экзотильна (Новиков, 1997). Предковый вид, встретив в Евразии подходящие условия, начал расширять свой ареал на ее обширные территории. Первым от этой древней формы произошел *An. maculipennis*. Вероятнее всего, это случилось в Европе, и видообразование сопровождалось перестройкой половой хромосомы – *An. messeae* В и *An. maculipennis* могут иметь идентичную структуру политенных аутосом (с учетом обширного хромосомного полиморфизма у *An. messeae* s.l.). *Anopheles messeae* А, вероятно, также произошел от *An. messeae* В, но позже *An. maculipennis*, распространился в Европе и начал экспансию на восток, усилившуюся с потеплением климата (Новиков, 1997; Novikov, Vaulin, 2014). Для более южных форм комплекса скорость накопления нуклеотидных замен за астрономическое время возросла вследствие увеличения числа поколений в год. *Anopheles maculipennis* дал начало *An. melanoon*, *An. artemievi*, вероятно, и *An. persiensis*. Однако, если три первых вида гомосеквентны, то *An. persiensis* цитогенетически не исследован. Вероятно, *An. atroparvus* произошел тоже от *An. maculipennis*, эти два вида различаются одной фиксированной инверсией в хромосомном плече 3R (Стегний, 1991). *Anopheles atroparvus* дал начало *An. labranchiae* и *An. sacharovi*, от последнего из которых произошел *An. martinius*. *Anopheles beklemishevi* дивер-

гировал от *An. earlei* или близкого ему вида в Америке и мигрировал в Евразию позже. Таким образом, филогения группы могла быть такой, как показано на рисунке, б.

В соответствии с нашей гипотезой, общее направление эволюции палеоарктической ветви комплекса было от экзотических, эвритерных форм, приспособленных к короткому лету и дикой природе, к эндофильным, адаптированным к длинному теплому сезону и ассоциированным с поселениями человека. Эврибионтные слабо специализированные виды дали начало стенобионтным и более специализированным. Адаптивная радиация группы завершилась в Южной Европе, Северной Африке, Средней Азии и Иране вследствие исчерпания потенциала физиологической толерантности к температуре.

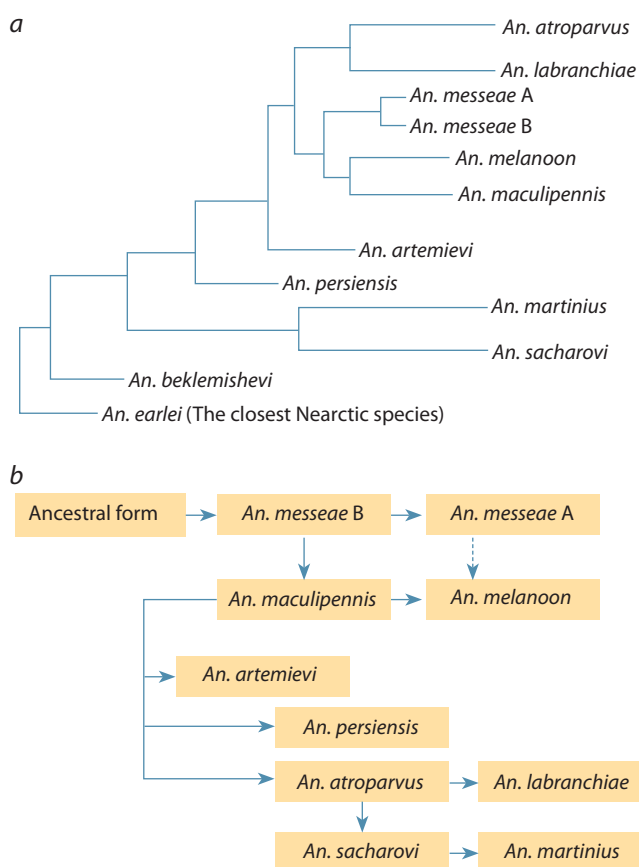
Особенность этой схемы – ее «инвертированность» по отношению ко многим другим, построенным ранее. Эта инвертированность объясняется различиями в темпах молекулярной эволюции различных палеоарктических членов комплекса *maculipennis*, а также сложностью эволюции физиологических и поведенческих черт.

Заключение

Предложенные нами схемы филогенеза палеоарктической ветви комплекса *maculipennis* – результат критического анализа известных представлений об ее эволюции, учета последних молекулярно-генетических исследований, а также закономерностей географического распространения и экологических особенностей видов этой группы.

Отсутствие цитогенетических и экологических данных для *An. persiensis* наряду с противоречиями топологий дендрограмм, построенных по результатам молекулярно-генетических исследований, требует дальнейшей работы. Учет несоответствия астрономического и биологического времени при интерпретации эволюционного процесса в некоторой степени способствует решению этой проблемы.

Рассмотренные нами молекулярно-генетические филогенетические деревья основаны на малом числе маркеров. Более обширные исследования геномов могут значительно расширить представления об эволюции рассматриваемой группы видов. Возможным подходом в исследовании направления эволюции палеоарктической ветви комплекса является секвенирование участков, фланкирующих предположительно древние инверсионные варианты, и сравнение их с соответствующими участками генома неарктических видов. Такая работа была проведена для хорошо изученного комплекса *Anopheles gambiae* (Kamali et al., 2012). Показано, что цитогенетическое сходство или различие видов могут быть обусловлены предковыми полиморфизмами и межвидовой гибридизацией (Fontaine et al., 2015). Если подобное будет установлено для палеоарктической ветви комплекса *maculipennis*, гомосеквентность *An. artemievi* и *An. maculipennis/An. melanoon* и его удаленность от этого кластера по другим признакам (см. Доп. материалы 2 (подпись к рис. 5)) могут быть объяснены. Однако наиболее перспективным подходом к установлению филогенетических связей между палеоарктическими видами комплекса *maculipennis* следует признать полногеномное исследование представителей разных популяций всех видов группы, а также наиболее близких североамериканских видов. Вместе с тем для



Consensus trees of the Palaearctic branch of the *maculipennis* complex. (a) The tree constructed with emphasis on molecular genetic data; (b) the tree constructed with emphasis on cytogenetics, ecology, and species ranges. The dotted arrow indicates a possible and less probable speciation direction.

установления направления видообразования необходимо учитывать все имеющиеся знания о видах комплекса *maculipennis*.

Acknowledgments

This work was supported by State Budgeted Project 0324-2015-0004.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

- Altuchov Yu.P. Populyatsionnaya genetika ryb [Population genetics of fish]. Moscow, Pishchevaya promyshlennost' Publ., 1974. (in Russian)
- Beebe N.W., Ellis J.T., Cooper R.D., Saul A. DNA sequence analysis of the ribosomal DNA ITS2 region for the *Anopheles punctulatus* group of mosquitoes. *Insect Mol. Biol.* 1999;8(3):381-390.
- Beebe N.W., Maung J., van den Hurk A.F., Ellis J.T., Cooper R.D. Ribosomal DNA spacer genotypes of the *Anopheles bancroftii* group (Diptera: Culicidae) from Australia and New Guinea. *Insect Mol. Biol.* 2001;10(5):407-414.
- Besansky N.J., Powello J.R., Caccone A., Hamm D.M., Scott J.A., Collins F.H. Molecular phylogeny of the *Anopheles gambiae* complex

- suggests genetic introgression between principal malaria vectors. Proc. Natl Acad. Sci. 1994;91:6885-6888.
- Bianchi Bullini A.P., Cianchi R., Sabatini A., Coluzzi M., Bullini L. Ricerche elettroforetiche su specie paleartiche del complesso *Anopheles maculipennis* (Diptera, Culicidae). Atti XII Congr. Naz. Entomol. Roma. 1980;2:255-259.
- Carson H.L. The genetics of speciation at the diploid level. Am. Nat. 1975;109:83-92.
- Collins F.H., Paskewitz S.M. A review of the use of ribosomal DNA (rDNA) to differentiate among cryptic *Anopheles* species. Insect Mol. Biol. 1996;5(1):1-9.
- Coluzzi M., Sabatini A., Petrarca V., Di Deco M.A. Chromosomal differentiation and adaptation to human environments in the *Anopheles gambiae* complex. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 1979;73(5):483-497.
- Cornel A.J., Porter C.H., Collins F.H. Polymerase chain reaction species diagnostic assay for *Anopheles quadrimaculatus* cryptic species (Diptera: Culicidae) based on ribosomal DNA ITS2 sequences. J. Med. Entomol. 1996;33(1):109-116.
- Cywinska A., Hunter F.F., Hebert P.D.N. Identifying Canadian mosquito species through DNA barcodes. Med. Vet. Entomol. 2006;20:413-424.
- Di Luca M., Boccolini D., Marinucci M., Romi R. Intrapopulation polymorphism in *Anopheles messeae* (*An. maculipennis* complex) inferred by molecular analysis. J. Med. Entomol. 2004;41(4):582-586. DOI <http://dx.doi.org/10.1603/0022-2585-41.4.582>.
- Djadjid N.D., Gholizadeh S., Tafsiiri E., Romi R., Gordeev M., Zakeri S. Molecular identification of Palearctic members of *Anopheles maculipennis* in northern Iran. Malar. J. 2007;6:6.
- Dobzhansky Th. Genetics of the Evolutionary Process. New York: Columbia Univ. Press, 1970.
- Dover G., Flavell R. Molecular coevolution: DNA divergence and the maintenance of function. Cell. 1984;38(3):622-623.
- Falleroni D. Fauna anofelica italiana e suo 'habitat' (paludi, risaie, canali). Metodi di lotta contro la malaria. Riv. Malar. 1926;5(5-6):553-593.
- Fanello C., Santolamazza F., della Torre A. Simultaneous identification of species and molecular forms of the *Anopheles gambiae* complex by PCR-RFLP. Med. Vet. Entomol. 2002;16:461-464.
- Fontaine M.C., Pease J.B., Steele A., Waterhouse R.M., Neafsey D.E., Sharakhov I.V., Jiang X., Hall A.B., Catteruccia F., Kakani E., Mitchell S.N., Wu Y.C., Smith H.A., Love R.R., Lawniczak M.K., Slotman M.A., Emrich S.J., Hahn M.W., Besansky N.J. Mosquito genomics. Extensive introgression in a malaria vector species complex revealed by phylogenomics. Science. 2015;347(6217). DOI 10.1126/science.1258524.
- Ganley A.R.D., Kobayashi T. Highly efficient concerted evolution in the ribosomal DNA repeats: Total rDNA repeat variation revealed by whole-genome shotgun sequence data. Genome Res. 2007;17:184-191.
- Gentile G., Santolamazza F., Fanello C.V., Petrarca V., Caccone A., della Torre A. Variation in an intron sequence of the voltage-gated sodium channel gene correlates with genetic differentiation between *Anopheles gambiae* s.s. molecular forms. Insect Mol. Biol. 2004;13(4):371-377.
- Gordeev M.I., Goryacheva I.I., Zvantsov A.B., Shaikevich E.V., Ezhov M.N. Molecular genetic analysis of malaria mosquito of Middle Asia. Vestnik Tomskogo gosudarstvennogo universiteta. Prilozhenie = Bulletin TSU, Supplement. Tomsk, 2004;10:17-19. (in Russian)
- Habirov Z., Kadamov D., Iskandarov F., Komilova S., Cook S., McAlister E., Harbach R.E. Malaria and the *Anopheles* mosquitoes of Tajikistan. J. Vector Ecol. 2012;37(2):419-427.
- Harbach R.E. The classification of genus *Anopheles* (Diptera: Culicidae): a working hypothesis of phylogenetic relationships. B. Entomol. Res. 2004;94(6):537-553.
- Hebert P.D.N., Cywinska A., Ball S., de Waard J.R. Biological identifications through DNA barcodes. P. Roy. Soc. B. 2003;270:313-321.
- Higgins D.G., Thompson J.D., Gibson T.J. Using CLUSTAL for multiple sequence alignments. Method Enzymol. 1996;266:383-402.
- Ilyinskaya N.B. A case of somatic mosaicism for a heterozygous paracentric inversion in chromosome II of *Chromosome plumosus*. Tsitologiya = Cytology. 1977;19(1):45-49. (in Russian)
- Jariyapan N., Choochote W., Junkum A., Jitpakdi A., Komalamisra N., Bates P.A., Crampton J.M. Sequence analyses of three nuclear ribosomal loci and a mitochondrial locus in cytologically different forms of Thai *Anopheles aconitus* mosquitoes. Southeast Asian J. Trop. Med. 2005;36(5):1162-1173.
- Kamali M., Xia A., Tu Z., Sharakhov I.V. A new chromosomal phylogeny supports the repeated origin of vectorial capacity in malaria mosquitoes of the *Anopheles gambiae* Complex. PLoS Pathog. 2012;8(10):e1002960. DOI 10.1371/journal.ppat.1002960.
- Kampen H. The ITS2 ribosomal DNA of *Anopheles beklemishevi* and further remarks on the phylogenetic relationships within the *Anopheles maculipennis* group of species (Diptera: Culicidae). Parasitol. Res. 2005;97:118-128.
- Kasap H. Comparison of experimental infectivity and development of *Plasmodium vivax* in *Anopheles sacharovi* and *An. superpictus* in Turkey. Am. J. Trop. Med. Hyg. 1990;42(2):111-117.
- Khrabrova N.V., Andreeva Yu.V., Vaulin O.V., Alekseeva S.S., Sibataev A.K. Variability of mitochondrial cytochrome oxidase subunit I gene sequence in species of the genera *Aedes* and *Ochlerotatus* (Diptera: Culicidae). Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2013;17(1):114-122. (in Russian)
- Kimura M. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. J. Mol. Evol. 1980;16:111-120.
- Kitzmler J.B., Frizzi G., Baker R.H. Evolution and speciation within the maculipennis complex of the genus *Anopheles*. Eds. J.W. Wright, R. Pal. Genetics of Insect Vectors of Disease. Amsterdam: Elsevier Publ. Co, 1967;151-210.
- Kovalenko L.V., Zakharenko L.P., Voloshina M.A., Karamysheva T.V., Rubtsov N.B., Zakharov I.K. Behavior of *hobo* and *P* transposons in *yellow2-717* unstable line of *Drosophila melanogaster* and its derivatives after crossing with a laboratory strain. Genetika = Genetics (Moscow). 2006;42(6):748-756. (in Russian)
- Laboudi M., Faraj C., Sadak A., Harrat Z., Boubidi S.C., Harbach R.E., El Aouad R., Linton Y.M. DNA barcodes confirm the presence of a single member of the *Anopheles maculipennis* group in Morocco and Algeria: *An. sicaulti* is conspecific with *An. labranchiae*. Acta Trop. 2011;118:6-13.
- Lanzaro G.C., Lee Y. Speciation in *Anopheles gambiae* – The distribution of genetic polymorphism and patterns of reproductive isolation among natural populations. Ed. S. Manguin. *Anopheles* mosquitoes – New Insights into Malaria Vectors. InTech. Publ. 2013:175-196.
- Lewontin R.C. The Genetic Basis of Evolutionary Change. New York: Columbia Univ. Press, 1974.
- Lukashov V.V. Molekulyarnaya evolyutsiya i filogeneticheskiy analiz [Molecular evolution and phylogenetic analysis]. Binom Publ., Moscow, 2009. (in Russian)
- Marinucci M., Romi R., Mancini M., Di Luca M., Severini C. Phylogenetic relationships of seven palearctic members of the maculipennis complex inferred from ITS2 sequence analysis. Insect Mol. Biol. 1999;8(4):469-480.
- Marrelli M.T., Sallum M.A.M., Marinotti O. The second internal transcribed spacer of nuclear ribosomal DNA as a tool for Latin American anopheline taxonomy – A critical review. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro. 2006;101(8):817-832.
- Nicolescu G., Linton Y.M., Vladimirescu A., Howard T.M., Harbach R.E. 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. B. Entomol. Res. 2004;94(6):525-535.
- Novikov Yu.M. *Anopheles messeae* Fall (Diptera, Culicidae): two species in *statu nascenti*. Makroevolyutsiya [Macroevolution]. Materialy I Vsesoyuznoy konferentsii po problemam evolyutsii [Proceedings of the 1st All-USSR conference on evolutionary problems]. Moscow, Nauka Publ., 1984:13-14. (in Russian)

- Novikov Yu.M. Effects of global warming: Directed dynamics of *Anopheles* species proportions and cytogenetic structure of the taxon *Anopheles messeae* Fall in Western Siberia. Problemy evolyutsionnoy tsitogenetiki, selektsii i introduksii [Problems of evolutionary cytogenetics, breeding, and introduction]. Materialy nauchnykh chteniy, posvyashchennykh 100-letiyu professora A.P. Chekhova [Materials of scientific readings dedicated to the 100th anniversary of Professor A.P. Chekhov]. Tomsk, IAP TPU Publ., 1997:39-41. (in Russian)
- Novikov Yu.M., Shevchenko A.I. Inversion polymorphism and the divergence of two cryptic forms of *Anopheles messeae* (Diptera, Culicidae) at the level of genomic DNA repeats. Genetika = Genetics (Moscow). 2001;37(7):915-925. (in Russian)
- Novikov Yu.M., Shevchenko A.I., Vaulin O.V. On the molecular-genetic divergence of cryptic species of the *Anopheles messeae* taxon (Diptera: Culicidae) and the phylogeny of the maculipennis complex. Vestnik Tomskogo gosudarstvennogo universiteta. Prilozhenie = Bulletin TSU, Supplement. Tomsk, 2004;(10):69-77. (in Russian)
- Novikov Yu.M., Vaulin O.V. Expansion of *Anopheles maculipennis* s.s. (Diptera: Culicidae) to northeastern Europe and northwestern Asia: Causes and Consequences. Parasites & Vectors. 2014;7:389. DOI 10.1186/1756-3305-7-389.
- Phillips A., Sabatini A., Milligan P.J.M., Boccolini D., Broomfield G., Molyneux D.H. The *Anopheles maculipennis* complex (Diptera: Culicidae): comparison of the cuticular hydrocarbon profiles determined in adults of five Palaearctic species. Bull. Entomol. Res. 1990;80:459-464.
- Porter C.H., Collins F.H. Phylogeny of nearctic members of the *Anopheles maculipennis* species group derived from the D2 variable region of 28S ribosomal RNA. Mol. Phylogenet. Evol. 1996;6(2):178-188.
- Ramsdale C., Snow K. Distribution of genus *Anopheles* in Europe. JEMCA (EMB). 2000;7:1-26.
- Sedaghat M.M., Linton Y.M., Oshagi M.A., Vatandoost H., Harbach R.E. The *Anopheles maculipennis* complex (Diptera: Culicidae) in Iran: molecular characterization and recognition of a new species. Bull. Entomol. Res. 2003;93(6):527-535.
- Sievers F., Wilm A., Dineen D., Gibson T.J., Karplus K., Li W., Lopez R., McWilliam H., Remmert M., Söding J., Thompson J.D., Higgins D.G. Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. Mol. Syst. Biol. 2011;7:539.
- Stegnii V.N. Detection of chromosomal races of the malaria mosquito *Anopheles sacharovi*. Tsitologiya = Cytology. 1976;18(8):1039-1041. (in Russian)
- Stegnii V.N. Populyatsionnaya genetika i evolyutsiya malyariynykh komarov [Population genetics and evolution of malaria mosquitoes]. Tomsk, TSU Publ., 1991. (in Russian)
- Stegnii V.N., Kabanova V.M. Cytoecological study of the natural malaria mosquito population in the USSR: I. Isolation of a new species in the maculipennis complex of malaria mosquitoes by cytodagnosis. Meditsinskaya parazitologiya i parazitarnye bolezni = Medical Parasitology and Parasitological Diseases. 1976;14(2):192-198. (in Russian)
- Stegnii V.N., Sichinava Sh.G., Sipovich N.G. Test cross analysis and biology of malaria mosquitoes of the *Anopheles maculipennis* complex (Diptera, Culicidae) in Western Georgia. Zoologicheskii zhurnal = Zoological Journal (Moscow). 1984;63(4):613-619. (in Russian)
- Takken W., Geene R., Adam W., Jetten T.H., van der Velden J.A. Distribution and dynamics of larval populations of *Anopheles messeae* and *A. atroparvus* in the delta of the rivers Rhine and Meuse, The Netherlands. AMBIO. 2002;31(3):212-218.
- Tamura K. Estimation of the number of nucleotide substitutions when there are strong transition-transversion and G + C-content biases. Mol. Biol. Evol. 1992;9:678-687.
- Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M., Kumar S. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. Mol. Biol. Evol. 2011;28(10):2731-2739.
- Thelwell N.J., Huisman R.A., Harbach R.E., Butlin R.K. Evidence for mitochondrial introgression between *Anopheles bwambae* and *Anopheles gambiae*. Insect Mol. Biol. 2000;9(2):203-210.
- Ushakov B.P. On labile and stable features of a species. Vestnik Leningradskogo gosudarstvennogo universiteta im. A.S. Pushkina = Vestnik of Pushkin Leningrad State University. 1957;4:153-154. (in Russian)
- Vaulin O.V., Novikov Yu.M. Geographical variability of ITS2 rDNA and COI mtDNA and cryptic species of mosquito *Anopheles messeae* Fall. (Diptera: Culicidae). Informatsionnyy vestnik VOGiS = The Herald of Vavilov Society for Geneticists and Breeders. 2010;14(3):546-557. (in Russian)
- Vaulin O.V., Novikov Yu.M. Polymorphism and interspecific variability of cytochrome oxidase subunit I (COI) gene nucleotide sequence in sibling species of A and B An. messeae and An. beklemishevi (Diptera: Culicidae). Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektsii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2012;16(2):358-368. (in Russian)
- Weir B.S. Analiz geneticheskikh dannykh [Genetic Data Analysis]. Moscow, Mir Publ., 1995. (in Russian)
- White G.B. Systematic reappraisal of the *Anopheles maculipennis* complex. Mosq. Syst. 1978;10(1):13-44.
- Wilkerson R.C., Reinert J.F., Li C. Ribosomal DNA ITS2 sequences differentiation six species in the *Anopheles crucians* complex (Diptera: Culicidae). J. Med. Entomol. 2004;41(3):392-401.
- Zulueta J. de, Ramsdale C., Cianchi R., Bullini L., Coluzzi M. Observations on the taxonomic status of *Anopheles sicaulti*. Parassitologia. 1983;25(1):73-92.