

УДК 574.3, 595.771

© Гордеев М. И., Москаев А. В.,
Манукян Д. В., Мелик-Андреасян Г. Г., Кешишян А. Ш.,
Арутюнова М. В., Арутюнова К. В., Топлуоглу С., 2012

МОРФОМЕТРИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ СТИГМАЛЬНЫХ ПЛАСТИНОК ЛИЧИНОК МАЛЯРИЙНЫХ КОМАРОВ

Аннотация. Получены объемные фотографии стигмальных пластинок *An. claviger*, *An. maculipennis*, *An. messeae*, *An. sacharovi*, *An. superpictus*. Определена структура стигмальных пластинок, предложен ключ для определения видов-двойников комплекса *An. maculipennis* на территории Республики Армении. Проведен анализ стигмальных пластинок *An. superpictus*, *An. maculipennis*, *An. messeae*, *An. claviger* с использованием методов геометрической морфометрии. Установлено, что эти виды малярийных комаров хорошо расходятся в пространстве относительных деформаций. Виды *An. superpictus*, *An. claviger* и представители комплекса *An. maculipennis* хорошо разделяются в градиенте RW1 и RW2; виды-двойники *An. maculipennis* и *An. messeae* успешно дифференцируются по градиентам RW1 и RW3. Показано, что величины прокрустовых дистанций отражают степень родства изученных видов малярийных комаров рода *Anopheles*.

Ключевые слова. Малярийные комары, стигмальная пластинка, морфология, геометрическая морфометрия, *Anopheles*.

© M.Gordeev, A.Moskaev,
D. Manukyan, G.Melik-Andreasyan, A.Keshishyan,
M.Harutyunova, K.Harutyunova, S.Topluoglu, 2012

MORPHOMETRIC ANALYSIS OF MALARIA MOSQUITO LARVAE'S STIGMA PLATES

Abstract. The purpose of the given work is the analysis of larvae of malaria mosquitoes' stigma plates of *Anopheles* genus (*Diptera*, *Culicidae*). Three-dimensional photos of stigmal plates are received from *An. claviger*, *An. maculipennis*, *An. messeae*, *An. sacharovi*, *An. superpictus*. The structure of stigmal plates has been defined, a key for definition of sibling species of *An. maculipennis* complex on territory of Republic of Armenia has been developed. The analysis of stigmal plates of *An. superpictus*, *An. maculipennis*, *An. messeae*, *An. claviger* has been made with use of geometrical morphometry methods. It was stated that these species of malaria mosquitoes disperse well in the space of relative deformations. *An. superpictus*, *An. claviger* and representatives of complex *An. maculipennis* are well differentiated in RW1 and RW2 gradients; sibling species *An. maculipennis* and *An. messeae* are successfully differentiated on RW1 and RW3 gradients. It was shown that the sizes of Procrustean distances reflect the degree of relationship between the studied malaria mosquitoes of *Anopheles* genus.

Key words: Malaria mosquitoes, stigma plate, morphology, geometrical morphometry, *Anopheles*.

Комары рода *Anopheles* (Diptera, Culicidae) являются одной из наиболее хорошо изученных групп насекомых, что обусловлено их эпидемиологической ролью как переносчиков малярии. На территории СНГ представлены малярийные комары подрода *Anopheles* Meigen (19 видов) и подрода *Cellia* Theobald (3 вида) [2]. Среди комаров подрода *Anopheles* имеются три комплекса видов-двойников (*An. maculipennis*, *An. claviger*, *An. hyrcanus*), которые характеризуются высоким морфологическим сходством. Идентификация этих видов основана на комплексном анализе, включающем морфологические, цитогенетические и молекулярно-генетические критерии. В этой связи остается актуальной проблема выявления новых подходов для морфологического описания видов-двойников и поиска новых таксономических признаков.

Ранее в качестве основного морфологического критерия для разделения видов-двойников комплекса *An. maculipennis* использовали различия в хетотаксии (строение и расположение щетинок) [6]. В нашем исследовании в качестве основного морфологического критерия использовали строение стигмальной пластинки личинок 4-го возраста. Стигмальная пластинка является более надежным таксономическим признаком, поскольку не изменяется в процессе фиксации, в то время как хетты у отдельных личинок могут быть утрачены. В данной работе были получены объемные фотографии стигмальной пластинки, обработанные с помощью программы Helicon Focus, позволяющей объединять оптические срезы объекта. Такие объемные фотографии стигмальных пластинок получены впервые.

Перспективные результаты при анализе морфологии близкородственных видов насекомых дает использование принципов, методов и программ геометрической морфометрии [5, 9–14]. Целью данной работы был анализ стигмальных пластинок личинок малярийных комаров с использованием методов геометрической морфометрии.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Материалом исследования послужили выборки личинок IV возраста малярийных комаров рода *Anopheles*, фиксированных в спирт-уксусной смеси (3:1). Выборки личинок были собраны из 7 местообитаний Армении (табл.1). Перед препарированием личинок проводили морфологическую и цитогенетическую диагностику видов. Для морфологической диагностики использовали стандартные определители [1-4; 8]. Цитогенетическую диагностику видов-двойников комплекса *An. maculipennis* проводили отдельно. Слюнные железы комаров выделяли в капле фиксатора под микроскопом МБС–10. Хитиновый покров личинки приподнимали с помощью препаровальных игл. Затем из грудного отдела личинки извлекали парные слюнные железы, которые располагаются по обеим сторонам от кишечника. Фиксатор осушали фильтровальной бумагой. Железы окрашивали 2%-ным лактоацеторсином в течение 30 минут. По истечении времени излишки краски убирали фильтровальной бумагой. Железы дифференцировали в 45%-ной уксусной кислоте. Далее железы накрывали покровным стеклом и раздавливали легкими постукиваниями тупым концом препаровальной иглы. По краям покровного стекла наносили капли красителя для предотвращения высыхания препаратов. Цитогенетический анализ политенных хромосом проводили под микроскопом Micros (Австрия). На препаратах по хромосомам определяли видовой и половой состав личинок малярийных комаров путем сравнения с фотокартами политенных хромосом видов-двойников [7].

Анализ стигмальных пластинок личинок проводили под микроскопом Micros (Австрия). Для получения цифровых микрофотографий использовали USB-фотонасадку ScopeTek DCM500. Препараты фотографировались при увеличении 10x10 и вводились

в компьютер. Объемные фотографии стигмальных пластинок получены с помощью программы Helicon Focus. В программе TPSUtil они подготавливались к обработке в экранном дигитайзере TPSDig2, в котором размещались метки и их координаты оцифровывались [13; 14]. Всего было изучено 37 стигмальных пластинок четырех видов малярийных комаров (образцы 1–17 – *An. superpictus*; 18–23 – *An. maculipennis*; 24–36 – *An. messeae*; 37 – *An. claviger*). Места и даты сбора личинок малярийных комаров на территории Республики Армения приведены в табл. 1. Личинки *An. messeae* были собраны 28.06.10 г. на станции Угловка Акуловского района Нижегородской области (Россия). Комаров *An. sacharovi* использовали только для таксономического анализа, морфометрический анализ не проводили.

Таблица 1

**Места и даты сбора личинок малярийных комаров Армении,
индексы доминирования совместно обитающих видов**

№	Место сбора личинок	Дата сбора, 2010 года	Число особей	Индекс доминирования, $f \pm sf$, %			
				<i>An. superpictus</i>	<i>An. maculipennis</i>	<i>An. sacharovi</i>	<i>An. claviger</i>
1	Армения, Армавирская область, с. Грибоедово	23.07	9	44,4±16,6	55,6±16,6	-	-
2	Армения, Арагацотская область, с. Кучак	19.08	5	-	100	-	-
3	Армения, Араратская область, с. Шаумян и с. Таперакан	27.08	14	7,2±6,9	71,4±12,1	21,4±11,0	-
4	Армения, Катайская область, с. Арзни	07.08	44	-	100	-	-
5	Армения, Араратская область, с. Овташен	16.08	28	96,4±3,5	-	-	3,6±3,5
6	Армения, Араратская область, с. Овташен	27.07	2	-	100	-	-
7	Армения, Гегаркуникская область, с. Еранос	09.09	136	-	100	-	-

Примечание. В таблице использованы следующие обозначения: f – доля комаров отдельных видов (%); s_f – стандартная ошибка, $s_f = \sqrt{[f(1-f)/n]}$.

Для характеристики структуры стигмальной пластинки использовано 16 меток (рис. 1).



Рис. 1. Расположение меток, описывающих конфигурацию стигмальной пластинки (на примере личинки *An. maculipennis*).

Виды сравнивали по усредненным конфигурациям [5; 9]. Последние вычисляли для каждого вида в целом с помощью программы TPSRelw [12]; эта же программа использовалась для анализа сходственных отношений между видами и характера изменений конфигурации заднего, среднего и переднего отделов центральной пластинки. В программе реализован метод тонких пластин (thin-plate spline analysis). Для вычисления между усредненными конфигурациями прокрустовых дистанций использовалась программа TPSSplin [10].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Одной из задач морфологического анализа было создание регионального определителя малярийных комаров комплекса *An. maculipennis* по личинкам IV возраста для Республики Армения. Для этого было необходимо сравнить стигмальные пластинки видов-двойников *An. maculipennis* и *An. sacharovi*.

Стигмальная пластинка личинки *Anopheles* с используемыми обозначениями приведена на рис. 2.

Описание стигмальной пластинки. Части восьмого и девятого сегментов брюшка личинки *Anopheles* образуют стигмальную пластинку, на которой расположена пара дыхалец или стигм. Основное функциональное значение стигмальной пластинки состоит в следующем: установление контакта дыхательной системы с атмосферным воздухом при подъеме личинок на поверхность воды, поддержание личинок на поверхности воды,

защита стигм и трахей от проникновения воды во время пребывания личинок на глубине [2]. У личинок малярийных комаров стигмы окружены пятью лопастями: непарной передней, парой боковых и парой задних лопастей. У середины основания передней лопасти имеется эллипсоидное прозрачное образование. Оно обеспечивает поворот передней лопасти на 180° назад. Это происходит при нырянии личинки, в процессе которого передняя лопасть закрывает собой стигмы. В образующуюся полость между передней лопастью и стигмами захватывается воздух, который помогает личинке вернуться на поверхность водоема, а стигмальной пластинке – прорвать поверхностную пленку воды для установления контакта стигм с атмосферным воздухом и удержания личинки на поверхности воды [2].

Между передней и боковыми лопастями находятся стигмы. Над стигмами располагается центральная пластинка. Задние лопасти своими верхними поверхностями слиты с центральной пластинкой. Центральная пластинка состоит из трех отделов: переднего, среднего и заднего. Передний отдел начинается с сужающегося переднего отростка. Средний отдел центральной пластинки имеет ячеистую структуру (срединная грануляция). Ячеи служат местом прикрепления дорсовентральных мышц. Вдоль середины центральной пластинки проходит срединная пигментация. Она отчетливо выражена только в передней трети переднего отдела, которая по-разному проявляется у отдельных видов [1].

На рис. 3–7 приведены объемные фотографии стигмальных пластинок личинок 5 видов малярийных комаров. Стигмальная пластинка *An. superpictus* (рис. 3) имеет неравномерно пигментированную переднюю лопасть. Стигмы вплотную примыкают к переднему отделу центральной пластинки с помощью стигмальных отростков. Передний отдел не имеет боковых отростков. Боковые края среднего отдела параллельны друг другу. Срединная пигментация захватывает весь передний отдел, прерывается в среднем отделе и отчетливо выражена в задней части заднего отдела, образуя круг.

Особый интерес представляет сравнение стигмальных пластинок видов-двойников *An. maculipennis* (рис. 4) и *An. sacharovi* (рис. 5). Передняя лопасть обоих видов – с темным основанием, остальная часть заметно светлее. Стигмы отстоят от стигмальной пластинки, овальной формы, не имеют отростков. У *An. sacharovi* основание переднего отростка центральной пластинки не доходит до границы среднего отдела. У *An. maculipennis* срединная пигментация захватывает весь передний отдел центральной пластинки. У обоих видов отчетливо выражена срединная грануляция, образуя светлый медальон в срединном отделе. В конце заднего отдела центральной пластинки срединная пигментация образует полуовал у *An. sacharovi*. У *An. maculipennis* срединная пигментация охватывает весь задний отдел полностью, хотя в начале заднего отдела степень пигментации выражена слабее.

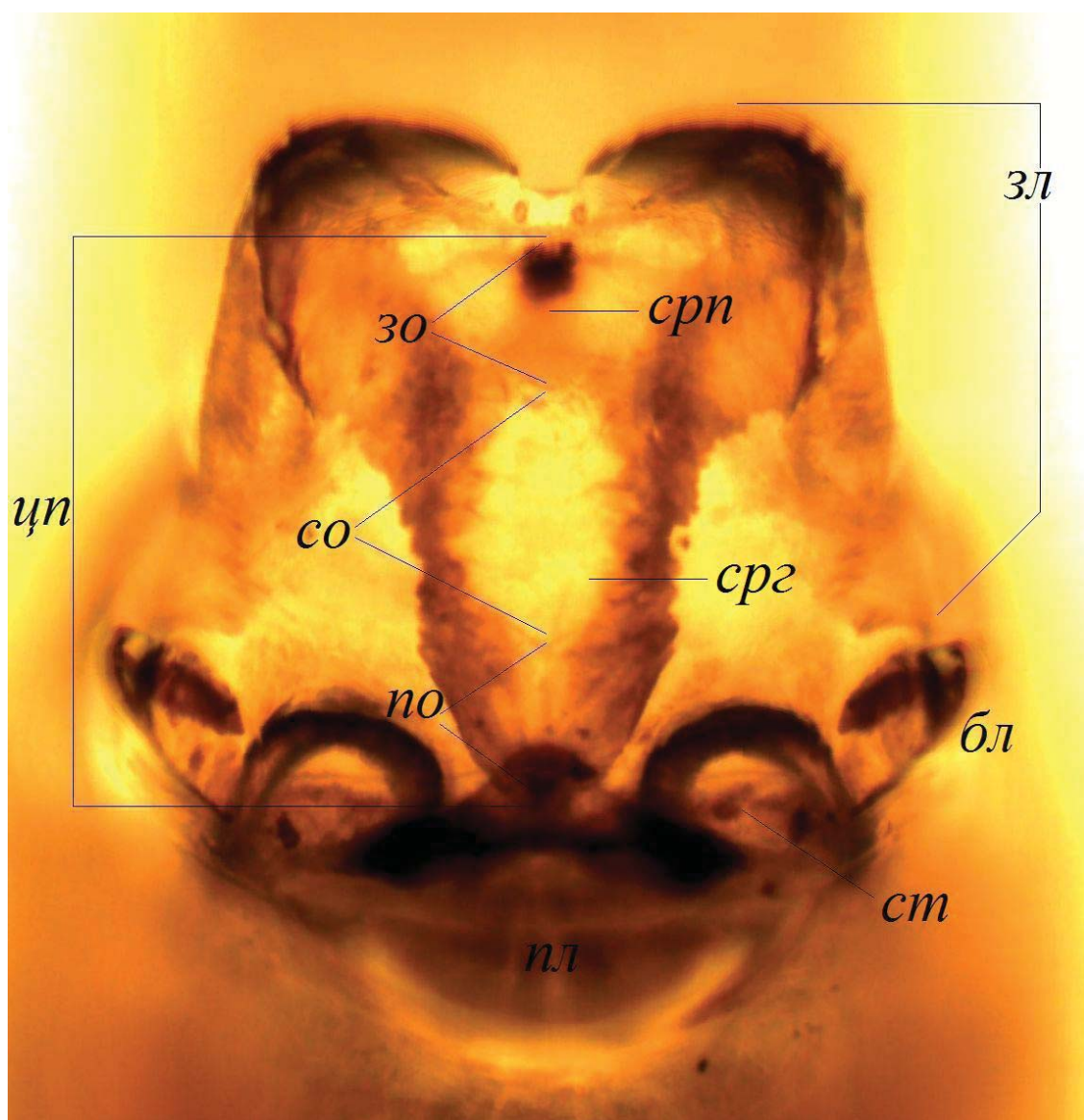


Рис. 2. Сtigмальная пластинка личинок *Anopheles* (на примере *An. sacharovi*)
зл, бл и пл – задняя, боковая и передняя лопасти, цп – центральная пластинка, зо, со и по – ее задний, средний и передний отделы, ст – стигмы, срг – срединная грануляция, срп – срединная пигментация.

Предлагается следующий ключ для определения двух видов-двойников комплекса *An. maculipennis* Армении по личинкам:

1(2) – строение стигмальной пластинки: срединная пигментация выражена только на краях переднего и заднего отделов центральной пластинки (занимает не более трети передней части переднего отдела и задней части заднего отдела).

An. sacharovi (Favre, 1903)

2(1) – строение стигмальной пластинки: срединная пигментация захватывает весь передний и большую часть заднего отдела центральной пластинки.

An. maculipennis (Meigen, 1818)

Стигмальная пластинка *An. claviger* (рис. 6) характеризуется равномерно пигментированной передней лопастью. Передний отдел центральной пластинки имеет форму треугольника с хорошо выраженной срединной пигментацией. В среднем отделе срединная пигментация ячеистая, темная или светлая. В заднем отделе срединная пигментация темная.

Стигмальная пластинка личинки *An. messeae* сходна с таковой у *An. maculipennis* (рис.7).

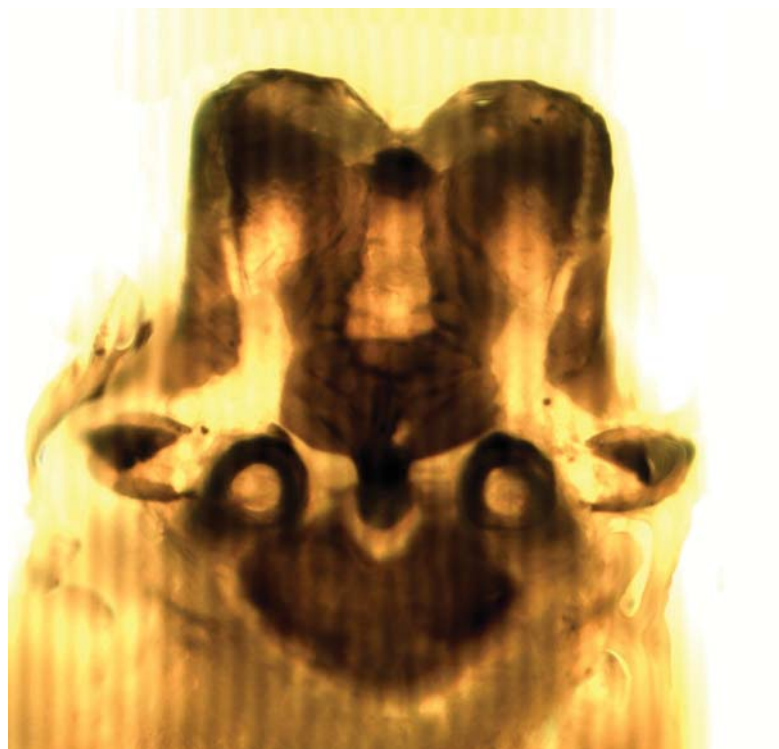


Рис. 3. Стигмальная пластинка личинки *An. superpictus*

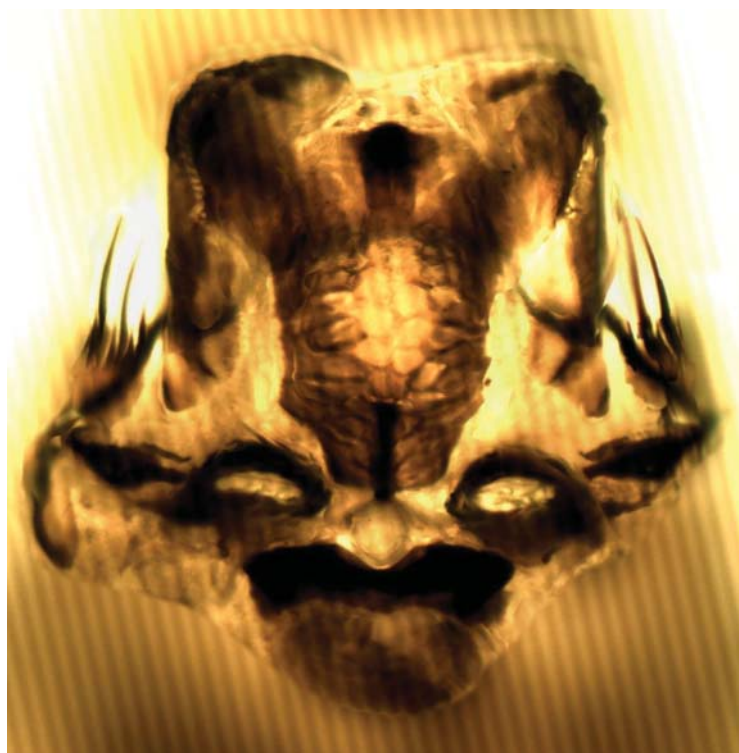


Рис. 4. Стигмальная пластинка личинки *An. maculipennis*

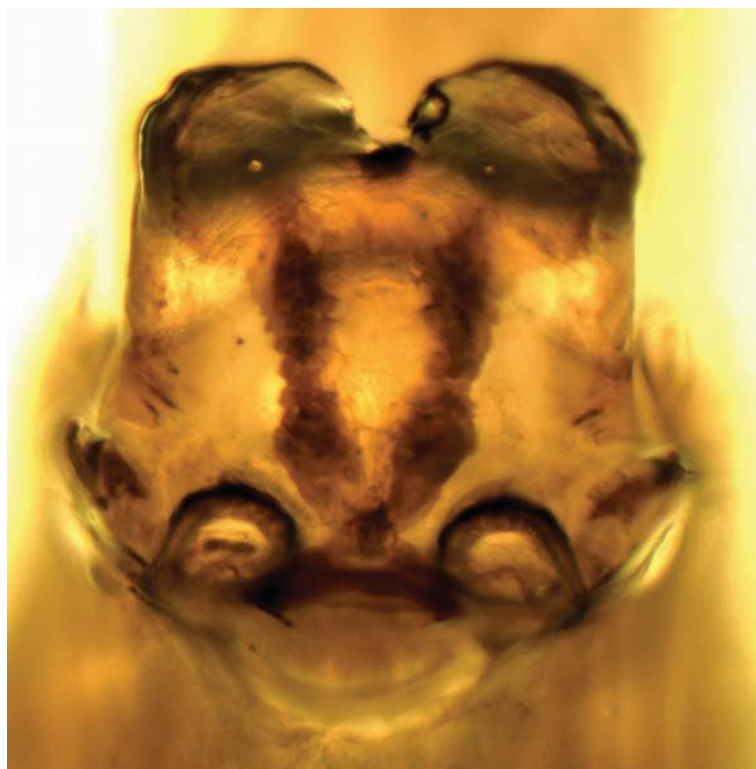


Рис. 5. Сtigмальная пластинка личинки *An. sacharovi*

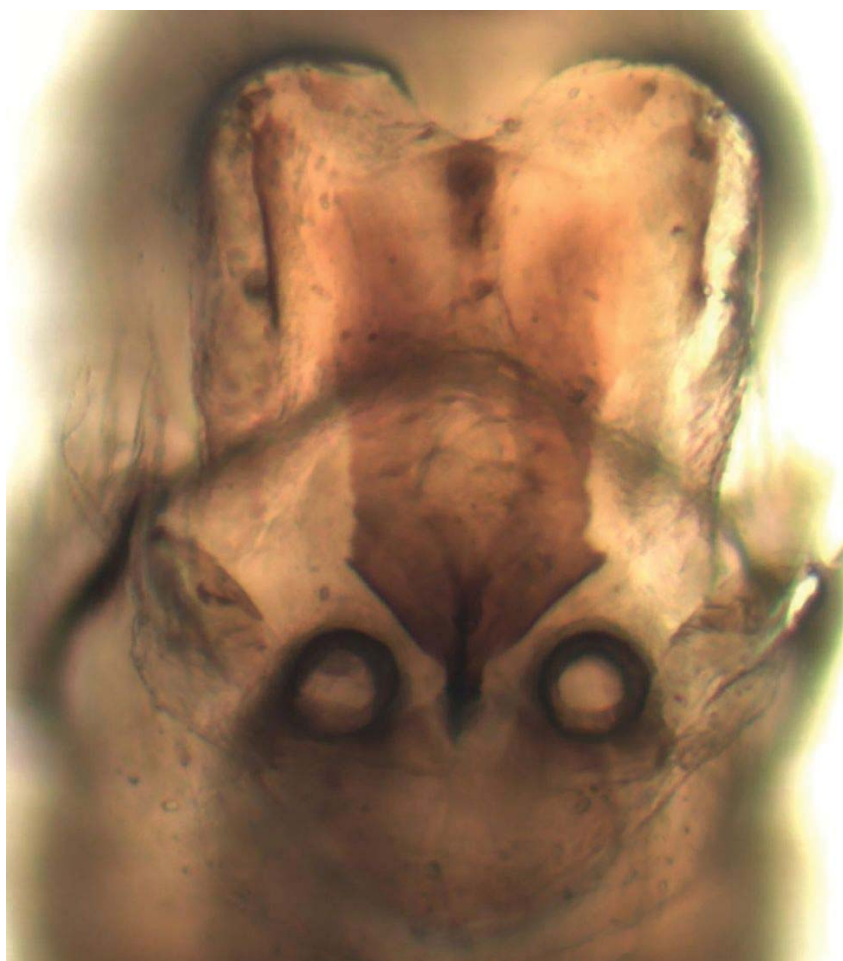


Рис. 6. Сtigмальная пластинка личинки *An. claviger*



Рис. 7. Стигмальная пластинка личинки *An. messeae*

Метод геометрической морфометрии был использован для анализа стигмальных пластинок 4 видов малярийных комаров: *An. superpictus*; *An. maculipennis*; *An. messeae*; *An. claviger*. Было установлено, что изученные виды хорошо расходятся в пространстве относительных деформаций (рис. 8, 10). Разложение совокупных межвидовых различий на отдельные RW показывает, что значения долей объясненной дисперсии резко убывают от первой к последней RW. На первую из них (RW1) приходится 72,96%, на вторую (RW2) – 22,82%, на третью (RW3) – 4,22%. По градиенту RW1 происходит расширение/сжатие (+/-) переднего отдела центральной пластинки. По градиенту RW2 наблюдается незначительное продольное смещение вниз центральной пластинки, а также удлинение срединной пигментации заднего отдела (в направлении +/-). По градиенту RW3 отмечено уменьшение срединной пигментации переднего отдела центральной пластинки (в направлении +/-). Анализ межвидовых различий показал, что виды *An. superpictus*, *An. claviger* и представители комплекса видов *An. maculipennis* хорошо разделяются в градиенте RW1 и RW2 (рис. 8, 9). Виды-двойники *An. maculipennis* и *An. messeae* успешно дифференцируются по градиентам RW1 и RW3 (рис. 10, 11). Таким образом, предварительный морфометрический анализ стигмальных пластинок позволил разделить близкородственные виды комплекса *An. maculipennis*, считающиеся морфологически идентичными.

Дальнейшие морфометрические исследования личинок и имаго, по нашему мнению, позволят построить новую систематику малярийных комаров Палеарктики.

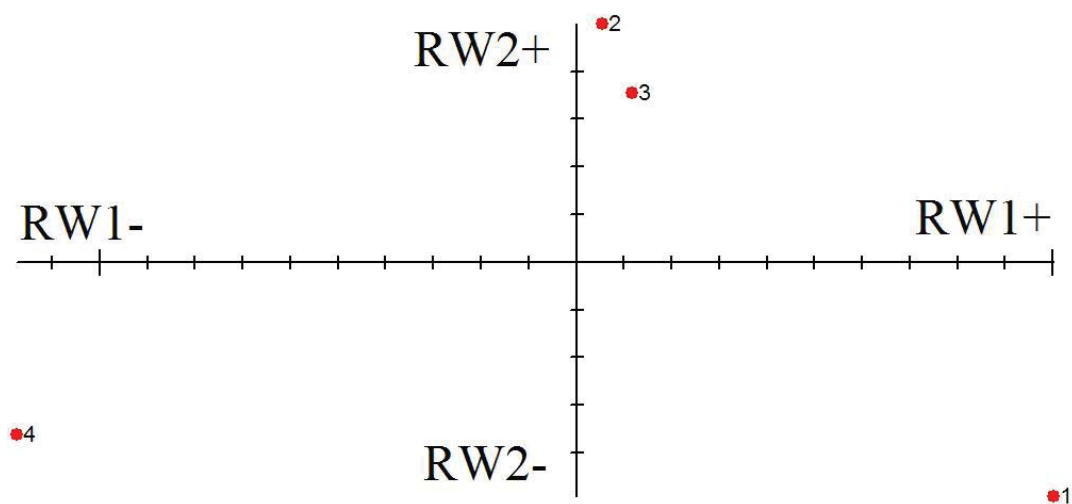


Рис. 8. Распределение конфигураций стигмальной пластинки в пространстве первых двух относительных деформаций (RW1, RW2)
Виды: 1 – *An. superpictus*; 2 – *An. maculipennis*; 3 – *An. messeae*; 4 – *An. claviger*.

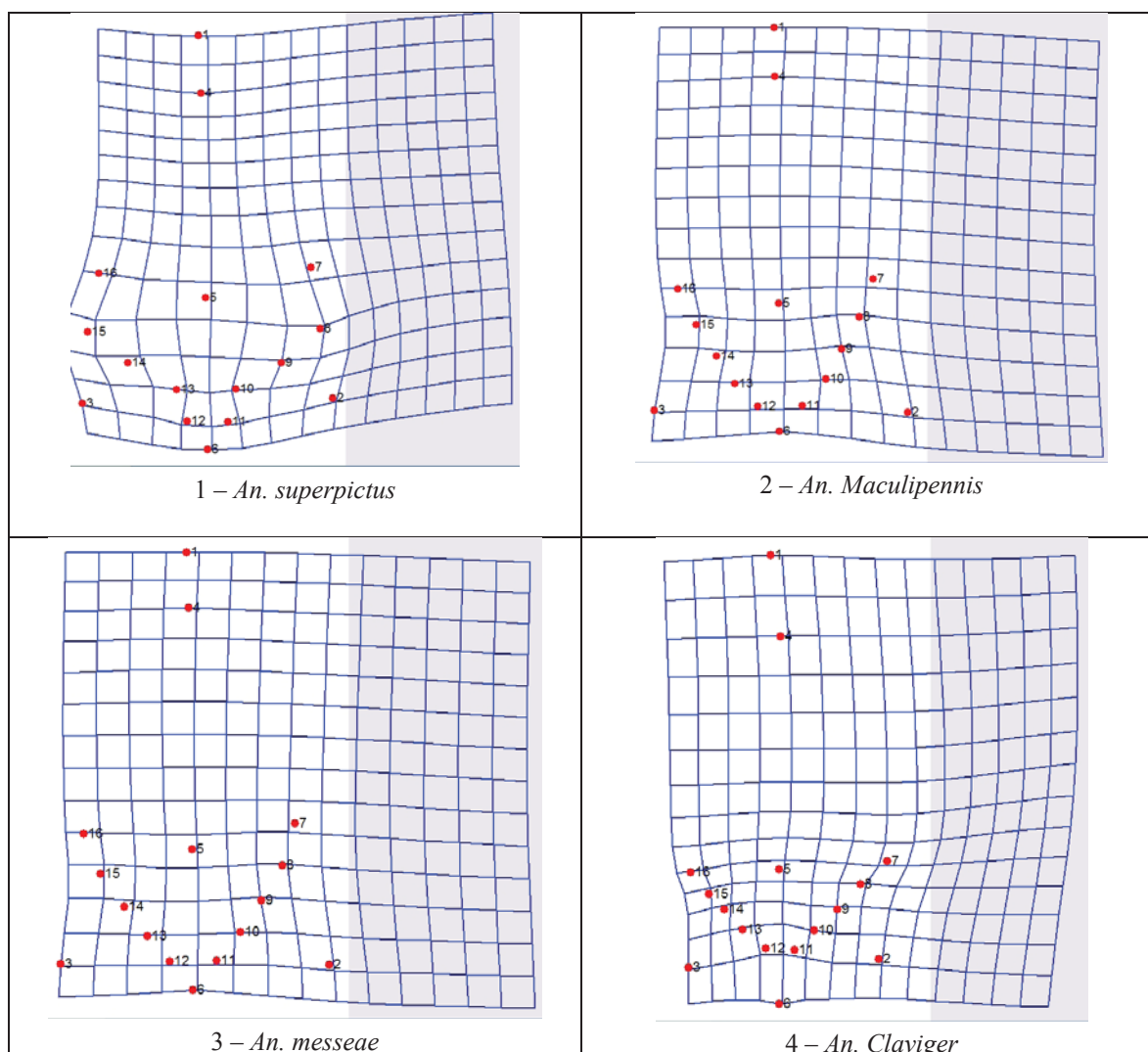


Рис. 9. Изменение распределения конфигураций и формы стигмальной пластинки по видам, в пространстве первых двух относительных деформаций (RW1, RW2).
Виды: 1 – *An. superpictus*; 2 – *An. maculipennis*; 3 – *An. messeae*; 4 – *An. claviger*.

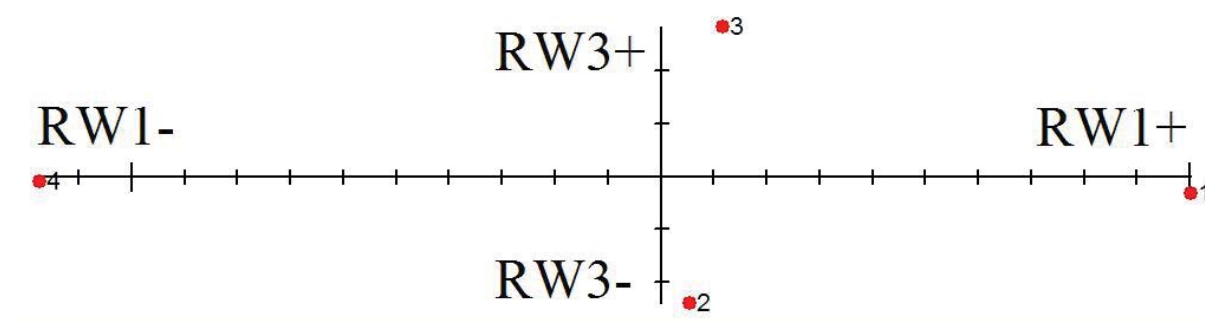


Рис. 10. Распределение конфигураций стигмальной пластинки в пространстве первой и третьей относительных деформаций (RW1, RW3)
Виды: 1 – *An. superpictus*; 2 – *An. maculipennis*; 3 – *An. messeae*; 4 – *An. claviger*.

Степень межвидовых различий по структуре стигмальной пластинки отражает величины прокрустовых дистанций. В табл. 2 приведены значения прокрустовых дистанций для каждого вида отдельно на основании сравнения центроидов общих конфигураций стигмальной пластинки. Значения прокрустовых дистанций для четырех видов варьируют от 0,055 до 0,218. Следует отметить, что величины прокрустовых дистанций хорошо отражают степень родства: наименьшая дистанция 0,055 выявлена для морфологически идентичных комаров *An. maculipennis* и *An. messeae*.

Таблица 2

Значения прокрустовых дистанций между центроидами общих конфигураций стигмальной пластинки четырех видов малярийных комаров рода *Anopheles*

	<i>An. superpictus</i>	<i>An. maculipennis</i>	<i>An. messeae</i>	<i>An. claviger</i>
<i>An. superpictus</i>	-	0,139	0,127	0,218
<i>An. maculipennis</i>	0,139	-	0,055	0,152
<i>An. messeae</i>	0,127	0,055	-	0,151
<i>An. claviger</i>	0,218	0,152	0,151	-

Очевидно, морфометрический анализ стигмальных пластинок может использоваться для выделения новых таксономических признаков в комплексе *An. maculipennis*. Работа финансировалась по гранту А-1662 Международного научно-технического центра (МНТЦ).

ВЫВОДЫ

1. Получены объемные фотографии стигмальных пластинок личинок IV возраста малярийных комаров *An. claviger*, *An. maculipennis*; *An. messeae*, *An. sacharovi*, *An. superpictus*. Определена структура стигмальных пластинок, предложен ключ для определения видов-двойников комплекса *An. maculipennis* на территории Республики Армения.

2. Проведен анализ стигмальных пластинок четырех видов малярийных комаров (*An. superpictus*; *An. maculipennis*; *An. messeae*; *An. claviger*) с использованием методов геометрической морфометрии. Установлено, что изученные виды малярийных комаров

хорошо расходятся в пространстве относительных деформаций: виды *An. superpictus*, *An. claviger* и представители комплекса видов *An. maculipennis* разделяются в градиенте RW1 и RW2; виды-двойники *An. maculipennis* и *An. messeae* успешно дифференцируются по градиентам RW1 и RW3.

3. Определены значения прокрустовых дистанций между центроидами общих конфигураций стигмальной пластинки четырех видов малярийных комаров. Показано, что величины прокрустовых дистанций хорошо отражают степень родства изученных видов.

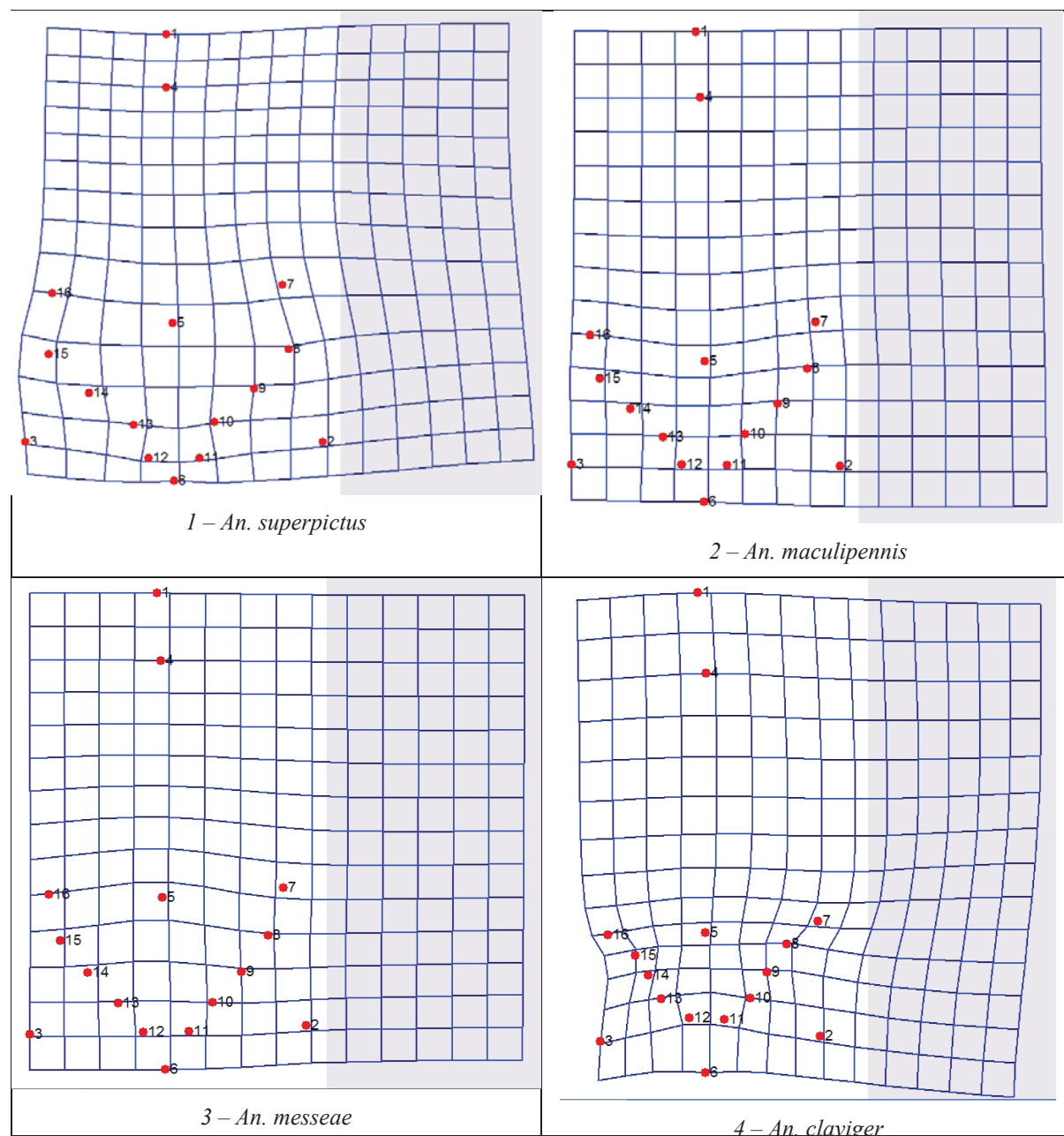


Рис. 11. Изменение распределения конфигураций и формы стигмальной пластинки малярийных комаров в пространстве первой и третьей относительных деформаций (RW1, RW3).
Виды: 1 – *An. superpictus*; 2 – *An. maculipennis*; 3 – *An. messeae*; 4 – *An. claviger*.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Гуцевич А.В., Мончадский А.С., Штакельберг А.А. Фауна СССР. Насекомые двукрылые. Т. 3. Вып. 4. Комары. Семейство Culicidae. – Л.: Наука, 1970. – 384 с.

2. Званцов А.Б., Ежов М.Н., Артемьев М.М. Переносчики малярии. Содружества Независимых Государств. – Копенгаген: ВОЗ, 2003. – С. 312.
3. Мончадский А.С. Личинки кровососущих комаров СССР и сопредельных стран (посем. Culicinae). – М.-Л.: Изд-во АН СССР, 1951. – 290 с.
4. Определитель членистоногих, вредящих здоровью человека / Под ред. Беклемишева В. Н. – М.: МЕДГИЗ, 1958. – 420 с.
5. Павлинов И.Я., Микешина Н.Г. Принципы и методы геометрической морфометрии // Журн. общей биол. 2002. Т. 63. № 6. – С. 473–493.
6. Сибатаев А.К., Шабанова Ю.В.. Морфология малярийных комаров комплекса *Anopheles maculipennis* на территории России // Научно-практическое руководство по малярии (эпидемиология, систематика, генетика) / Науч. ред. В.Н. Стегний. – Томск: Томский государственный университет, 2007. – С. 146–185.
7. Стегний В.Н. Популяционная генетика и эволюция малярийных комаров. – Томск: Изд-во Томск. ун-та, 1991. – 136 с.
8. Stone A., Knight K.L., Starcke H. A synoptic catalog of the world (Diptera, Culicidae)/ - Washington: Thomas Say Foundation, 1959, v.6.-358 p.
9. Rohlf FJ. Relative warps analysis and example of its application to mosquito wings // Eds Marcus L.F., Bello E., Garcia-Valdecasas A. Contributions to morphometrics. – Madrid: C.S.C.I., 1993. – P. 131–160.
10. Rohlf FJ. TPSsplin. Version 1.20. – N.Y.: State University at Stony Brook, 2004. (program).
11. Rohlf FJ. TPSSuper. Version 1.14. – N.Y.: State University at Stony Brook, 2004. (program).
12. Rohlf FJ. TPSRelw. Version 1.49. – N.Y.: State University at Stony Brook, 2010. (program).
13. Rohlf FJ. TPSDig. Version 2.16. – N.Y.: State University at Stony Brook, 2010. (program).
14. Rohlf FJ. TPSUtil. Version 1.46. – N.Y.: State University at Stony Brook, 2010. (program).