

УДК 576.895.421

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВИДОВОЙ ПРИНАДЛЕЖНОСТИ КЛЕЩЕЙ *IXODES PERSULCATUS* И *IXODES PAVLOVSKYI OCCIDENTALIS* (*IXODIDAE*) НА ОСНОВАНИИ РЕЗУЛЬТАТОВ АНАЛИЗА ФРАГМЕНТА ГЕНА COI (ЦИТОХРОМОКСИДАЗЫ I)

© Н. Н. Ливанова,^{1,5} Н. В. Тикунова,² С. Г. Ливанов,³ Н. В. Фоменко^{4,6}

^{1,3} Институт систематики и экологии животных СО РАН
ул. Фрунзе, 11, Новосибирск, 930091

^{2, 5, 4} Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН
пр. Лаврентьева, 8, Новосибирск, 630090

⁶ ЗАО «Вектор-Бест», ул. Пасечная, 3, Новосибирск, 630127

^{1, 2} E-mail: nata-livanova@yandex.ru

Поступила 29.08.2012

В 2010 г. отловлены клещи рода *Ixodes* в Тогучинском (равнинная часть) р-не Новосибирской обл. и на территории лесопарковой зоны Новосибирского научного центра и окрестностей (Советский р-н г. Новосибирска), установлена их видовая принадлежность — *Ixodes persulcatus* (Schulze, 1930) и *Ixodes pavlovskyi*. Определены нуклеотидные последовательности фрагмента митохондриального гена COI для 56 клещей. Филогенетический анализ фрагмента гена COI представителей группы *persulcatus-ricinus* показал, что внутри видов *I. pavlovskyi* и *I. persulcatus*, обитающих на территории Азии, последовательности исследуемого фрагмента гена COI высоко консервативны. Молекулярно-генетические методы позволяют однозначно дифференцировать морфологически близкие виды патогенных для человека клещей *I. pavlovskyi* и *I. persulcatus*.

Ключевые слова: *Ixodes pavlovskyi*, *I. persulcatus*, иксодовые клещи, морфометрические признаки, ген цитохром оксидазы COI, Новосибирская обл.

Интерес к всестороннему изучению клещей группы *persulcatus-ricinus* продиктован их активным участием в поддержании и распространении природных очагов трансмиссивных инфекций человека. В последнее время повышенное внимание к отдельным видам клещей данной группы, а именно — *Ixodes pavlovskyi* (Rom., 1946), определяется новыми сведениями об их распространении, стациональной и хозяйинной приуроченности, а также неоднозначной роли в передаче природноочаговых патогенов человеку (Романенко, Чекалкина, 2004; Москвитина и др., 2008; Chaouov et al., 2010; Ливанова и др., 2011; Романенко, Кондратьева, 2011). Тесный контакт на всех активных фазах жизненного цикла *I. pavlovskyi* и *Ixodes persulcatus* (Schulze, 1930), преобладание первого по численности на террито-

риях с интенсивным антропогенным воздействием выдвигают задачу углубленного дифференцированного изучения этих видов клещей. Ситуация усложняется существованием таксономической внутривидовой дифференциации вида *I. pavlovskyi* на 2 подвида *I. p. pavlovskyi* Pom., 1946 и *I. p. occidentalis* Filiprova et Panova, 1998, ареалы которых характеризуются обширной дизъюнкцией (Филиппова, 2007).

Результаты планомерных таксономических исследований представителей сем. Ixodidae Murray, 1877 позволили продемонстрировать тесные родственные связи в группе *persulcatus-ricinus* (Филиппова, 1971, 1973, 1977, 1990, 1999; Filiprova, 2002). Помимо фундаментальных таксономических данных для иксодовых клещей (hard ticks) накоплены сведения по филогении, эволюции и исторической зоогеографии, основанные на анализе последовательностей внутренней транскрибируемой области (internal transcribed spacer 2 ITS2) и, как правило, 3 генов митохондриальной ДНК: 12S и 16S рРНК, гена цитохромоксидазы CO1 (cytochrome c oxidase subunit 1) (Norris et al., 1996; Keirans et al., 1999; Fukunaga et al., 2000; Hlinka et al., 2002; Murrel et al., 2003; Barker, Murrel, 2004; Guglielmone et al., 2006; Chen et al., 2010). Известно, что перечисленные выше гены митохондрий клещей, отнесенные к группе идиосинкразических маркеров, с успехом использованы как основа при проведении филогенетических исследований (Murrel et al., 2003; Barker, Murrel, 2004). Весьма важно для сравнительного анализа наличие соответствующих нуклеотидных последовательностей, депонированных в международной базе данных GenBank.

Целью данной работы было проведение сопоставления данных морфологических критериев, используемых при определении видовой принадлежности, двух близкородственных видов клещей *I. pavlovskyi* и *I. persulcatus* с таковыми, полученными при анализе фрагмента гена цитохром оксидазы.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Взрослые голодные клещи отловлены на флаг в мае—июне 2010 г. в Тогучинском (равнинная часть) р-не Новосибирской обл. и на территории лесопарковой зоны Новосибирского научного центра и окрестностей (Советский р-н г. Новосибирска). В Тогучинском р-не (83°21'—84°21' в. д. и 54°53'—54°53' с. ш.) клещи отловлены преимущественно в осиново-березовых и березовых лесах с включениями осинников. На территории лесопарковой зоны Новосибирского научного центра и его окрестностей (83°05'—83°49' в. д. и 54°48'—54°50' с. ш.) отлов проведен в сосновых лесах с примесью березы и осины.

До исследования клещей хранили в 70%-ном растворе этилового спирта при +4 °С. Перед выделением суммарных нуклеиновых кислот определен вид клещей не менее чем по 15 диагностическим признакам. Выполнено измерение органов самцов (10 особей) и самок (10) каждого вида. Для этих целей задействованы способы, подробно представленные ранее (Филиппова, 1977; Таежный..., 1985), использован микроскоп МС-2 ZOOM. Измерения выполнены для органов, морфометрические признаки которых описаны и приведены при характеристике географической изменчивости

активных фаз онтогенеза и оценки внутривидовой таксономической структуры представителей группы *persulcatus-ricinus* (Таежный..., 1985; Филиппова, Мусатов, 1996; Филиппова, Панова, 1998).

Суммарные нуклеиновые кислоты экстрагированы из клещей с помощью набора «Проба НК» (ДНК-технология, Москва). ДНК клещей выявлена с использованием полимеразной цепной реакции (ПЦР) в присутствии праймеров из области гена CO1. Праймеры выбраны на основании анализа нуклеотидных последовательностей CO1 10 видов клещей (*I. persulcatus*, *I. ricinus*, *I. pavlovskiy*, *Dermacentor reticulatus*, *D. nuttali*, *D. silvarum*, *D. marginatus*, *Hyalomma marginatum*, *Haemaphysalis concinna*, *Rhipicephalus sanguineus*) и позволяют амплифицировать фрагмент гена длиной 650 пар нуклетидов (п. н.). Пару праймеров 5'-accacaagacattggaactatata-3' и C2 5'-aatccaggaagaataagaatatac-3' использовали в ПЦР по следующей программе (35 циклов, 94 °C — 10 с, 50 °C — 15 с, 72 °C — 40 с). Нуклеотидные последовательности продуктов ПЦР очищены с использованием GTG agarose gel (FMC BioProducts), определены с использованием праймеров, соответствующих анализируемому ПЦР-фрагменту, набора Big Dye™ Terminator Cycle Sequencing Kit в Центре секвенирования ДНК СО РАН, г. Новосибирск (<http://sequest.niboch.nsc.ru>). Определенные последовательности гена CO1 внесены в базу данных GenBank под номерами: JQ823024, JQ823025, JQ867068, JQ867069, JQ867070, JQ867071, JQ867072.

Сравнение нуклеотидных последовательностей с ранее опубликованными проведено с использованием программы BLASTN (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>). Выравнивание последовательностей выполняли с помощью программы CLUSTALW (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/index.html>), филогенетический анализ — с использованием метода максимального правдоподобия с помощью программы MEGA 5.0. Достоверность филограммы оценивали, вычисляя индекс статистической достоверности при общем числе повторов 1000.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На основании морфологических критериев из 56 исследованных клещей 23 особи отнесены к виду *I. pavlovskiy* (самки — 13, самцы — 10), 33 — *I. persulcatus* (самки — 18, самцы — 15). Средние значения размеров органов клещей приведены в таблице (табл. 1).

Сравнительный анализ данных морфометрических особенностей половозрелых клещей *I. pavlovskiy*, обитающих в лесопарковой зоне Новосибирского научного центра, показал, что клещи максимально близки (табл. 1) представителям, отловленным в западной части ареала (восточные отроги Салаирского кряжа — западные отроги Кузнецкого Алатау). Кроме того, сопоставление значений размеров органов клещей *I. pavlovskiy*, отловленных в г. Новосибирске, со значениями, приводимыми в литературе, позволяет утверждать о более высокой степени сходства с клещами, обитающими в условиях Салаир-Кузнецкого Алатау, чем с представителями из юго-западного Алтая (Филиппова, Ушакова, 1967; Филиппова, 1977; Таежный..., 1985; Филиппова, Панова, 1998). Существование 2 под-

Таблица 1

Средние размеры некоторых органов (мм) самок, самцов *I. persulcatus* (Тогучинский р-н, Новосибирская обл.) и *I. pavlovskyi* (лесопарковая зона Новосибирского научного центра и его окрестностей, г. Новосибирск)

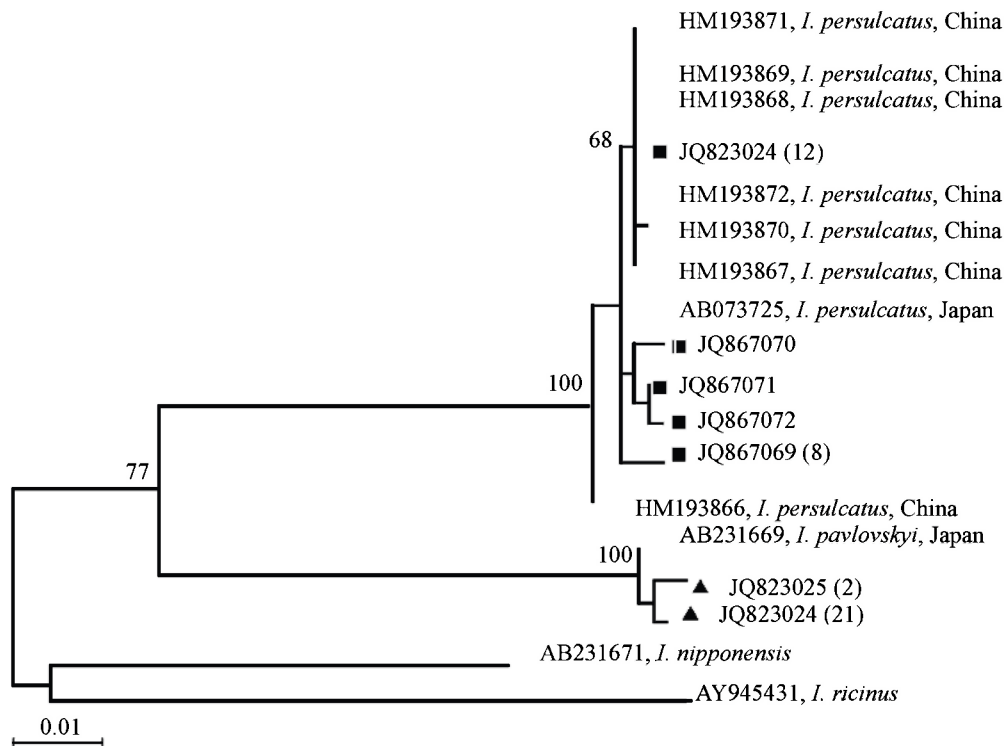
Table 1. Average size (mm) of some body parts in females and males of *Ixodes persulcatus* (Toguchinsk District, Novosibirsk Province) and *I. pavlovskyi* (forested park of Novosibirsk Scientific Centre and its outskirts, Novosibirsk)

Признак	<i>I. pavlovskyi</i> */**		<i>I. persulcatus</i>	
	самка (n = 10)	самец (n = 10)	самка (n = 10)	самец (n = 10)
Длина скутума/конскутума со скапулами	1.458/*1.460/**1.489	2.050/*2.051/**2.032	—	—
Длина идиосомы со скапулами	—	—	2.320	2.100
Ширина скутума	1.172/*1.171/**1.192	1.197/*1.195/**1.170	1.320	—
Длина гнатосомы снизу	0.978/*0.979/**1.029	0.474/*0.476/**0.492	0.990	0.550
Ширина гнатосомы снизу	0.450/*0.499/**0.508	0.305/*0.305/**0.312	0.540	0.380
Ширина гипостомы	0.170/*0.186/**0.197	0.176/*0.176/**0.184	0.210	0.190
Длина лапки I	0.725/*0.723/**0.774	0.728/*0.727/**0.757	0.815	0.680
Длина II—III членика пальп	0.630/*0.632/**0.654	0.358/*0.356/**0.380	0.673	0.356
Длина медиального зубца кокс I	0.125/*0.123/**0.149	0.69/*0.71/**0.88	0.295	—

Примечание. * — средние размеры органов самок и самцов *I. pavlovskyi*, отловленных на Салаир-Кузнецком Алатау (Филиппова, Панова, 1998); ** — средние размеры органов самок и самцов *I. pavlovskyi*, отловленных в Сихотэ-Алине (там же).

видов *I. p. pavlovskyi* Pom., 1946 и *I. p. occidentalis* Filippova et Panova ранее обосновано анализом более 30 признаков (Филиппова, Панова, 1998). Кроме того, в ходе работы мы принимали во внимание существующие различия в глазмерных признаках половозрелых фаз подвидов *I. p. pavlovskyi* Pom., 1946 и *I. p. occidentalis* Filippova et Panova (Филиппова, 2007). Сопоставление материала, собранного в лесопарке Новосибирского научного центра, с типовыми образцами представителей *I. p. pavlovskyi* Pom., 1946 позволило зафиксировать отличия в степени выраженности боковых бород, валиков скутума, в очертании гипостомы самок и в формах лапок у обоих полов (Филиппова, 2007) и получить дополнительные подтверждения в установленной подвидовой принадлежности. Предположительно, причиной появления отличий у особей одного вида послужило разобщение восточной и западной частей ареала в период плиоцена (Филиппова, Панова, 1998; Филиппова, 2007). По всей видимости, морфометрические отличия, зафиксированные исследователями еще в конце прошлого столетия, сформировались в неоднозначных природных условиях западного и восточного дизъюнктов и при наличии более тесных фаунистических связей между горными системами южной Сибири и Алтая в пределах западной территории.

Сравнительно-морфологический анализ данных для половозрелых *I. persulcatus* показал следующее. Средние показатели размеров органов у рассмотренных в ходе нашего исследования клещей каждого пола наиболее близки к таковым, зарегистрированным для таежных клещей, отлов-



Филограмма нуклеотидных последовательностей фрагмента гена субъединицы I цитохром оксидазы C иксодовых клещей, отловленных в Новосибирской обл.

Значения статистической достоверности приведены в узлах дерева. Внизу показана шкала дивергенции. Последовательности из данной работы выделены квадратами (для *I. persulcatus*) и треугольниками (для *I. pavlovskyi*).

Phylogram based on the nucleotide sequences of cytochrome c oxidase subunit I gene fragment of ixodid ticks from Novosibirsk Province.

ленных в Юго-Западном Алтае (табл. 1) (Таежный..., 1985). Известно, что каждый из полов *I. persulcatus* компактен в морфологическом отношении, что в свою очередь обеспечивает стабильность видовых диагностических признаков и позволяет четко отличать таежного клеща от представителей близкородственных видов (Филиппова, Мусатова, 1996).

Для последовательностей фрагмента митохондриального гена COI размером 650 п.н. сравнительный анализ показал, что они высоко гомологичны (99—100 %). При этом выявлено 7 различных вариантов нуклеотидных последовательностей, которые на основании результатов филогенетического анализа с высокой достоверностью формируют 2 группы (см. рисунок). В первой группе последовательности фрагмента гена COI генома митохондрий, полученные в ходе нашего исследования от *I. persulcatus*, кластеризовались с соответствующими последовательностями, ранее опубликованными для этого вида клещей. Вторая группа сформирована полученными нами для *I. pavlovskyi* и единственной, имеющейся в базе данных GenBank. Депонированная последовательность (GenBank AB231669) получена от потомков *I. pavlovskyi* с о-ва Хоккайдо (Япония), выращенных в лабораторных условиях (Mitani et al., 2007). Последовательности JQ823024 и

Таблица 2

Конденсированное выравнивание нуклеотидных последовательностей фрагмента гена субъединицы I цитохром оксидазы *C. I. pavlovskyi*, отловленных на о-ве Хоккайдо (Япония) и в Новосибирской обл.

Table 2. Condensed alignment of nucleotide sequences of cytochrome C oxidase subunit I gene fragment of *Ixodes pavlovskyi* from Hokkaido, Japan, and Novosibirsk Province, Russia

№ GenBank	Позиция			
	66	123	351	526
AB231669	G	A	A	C
JQ823024	•	•	G	T
JQ823025	T	C	G	•

JQ823025 от *I. pavlovskyi* из Новосибирской обл. отличались от депонированной нуклеотидной последовательности соответственно по двум и трем п. н. (табл. 2), причем эти замены не приводили к заменам в аминокислотной последовательности. Следует отметить, что из двух генетических вариантов нуклеотидных последовательностей от *I. pavlovskyi* из Новосибирского научного центра доминирует генетический вариант, соответствующий таковому, зарегистрированному под номером JQ823024 (см. рисунок).

К настоящему времени в базе данных GenBank депонировано 8 последовательностей соответствующего фрагмента гена COI митохондрий *I. persulcatus* с указанием места отлова клещей (GenBank ABO73725, NM193866, NM193867, NM193868, NM193869, NM193870, NM193871, NM193872). Филогенетический анализ последовательности фрагмента гена COI митохондрий *I. persulcatus*, отловленных в Новосибирской обл., показал, что они ближе всего кластеризовались с таковой клещей *I. persulcatus*, обитающих в Японии на о-ве Хоккайдо (GenBank ABO73725; Shao et al., 2004). Вместе с тем последовательность JQ867068, обнаруженная в образцах от 10 клещей, совпадала с некоторыми нуклеотидными последовательностями рассматриваемого фрагмента гена таежных клещей с различных удаленных территорий Китая (см. рисунок). Оценка филогении фрагмента гена COI показала 9 нуклеотидных позиций, по которым сибирские последовательности отличаются от японской, причем для каждой нуклеотидной последовательности обнаружено от 2 до 4 замен (табл. 3). Большинство выявленных замен незначимы. Исключение составляет замена $A_{502} \rightarrow G$ в нуклеотидной последовательности под номером JQ867070, которая привела к замене остатка изолейцина на остаток валина. Можно предположить, что эта замена не отразилась на свойствах белковой молекулы, поскольку не изменился класс аминокислоты.

В целом анализ филограммы показывает, что внутри видов *I. pavlovskyi* и *I. persulcatus*, обитающих на территории Азии, последовательности исследуемого фрагмента гена COI высоко консервативны и при проведении молекулярно-генетических исследований позволяют однозначно относить клещей к одному из указанных видов.

Таблица 3

Конденсированное выравнивание нуклеотидных последовательностей фрагмента гена субъединицы I цитохром оксидазы *C. I. persulcatus*, отловленных на о-ве Хоккайдо (Япония) и в Новосибирской обл.

Table 3. Condensed alignment of nucleotide sequences of cytochrome C oxidase subunit I gene fragment of *Ixodes persulcatus* from Hokkaido, Japan, and Novosibirsk Province, Russia

№ GenBank	Позиция								
	87	163	210	228	309	351	426	459	502
AB073725	G	G	A	A	A	A	C	C	A
JQ867068	•	•	G	•	•	•	•	•	•
JQ867071	•	•	•	•	T	•	T	•	•
JQ867072	•	•	•	G	T	•	T	•	•
JQ867070	•	•	•	•	T	G	•	•	G
JQ867069	A	A	•	•	•	•	•	T	•

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Представители близкородственной группы подрода *Ixodes* (s. str.) *I. persulcatus* и *I. pavlovskyi* имеют ряд стабильных качественных морфологических различий (Филиппова, Ушакова, 1967). Для *I. pavlovskyi* продемонстрирована географическая изменчивость, обоснована морфологическая внутривидовая дифференциация, тогда как для каждого из полов *I. persulcatus* характерна морфологическая стабильность (Филиппова, Ушакова, 1967, 1968; Филиппова, 1971; Филиппова, Мусатов, 1996; Филиппова, Панова, 1998). Анализ обширных литературных сведений, их сопоставление с результатами морфометрических исследований, выполненных нами, позволили получить не только дополнительные подтверждения существования вида *I. pavlovskyi* на территории лесопарковой зоны Новосибирского научного центра, но и отнести обитающих здесь клещей к подвиду *I. p. occidentalis* Filippova et Panova.

Сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей фрагмента гена COI близкородственных клещей *I. persulcatus* и *I. pavlovskyi* из Новосибирской обл. с соответствующими последовательностями, опубликованными ранее, не выявил каких-либо существенных отличий. Мы можем предполагать, что представителям этих видов, обитающим на территории Японии и Китая, свойственна высокая степень родства с западносибирскими *I. persulcatus* и *I. pavlovskyi*. Безусловно, данное предположение требует дальнейших углубленных исследований. Вместе с тем результаты, позволившие по-новому взглянуть на эволюцию, морфологические и паразито-хозяйственные преобразования, реконструировать генезис ареалов важнейших переносчиков инфекционных болезней, получены преимущественно для западноевропейских и североамериканских природных очагов трансмиссивных инфекций (Filippova, 2002; Barker, Murrel, 2003, 2004; Mitani et al., 2007; Song et al., 2011). В то же время обширнейшая территория

азиатской части России и виды сем. Ixodidae, обитающие здесь, остаются малоизученными.

Важно отметить, что результаты нашего исследования демонстрируют четкое совпадение данных морфометрического и молекулярно-генетического анализов, что делает возможным проведение углубленных исследований. Дальнейший анализ генома клещей *I. pavlovskyi* и *I. persulcatus*, отловленных на территориях с различными природно-климатическими условиями, позволит не только получить дополнительные представления о родственных отношениях в группе *persulcatus-ricinus*, но и показать их существенное значение при проведении сравнительного изучения переноса возбудителей и функционирования природных очагов, поддерживаемых разными видами.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность доктору биологических наук Н. А. Филипповой за консультации и предоставленную возможность работы с типовыми образцами клещей из коллекции Зоологического института РАН.

Исследования частично финансировались из средств междисциплинарного интеграционного проекта № 135 фундаментальных исследований СО РАН.

Список литературы

- Ливанова Н. Н., Ливанов С. Г., Панов В. В. 2011. Особенности распределения клещей *Ixodes persulcatus* и *Ixodes pavlovskyi* на границе лесной и лесостепной зон Приобья. *Паразитология*. 45 (3) : 94—103.
- Москвитина Н. С., Романенко В. Н., Терновой В. А., Иванова Н. В., Протопопова Е. В., Кравченко Л. Б., Кононова Ю. В., Куранова В. Н., Чаусов Е. В., Москвитин С. С., Першикова Н. Л., Гашков С. П., Коновалова С. Н., Большакова Н. П., Локтев В. Б. 2008. Выявление вируса Западного Нила и его генотипирование в иксодовых клещах (Acari: Ixodidae) в Томске и его пригородах. *Паразитология*. 42 (3) : 210—224.
- Романенко В. Н., Кондратьева Л. М. 2011. Зараженность иксодовых клещей, снятых с людей, вирусом клещевого энцефалита на территории города Томска и его окрестностей. *Паразитология*. (45) : 3—10.
- Романенко В. Н., Чекалкина Н. Б. 2004. Видовой состав иксодовых клещей на территории г. Томска. *Вестн. Томск. гос. ун-та*. 11 : 132—135
- Таежный клещ *Ixodes persulcatus* Schulze (Acarina, Ixodidae). 1985. Морфология, систематика, экология, медицинское значение. Л.: Наука. 416 с.
- Филиппова Н. А. 1971. О видах группы *Ixodes persulcatus* (Parasitiformes, Ixodidae). VI. Особенности ареалов *I. pavlovskyi* Pom. и *I. persulcatus* Schulze в связи с их палеогенезом. *Паразитология*. 5 (5) : 385—391.
- Филиппова Н. А. 1973. О видах группы *Ixodes persulcatus* (Parasitiformes, Ixodidae). VII. Палеогенез южной ветви группы *Ixodes persulcatus* и взаимоотношения с *I. ricinus* (L.). *Паразитология*. 7 (1) : 3—12.
- Филиппова Н. А. 1977. Иксодовые клещи подсемейства Ixodinae. Фауна СССР. Паукообразные. Л.: Наука. 4 (4). 396 с.
- Филиппова Н. А. 1990. Таксономические аспекты переноса возбудителей болезни Лайма. *Паразитология*. 24 (4) : 257—267.

- Филиппова Н. А. 1999. Симпатрия близкородственных видов иксодовых клещей и ее возможная роль в паразитарных системах природных очагов трансмиссивных болезней. *Паразитология*. 33 (3) : 223—241.
- Филиппова Н. А. 2007. Таксономическая внутривидовая дифференциация у иксодовых клещей (Acari: Ixodidae) с позиций морфологической концепции вида. *Паразитология*. 41 (6) : 409—427.
- Филиппова Н. А., Мусатов С. А. 1996. Географическая изменчивость половозрелой фазы *Ixodes persulcatus* (Ixodidae). Опыт применения баз данных по морфометрии. *Паразитология*. 30 (3) : 205—215.
- Филиппова Н. А., Панова И. В. 1998. Географическая изменчивость всех активных фаз онтогенеза как основы для оценки внутривидовой таксономической структуры *Ixodes pavlovskiyi* (Ixodidae). *Паразитология*. 5 (32) : 396—411.
- Филиппова Н. А., Ушакова Г. В. 1967. О видах группы *Ixodes persulcatus* (Ixodidae, Parasitiformes). 1. *I. pavlovskiyi* Rom. в восточном Казахстане; переписание самки и описание самца. *Паразитология*. (1) 4 : 396—411.
- Barker S. C., Murrel A. 2004. Systematics and evolution of ticks with a list of valid genus and species names. *Parasitology*. 129 : 15—36.
- Casati S., Bernasconi M. V., Gern L., Piffaretti J.-C. 2007. Assessment of intraspecific mtDNA variability of European *Ixodes ricinus* sensu stricto (Acari: Ixodidae). *Infection, Genetics and Evolution*. 8 : 52—158.
- Chausov E. V., Ternovoi V. A., Protopopova E. V., Kononova J. V., Konovalova S. N., Pershikova N. L., Romanenko V. N., Ivanova N. V., Bolshakova N. P., Moskvitina N. S., Loktev V. B. 2010. Variability of the tick-borne encephalitis virus genome in the 5' noncoding region derived from ticks *Ixodes persulcatus* and *Ixodes pavlovskiyi* in Western Siberia. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 10 (4) : 365—375.
- Chen Ze, Yang X., Bu F., Yang X., Yang X., Liu J. 2010. Ticks (Acari: Ixodoidea: Argasidae, Ixodidae) of China. *Exp. Appl. Acarol.* (51) : 393—404.
- Filippova N. A. 2002. Forms of sympatry and possible ways of microevolution of closely related species of the group *Ixodes ricinus-persulcatus* (Ixodidae). *Acta Zoologica Lituaniaca*. 12 (3) : 215—277.
- Fukunaga M., Yabuki V., Hamase A., Oliver J. H., Nakao M. 2000. Molecular phylogenetic analysis of ixodid ticks based on the ribosomal DNA spacer, internal transcribed spacer 2, sequences. *Journ. Parasitol.* 86 (1) : 38—43.
- Guglielmone A. A., Venzal J. M., Gonzalez-Acuna D., Nava S., Mangold A. J., Hinojosa A. 2006. The phylogenetic position of *Ixodes stilesi* Neumann, 1911 (Acari: Ixodidae): morphological and preliminary molecular evidences from 16S rDNA sequences. *Syst. Parasitol.* (65) : 1—11.
- Hlinka O., Murrell A., Barker S. C. 2002. Evolution of the secondary structure of the rRNA internal transcribed spacer 2 (ITS2) in hard ticks (Ixodidae, Arthropoda). *Heredity*. 88 : 275—279.
- Keirans J. E., Needham G. R., Oliver J. H. 1999. *Ixodes ricinus* complex worldwide: diagnosis of the species in the complex, host and distribution. *Acarology IX Proceedings*. 2. Columb, Ohio. 188—347.
- Mitani H., Takahashi M., Masuyama M., Fukunaga M. 2007. *Ixodes philipi* (Acari: Ixodidae): phylogenetic status inferred from mitochondrial cytochrome oxidase subunit I gene sequence comparison. *Journ. Parasitol.* 93 (3) : 719—722.
- Murrel A., Campbell N. J. H., Barker S. C. 2003. The value of idiosyncratic markers and changes to conserved tRNA sequences from the mitochondrial genome of hard ticks (Acari: Ixodoidea: Ixodidae) for phylogenetic inference. *Syst. Biol.* 52 (3) : 296—310.
- Norris D. E., Klompen J. S., Keirans J. E., Black W. C. t. 1996. Population genetics of *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae) based on mitochondrial 16S and 12S genes. *Journ. Med. Entomol.* 33 : 78—89.
- Song S., Shao R., Atwell R., Barker S., Vankar D. 2011. Phylogenetic and phylogeographic relationships in *Ixodes holocyclus* and *Ixodes cornuatus* (Acari: Ixodidae) inferred from COX1 and ITS2 sequences. *Intern. Journ. Parasitol.* 4 : 871—880.

Xu G., Fang Q. Q., Keirans J. E., Durden L. A. 2003. Molecular phylogenetic analyses indicate that the *Ixodes ricinus* complex is a paraphyletic group. *Journ. Parasitol.* 89 (3) : 452—457.

IDENTIFICATION OF IXODES PERSULCATUS AND IXODES PAVLOVSKYI OCCIDENTALIS (IXODIDAE) BY THE ANALYSIS OF THE GENE FRAGMENT COXI (CYTOCHROME OXIDASE SUBUNIT I)

N. N. Livanova, N. V. Tikunova, S. G. Livanov, N. V. Fomenko

Key words: *Ixodes pavlovskyi*, *Ixodes persulcatus*, Ixodidae, morphometric characters, COXI, Novosibirsk Region.

SUMMARY

Ticks of the genus *Ixodes* were collected in 2010 in the lowland part of Toguchinsk district of Novosibirsk Province (Russia) and in the forest-park area of Novosibirsk Scientific Centre and its outskirts (Sovetskiy district of Novosibirsk), and identified as *Ixodes persulcatus* (Schulze, 1930) (18 females and 13 males) and *Ixodes pavlovskyi* (13 females and 10 males). Ten specimens of each sex from each collecting site were examined. The following nine characters were used: the length and width of the scutum (conscutum) and of the gnathosoma in ventral view; the length of palpal segments II—III; the width of the hypostome; the length of idiosoma with scapula, of leg I, of the medial spur on fore coxa (Taiga..., 1985; Filippova, Musatov, 1996; Filippova, Panova, 1998). According to morphometric characters, specimens of *Ixodes pavlovskyi* collected in the forest-park area of the Novosibirsk Scientific Centre were identified as the subspecies *I. p. occidentalis* Filippova et Panova, 1998. Nucleotide sequences of the COI mitochondrial gene fragment were determined for 56 ticks. Phylogenetic analysis of the COI gene fragment in representatives of the *persulcatus-ricinus* species-group dwelling in Asia demonstrated high degree of conservatism. Molecular-genetic methods allow reliable identification of morphologically similar species *I. pavlovskyi* and *I. persulcatus*, pathogenic for humans.
