

В.Н. Стегний, А.О. Сайджафарова, Г.Н. Артемов,
Т.В. Карамышева, Н.Б. Рубцов

**СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ МОЛЕКУЛЯРНОГО СОСТАВА
ПРИЦЕНТРОМЕРНОГО ГЕТЕРОХРОМАТИНА
ПОЛИТЕННЫХ ХРОМОСОМ МАЛЯРИЙНЫХ КОМАРОВ
РОДА *ANOPHELES* (CULICIDAE, DIPTERA)**

При помощи метода микродиссекции политенных хромосом с последующей *in situ* гибридизацией изучены особенности хромосомной локализации районспецифичных ДНК-проб из прицентромерного участка гетерохроматина хромосомы 2L *Anopheles beklemishevi* Stegnii et Kabanova и из района прикрепления хромосомы XL *An. messeae* на политенных хромосомах *Anopheles atroparvus* van Thiel, *Anopheles messeae* Fall и *An. beklemishevi*. Установлено, что последовательности ДНК, гомологичные пробе прицентромерного участка гетерохроматина хромосомы 2L *An. beklemishevi*, присутствуют у всех видов на хромосомах 2 и 3 в прицентромерных участках и районах прикрепления, кроме участков прикрепления хромосомы XL *An. beklemishevi* и *An. messeae* и прицентромерной области 2R *An. messeae*. В α -гетерохроматине прицентромерных участков – 2L *An. messeae* и – 3R *An. atroparvus* также не содержатся гомологичные этой пробе ДНК-последовательности. ДНК-проба из района прикрепления хромосомы XL *An. messeae* гибридизовалась в прицентромерных областях всех хромосом; гомология обнаружена с множеством интеркалярных районов хромосомы 2 и хромосомы 3 и в блоках α -гетерохроматина. Результаты были сопоставлены с полученными ранее данными по локализации видоспецифичной пробы из участка хромосомы 2R *An. atroparvus* на хромосомах видов *An. atroparvus*, *An. messeae* и *An. beklemishevi* [1]. Выявленные межвидовые различия в местах локализации проб и интенсивности свечения указывают на наличие индивидуального сочетания последовательностей в районах прикрепления хромосом.

Исследования в области проблемы пространственной организации клеточного ядра проводятся уже более ста лет. В 60-х гг. прошлого столетия были сформулированы основные принципы организации хроматина в интерфазном ядре [2]. В настоящее время остается актуальным вопрос распределения генетического материала в пространстве ядра, особенно в период интерфазы, когда в клеточном ядре происходит ряд событий, в которых ориентация хромосом играет немаловажную роль. Неслучайное распределение хроматина в ядре связано с надхромосомными механизмами регуляции генетической экспрессии [3, 4].

Ранее было показано, что пространственная организация хромосом в ядрах слюнных желез и мальпигиевых сосудов малярийных комаров отличается от таковой в трофоцитах яичников, а также, что архитектура хромосом в ядрах клеток генеративной ткани двукрылых может различаться даже у филогенетически близких видов [5]. Это говорит об эволюционном значении организации хромосом в пространстве клеточного ядра.

Известно, что топологические особенности организации хроматина в ядре основаны на взаимодействии хроматина с белками внутриядерного матрикса и ядерной оболочки. Очевидно, что эти контакты обеспечиваются специфическими последовательностями ДНК, которые опосредованно через белки определяют архитектуру хромосом во внутриядерном пространстве. Поскольку в местах контактов хромосом с ядерной оболочкой были обнаружены гетерохроматиновые блоки, можно говорить о том, что связи гетерохроматина с ядерной оболочкой являются основой для пространственного упорядочения отдельных хромосом и интерфазного ядра в целом [6–10]. Гетерохроматин ассоциирует в себе ряд различных последовательностей ДНК и является источником их изменчивости, что предусматривает его важную роль в эволюции эукариот [11]. В настоящее время известно, что гетерохроматин является не менее важной частью генома, чем эухроматин. Изменения, относящиеся к его составу, количеству, структуре и распределению, характеризуют гетерохроматин как фактор, сопутствующий видообразованию [5, 11, 12].

Несмотря на успешное изучение различных механизмов работы гетерохроматина, таких как эффект положения или механизм его компактизации [13–15], остается еще ряд нерешенных вопросов. Например, вопрос о характере влияния изменений прицентромерного гетерохроматина (ПГ) на пространственную структуру интерфазного ядра

Удобным объектом для решения подобных вопросов является ПГ политенных хромосом малярийных комаров рода *Anopheles* комплекса *maculipennis*. Род *Anopheles* включает большое разнообразие видов, которые имеют широкий ареал распространения, исключая зоны пустынь и крайних широт. Изучение архитектоники политенных хромосом в ядрах трофоцитов яичников 8 видов комаров комплекса «*Anopheles maculipennis*» показало, что существуют межвидовые различия прикрепления хромосом к оболочке клеточного ядра. Хромосомы этих видов имеют четкие различия по наличию/отсутствию облигатного прикрепления к ядерной оболочке, по морфологии участков прикрепления и по расположению области прикрепления на оболочке ядра [5, 16–18]. В популяциях малярийного комара *Anopheles* наблюдаются изменения размеров α -гетерохроматиновых блоков [13, 15, 18–20], что, возможно, связано с его адаптивным значением, β -гетерохроматин участвует как в межхромосомных взаимодействиях (образование хромоцентров), так и в контактах с ядерной оболочкой [8].

Представляет интерес исследование структурных особенностей участков прикрепления хромосом к ядерной оболочке некоторых видов комплекса «*Anopheles maculipennis*»: *An. atroparvus*, *An. messeae* и *An. beklemishevi*. Архитектура политенных хромосом в трофоцитах яичников этих видов на цитогенетическом уровне к настоящему времени уже хорошо изучена. Ранее при помощи метода микродиссекции политенных хромосом трофоцитов яичников с последующей амплификацией и мечением был получен зонд Atr2R из ДНК ПГ хромосомы 2R, не имеющий жесткого прикрепления к оболочке ядра (рис. 1, а), для сравнительной *in situ* гибридизации проведенной на данных видах [1]. Было выявлено наличие консервативных и гомологичных последовательностей ДНК во всех районах ПГ исследуемых видов, кроме ПГ хромосомы

2L *An. beklemishevi* (рис. 2, б) [1]. Так как этот участок имеет жесткое прикрепление к оболочке ядра, интересным будет дальнейшее изучение структуры ДНК участков прикрепления к оболочке ядра политенных хромосом видов *An. atroparvus*, *An. messeae* и *An. beklemishevi*.

Материал и методика

В работе использовали взрослых самок малярийных комаров трех видов: *An. beklemishevi*, *An. messeae* и *An. atroparvus*. Выделяли яичники и фиксировали в этанол-уксусной смеси (3:1). Для приготовления суховоздушных препаратов политенных хромосом трофоциты яичников давили в 50%-ной пропионовой кислоте, вымораживали в жидком азоте с последующим обезвоживанием в батарее спиртов (50–70–96%) и еще раз фиксировали в этанол-уксусной смеси (3:1) [22, 23]. Фрагменты ДНК из района прикрепления хромосомы 2L *An. beklemishevi* и хромосомы XL *An. messeae* получали методом микродиссекции хромосом сухих препаратов с проведением DOP ПЦР в присутствии протеиназы К. Метод адаптировали для политенных хромосом [23]. Для получения ДНК-зонда проводили дигоксигенирование ДНК (Digoxysygenin «Sigma», США), гибридизацию и детекцию (Anty-Digoxysygenin-Rhodamin «Sigma», США) по рекомендованному протоколу [23]. Хромосомы окрашивали DAPI и заключали в DABCO antifade solution («Sigma», США).

Для проведения указанных исследований использовали микроскоп AXIOVERT 10, оснащенный микроманипулятором IR (Zeiss) и механическим позиционером, и флуоресцентный микроскоп AXIOSCOP 2; регистрировали сигнал при помощи CCD-камеры (Германия).

Меченые районы хромосом идентифицировали по картам политенных хромосом слюнных желёз видов *An. atroparvus* [24], *An. messeae* [25] и *An. beklemishevi* [26, 27].

Результаты и обсуждение

На первом этапе исследования провели микродиссекцию прицентромерного участка 15d хромосомы 2L *An. beklemishevi* (см. рис. 1, б) имеющего жесткое прикрепление к ядерной оболочке. Далее провели *in situ* гибридизацию полученной районоспецифичной ДНК-пробы (Abek12L) на политенные хромосомы из трофоцитов яичников видов *An. atroparvus*, *An. messeae*, *An. beklemishevi*. Особенности хромосомной локализации районоспецифичной ДНК-пробы (Abek12L) из ПГ хромосомы 2L *An. beklemishevi* на политенных хромосомах *An. atroparvus*, *An. messeae* и *An. beklemishevi* оценивали в сравнении с результатами гибридизации районоспецифичной пробы Atr2R.

In situ гибридизация районоспецифичной пробы прицентромерного района хромосомы 2L *An. beklemishevi* на хромосомы питающих клеток яичников *An. beklemishevi*, *An. messeae*, *An. atroparvus* показала следующие результаты.

У *An. beklemishevi* зонд гибридизовался в небольшом участке проксимальной области прицентромерного района 5ab хромосомы XL (рис. 3, а). В хромосоме 2L метка Abek12L включилась в область прикрепления к оболочке ядра

(район 15d, из которого была взята проба), при этом видны ярко светящиеся тяжи (см. рис. 2, а; 3, а). В прицентромерном участке хромосомы 2R, район 14с, также можно наблюдать меченые тяжи ДНК прикрепления к ядерной оболочке, но менее яркие, чем у смежного участка хромосомы 2L. Хромосома 2L *An. messeae* помети́лась в прицентромерном районе 15d, а также в районе 12b хромосомы 2R (рис. 3, б). В хромосоме 3R гомологичные пробы последовательности локализованы в районе 32cd. В хромосоме 3L выявлено два участка мечения в районе расхождения гомологов 33с, разделенных участком, где сигнал отсутствует (см. рис. 3, а). В то же время, метка отсутствовала на прицентромерных участках с α -гетерохроматином хромосомы 3R *An. beklemishevi*.

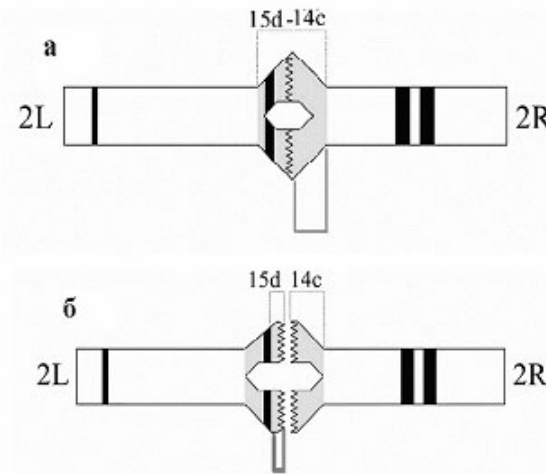


Рис. 1. Схема организации гетерохроматиновых районов хромосомы 2:
 а – *An. atroparvus*; б – *An. beklemishevi*; ■ – блоки α -гетерохроматина;
 □ – β -гетерохроматин; ww – районы прикрепления к оболочке ядра;
 □ – район, подвергшийся микродиссекции

Ранее в работе с фрагментом ПГ 2R *An. atroparvus* [1] у *An. beklemishevi* локализация меченого зонда в районе 5ab хромосомы XL не была определена [1]. Не было обнаружено и локализации флуоресцентной метки на хромосоме 2L (см. рис 2, б), но в участках прикрепления хромосомы 2R мечение имело место с характерными тяжами прикрепления к ядерной оболочке. Хромосома 3 была тоже помечена, но гомологичные последовательности были включены как в блочный α - и β -гетерохроматин [1].

У *An. messeae* проба обнаружена в ПГ хромосомы XL и в районе 5ab (рис. 3, б). Хромосома 2L *An. messeae* помети́лась в прицентромерном районе 15d (мечение наблюдается только в районе β -гетерохроматина), а также в районе 12b хромосомы 2R (см. рис. 3, б). Хромосома 3R отмечена локальным сигналом в прицентромерной области, район 32cd, и более диффузно – в хро-

мосоме 3L, район 33с (рис. 3, б). Отсутствие метки наблюдается на участках с α -гетерохроматином прицентромерного участка и в других районах хромосомы 3R.

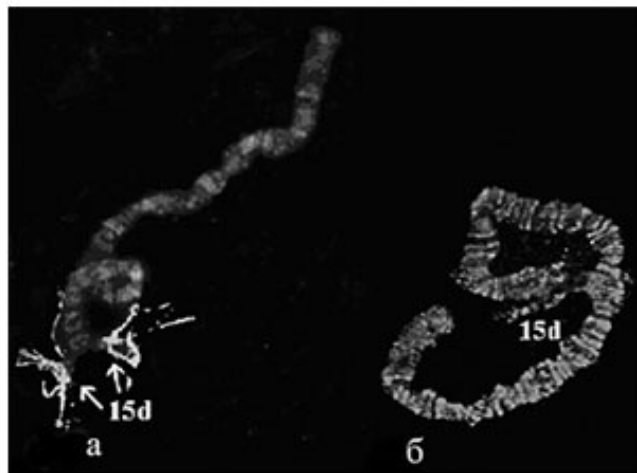


Рис. 2. Результаты *in situ* гибридизации: а – флуоресцентная гибридизация ДНК-пробы Abek12L; б – отсутствие гибридизации ДНК-пробы Atr2R с хромосомой 2L *An. beklemishevi* [1]

Ранее при гибридизации ДНК-зонда Atr2R с политенными хромосомами *An. messeae* также наблюдалось мечение ПГ хромосомы XL. Хромосома 2 обнаруживала сигнал в районах и α - и β -гетерохроматин прицентромерного района обоих плеч, а уровень сигнала был высоким. Гомологичные последовательности были обнаружены в блочном α - и β -гетерохроматине хромосомы 3 [1].

У *An. atroparvus* также обнаружены последовательности, гомологичные ДНК-последовательностям ПГ XL-плеча половой хромосомы, локализованные в районе 5ab (см. рис. 3, в), который у данного вида в трофоцитах яичников всегда прикреплен к ядерной оболочке. На хромосоме 2 сигнал расположен в прицентромерном районе обоих плеч – 15d плеча 2L (помечен только β -гетерохроматин) и 14с плеча 2R, но в правом плече наблюдается менее интенсивное свечение метки (рис. 3, в). У *An. atroparvus* помечен как и у двух предыдущих видов ПГ хромосомы 3: только районы 32a–с и 33cd (рис. 3, в).

В работе с районспецифичной пробой Atr2R [1] наблюдалось мечение ПГ хромосомы района XL интеркалярного гетерохроматина 2b. У *An. atroparvus* был помечен и α - и β -гетерохроматин прицентромерного района обоих плеч второй хромосомы, как и у *An. messeae*. Уровень сигнала на хромосоме 2 был высоким [1]. ПГ хромосомы 3 тоже включал в свой состав гомологичные пробе Atr2R последовательности, заключенные в блочном α - и β -гетерохроматине [1].

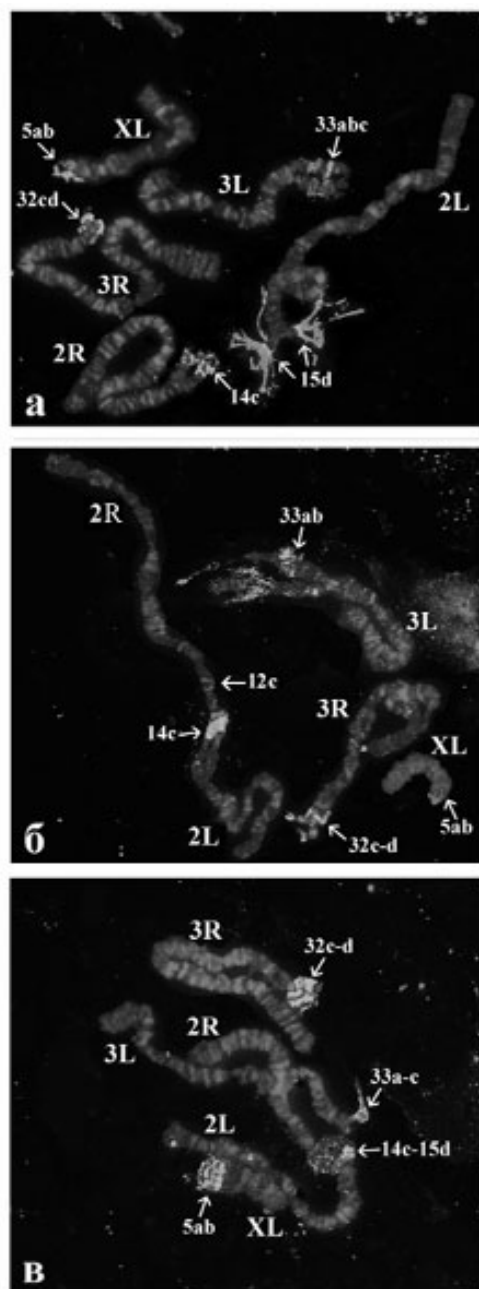


Рис. 3. Флуоресцентная *in situ* гибридизация районспецифичной ДНК-пробы Abek12L на поличенных хромосомах трофоцитов яичников малярийных комаров: а – *An. beklemishevi*; б – *An. messeae*; в – *An. Atroparvus*

Таким образом, в ранее проведенных исследованиях с ДНК-пробой Atr2R гомология обнаруживалась со всеми хромосомами независимо от их отношения к ядерной оболочке. Причем левое плечо хромосомы 2 *An. beklemishevi*, которое облигатно крепится к оболочке ядра, оказалось непомеченным. Не обнаружил сигнала также район прикрепления XL хромосомы *An. messeae*.

В наших исследованиях с ДНК-зондом у Abek12L *An. beklemishevi* и *An. atroparvus* зонд гибридизовался во все прицентромерные районы, у *An. messeae* – в прицентромерные участки всех хромосом, а также в интеркалярный район хромосомы 2. Но сигнал отсутствовал в блоках прицентромерного α -гетерохроматина хромосом 2 и 3. Район прикрепления XL снова не обнаружил гомологии с изучаемым зондом Abek12L (см. рис. 3б).

Слабая гомология ДНК районспецифичной пробы из прицентромерного участка хромосомы 2 *An. atroparvus* и пробы из ПГ левого плеча хромосомы 2 *An. beklemishevi* с районом прикрепления XL хромосомы к оболочке ядра *An. messeae* говорит о наличии в этом районе состава ДНК ПГ отличного от такового в исследуемых зондах Atr2R и Abek12L.

Вторым этапом с помощью метода микродиссекции выделили ДНК района прикрепления хромосомы XL (рис. 4). Провели сравнительную *in situ* гибридизацию на хромосомы этого же вида и получили следующие результаты: оказались помеченными прицентромерные области всех хромосом, кроме того, гомология была обнаружена с множеством интеркалярных районов хромосомы 2 и хромосомы 3. Блоки α -гетерохроматина также обнаруживали метку.

Выявлены следующие различия прикрепления хромосомы 2 у трех изучаемых видов: у *An. beklemishevi* хромосома 2 в области прицентромерного гетерохроматина образует облигатный контакт с оболочкой ядра, у *An. messeae* она вообще не образует контактов с ядерной оболочкой, а у *An. atroparvus* обнаруживается внутривидовая изменчивость морфологии данного района с образованием факультативных связей хромосома – ядерная оболочка, расположение хромосом в ядре и их взаимоотношение с ядерной оболочкой не определяется универсальными последовательностями, так как не все области прикрепления имеют одинаковую элементарную структуру.

При анализе состава ДНК в исследованиях с ДНК-пробой Atr2R была обнаружена гомология последовательностей двух фрагментов с участками некоторых генов (Atr2R-6, Atr2R-71a и Atr2R-107), мобильными элементами типа *gypsy* (Atr2R-50a и Atr2R-53) *An. gambiae* и *D. melanogaster*. Но основную часть прицентромерного района хромосомы 2 *An. atroparvus* составляют АТ-богатые повторы, различающиеся как по последовательности, так и по копийности в геноме этого вида. Причем коротких tandemных повторов почти не было обнаружено; единственный tandemный повтор длиной 45 пн. был найден только в одном из фрагментов. С помощью Саузерн-блот гибридизации такие повторы были обнаружены и у *An. messeae*. Большинство повторов изучаемых фрагментов, как показал анализ, проявляют гомологию с первичной последовательностью *An. messeae*, хотя разница в интенсивности сигналов свидетельствует о количественном различии этих повторов.

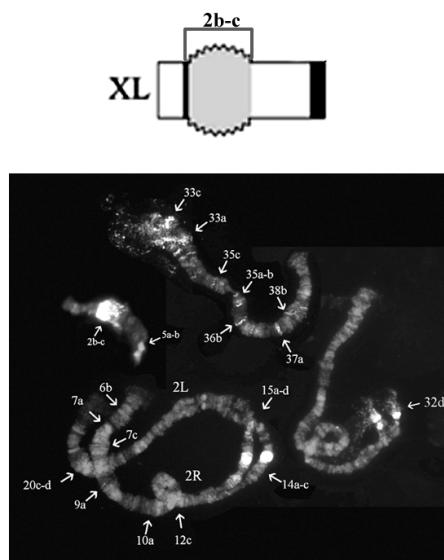


Рис. 4. Схема организации гетерохроматинового района хромосомы XL *An. messeae* (■ – блоки α -гетерохроматина; □ – β гетерохроматин; WW – районы прикрепления к оболочке ядра; □ – район, подвергшийся микродиссекции) и флуоресцентная *in situ* гибридизация районспецифичной ДНК-пробы из участка прикрепления хромосомы XL *An. messeae* на политенных хромосомах трофоцитов яичников того же вида

Исследование ДНК-зонда Abek12L содержит АТ-богатую ДНК низкой сложности, только в одном фрагменте обнаружены тандемные повторы, найдено несколько фрагментов гомологичных LINE-элементам, характерным для млекопитающих, что говорит о консервативности данного района. Анализ обеих проб Abek12L и Atr2R на гомологию состава первичных последовательностей ДНК выявил всего одну пару гомологичных клонов – Abek12L-135 и Atr2R-133 соответственно [E-value: 1.6×10^{-64} ; Smith-Waterman score: 929; 93,868% identity (94,313% ungapped) in 212 nt overlap (217-7:158-369)]. Такие результаты говорят, что данная проба является более специфичной, нежели проба Atr2R из ПГ хромосомы 2R *An. atroparvus*.

По данным ранее проведенных исследований, ДНК 80% района ПГ хромосомы 2R *An. atroparvus* составляют последовательности обладающими характеристиками различных классов ДНК ядерного матрикса. Наиболее представлен класс ДНК синаптонемного комплекса, однако выявляются и ДНК ядерной ламина. Несмотря на отсутствие прочного крепления изучаемого района прицентромерного гетерохроматина к оболочке ядра в трофоцитах яичников у *An. atroparvus*, в его составе присутствуют ДНК с необходимыми свойствами. Следовательно, одного наличия подобных последовательностей

ДНК ещё недостаточно для формирования прочной связи хромосомы с ядерной оболочкой.

Таким образом, расположение хромосом в ядре и их взаимоотношения с ядерной оболочкой не определяются универсальными последовательностями, т.к. не все области прикрепления имеют одинаковую элементарную структуру. В то же время нельзя утверждать, что свойство прикрепления хромосом к оболочке может зависеть от специфических повторов характерных для отдельно взятой хромосомы. Вероятно, пространственную организацию хромосом в ядре определяют композиции повторенных последовательностей, специфичных для каждого участка прикрепления.

Работа выполнена при финансовой поддержке: РФФИ (проект № 06-0496965, № 07-04-01484, № 07-04-12185), целевой программы «Развитие научного потенциала высшей школы (2006–2008 гг.)» (проект РНП.2.2.1.1.2038) и проекта ФЦП № 2007-2-1.2-06-03-019.

Литература

1. Грушко О.Г., Шарахова М.В., Шевченко А.И. и др. Характеристика и сравнительный анализ ДНК из прицентромерного гетерохроматина хромосомы 2 *Anopheles atroparvus* V. Tiel (Culicidae, Diptera) // Генетика. 2004. Т. 40, № 8. С. 1–10.
2. Coomings D.E. The rationale and ordered arrangement of chromatin in the interphase nucleus // Am. J. Hum. Genet. 1968. Vol. 20, № 5. P. 440–460.
3. Benedict M.Q., McNitt L.M., Cornel A.J., Collins F.H. Mosaic: a position-effect variegation eye-color mutant in the mosquito *Anopheles gambiae* // J. Hered. 2000. Vol. 91, № 2. P. 128–133.
4. Elgin S.C., Workman J.L. Chromosome and expression mechanisms: A year dominated by histone modifications, transitory and remembrance // D. Curr. Opin. Genet. Dev. 2002. Vol. 12. P. 127–129.
5. Стегний В.Н. Популяционная генетика и эволюция малярийных комаров. Томск: Изд-во Том. ун-та, 1991. 136 с.
6. Paddy M.R., Belmont A.S., Saumweber H., Agard D.A., Sedat J.W. Interphase nuclear envelope lamins form a discontinuous network that interacts with only a fraction of the chromatin in the nuclear periphery // Cell. 1990. Vol. 62, № 1. P. 89–106.
7. Belmont A.S., Zhai Y., Thilenius A. Lamin B distribution and association with peripheral chromatin revealed by optical sectioning and electron microscopy tomography // J. Cell Biol. 1993. Vol. 123, № 6. P. 1671–1685.
8. Стегний В.Н. Архитектоника генома, системные мутации и эволюция. Новосибирск: Изд-во Новосиб. ун-та, 1993. 111 с.
9. Marshall W.F., Dernburg A.F., Harmon B., Agard D.A., Sedat J.W. Specific interactions of chromatin with the nuclear envelope: positional determination within the nucleus in *Drosophila melanogaster* // Mol. Biol. Cell. 1996. Vol. 7, № 5. P. 825–842.
10. Sage B.T., Csink A.K. Heterochromatic self-association, a determinant of nuclear organization, does not require sequence homology in *Drosophila* // Genetics. 2003. Vol. 165, № 3. P. 1183–1193.
11. Hennig W. Heterochromatin // Chromosoma. 1999. Vol. 108, № 1. P. 1–9.
12. Корочкин Л.И. Эволюционное значение генетических подвижных элементов. Гипотеза // Цитология и генетика. 1983. Т. 17. С. 67–78.
13. Кикнадзе И.И., Сиурин М.Т. Полиморфизм прицентромерного гетерохроматина у комара-хирономуса *Chironomus plumosus* // Цитология. 1991. Т. 33, № 3. С. 60–67.

14. Elgin S.C., Grewal S.I. Heterochromatin: silence is golden // *Curr Biol.* 2003. Vol. 13, № 23. P. 895–898.
15. Жимулев И.Ф., Беляева Е.С. Гетерохроматин, эффект положения гена и генетический сайленсинг // *Генетика.* 2003. Т. 39, № 2. С. 187–201.
16. Стегний В.Н. Реорганизация структуры интерфазных ядер в онто- и филогенезе малярийных комаров // *ДАН СССР.* 1979. Т. 249, № 5. С. 1231.
17. Стегний В.Н. Системная реорганизация архитектоники политенных хромосом в онто- и филогенезе малярийных комаров. II. Видоспецифичность в характере взаимоотношений хромосом с ядерной оболочкой в питательных клетках яйчников // *Генетика.* 1987. Т. 23. С. 1194.
18. Прокофьева-Бельговская А.А. Гетерохроматизация как изменение цикла хромосомы // *Журн. общей биол.* 1945. Т. 6, № 2. С. 93–123.
19. Baimai V. Heterochromatin accumulation and karyotypic evolution in some dipterian insects // *Zoological studies.* 1998. Vol. 37, № 2. P. 75–88.
20. Русакова А.М. Популяционно-цитогенетический анализ комаров комплекса *Anopheles maculipennis* (Diptera; Culicidae): Дис. ... канд. биол. наук. Томск: НИИ биологии и биофизики Том. гос. ун-та, 2007. 142 с.
21. Peacock W.J., Lohe A.R., Gerlach W. et. al. Fine structure and evolution of DNA of heterochromatin // *Cold. Spring. Harb. Symp. Quant. Biol.* 1978. Vol. 42, pt 2. P. 1121–1135.
22. Шарахова М.В., Шарахов И.В. и др. Прицентромерный и интеркалярный α -гетерохроматин политенных хромосом малярийных комаров // *Генетика.* 2000. Т. 36, № 2. С. 175–181.
23. Рубцов Н.Б., Алексеенко А.А., Беляева Е.С. и др. Микроклонирование и характеристика ДНК из районов прицентромерного гетерохроматина политенных хромосом *Drosophila melanogaster* // *Генетика.* 1999. Т. 35, № 1. С. 55–61.
24. Стегний В.Н., Кабанова В.М. Хромосомный анализ малярийных комаров *ANOPHELES ATROPARVUS* и *A. MACULIPENNIS* (DIPTERA, CULICIDAE) // *Зоол. журн.* 1978. № 4. С. 613–619.
25. Стегний В.Н., Кабанова В.М., Новиков Ю.М. Кариотипическое исследование малярийного комара // *Цитология.* 1976. Т. 18, № 6. С. 760–766.
26. Стегний В.Н., Кабанова В.М. Цито-экологическое изучение природных популяций малярийного комара на территории СССР. I. Выделение нового вида в комплексе *maculipennis* цитогенетическим методом // *Мед. паразитал. и паразит. болезни.* 1976. № 2. С. 192–198.
27. Stegnyy V.N., Kabanova V.M. Cytoecological Study of Indigenous Populations of the Malaria Mosquito in the Territory of the USSR. I. Identification New Species of *Anopheles* in the *maculipennis* Complex by the Cytodiagnostic Method // *Mosquito Systematics.* 1978. Vol. 10, № 1. P. 1–12.