

На правах рукописи



БУЛЭУ
Олеся Георгиевна

ЭВОЛЮЦИЯ КАРИОТИПОВ И СИСТЕМ ХРОМОСОМНОГО
ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПОЛА У САРАНЧОВЫХ СЕМЕЙСТВА
РАМРНАGIDAE (ORTHOPTERA, ACRIDOIDEA)

03.02.05 – энтомология

АВТОРАФЕРАТ
диссертации на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

Новосибирск – 2020

Работа выполнена в лаборатории филогении и фауногенеза ИСиЭЖ СО РАН и на кафедре общей биологии и экологии ФЕН (НГУ)

Научный руководитель: **Бугров Александр Геннадьевич**
доктор биологических наук, в.н.с
ИСиЭЖ СО РАН, профессор каф.
общей биологии и экологии ФЕН
(НГУ), г. Новосибирск

Официальные оппоненты: **Кузнецова Валентина Григорьевна** д. б. н., профессор, г.н.с., федерального государственного бюджетного учреждения науки Зоологический институт Российской академии наук, заведующая отделением кариосистематики лаборатории систематики насекомых, г. Санкт-Петербург

Гольгина Вероника Вилорьевна кандидат биологических наук, в.н.с лаборатории механизмов клеточной дифференцировки, сектор эволюционной геномики хирономид ИЦИГ СО РАН, г. Новосибирск

Ведущая организация: Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Национальный исследовательский Томский государственный университет», г. Томск


Защита состоится «15» декабря 2020 г. в 10 часов на заседании диссертационного совета Д 003.033.01 при Институте систематики и экологии животных СО РАН по адресу: 630091, Новосибирск, ул. Фрунзе 11.

Факс+7(383)217-09-73, e-mail: dis@eco.nsc.ru

С диссертацией можно ознакомиться в Научной библиотеке Института систематики и экологии животных СО РАН и на сайте eco.nsc.ru

Автореферат разослан « » октября 2020 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук

 Петрожицкая
Людмила Владимировна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность. Семейство саранчовых Pamphagidae Burmeister, 1840 включает около 600 видов из 96 родов, обитающих в аридных и горных районах Южной и Северной Африки, Европы и Азии (Ünal, 2016). Исследования кариотипов Pamphagidae из Африки, Южной Европы и Юго-Восточной Азии, проводимые до 1990-х годов, привели к заключению о том, что эта группа имеет единообразный кариотип, состоящий из 19 у самца и 20 у самки акроцентрических хромосом при X0/XX системе определения пола ($2n\♂=19\ X0$; $2n\♀=20\ XX$) (Hewitt, 1979; Cabrero et al., 1985). Позднее, цитогенетические исследования Pamphagidae из фауны Центральной Азии, Кавказа и Болгарии показали, что эта группа не является единообразной по структуре кариотипа. У нескольких видов этой группы был описан кариотип, состоящий из 16 акроцентрических аутосом при нео-XY/нео-XX системе определения пола ($2n\♂=16+\text{нео-XY}$; $2n\♀=16+\text{нео-XX}$) (Бугров, 1986; Bugrov, Grozeva, 1998). Данный кариотип образуется в результате робертсоновской транслокации акроцентрической X хромосомы с одной из акроцентрических аутосом. Хромосомные перестройки такого типа описаны у более ста видов саранчовых из разных таксономических групп (Hewitt, 1979). Однако исключительно редко бывает, чтобы группа видов, принадлежащих к одному роду или группе близких родов саранчовых, обладала бы изменённой на основе робертсоновской транслокации системой определения пола. Это давало основание предполагать, что возникшие *de novo* системы определения пола у саранчовых не поддерживаются естественным отбором и не приводят к дальнейшей дивергенции (Mesa et al., 2001). Ранее считалось, что только южноамериканские саранчовые из подсемейства Melanoplinae семейства Acrididae являются исключением из этого правила (Castillo et al., 2010). Обнаружение нео-XY системы определения пола у нескольких видов другого семейства настоящих саранчовых – Pamphagidae привлекло внимание к этой группе насекомых как новой модели эволюции половых хромосом.

Анализ структурных особенностей нео-половых хромосом у Pamphagidae из подсемейств Thrinchinae и Pamphaginae выявил различия в степени гетероморфизации половых хромосом. Исходя из этого, были высказаны две гипотезы о путях эволюции кариотипов в этих группах. Одна из них опиралась на предположение, что редкая хромосомная перестройка была единичным эволюционным событием, а все таксономические группы семейства Pamphagidae, обладающие такой системой определения пола, представляют монофилетическую ветвь этого семейства (Bugrov, Grozeva, 1998). Поздние сведения о кариотипах Pamphagidae из фауны Армении привели к пересмотру этой гипотезы и

предположению о независимых путях эволюции кариотипов в подсемействах Thrinchinae и Pamphaginae (Bugrov et al., 2016).

Для проверки данных гипотез необходимо было получить и исследовать новый материал из основных центров биологического разнообразия саранчовых семейства Pamphagidae, что нашло отражение в постановке цели и задач настоящего исследования.

Целью данной работы являлось выяснение кариотипических особенностей и путей эволюции систем хромосомного определения пола у саранчовых семейства Pamphagidae.

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

1. У ранее цитогенетически не исследованных видов саранчовых Pamphagidae выяснить структурные особенности кариотипов.
2. В кариотипах Pamphagidae с X0 и нео-XY системами определения пола описать локализацию и относительные размеры районов конститутивного гетерохроматина.
3. В кариотипах Pamphagidae с X0 и нео-XY системами определения пола описать расположение рибосомных и теломерных (TTAGG)_n повторяющихся последовательностей ДНК.
4. Методом кросс-гибридизации оригинальных микродиссекционных ДНК-проб выявить гомологию повторяющихся последовательностей ДНК в хромосомах исследуемых видов Pamphagidae.
5. На основе анализа полученных молекулярно-цитогенетических данных предложить гипотезу эволюции кариотипов и систем определения пола у модельной группы саранчовых.

Степень разработанности темы исследования. С цитогенетической точки зрения, саранчовые семейства Pamphagidae – одна из наименее исследованных групп саранчовых. До предпринятого нами исследования были описаны кариотипы не более 50 видов этого семейства. Лишь для некоторых из них приведена информация об относительной величине и локализации районов гетерохроматина в хромосомах (Sabero, et al., 1985). С молекулярно-цитогенетической точки зрения Pamphagidae исследованы крайне слабо. На примере единичных видов были выяснены особенности локализации рибосомной ДНК и теломерного (TTAGG)_n повтора (Vitturi et al., 2008; Бугров, Джетыбаев, 2014; Bugrov et al., 2016).

Интерес к продолжению цитогенетического исследования Pamphagidae возник после того, как у нескольких видов была описана нео-XY система определения пола (Бугров, 1986; Bugrov, Grozeva, 1998). Эти находки послужили основой для целенаправленного поиска новых цитогенетических особенностей Pamphagidae, чему и посвящена данная работа.

Научная новизна. Впервые получены оригинальные сведения о кариотипах ранее не исследованных видов саранчовых семейства Pamphagidae из России, Казахстана, Турции, Ирана, Северной (Марокко) и Южной (ЮАР) Африки. Совокупность классических и современных молекулярно-цитогенетических методов исследования кариотипов Pamphagidae была направлена на выявление тенденций эволюции половых хромосом в подсемействах Thrinchinae и Pamphaginae и использование этих данных для уточнения систематики и реконструкции исторического развития этой группы саранчовых на арене жизни. У 22 видов Pamphagidae выявлена исходная для всех Acridoidea X0 система определения пола. У 18 видов обнаружена редкая для саранчовых нео-XY система определения пола. С помощью использованных нами методов установлено, что исходным моментом формирования нео-XY системы определения пола из X0 у Pamphagidae стала робертсоновская транслокация с делецией небольшого прицентромерного района. В подсемействах Thrinchinae (Thrinchini) и Pamphaginae (Tropidauchenini, Nocarodeini) зафиксированы разные этапы гетероморфизации нео-половых хромосом. Впервые в хромосомах 41 вида Pamphagidae описана локализация блоков гетерохроматина, кластеров рибосомной и теломерной (TTAGG)_n ДНК. Определение локализации теломерного (TTAGG)_n повтора в хромосомах Pamphagidae позволило уточнить механизм образования нео-половых хромосом в данной группе саранчовых. При помощи кросс-гибридизации ДНК-проб впервые определена гомология молекулярного состава половых хромосом и аутосом саранчовых семейства Pamphagidae. Полученные результаты в значительной мере расширяют возможности реконструкции структурной эволюции хромосом этого семейства. Сопряжённый анализ цитогенетических данных и географического распространения Pamphaginae с X0 и нео-XY системами определением пола позволяет предположить, что эволюционные события, приведшие к трансформации исходного определения пола в подсемействах Thrinchinae и Pamphaginae произошли независимо друг от друга. В подсемействе Thrinchinae перестройка системы определения пола произошла, вероятно, на территории Центральной и Малой Азии, а центром происхождения групп с нео-XY системой определением пола у видов подсемейства Pamphaginae является Передняя Азия, а именно Иранское нагорье.

Научно-практическая ценность. Совокупность полученных данных расширяет представление о структуре и эволюции кариотипов саранчовых Pamphagidae. Полученные данные локализации молекулярных маркёров в хромосомах исследованных Pamphagidae можно использовать в сравнительно-цитогенетическом анализе и реконструкции

эволюционных событий у саранчовых. Полученные микродиссекционные ДНК-пробы являются основой для дальнейшего анализа повторяющихся последовательностей ДНК в хромосомах саранчовых и других групп насекомых. Обнаруженные различия структурной гомологии половых хромосом указывают на то, что представители этого семейства могут стать перспективной моделью для исследования эволюции XY гетерогаметного пола из исходного для них X0. Полученные результаты могут быть использованы в курсах лекций по энтомологии и цитологии.

Степень достоверности результатов и апробация работы. Материалы работы изложены в 13 публикациях, достоверность которых подтверждена независимыми рецензентами. Результаты работы вошли в отчет по гранту РФФИ (№ 15-04-04816 А). Основные положения были представлены на лабораторных и межлабораторных семинарах ИСиЭЖ СО РАН, собраниях кафедры общей экологии и биологии (ФЕН, НГУ). Результаты диссертации представлены на Всероссийской конференции с международным участием «Биогеосистемная экология и эволюционная биогеография» (14–19 декабря 2016, Новосибирск); 55-й Международной научной студенческой конференции «МНСК» (Новосибирск, 2017); XV Съезде Русского энтомологического общества (31 июля–7 августа 2017, Новосибирск); XI Всероссийском конгрессе молодых ученых-биологов с международным участием “Симбиоз-Россия 2019” (13–15 мая 2019 года, Пермь).

Положения, выносимые на защиту:

1. Кариотипы саранчовых семейства Pamphagidae не являются единообразными.
2. У саранчовых Pamphagidae исходным моментом формирования нео-половых хромосом является робертсоновская транслокация, сопровождавшаяся делецией прицентромерного района.
3. Выявленные структурные особенности нео-половых хромосом у *Thrinchini*, *Tropidauchenini* и *Nocarodeini* указывают на независимые пути эволюции нео-Y хромосомы в подсемействах *Thrinchinae* и *Pamphaginae*.
4. Эволюционные события, приведшие к формированию нео-XY системы определения пола у видов из подсемейства *Thrinchinae*, произошли и эволюционировали на территории Центральной и Малой Азии. Находка в Иране исходного этапа эволюции нео-половых хромосом в подсемействе *Pamphaginae* (триба *Tropidauchenini*), позволяет предполагать, что центром происхождения групп с нео-XY типом определения пола в этом подсемействе является Иранское нагорье.
5. Локализация кластеров рибосомной ДНК в хромосомах Pamphagidae имеет дискретные различия от расположения этого маркера в

хромосомах других семейств в надсемействе настоящих саранчовых Acridoidea.

6. Молекулярно-цитогенетические данные о структурных особенностях X хромосом при X0 системе определения пола и XL-плеч нео-X хромосом при нео-XY системе определения пола свидетельствует о монофилетическом происхождении XL-плеч нео-X и X хромосом в каждом из подсемейств (Thrinchinae и Pamphaginae).

7. Молекулярно-цитогенетические данные о структурных особенностях нео-половых хромосом в подсемействах Thrinchinae и Pamphaginae отражают разную степень гетероморфизации исходно гомологичных XR-плеч нео-X хромосом и нео-Y хромосом в этих подсемействах.

Личный вклад автора. Автором приготовлены и С-дифференциально окрашены все хромосомные препараты. FISH, микрордиссекция и кросс-гибридизация проведены совместно с И. Е. Джетыбаевым. Автор принимал непосредственное участие в обработке и анализе всех полученных результатов. Подготовка публикаций проводилась совместно с соавторами.

Публикации. По теме диссертации опубликовано 13 работ, в том числе 2 статьи в журналах, входящих в список рекомендованный ВАК и 4 статьи в журналах, входящих в базы цитирования Web of Science и Scopus.

Структура и объем работы. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, описания и обсуждения полученных результатов, выводов, списка цитируемой литературы, который включает 175 публикаций в отечественных и зарубежных журналах и приложения. Работа изложена на 130 страницах машинописного текста. Представленный материал иллюстрирован 3 таблицами и 46 фотографиями.

Благодарность. Выражаю искреннюю и глубокую благодарность моему научному руководителю доктору биологических наук, в.н.с ИСиЭЖ СО РАН, профессору кафедры общей биологии и экологии (НГУ), Александру Геннадьевичу Бугрову, чьи идеи и научные планы послужили основой для этой работы, за внимание, поддержку и ценные советы. Особая признательность к. б. н. Ильясу Еркиновичу Джетыбаеву (ИЦиГ СО РАН), за помощь в проведении экспериментальной части исследований, советы и поддержку на всех этапах работы. Автор благодарен д. б. н., профессору, зав. кафедры цитологии и генетики (НГУ), г.н.с., зав. лабораторией ИЦиГ СО РАН, Николаю Борисовичу Рубцову, за помощь в проведении экспериментальной работы. За помощь в сборе материала для исследования благодарю доктора Драгона

Чобанова (IBER, Bulgaria), доктора Мустафу Унала (Abant İzzet Baysal Üniversitesi, Turkey), доктора Гаяне Карганян (SCZH NAS RA, Armenia), доктора Mohsen Mofidi-Neystanak (Iranian Research Institute of Plant Protection, Iran Tehran). За помощь в компьютерной обработке фотографий, благодарю к. б. н. Богомолова А. Г. (ИЦиГ СО РАН). За всестороннюю помощь благодарю д. б. н., профессора, зав. кафедрой общей биологии и экологии (НГУ), в.н.с ИСиЭЖ СО РАН Михаила Георгиевича Сергеева. За дружеское участие благодарю коллектив каф. общей экологии и биологии (НГУ). За помощь и поддержку искренне благодарна к.б.н., доценту каф. сельскохозяйственной биологии Сергею Владимировичу Лукьянцеву (ТГУ). За внимательное прочтение и ценные замечания при рецензировании работы благодарю д. б. н., зав. лабораторией экологической паразитологии ИСиЭЖ СО РАН Крюкова Вадима Юрьевича и к. б. н., доцента каф. цитологии и генетики (НГУ) Анну Михайловну Гусаченко.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ. В главе приведена общая характеристика саранчовых Pamphagidae, которая включает описание диагностических морфологических признаков, таксономической структуры и географического распространения семейства. В этом же разделе сделан обзор цитогенетических особенностей и путей эволюции кариотипа саранчовых надсемейства Acridoidea.

Глава 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ. В основу работы был положен материал, собранный и любезно предоставленный А. Г. Бугровым (ИСиЭЖ СО РАН, НГУ), И. Е. Джетыбаевым (ИЦиГ СО РАН), Д. Чобановым (IBER, Болгария), Г. Карагян (SCZH NAS RA, Армения). Сбор материала проводили в разные годы в России, Армении, Казахстане, Турции, Иране, Северной и Южной Африке. Всего исследован 41 вид Pamphagidae из трех подсемейств: Thrinchinae Stål, 1876 (11 видов), Pamphaginae Burmeister, 1840 (29 видов) и Porthetinae Bolívar, 1916 (1 вид).

Методика фиксации семенных фолликулов самцов. Отловленным самцам Pamphagidae в брюшко вводили 0,1-0,2 мл 0,1% раствора колхицина на 1,5-2,0 ч. Затем семенники извлекали и после 20 минутной гипотонии в 0,9% растворе цитрата натрия фиксировали в смеси ледяной уксусной кислоты и 96% этанола (1:3) в течение 15 минут. Фиксированные семенники отмывали и хранили в 70% этаноле.

Методика приготовления хромосомных препаратов из семенных фолликулов самцов. От зафиксированного семенника отделяли 3-5 семенных фолликулов и помещали их в каплю 60% уксусной кислоты на чистое предметное стекло. Фолликулы раздавливали с помощью

покровного стекла. Давленные препараты замораживали на охлажденном жидким азотом металлическом столике. Покровное стекло снимали и высушивали препараты на воздухе. С-дифференциальное окрашивание проводили согласно протоколу Самнера (Sumner, 1972) с некоторыми модификациями, затрагивающими продолжительность обработки препаратов в растворах. Структуру кариотипа, локализацию и относительные размеры блоков С-гетерохроматина в хромосомах определяли на основе номенклатуры описанной в работе Cabrero et al., 1985. Флуоресцентную гибридизацию *in situ* (FISH) проводили в соответствии с протоколом Пинкеля (Pinkel et al., 1986) с модификациями описанными в статье Rubtsov et al., 2000. Рибосомная и теломерная ДНК-пробы получены по методике описанной в работе Jetybayev et al. 2017a. Микродиссекцию метафазных хромосом, получение и мечение ДНК-проб проводили в ИЦиГ СОРАН под руководством и непосредственным участии Н. Б. Рубцова и И. Е. Джетыбаева. Оригинальные ДНК-библиотеки приготовлены микроманипуляционным сбором копий XL-плеч нео-Х хромосом и проксимальных частей нео-У хромосом (Jetybayev, et al. 2017b). Анализ локализации последовательностей, гомологичных полученным ДНК-пробам выполнен с помощью FISH. Для улучшения визуализации полученных в результате кросс-гибридизации FISH изображений использовали компьютерный метод VISSIS. Микрофотографии хромосомных пластинок получены в Центре микроскопических исследований СО РАН на микроскопе AXIOSKOP 2 Plus (Zeiss, ФРГ). Для регистрации и обработки микроизображений использовали CCD-камеру и программное обеспечение «ISIS3» фирмы METASYSTEMS GmbH и AxioVision GmbH (Германия).

Результаты и обсуждение. В работе впервые описаны кариотипы 41 вида саранчовых Pamphagidae из трех подсемейств: Thrinchinae, Pamphaginae и Porthetinae. У 22 из 41 вида Pamphagidae кариотип представлен 19-ю акроцентрическими хромосомами при X0 системе определения пола (Рис.1А,Б). Один из возможных вариантов изменения кариотипа у Pamphagidae выявлен у *Eremopeza bicoloripes* и *E. saussurei* (Thrinchinae). У *E. bicoloripes* Х хромосома субacroцентрическая, а у *E. saussurei* мелкие вторые плечи имеют все большие, средние пары аутосом и Х хромосома (Рис.1В).

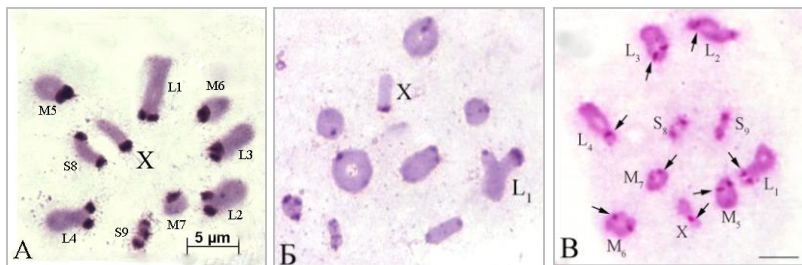


Рис. 1. Кариотипы Pamphagidae с X0 системой определения пола. А – *Glyphotmethis adalidae* (Thrinchinae); Б – *Saxetania paramonovi* (Pamphaginae); В – *Eretopezsa saussurei*, стрелки указывают на прицентромерный район двуплечих хромосом. С-дифференциальное окрашивание.

Большая группа Pamphagidae из подсемейств Thrinchinae (Thrinchini) и Pamphaginae (Nocarodeini и Tropidauchenini) имеют иной вариант хромосомного набора, состоящий из 18 (♂) хромосом при нео-XY системе определения пола (Рис.2А,Б,В). Такой кариотип сформировался в результате робертсоновской транслокации исходной X хромосомы с одной из крупных аутосом. Данный вариант выявлен у пяти видов из подсемейства Thrinchinae (Thrinchini) и у 13 видов из подсемейства Pamphaginae (Nocarodeini и Tropidauchenini). У *P. citimus* (Nocarodeini) кариотип состоит из 14 акроцентрических аутосом, двух нео-X (нео-X₁, нео-X₂) и одной нео-Y хромосом у самца (2n=14+нео-X₁нео-X₂нео-Y) (Рис.2Г). Такой кариотип сформировался на основе нео-XY системы определения пола в результате центрического слияния акроцентрической нео-Y хромосомы с одной из акроцентрических аутосом.

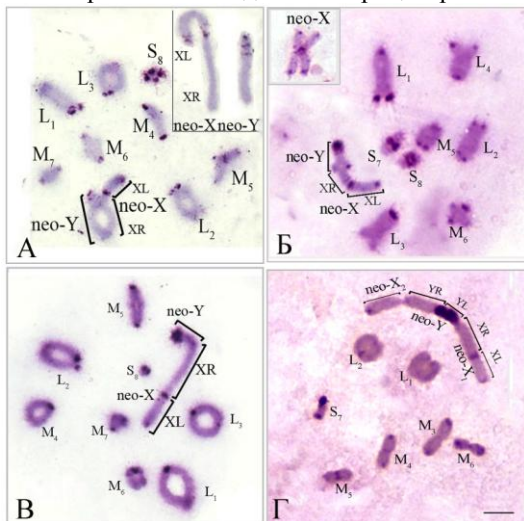


Рис. 2. Кариотипы Pamphagidae с нео-XY и нео-X₁X₂Y системами определения пола. А – *Glyphotmethis holtzi* (Thrinchini); Б – *Tropidauchen escaleraei* (Tropidauchenini); В – *Nocaracris sureyana* (Nocarodeini). Г – *Paranothrotres citimus*. С-дифференциальное окрашивание.

У видов трибы *Thrinchini* равные по величине нео-Y хромосома и XR-плечо нео-X хромосомы в профазе мейоза формируют бивалент с двумя, реже с тремя хиазмами (Рис.2А). У видов трибы *Tropidauchenini* нео-Y хромосома и XR-плечо в профазе мейоза ассоциируют интеркалярными и субтерминальными частями и формируют одну хиазму (Рис.2Б). У видов трибы *Nocarodeini* нео-Y хромосома значительно меньше гомологичного ей XR-плеча нео-X хромосомы. В профазе мейоза XR-плечо и нео-Y хромосома ассоциируют дистальными участками, формируя одну хиазму (Рис.2В).

Анализ полученных нами данных и опубликованных результатов (Bugrov et al., 2016) показал, что изменения кариотипа у видов рода *Eremopeza* могут быть результатом перичентрических инверсий.

Сравнительный анализ структурных особенностей нео-половых хромосом у *Pamphaginae* из подсемейств *Thrinchinae* (*Thrinchini*) и *Pamphaginae* (*Nocarodeini* и *Tropidauchenini*) выявил, разные стадии гетероморфизации первоначальных гомологов XR-плеча нео-X хромосомы и нео-Y хромосомы. У видов *Thrinchinae* (*Thrinchini*), отмечены начальные признаки гетероморфизации XR-плеча и нео-Y хромосомы, связанные с частичной гетерохроматинизацией прицентромержной области нео-Y хромосомы. У видов трибы *Tropidauchenini* (*Pamphaginae*) нео-половые хромосомы демонстрируют высокий уровень гомологии XR-плеча нео-X хромосомы с нео-Y хромосомой. На другом этапе эволюции половых хромосом в подсемействе *Pamphaginae* находятся виды трибы *Nocarodeini*. В этой группе преимущественно гетерохроматиновая нео-Y хромосома значительно меньше исходно гомологичного ей XR-плеча нео-X хромосомы. Дальнейший этап эволюции кариотипа в трибе *Nocarodeini* связан с образованием множественных половых хромосом (нео- X_1X_2Y) у видов рода *Paranothrotres*. Этот вариант хромосомного определения пола возникает на основе нео-XY в результате транслокации между акроцентрической нео-Y и одной из аутосом.

Вероятно, у *Thrinchini* в подсемействе *Thrinchinae* и у *Tropidauchenini* в подсемействе *Pamphaginae* слияние X хромосомы с одной из аутосом, произошло относительно недавно. На что указывает слабая гетерохроматинизация нео-Y хромосомы и сходство её размеров с гомологом. Подтверждением ранних этапов эволюции половых хромосом в этих группах является и то, что в этих трибах были описаны кариотипы как с исходной XO , так и с измененной, нео-XY системой определения пола. Впервые полученные нами данные о кариотипических особенностях видов трибы *Tropidauchenini* из Ирана, позволяют считать их исходным этапом эволюции нео-половых хромосом в подсемействе *Pamphaginae*

(Buleu et al., 2020). Все исследованные виды трибы Nocarodeini из этого подсемейства имеют только нео-XY или нео- X_1X_2Y системы определения пола.

Особенности локализации С-блоков гетерохроматина в хромосомах исследованных видов Pamphagidae. С-блоки в хромосомах Pamphagidae локализованы в прицентромерном, интеркалярном и теломерном районах. Прицентромерные С-блоки выявлены во всех хромосомах у всех исследованных в данной работе видов (Рис.1,2). Нео-Y хромосома у видов Thrinchini и Tropidauchenini по размеру прицентромерного С-блока не отличается от гомологичного ей XR-плеча нео-X хромосомы (Рис.2А,Б). У видов Nocarodeini прицентромерный район нео-Y хромосомы по сравнению с XR-плечом нео-X хромосомы гетерохроматинизирован сильнее (Рис.2В). Интеркалярные блоки в аутосомах выявлены у 13 из 41 исследованных видов Pamphagidae. Чаще всего интеркалярные блоки располагаются в средних и крупных парах аутосом (Рис.1,2). У Thrinchini в нео-Y хромосоме выявлено несколько мелких интеркалярных блоков, которых нет в гомологичном ей XR-плече нео-X хромосомы (Рис.2А). У Nocarodeini нео-Y хромосома имеет несколько больших интеркалярных блоков, которых нет в гомологичном ей XR-плече нео-X хромосомы (Рис.2В). У большинства исследованных видов в мелких и средних парах аутосом выявлены теломерные С-блоки (Рис.1,2).

Особенности локализации теломерной (TTAGG)_n и рибосомной ДНК-проб в хромосомах Pamphagidae. Анализ локализации теломерной (TTAGG)_n ДНК-пробы показал, что у Pamphagidae как с исходным (2n=19; X0) так и с измененными (2n=18; нео-XY и 2n=14; нео- X_1X_2Y) кариотипами теломерные повторяющиеся последовательности локализованы в терминальных районах всех хромосом (Рис. 3). В прицентромерных районах двуплечих хромосом у видов рода *Eretopeza* выявлены интеркалярные теломерные повторы (ITS). Это наблюдение поддерживает нашу гипотезу о том, что вторые плечи у видов этого рода образовались в результате перичентрической инверсии (Buleu et al., 2020), а не в результате расселения рибосомных повторов ДНК в прицентромерную область хромосом (Bugrov et al., 2016).

У большинства исследованных Pamphagidae с нео- половыми хромосомами FISH сигнал теломерных последовательностей в прицентромерном районе нео-X хромосомы отсутствовал, что можно объяснить утерей терминальных районов акроцентрических хромосом при транслокации X хромосомы и аутосомы. На основе этого можно предположить, что в исследуемой нами модели исходным моментом дифференциации нео-Y хромосомы стала центромерная транслокация с

делецией, приведшая к утрате структурной гомологии между аутосомным плечом нео-X и нео-Y хромосомой. Однако, у *G. dimorphus*, *G. efe*, *G. holtzi* (Thrinchinae, Thrinchini), *Tropidauchen* sp., *P. tolunayi* и *P. karabagi* (Pamphaginae, Nocarodeini) в прицентромерном районе нео-X хромосомы выявлен теломерный повтор. ITS в прицентромерном районе нео-X хромосомы у этих видов можно объяснить инверсией плеча X хромосомы и перемещением теломерных последовательностей в прицентромерный район.

Кластеры рибосомной ДНК в хромосомах Pamphagidae могут быть локализованы в одной, двух, трёх, четырех, пяти, шести, восьми парах аутосом (Рис.4), в X хромосоме при X0 (Рис.4.А,Б), XL-плечах нео-X и нео-X₁ хромосом при нео-XY и нео-X₁X₂Y и системах определения пола (Рис.4.В,Г,Д,Е). В одной паре аутосом может быть локализован один, два или три кластера рибосомной ДНК (Рис. 4).

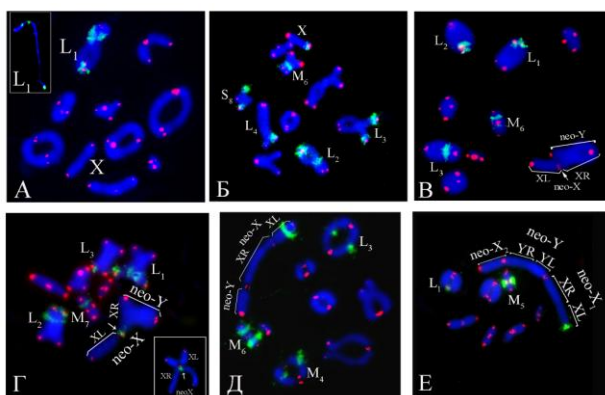


Рис. 4. Локализация рибосомной (зеленый сигнал) и теломерной (красный сигнал) ДНК-проб в хромосомах Pamphagidae. А – *Pseudoglaucia terrea*; Б – *Asiomethis muricatus*; В – *Glyphotmethis efe*; Г – *G. holtzi*; Д – *Paranocarodes tolunayi*; Е – *Paranthrotes citimus*.

В хромосомах саранчовых семейства Acrididae единичные кластеры рибосомной ДНК располагаются на одной, двух или трех парах хромосом (López-León et al., 1999; Cabrero, Camacho, 2008; Jetybayev et al., 2012). Анализ данных о локализации кластеров рибосомной ДНК в хромосомах у исследованных нами Pamphagidae показал, что они расположены очень разнообразно как у видов с X0 так и у видов с нео-XY типом определения пола. При этом на одной хромосоме может быть локализован один, два или три кластера рибосомной ДНК. Такое расположение кластеров рибосомной ДНК в хромосомах Pamphagidae несомненно является специфической характеристикой кариотипов этого семейства саранчовых,

но не позволяет использовать их в качестве маркера хромосомных перестроек.

Кросс-гибридизация микродиссекционных ДНК-проб с половыми хромосомами и аутосомами саранчовых *Pamphagidae*. При кросс-гибридизации пробы *AheXl*, полученной из XL-плеча нео-X хромосомы *A. heptapotamicus* (Thrinchini) выявлена гомология этой ДНК-пробы с X хромосомами у видов Thrinchini с X0 системой определения пола (Рис.5А). Кросс-гибридизация пробы *AheYcen*, полученной из проксимальной части нео-Y хромосомы *A. heptapotamicus*, не выявила гомологии с X хромосомой у видов Thrinchini с X0 системой определения пола (Рис.5А). Обе пробы давали диспергированный гибридационный сигнал в аутосомах исследованных видов (Рис.5А). Кросс-гибридизация ДНК-пробы *AheXl* с хромосомами видов с нео-XY системой определения пола показала интенсивный гибридационный сигнал в XL-плече нео-X хромосом (Рис.5Б,В). В XR-плече нео-X и нео-Y хромосомах гибридационный сигнал отсутствовал (Рис.5Б,В). Гибридизация *AheYcen* пробы показала интенсивный гибридационный сигнал в нео-Y и проксимальной части XR-плеча нео-X хромосом у всех видов с нео-половыми хромосомами (Рис.5Б,В). Обе пробы давали диспергированный гибридационный сигнал в аутосомах исследованных видов (Рис.5Б,В).

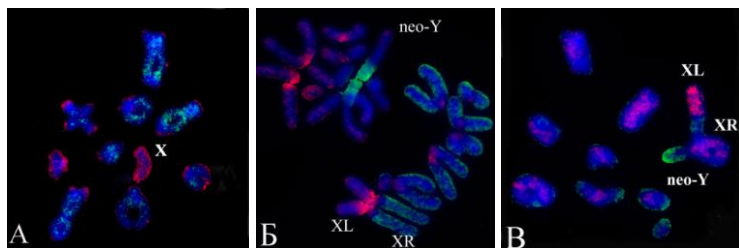


Рис. 5. Кросс-гибридизация микродиссекционных ДНК-проб *AheXl* и *AheYcen* с хромосомами видов Thrinchini с X0 и нео-XY системами определения пола. А – *Asiotmethis muricatus*; Б – *A. heptapotamicus*; В – *Glyphotmethis dimorphus*. Красный сигнал – ДНК-проба *AheXl*; Зеленый сигнал – ДНК-проба *AheYcen*.

Анализ кросс-гибридизации ДНК-пробы полученной из XL-плеча нео-X хромосомы *Asiotmethis heptapotamicus* с хромосомами других видов из подсемейства Thrinchinae, позволила установить гомологию повторяющихся последовательностей этой ДНК-пробы с X хромосомами видов с X0 и XL-плечом нео-X хромосом у видов с нео-XY системами определения пола. Этот результат свидетельствует о монофилетическом происхождении X хромосомы и XL-плеч нео-X хромосомы в подсемействе Thrinchinae, а так же сохранении молекулярного состава

предковой X хромосомы при формировании нео-XY системы определения пола. Кросс-гибридизация микродиссекционных ДНК-проб полученных из нео-Y хромосомы *Asiotmethis heptapotamicus* с хромосомами других видов из подсемейства Thrinchinae, позволила установить сходство молекулярного состава околоцентромерного района XR-плеч нео-X и соответствующего участка нео-Y хромосомы. Данный результат подтверждает структурную гомологию XR-плеча нео-X хромосомы и нео-Y хромосомы при формировании нео-XY системы определения пола.

Гибридизация ДНК-проб *NcyXl*, *NruXl* и *NtaXl*, полученных из XL-плеч нео-X хромосом видов рода *Nocaracris*, с хромосомами видов рода *Nocaracris* показала сходство молекулярного состава повторяющихся последовательностей ДНК XL-плеч нео-X хромосом (Рис.6). В XR-плече нео-X хромосом видов рода *Nocaracris* повторы ДНК-проб *NcyXl*, *NruXl* и *NtaXl* были либо слабо диспергированы в околоцентромерной части XR-плеча (Рис.6А,Б), либо не гибридизовались с ними (Рис.6В). ДНК-пробы *NcyXl*, *NruXl* и *NtaXl* давали диспергированный гибридизационный сигнал в аутосомах большинства видов рода *Nocaracris* (Рис.6). Гибридизация ДНК-проб *NcyY*, *NruY* и *NtaY*, полученных из нео-Y хромосом видов рода *Nocaracris*, показала интенсивный гибридизационный сигнал в С-позитивных районах нео-Y хромосом у всех видов рода *Nocaracris* (Рис.6). В проксимальном районе XR-плеч нео-X хромосом у всех исследованных видов *Nocaracris* гибридизационного сигнала проб *NcyY*, *NruY* и *NtaY* не выявлено (Рис.6). В дистальных районах XR-плеч нео-X хромосом, выявлен слабый гибридизационный сигнал проб полученных из нео-Y хромосом (Рис.6). В аутосомах эти ДНК-пробы давали диспергированный гибридизационный сигнал (Рис. 6).

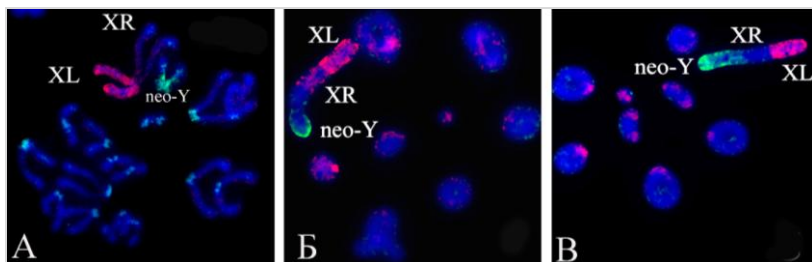


Рис. 6. Кросс-гибридизация микродиссекционных ДНК-проб с хромосомами видов рода *Nocaracris* (Pamphaginae, Nocarodeini). А – *N. cyanipes*; Б – *N. citripes*; В – *N. furvus*. Красный сигнал – ДНК-пробы *NcyXl*, *NruXl* и *NtaXl*; Зеленый сигнал – ДНК-пробы *NcyY*, *NruY* и *NtaY*.

Кросс-гибридизация микродиссекционных ДНК-проб, полученных из половых хромосом видов рода *Nocaracris*, с хромосомами видов из рода *Paranocarodes* показал сходство повторяющихся последовательностей ДНК XL-плеч нео-X хромосом всех исследованных видов родов *Nocaracris* и *Paranocarodes* (Рис.7). В XR-плече нео-X хромосом и в аутсомах исследованных видов рода *Paranocarodes* выявлен диспергированный гибридационный сигнал ДНК-проб полученных из XL-плеч нео-X хромосом видов рода *Nocaracris* (Рис. 7). Кросс-гибридизация ДНК-проб *NcyY*, *NruY* и *NtaY*, полученных из нео-Y хромосом видов рода *Nocaracris*, показала диспергированный гибридационный сигнал в XR-плечах нео-X хромосом, в С-позитивных районах нео-Y хромосом и в аутсомах у большинства видов рода *Paranocarodes* (Рис.7).

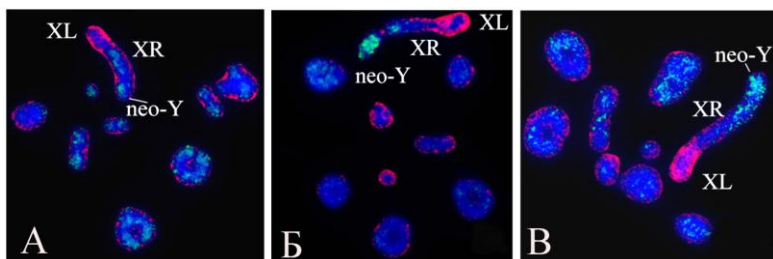


Рис. 7. Кросс-гибридизация микродиссекционных ДНК-проб полученных из половых хромосом видов рода *Nocaracris* с хромосомами видов рода *Paranocarodes*. А – *P. anatoliensis*; Б – *P. tolunai*; В – *P. turkmen*. Красный сигнал – ДНК-пробы *NcyXl*, *NruXl* и *NtaXl*; Зеленый сигнал – ДНК-пробы *NcyY*, *NruY* и *NtaY*.

Кросс-гибридизация ДНК-пробы *PtoXl*, полученной из XL-плеча нео-X хромосомы *Paranocarodes tolunai*, с хромосомами видов рода *Paranocarodes* выявила интенсивный гибридационный сигнал в XL-плечах нео-X хромосом у всех исследованных видов этого рода (Рис.8А,Б). В XR-плечах нео-X хромосом и в аутсомах у всех видов *Paranocarodes* выявлен диспергированный гибридационный сигнал данной пробы (Рис.8А,Б). В нео-Y хромосомах видов *Paranocarodes* гибридационный сигнал ДНК-пробы *PtoXl* не выявлен (Рис. 8). Гибридизация ДНК-пробы *PtoY*, полученной из нео-Y хромосомы *P. tolunai*, показала интенсивный гибридационный сигнал в С-позитивных районах нео-Y хромосом (Рис.8А,Б). В дистальном районе XR-плеч нео-X хромосом и в аутсомах выявлен диспергированный гибридационный сигнал ДНК-пробы *PtoY* (Рис.8А,Б). В XL-плече нео-X хромосом гибридационного сигнала этой пробы не выявлено (Рис.8А,Б).

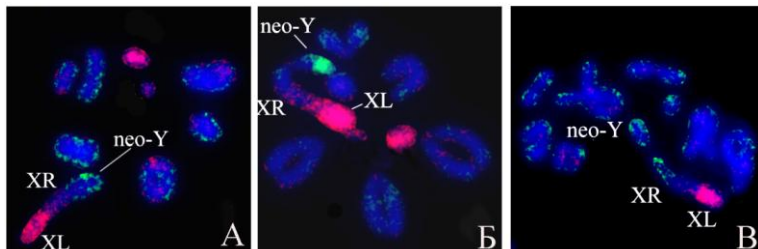


Рис. 8. Кросс-гибридизация микродиссекционных ДНК-проб полученных из половых хромосом видов рода *Paranocarodes* с хромосомами видов рода *Paranocarodes* (А,Б) и видов рода *Nocaracris* (В). А – *P. anatoliensis*; Б – *P. karabagi*; В – *Nocaracris sureyana*. Красный сигнал – ДНК-пробы *PtoXI*; Зеленый сигнал – ДНК-пробы *PtoY*.

Анализ результатов кросс-гибридизации ДНК-проб, полученных из XL-плеч нео-X хромосом четырех видов трибы Nocarodeini, выявил гомологию повторяющихся последовательностей ДНК XL-плеч нео-X хромосом у 11 видов из родов *Nocaracris* и *Paranocarodes*. Гибридизация ДНК-проб, полученных из нео-Y хромосом видов трибы Nocarodeini, показала интенсивный гибридационный сигнал в С-позитивных районах нео-Y хромосом у исследованных видов этой трибы. Полученный результат поддерживает гипотезу о монофилетическом возникновении XL-плеч нео-X хромосом и нео-Y хромосом у видов этой трибы. В околоцентромерном районе XR-плеч нео-X хромосом исследованных видов трибы Nocarodeini гибридационный сигнал ДНК-проб полученных из нео-Y хромосом видов трибы Nocarodeini, был слабо диспергирован либо отсутствовал. Данный результат указывает на накопившиеся различия молекулярного состава в исходно гомологичных XR-плече нео-X и нео-Y хромосом, которые возникли в эволюции нео-XY системы определения пола в этой трибе.

Анализ структурных особенностей исходно гомологичных XR-плеча нео-X и нео-Y хромосом у видов из подсемейств Thrinchinae и Pamphaginae, выявленных в результате гибридации ДНК-проб показал, что у видов подсемейств Thrinchinae XR-плечо нео-X и нео-Y хромосома сохранили значительное сходство молекулярного состава, тогда как у видов из подсемейства Pamphaginae XR-плечо нео-X и нео-Y хромосома имеют значительные различия.

Эксперименты по кросс-гибридизации ДНК-проб показали, что повторяющиеся последовательности ДНК-проб присутствуют и в аутосомах, о чем можно судить по слабому диспергированному сигналу. Исходя из этого можно сделать вывод, о том что кластеры

повторяющихся последовательностей ДНК в половых хромосомах формируются в результате амплификации тех же повторов ДНК, что и в аутосомом, но в значительно меньшем количестве.

Анализ географического распространения Pamphagidae с разными системами определения пола, показал, что все кариотипически исследованные виды, обитающие в Африке, обладают исходным для этого семейства кариотипом ($2n\♂=19/X0$). Значительная часть видов, населяющих территорию Передней, Средней, Малой и сопредельных регионов Центральной Азии имеют другие кариотипы ($2n\♂=18\text{neo-XY}$; $2n\♂=14X_1X_2Y$). На данное время мы не можем сказать когда и где произошла и закрепились перестройка половых хромосом у видов трибы Thrinchini (Thrinchinae). Но, если судить по степени структурной гомологии половых хромосом, то вероятно, что перестройка у Thrinchini является относительно недавним событием произошедшим на территории Центральной Азии откуда она распространилась на сопредельные территории Малой Азии. Благодаря находке в Иране исходного этапа эволюции нео-половых хромосом в трибе Tropidauchenini, можно предложить гипотезу, что центром происхождения групп с нео-XY типом определения пола в подсемействе Pamphaginae является Иранское нагорье.

ВЫВОДЫ

1. Впервые получены данные о кариотипах 41 вида саранчовых Pamphagidae из подсемейств Thrinchinae, Pamphaginae и Porthetinae, обитающих в пустынных, полупустынных и горных районах России, Казахстана, Армении, Турции, Ирана, Северной и Южной Африки.

2. 22 вида имеют исходный для семейства Pamphagidae кариотип, состоящий из 19 акроцентрических хромосом ($2n\♂=19; X0$). У 18 видов кариотип состоит из 16 акроцентрических хромосом, одной метацентрической нео-X и одной акроцентрической нео-Y хромосом ($2n\♂=16; \text{neo-XY}$). Такой кариотип образовался в результате Робертсоновской транслокации исходной акроцентрической X хромосомы с одной из акроцентрических аутосом. У *Paranothrotes citimus* (Pamphaginae, Nocarodeini) кариотип сформировался в результате слияния акроцентрической нео-Y хромосомы с одной из акроцентрических аутосом, что привело к образованию нео- X_1X_2Y системы определения пола.

3. В трибе Thrinchini подсемейства Thrinchinae выявлены как исходная (X0), так и нео-XY системы определения пола. Neo-Y хромосома по длине равна своему гомологу (XR-плечу нео-X хромосомы) с которым нормально рекомбинирует в профазе мейоза. В

околоцентромерной части нео-Y хромосомы выявлено несколько мелких гетерохроматиновых блоков, которых нет в XR-плече нео-X хромосомы.

4. В подсемействе Pamphaginae выявлены разные стадии эволюции нео-Y хромосом. В трибе Tropidauchenini обнаружен как исходная (X0), так и нео-XY системы определения пола. У видов этой трибы нео-Y хромосома не отличается по размеру и гетерохроматинизации прицентромерного района от XR-плеча нео-X хромосомы. Виды трибы Nocarodeini имеют только нео-половые хромосомы. Нео-Y хромосома значительно меньше гомологичного ей XR-плеча нео-X-хромосомы и очень сильно гетерохроматинизирована. В профазе мейоза нео-Y хромосома и XR-плечо нео-X хромосомы формируют единственную дистальную хиазму.

5. Анализ структуры нео-половых хромосом у саранчовых Pamphagidae позволил обнаружить разные стадии эволюции нео-Y хромосом в подсемействах Thrinchinae и Pamphaginae. Исходные стадии эволюции нео-XY системы определения пола выявлены в подсемействе Thrinchinae в трибе Tropidauchenini в подсемейства Pamphaginae. Миниатюаризация и гетерохроматинизация нео-Y хромосомы в трибе Nocarodeini отражают наиболее продвинутую стадию эволюции половых хромосом в подсемействе Pamphaginae.

6. Анализ локализации теломерных повторённых последовательностей в хромосомах Pamphagidae с X0, нео-половыми хромосомами показал, что транслокация X хромосомы и аутосомы произошла с делецией прицентромерного района акроцентрической хромосомы. Это событие привело к утрате структурной гомологии XR-плеча нео-X и нео-Y хромосомы.

7. Локализация кластеров рибосомной ДНК в хромосомах Pamphagidae имеет дискретные различия от расположения этого маркера в хромосомах других семейств надсемейства Acridoidea.

8. Анализ гомологии оригинальных микродиссекционных ДНК проб, полученных из нео-X хромосом, свидетельствует о монофилетическом происхождении XL-плеч нео-X и X хромосом в каждом из подсемейств (Thrinchinae и Pamphaginae).

9. Анализ структурных особенностей исходно гомологичных XR-плеча нео-X хромосомы и нео-Y хромосомы у видов из подсемейств Thrinchinae и Pamphaginae выявленные в результате кросс-гибридизации ДНК-проб показал, что у видов подсемейств Thrinchinae XR-плечо нео-X хромосомы и нео-Y хромосома сохранили значительное сходство молекулярного состава. У видов подсемейства Pamphaginae XR-плечо нео-X хромосомы и нео-Y хромосома в значительной степени утратили гомологию повторяющихся последовательностей ДНК.

10. Сравнительный анализ молекулярно-цитогенетических данных о кариотипах саранчовых Pamphagidae свидетельствует о независимом происхождении нео-XY системы определения пола в подсемействах Thrinchinae и Pamphaginae.

11. Анализ географического распространения саранчовых семейства Pamphagidae с X0 и нео-системами определением пола позволяет предположить, что эволюционные события, приведшие к трансформации исходного хромосомного определения пола в подсемействе Thrinchinae произошли и эволюционировали на территории Центральной и Малой Азии. Находка в Иране исходного этапа эволюции нео-половых хромосом в трибе Tropidauchenini подсемейства Pamphaginae, позволяет считать Иранское нагорье центром происхождения групп с нео-XY системой определения пола в этом подсемействе.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Публикации в журналах из списка ВАК и Web of Science:

Буляу О.Г., Джетыбаев И.Е., Чобанов Д.П., Бугров А.Г. Цитогенетические особенности некоторых видов саранчовых семейства Pamphagidae из Марокко // Евразийский энтомологический журнал. – 2015. – Т.14. №6. – С. 555–560.

Бугров А.Г., Буляу О.Г., Джетыбаев И.Е. Хромосомный полиморфизм в популяциях семиреченской кобылки *Asiotmethis heptapotamicus* (Zub.) (Pamphagidae, Thrinchinae) из Казахстана // Евразийский энтомологический журнал. – 2016. – Т. 15. №6 – С. 545–549.

Buleu O.G., Jetybayev I.Y., Bugrov A.G. Comparative analysis of chromosomal localization of ribosomal and telomeric DNA markers in three species of Pyrgomorphidae grasshoppers // Comparative Cytogenetics. – 2017. – V. 11(4). – P. 601–611.

Jetybayev I.E., Bugrov A.G., Unal M., **Buleu O.G., Rubtsov N.B.** Molecular cytogenetic analysis reveals the existence of two independent neo-XY sex chromosome systems in Anatolian Pamphagidae grasshoppers // BMC Evolutionary Biology. – 2017. – 17 (Suppl 1):20 <https://doi.org/10.1186/s12862-016-0868-9>

Jetybayev I.Y., Bugrov A.G., **Buleu O.G., Bogomolov A.G., Rubtsov N.B.** Formation and evolution of the neo-sex chromosomes in Pamphagidae grasshoppers through chromosome fusion followed their heteromorphization // Genes. – 2017. – V.8(11). P. 323. [https://doi:10.3390/genes8110323](https://doi.org/10.3390/genes8110323)

Buleu O.G., Jetybayev I.Y., Chobanov D.P., Bugrov A.G. Comparative analysis of C-heterochromatin, ribosomal and telomeric DNA markers in

chromosomes of Pamphagidae grasshoppers from Morocco // Comparative Cytogenetics. – 2019. – V. 13(1). – P. 61–74.

<https://doi.org/10.3897/CompCytogen.v13i1.32039>

Buleu O.G., Jetybayev I.Y., Mohsen M.-N., Bugrov A.G. Karyotypes diversity in some Iranian Pamphagidae grasshoppers (Orthoptera, Acridoidea, Pamphagidae): new insights on the evolution of the neo-XY sex chromosomes // Comparative Cytogenetics. – 2020. in print.

Публикации в сборниках материалов конференций:

Джетыбаев И.Е., **Булэу О.Г.** Бугров А.Г. Эволюция цитологического механизма определения пола у саранчовых семейства Pamphagidae // Всероссийская конференция с международным участием «Биогеосистемная экология и эволюционная биогеография» Новосибирск, 14–19 декабря 2016. С. 99–102.

Булэу О.Г. Эволюция половых хромосом у саранчовых семейства Pamphagidae (Orthoptera, Acridoidea) // Материалы 54-й международной научной студенческой конференции. МНСК–2016. Новосибирск, 2016. С. 97.

Jetybayev I.E., Bugrov A.G., **Buleu O.G.**, Bogomolov A.G., Rubtsov N.B. Sex chromosome evolution in Pamphagidae grasshoppers // 10-th International conference on bioinformatics of genome regulation and structure. Systems biology BGRS/SB-2016 Novosibirsk, Russia 29 August – 2 September, 2016. P.112.

Бугров А.Г., Джетыбаев И.Е., **Булэу О.Г.**, Рубцов Н.Б. Транслокационная модель эволюции половых хромосом на примере саранчовых семейства Pamphagidae // XV съезд Русского энтомологического общества Россия, Новосибирск, 31 июля – 7 августа 2017 г. Материалы съезда. Новосибирск: «Издательство Гармонд», 2017. С.90–91.

Булэу О.Г. Таксономический статус и филогенетические взаимоотношения саранчовых семейств Purgomorphidae и Pamphagidae (Orthoptera, Acridoidea), основанные на цитогенетическом анализе. Материалы 55-й Международной научной студенческой конференции МНСК 2017: Биология /Новосиб. гос. ун-т. – Новосибирск: ИПЦ НГУ, 2017, С. 10.

Булэу О.Г. Эволюция нео-XX/нео-XY системы определения пола у саранчовых семейства Pamphagidae (Orthoptera, Acridoidea) // Симбиоз-Россия 2019: материалы XI Всерос. конгр. молодых ученых-биологов с межд. участием (Пермь, 13–15 мая 2019 г.) / Перм. гос. нац. исслед. ун-т. – Пермь, 2019. С. 172–173. <http://imbiocom.ru/konf/symbiosis2019>