

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ ИНСТИТУТ
СИСТЕМАТИКИ И ЭКОЛОГИИ ЖИВОТНЫХ СИБИРСКОГО ОТДЕЛЕНИЯ РАН

УДК 595.727

На правах рукописи

БУЛЭУ ОЛЕСЯ ГЕОРГИЕВНА

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

03.02.05 – энтомология

Диссертация на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
профессор, доктор биологических наук
Бугров Александр Геннадьевич

Новосибирск – 2020

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	3
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	10
1.1. Общая характеристика саранчовых семейства Pamphagidae	10
1.2. Цитогенетические особенности эволюции кариотипов у саранчовых надсемейства Acridoidea	15
1.3. Краткий обзор методических приемов, используемых для идентификации хромосом и их районов.....	21
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ	31
ГЛАВА 3. СРАВНИТЕЛЬНО-КАРИОТИПИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ХРОМОСОМ САРАНЧОВЫХ РАМРНАGIDAE.....	43
3.1. Число, морфология хромосом и типы определения пола у саранчовых Pamphagidae.....	45
3.2. Особенности локализации блоков гетерохроматина в хромосомах Pamphagidae.....	51
3.3. Особенности локализации теломерной (TTAGG) _n и рибосомной ДНК-проб в хромосомах Pamphagidae	63
3.3.1 Локализация теломерной (TTAGG) _n ДНК-пробы в хромосомах Pamphagidae.....	63
3.3.2 Локализация кластеров рибосомной ДНК-пробы в хромосомах Pamphagidae.....	65
3.4. Кросс-гибридизация микродиссекционных ДНК-проб с половыми хромосомами и аутосомами саранчовых Pamphagidae	72
ОБСУЖДЕНИЕ	90
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	102
ВЫВОДЫ.....	103
ЛИТЕРАТУРА.....	106
СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	119
ПРИЛОЖЕНИЕ 1. КЛАССИФИКАЦИЯ САРАНЧОВЫХ СЕМЕЙСТВА РАМРНАGIDAE BURMEISTER, 1840.....	121
ПРИЛОЖЕНИЕ 2. КАРИОТИПЫ САРАНЧОВЫХ РАМРНАGIDAE.....	122
ПРИЛОЖЕНИЕ 3. ОСОБЕННОСТИ ЛОКАЛИЗАЦИИ С-БЛОКОВ В ХРОМОСОМАХ ИССЛЕДОВАННЫХ ВИДОВ РАМРНАGIDAE	126
ПРИЛОЖЕНИЕ 4. ЛОКАЛИЗАЦИЯ РИБОСОМНОГО И ТЕЛОМЕРНОГО ПОВТОРОВ ДНК В ХРОМОСОМАХ ИССЛЕДОВАННЫХ ВИДОВ РАМРНАGIDAE.....	128

ВВЕДЕНИЕ

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; Cigliano et al., 2020). Проводившиеся до 1990-х годов исследования хромосомных наборов Pamphagidae, обитающих на территории Африканского континента, Южной и Юго-Восточной Европы, привели к выводу о том, что эта группа саранчовых обладает консервативным кариотипом состоящим 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). Исследования кариотипов Pamphagidae из фауны Центральной Азии, Кавказа и Болгарии, проводимые с начала 1990-х годов, показали, что эта группа саранчовых не является единообразной по структуре кариотипа, так как у нескольких видов этого семейства был описан хромосомный набор, состоящий из 16 акроцентрических аутосом, двух метацентрических нео-X хромосом у самки, и одной метацентрической нео-X и одной акроцентрической нео-Y хромосом у самца ($2n♂=16+neo-XY$; $2n♀=16+neo-XX$) (Бугров, 1986; Bugrov, Grozeva, 1998). Такой вариант хромосомного набора образуется в результате робертсоновской транслокации акроцентрической X хромосомы и одной из акроцентрических аутосом. Хромосомные перестройки такого типа были описаны у более ста видов Acrididae 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 замечание 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 Acrididae из подсемейства Melanoplinae Scudder, 1897 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 у Acrididae.

Анализ структурных особенностей нео-половых хромосом у видов Pamphagidae из подсемейств Thrinchinae Stål, 1876 и Pamphaginae Burmeister, 1840 выявил различия в степени гетероморфизации половых хромосом. Исходя из этого, было высказано две гипотезы о путях эволюции кариотипов в этих группах Pamphagidae. Одна гипотеза опиралась на предположение, о том что хромосомная перестройка была единичным эволюционным событием в этой группе саранчовых, 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 этих гипотез необходимо было получить и проанализировать новый материал из основных центров биологического разнообразия саранчовых семейства Pamphagidae. Это нашло отражение в постановке цели и задач настоящего исследования, направленного на выяснение кариотипических особенностей, путей эволюции кариотипов и систем хромосомного определения пола у мало исследованных в этом отношении саранчовых семейства Pamphagidae.

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 разных группах Pamphagidae с X0/XX и neo-XY/neo-XX системами определения пола описать локализацию и относительные размеры районов конститутивного гетерохроматина в аутосомах и половых хромосомах;

3. В разных группах саранчовых Pamphagidae с X0/XX и neo-XY/neo-XX системами определения пола описать расположение функционально значимых рибосомного и теломерного (TTAGG)_n повторов;

4. В разных группах саранчовых Pamphagidae определить районы аутосом и половых хромосом обогащённые гомологичными повторёнными последовательностями ДНК.

Степень разработанности темы исследования

С цитогенетической точки зрения виды пустынных саранчовых Pamphagidae до предпринятого нами исследования оставались слабо исследованной группой среди других Acridoidea. Из 600 описанных видов Pamphagidae кариотипы известны только для 50. Слабый интерес к цитогенетическому анализу хромосомных наборов Pamphagidae с одной стороны был связан с тем, что большинство популяций тех или иных видов Pamphagidae обладают низкой плотностью. С другой стороны у Pamphagidae обитающих в аридных районах Южной Европы и Африки описывали однообразный набор хромосом, что давало основание говорить о том, что эта группа саранчовых обладает консервативным кариотипом (Chen, 1964; White, 1973; Alicata et al., 1976; Camacho, et al., 1981; Santos et al., 1983; Cabrero, et al., 1985; Fossey, 1985; Fu Peng, 1989; Vitturi, et al., 1993; Warchałowska-Śliwa, et al., 1994). В большинстве выше цитированных работ приводится описание хромосомного набора (число, морфология, определение пола) и

локализация блоков гетерохроматина в хромосомах. Интерес к исследованию кариотипов этой группы возник после того, как у некоторых видов из Центральной Азии, Болгарии, Кавказа и Закавказья были описаны хромосомные наборы, возникшие в результате реципрокной транслокации исходно акроцентрической X-хромосомы и акроцентрической аутосомы с образованием neo-XY/neo-XX механизма определения пола (Бугров, 1986; Bugrov, Warchałowska-Śliwa, 1997; Bugrov, Grozeva, 1998). В цитированных работах описаны особенности гомологии образованных *de novo* половых хромосом. На результатах дальнейшего целенаправленного поиска цитогенетических особенностей хромосом Pamphagidae основана данная работа. С молекулярно-цитогенетической точки зрения Pamphagidae исследованы крайне слабо. Особенности локализации молекулярных маркеров (рибосомной ДНК и теломерного (TTAGG)_n повтора), до предпринятого нами исследования, описаны в хромосомах шести видов Pamphagidae (Vitturi et al., 2008; Бугров и др., 2014; Bugrov et al., 2016). Описания структуры повторяющихся последовательностей ДНК и исследования степени гомологии повторяющихся последовательностей ДНК для Pamphagidae ранее не проводилось.

Научная новизна

Впервые у 41 вида саранчовых Pamphagidae, обитающих в пустынных и горных районах России, Казахстана, Армении, Турции, Ирана, Северной и Южной Африки были описаны кариотипические и молекулярно-цитогенетические особенности половых хромосом и аутосом. У 22 видов саранчовых Pamphagidae описан исходный для всех Acridoidea X0/XX тип определения пола. У 18 видов выявлен редкий для саранчовых neo-XY/neo-XX тип определения пола. С помощью цитогенетических и молекулярно-цитогенетических методов установлено, что у саранчовых Pamphagidae исходным моментом формирования neo-XX/neo-XY системы определения пола из X0/XX стала Робертсоновская транслокация между исходно акроцентрической X хромосомой и одной из акроцентрических аутосом. В результате этой транслокации у Pamphagidae образовалась метацентрическая neo-X хромосома, а оставшаяся непарной акроцентрическая аутосома стала neo-Y хромосомой. При транслокации X хромосомы и аутосомы произошла делеция небольшого прицентромерного района, что могло привести к утрате структурной гомологии между исходно гомологичными neo-Y хромосомой и аутосомным XR-плечом neo-X хромосомы. Утрата структурной гомологии между XR-плечом neo-X хромосомы и neo-Y хромосомой привела к подавлению рекомбинации между ними. Из-за невозможности обмена гомологичными участками хромосом в непарной neo-Y хромосоме стали накапливаться повторённые последовательности ДНК. В процессе эволюции neo-Y хромосома уменьшается и сильно гетерохроматинизируется. В связи с этим утрачивается её связь с гомологичной хромосомой. В исследованных подсемействах Pamphagidae нами были зафиксированы различные стадии структурной гомологии neo-X и neo-Y хромосом, которые

видны в профазе мейоза при формировании полового бивалента и особенностей гетерохроматинизации нео-Y хромосомы. На начальной стадии структурной гомологии нео-X и нео-Y хромосом находятся половые хромосомы у некоторых видов трибы *Thrinchini* Stål, 1876 (*Thrinchinae*). У видов трибы *Thrinchini* нео-Y хромосома одинакового размера с XR-плечом нео-X хромосомы и незначительно гетерохроматинизирована в прицентромерном районе. У видов трибы *Nocarodeini* Bolívar, 1916 (*Pamphaginae*) нео-Y хромосома значительно меньше своего гомолога (XR-плеча нео-X-хромосомы) и очень сильно гетерохроматинизирована. Следующим этапом эволюции половых хромосом в трибе *Nocarodeini* (*Pamphaginae*, *Nocarodeini*, *Paranothrotres citimus* Mistshenko, 1951) является образование множественных половых хромосом ($X_1X_2Y/X_1X_1X_2X_2$). Такой комплекс половых хромосом является наиболее продвинутым этапом при формировании половых хромосом *de novo* на основе уже установленного нео-XY/нео-XX типа определения пола. В подсемействе *Pamphaginae* трибе *Tropidauchenini* Zhang, Yin & Yin, 2003 нами впервые были обнаружены не только продвинутые, но и исходный этапы эволюции половых хромосом.

Выяснено, что эволюция кариотипов у *Pamphagidae* связана не только с трансформацией половых хромосом, но и изменением морфологии аутосом. При помощи молекулярно-цитогенетического анализа кариотипов *Eremopeza bicoloripes* (Moritz, 1928) и *E. saussurei* (Uvarov, 1918), установлено, что основным механизмом образования коротких вторых плеч в хромосомах этих видов является перичентрическая инверсия.

Впервые у 41 вида *Pamphagidae* описаны особенности локализации блоков гетерохроматина, кластеров рибосомной ДНК и теломерного (TTAGG)_n повтора. Описанная локализация маркёров в хромосомах *Pamphagidae* позволит использовать эти данные при сравнительно-цитогенетических исследованиях *Pamphagidae* и *Acridoidea*. Расположение кластеров рибосомной ДНК в хромосомах *Pamphagidae* отличает их кариотипы от кариотипов других семейств надсемейства *Acridoidea*, что может послужить маркёром для таксономического анализа разных групп саранчовых. Определение локализации теломерных повторённых последовательностей (TTAGG)_n у саранчовых *Pamphagidae* как с X0 так и с нео-XY, нео-X₁X₂Y типами определения пола позволило установить механизм образования неополовых хромосом в данной группе саранчовых.

Впервые для саранчовых семейства *Pamphagidae* была показана возможность определения в хромосомах гомологичных повторённых последовательностей ДНК. Ранее, из-за большого количества повторяющихся последовательностей ДНК в геномах саранчовых, этого сделать не удавалось (Jetybayev et al., 2017b). Использование метода кросс-гибридизации ДНК-проб с последующей компьютерной обработкой (VISSIS) полученных микроизображений, позволило провести сравнительный анализ локализации повторяющихся последовательностей

ДНК в хромосомах Pamphagidae из подсемейств Thrinchinae и Pamphaginae, а так же выявить гомологичные повторы. Полученные результаты в значительной мере расширяют возможности реконструкции этапов молекулярной эволюции половых хромосом и аутосом у саранчовых Pamphagidae.

Анализ географического распространения видов Pamphaginae с X0/XX и neo-XY/neo-XX типами определением пола позволяет предположить, что эволюционные события, приведшие к трансформации исходного определения пола в группах Thrinchinae (Thrinchini) и Pamphaginae (Tropidauchenini и Nocarodeini) произошли независимо друг от друга. У видов из подсемейства Thrinchinae (Thrinchini) перестройка кариотипа, вероятно, произошла на территории Центральной и Малой Азии. Центром происхождения групп с neo-XY/neo-XX типом определением пола у видов из подсемейства Pamphaginae (Tropidauchenini и Nocarodeini) можно считать Переднюю Азию, а именно Иранское нагорье.

Научно-практическая ценность

Совокупность полученных в результате работы данных расширяют представление о структуре и эволюции кариотипов саранчовых Pamphagidae. Описанная локализация маркёров в хромосомах исследованных видов Pamphagidae позволяет использовать эти данные при реконструкции систематики и филогении в разных таксономических группах саранчовых Pamphagidae и других Acridoidea. Полученные микродиссекционные ДНК-пробы являются основой дальнейшего анализа повторённых последовательностей ДНК в хромосомах Pamphagidae и других Acridoidea. Описанные варианты половых хромосом у Pamphagidae показывают, что представители этого семейства являются перспективной моделью для исследования эволюции XX/XY гетерогаметного пола из исходного для них XX/X0 типа определения пола, что способствуют лучшему пониманию особенностей эволюции половых хромосом и аутосом вообще. Полученные результаты могут найти применение при подготовке общих и специальных курсов по энтомологии, цитологии, эволюционной цитогенетики в вузах биологических специальностей.

Положения, выносимые на защиту

1. У саранчовых семейства Pamphagidae Burmeister, 1840 кариотипы не являются единообразными;
2. У саранчовых семейства Pamphagidae Burmeister, 1840 исходным моментом формирования neo-XX/neo-XY половых хромосом является робертсоновская транслокация с делецией;
3. Структурные особенности neo-половых хромосом в подсемействах Thrinchinae Stål, 1876 (Thrinchini Stål, 1876) и Pamphaginae Burmeister, 1840 (Tropidauchenini Zhang, Yin & Yin, 2003 и Nocarodeini Bolívar, 1916) указывают на независимые пути эволюции neo-Y хромосомы;

4. Эволюционные события, приведшие к трансформации исходного ($2n\♂=19\text{ X}0$; $2n\♀=20\text{ XX}$) кариотипа у видов из подсемейства Thrinchinae (Thrinchini) произошли и эволюционировали на территории Центральной и Малой Азии. Благодаря находке в Иране исходного этапа эволюции нео-половых хромосом в подсемействе Pamphaginae (Tropidauchenini), можно предположить, 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 Acridoidea;

6. У видов трибы Thrinchini (*Asiotmethis* Uvarov, 1943 и *Glyphotmethis* Bey-Bienko, 1951) с XX/X0 и нео-XY/нео-XX системами определения пола X хромосома имеет монофилетическое происхождение;

7. У видов трибы Thrinchini (*Asiotmethis* и *Glyphotmethis*) с нео-XY/нео-XX системой определения пола нео-Y хромосома имеет монофилетическое происхождение;

8. У видов трибы Nocarodeini с нео-XY/нео-XX системой определения пола XL-плечо нео-X хромосомы имеет монофилетическое происхождение;

9. У близкородственных видов трибы Nocarodeini с нео-XY/нео-XX системой определения пола нео-Y имеет монофилетическое происхождение.

Личный вклад автора

Автором самостоятельно приготовлены и С-дифференциально окрашены все хромосомные препараты. Приготовлены хромосомные препараты для проведения FISH и микродиссекции. FISH и кросс-гибридизация микродиссекционных проб проведены совместно с Ильясом Еркиновичем Джетыбаевым. Автор принимал непосредственное участие в обработке и анализе всех полученных результатов. Подготовка публикаций проводилась совместно с соавторами.

Степень достоверности результатов и апробация работы. Материалы работы изложены в 13 рецензируемых изданиях, в том числе в 6 статьях, опубликованных в журналах, рекомендованных ВАК РФ. Достоверность всех опубликованных работ подтверждена независимыми рецензентами. Результаты работы вошли в отчёт по гранту Российского фонда фундаментальных исследований (№ 15-04-04816 А, руководитель Бугров А. Г.). Основные положения были представлены и обсуждались 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).

Публикации

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

Структура и объем работы

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, описания полученных результатов, обсуждения результатов, выводов, списка цитируемой литературы. Работа содержит четыре приложения, включающие четыре таблицы. Диссертация изложена на 130 страницах. Представленный материал иллюстрирован 3 таблицами и 46 фотографиями. Список цитируемой литературы включает 175 публикаций в отечественных и зарубежных монографиях и журналах.

Благодарности

За неоценимую помощь, поддержку на протяжении всех этапов работы и долготерпение выражаю искреннюю благодарность профессору кафедры общей биологии и экологии ФЕН (НГУ), доктору биологических наук, в.н.с Института систематики и экологии животных СО РАН Александру Геннадьевичу Бугрову. Особая признательность кандидату биологических наук Ильясу Еркиновичу Джетыбаеву за помощь в проведении экспериментальной части исследований, ценные советы и поддержку на всех этапах работы. За помощь в сборе экспериментального материала д-ру Драгану Чобанову (Institute of Biodiversity and Ecosystem Research, Bulgaria), д-ру Мустафе Уналу (Mustafa Ünal) (Abant İzzet Baysal Üniversitesi, Turkey), д-ру Гаяне Карганян (Scientific Center of Zoology and Hydroecology, Armenia), д-ру Мохсену Нейстанак (Mohsen Mofidi-Neyestanak) (Iranian Research Institute of Plant Protection (IRIPP), Iran Tehran). За помощь, в компьютерной обработке фотографий, кандидату биологических наук Антону Геннадьевичу Богомолу (ИЦиГ СО РАН). За всестороннюю помощь и поддержку благодарю заведующего кафедрой общей биологии и экологии ФЕН (НГУ), профессора кафедры общей биологии и экологии ФЕН (НГУ), доктора биологических наук, в.н.с Института систематики и экологии животных СО РАН Михаила Георгиевича Сергеева. За дружеское участие и всестороннюю помощь благодарю коллектив кафедры общей экологии и биологии ФЕН (НГУ).

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Общая характеристика саранчовых семейства *Pamphagidae*

Саранчовые *Pamphagidae* Burmeister, 1840 небольшое семейство из надсемейства настоящих саранчовых (*Acridoidea*) описаное в 1840 году Германом Бурмейстером (Hermann Conrad Burmeister). К семейству *Pamphagidae* относится около 600 видов из 96 родов обитающих в аридных и горных районах Южной и Северной Африки, Европы и Азии (Ünal, 2016; Cigliano et al., 2020). В палеарктике основное видовое разнообразие *Pamphagidae* представлено на территории Северной Африки (около 100 видов) (Massa, 2013), Ирана и Афганистана (около 130 видов) (Шумаков, 1963; Mirzayans, 1998; Hodjat, 2012), Турции (около 93 видов) (Ünal, 2016), Кавказа и Закавказья и Центральной Азии (около 80 видов) (Бей-Биенко, Мищенко, 1951; Sergeev, 1995). В аридных и горных районах Западного Средиземноморья (Испания, Италия, Франция, Хорватия, Сербия, Греция) насчитывают около 52 видов (Otte, 1994; Massa, 2013; Zhang et al., 2013; Ünal, 2016; Cigliano et al., 2020).

Большинство видов *Pamphagidae* эндемики небольших районов, приуроченных к определенным долинам, горным массивам, их системам или даже отдельным горным хребтам (Шумаков, 1963). Ограниченное распространение *Pamphagidae* связывают с тем, что многие из них не имеют крыльев и не способны перемещаться на большие расстояния. Слабые миграционные способности *Pamphagidae* приводят к формированию очень узких ареалов и высокой степени эндемизма. Следует отметить, что виды *Pamphagidae* с хорошо развитыми крыльями также имеют ограниченные ареалы. Например, анализ видового состава *Pamphagidae* на территории Иранского нагорья показал, что 77% видов *Pamphagidae* являются эндемиками этого района (Шумаков, 1963; Hodjat, 2012). По образу жизни *Pamphagidae* являются геофилами и петробионтами. Памфагиды-геофилы обитают на равнинах пустынь и полупустынь. Памфагиды-петробионты распространены на глинисто-галечниковых и каменистых участках гор и долин (Бей-Биенко, Мищенко, 1951).

Большинство видов саранчовых *Pamphagidae* имеют крупное тело, особенно самки. Покровы тела *Pamphagidae* покрыты шипиками, бугорками и морщинками (Рисунок 1, 2, 3, 4). Главным диагностическим признаком *Pamphagidae* является неправильная скульптура бедер задних ног (Рисунок 1, 2, 3, 4) (Бей-Биенко, Мищенко, 1951, Шумаков, 1963).



Рисунок 1. *Nocaracris furvus furvus* Mishchenko, 1951 (Pamphaginae), самка и самец, (Турция). Фотография А. Бугрова.

У многих Pamphagidae средний киль переднеспинки хорошо развит и высоко приподнят (Рисунок 2), что придает их телу сходство с осколками камней или комочками почвы.



Рисунок 2. *Tropidauchen* sp. (Pamphaginae), самец, (Иран). Фотография А. Бугрова.

Среди Pamphagidae есть полностью бескрылые формы, такими например, являются многие виды подсемейства Pamphaginae (Рисунок 1, 2). Есть короткокрылые формы Pamphagidae (Рисунок 3) и формы с хорошо развитыми надкрыльями и крыльями, например многие виды подсемейства Thrinchinae (Рисунок 4).



Рисунок 3. *Glyphotmethis adaliae* (Uvarov, 1928) (Thrinchinae), самка, (Турция). Фотография А. Бугрова.

Крылатые и короткокрылые Pamphagidae имеют по бокам второго членика брюшка специфическое образование – орган Краусса. Орган Краусса представляет собой шероховатую пластинку в равной степени развитую и у имаго, и у личинок. При трении бедра о шероховатую пластинку (орган Краусса) Pamphagidae издают шипящие звуки (Massa, 2012).



Рисунок 4. Орган Краусса у *Asiotmethis heptapotamicus heptapotamicus* (Zubovskii, 1898), (Алматы). Стрелка указывает на орган Краусса

У многих видов Pamphagidae голени задних ног ярко окрашены в красный, оранжевый и синий цвета. В спокойном состоянии насекомого яркая окраска скрыта и обнаруживается лишь

при поднятых и слегка вывернутых задних бедрах (Рисунок 5). Часто отдельные части задних ног окрашены контрастно по отношению друг к другу (Рисунок 5 Б).



Рисунок 5. *Eremopeza bicoloripes* (Moritz, 1928), (Thrinchinae), самка, (Иран). А – габитус; Б – контрастная окраска голени задних ног и крыла. Фотография А. Бугрова.

Самцы Pamphagidae, как правило, значительно меньше самок (Рисунок 1). Конец брюшка самцов всегда резко загнут кверху, благодаря чему хорошо видна контрастная черно-желтая окраска последних члеников брюшка (Рисунок 2). У самок этот признак отсутствует (Рисунок 5).

Таксономическое положение Pamphagidae в группе Acridomorpha долгое время было дискуссионным вопросом (Storozhenko, Paik, 2011; Song, 2010; Ünal, 2016). Полагаясь на исследования морфологии копулятивных аппаратов самцов Pamphagidae, R. Roberts (Roberts, 1941) предлагал считать группу Pamphagidae подсемейством в составе семейства Acrididae. Такой же точки зрения придерживались Г. Я Бей-Биенко, Л. Л. Мищенко, К. Harz и D. Otte (Бей-Биенко, Мищенко 1951; Harz, 1975; Otte, 1994). Другая группа ортоптерологов, основываясь на особенностях жилкования крыльев Pamphagidae, предлагала считать их самостоятельным семейством Pamphagidae (Тарбинский, 1940; Uvarov, 1966; Шаров, 1968; Dirsh, 1975). Стоит отметить, что фоссилии Pamphagidae не найдены (Шаров, 1968). А. Г. Шаров на основе анализа жилкования крыльев рецентных видов Pamphagidae предполагал, что все современные виды саранчовых Acrididae произошли от перешедших к жизни на открытых пространствах Pamphagidae (Шаров, 1968).

Современный анализ морфологии гениталий самцов Pamphagidae показал, что эту группу саранчовых следует рассматривать в качестве самостоятельного семейства (Eades, 2000; Song, Mariño-Pérez, 2013). В настоящее время большинство акридологов поддерживают статус семейства Pamphagidae, что отражено в международной таксономической базе данных Orthoptera Species File (OSF) (Cigliano et al., 2020).

Вопросы о таксономической структуре и филогенетических связях подсемейств, триб, родов и видов внутри семейства Pamphagidae продолжают быть дискуссионными. Мнения о количестве триб внутри семейства Pamphagidae изменялось много раз. Так, Б. Уваров, Г. Я. Бей-Биенко и Л.Л. Мищенко выделяли в составе подсемейства Pamphaginae 9 триб (Uvarov, 1943; Бей-Биенко, Мищенко, 1951). Позже, Е. М. Шумаков свел эти трибы до двух Thrinchini и Pamphagini (Шумаков, 1963). В свою очередь, V.M. Dirsh, предлагал выделять в семействе Pamphagidae четыре подсемейства (Echinotropinae Dirsh, 1961, Porthetinae Bolívar, 1916, Akicerinae Bolívar, 1916, Pamphaginae Burmeister, 1840) и отмечал, что дальнейшее разделение Pamphagidae на более мелкие таксономические категории (триба, род) проблематично (Dirsh, 1975). D. Otte, все рода «подсемейства» Pamphaginae, объединял, в единственную трибу Pamphagini (Otte, 1994).

Оригинальная система классификации саранчовых Pamphagidae была предложена К. Harz (Harz, 1975). На основании наличия или отсутствия органа Крауса К. Harz предлагал разделять подсемейство Pamphaginae на две трибы: 1) Pamphagini, все виды которой имеют орган Крауса и 2) Sulcatini, виды которой не имеют этой морфологической структуры (Harz, 1975). Данное предложение было отвергнуто, так как оно не соответствовало правилам зоологической номенклатуры (Storozhenko, Paik, 2011).

Основываясь на различиях морфологических структур (строение усиков, голени, наличие органа Крауса) Pamphagidae, D. C. Zhang с коллегами в 2003 году предложили новую таксономическую систему. Семейство Pamphagidae они разбили на 6 подсемейств: Prionotropisinae, Thrinchinae, Pamphaginae, Tropidaucheninae, Nocarodesinae, Orchaminae (Zhang et al, 2003). В 2011 году С. Storozhenko и J. Paik пересмотрели предложенную китайскими энтомологами классификацию семейства и предложили считать подсемейства Nocarodesinae и Prionotropisinae синонимами трибы Nocarodeini, подсемейство Orchaminae – синонимом трибы Pamphagini, а подсемейство Tropidaucheninae – синонимом подсемейства Thrinchinae (Storozhenko, Paik, 2011). В результате ревизии таксономической структуры Pamphagidae в 2013 году было выделено 5 подсемейств: Echinotropinae, Porthetinae, Akicerinae, Thrinchinae и Pamphaginae (Eades, Otte, 2013). Эта таксономическая структура является актуальной на данное время (Cigliano et al., 2020; Orthoptera Species File, (OSF)). С актуальной классификацией семейства Pamphagidae (до уровня подсемейства, трибы и рода) можно ознакомиться в Приложение 1.

Несмотря на тщательные исследования морфологии Pamphagidae реконструкция таксономических взаимоотношений между теми или иными группами семейства вызывает затруднения. Перспективным подходом для оценки родственных связей саранчовых может быть анализ цитогенетических и молекулярных данных. Возможность и успешность

использования кариотипических характеристик для решения проблем систематики и филогении саранчовых была показана многими кариосистематиками (McClung, 1917; White, 1951; Helwig, 1958; Fontana, Vickery, 1976; Weissman, Rentz, 1980; Бугров и др., 1993 и др.). Описанию цитогенетических особенностей саранчовых надсемейства Acridoidea будет посвящен следующий раздел.

1.2. Цитогенетические особенности эволюции кариотипов у саранчовых надсемейства Acridoidea

Саранчовые (Acridoidea MacLeay, 1819) являются классическим объектом в различных цитогенетических исследованиях. Первые работы по цитогенетике саранчовых были посвящены изучению механизмов мейоза и сперматогенеза (McClung, 1905; Granata, 1910; Darlington, 1932 и др.). В процессе этих исследований были описаны кариотипы многих видов Acrididae из различных таксономических групп. Обобщив все описанные на то время кариотипы саранчовых, У. Робертсон обратил внимание на однотипность их хромосомных наборов. Он отметил, что кариотипы большинства видов Acridoidea состоят из 23 акроцентрических хромосом у самца и 24 акроцентрических хромосом у самки при X0/XX типе определения пола ($2n\♂=23+X0$; $2n\♀=24+XX$) (Robertson, 1916). В то же время при анализе хромосомных наборов близких видов Acridoidea У. Робертсон заметил, что кариотипы некоторых видов образованы меньшим числом хромосом и имеют не акроцентрическую морфологию. Он предположил, что такие кариотипы могут быть образованы в результате центрических слияний хромосом и такие слияния являются главным механизмом структурной эволюции кариотипов у саранчовых (Robertson, 1916). В дальнейшем изменение морфологии хромосом посредством центрических слияний стали называть робертсоновской транслокацией.

Все последующие описания хромосомных наборов Acridoidea только подтверждали то, что большинство видов саранчовых имеют одинаковый кариотип, а выявляемые у некоторых видов саранчовых модификации числа и морфологии хромосом являются результатом робертсоновских транслокаций (White, 1973; Hewitt, 1979; John, 1983). Изменения кариотипов в результате одной, двух или трёх робертсоновских транслокаций были описаны у неарктических и палеарктических видов саранчовых из подсемейства Gomphocerinae ($2n\♂=21, 19, 17$) (*Chorthippus*, *Chloaltis*, *Eremippus*, *Myrmeleotettix*, *Stauroderus*, *Stenobothrus* и др.) (White, 1951; Бугров, 2010; Castillo et al., 2010a). Сходные тенденции изменения числа и морфологии хромосом выявлены у многих южноамериканских видов саранчовых подсемейства Melanoplinae (White, 1951; Hewitt, 1979; Mesa et al., 1982; Castillo et al., 2010ab). Модификации кариотипов у Acridoidea в результате робертсоновских транслокаций были установлены не только на видовом, но и на популяционном уровне. Например, различные морфотипы

хромосомных наборов были описаны в популяциях саранчовых *Oedaleonotus enigma*, *Dichroplus pratensis* и *Leptysmia argentina* (Colombo, 2013).

Иногда изменения кариотипов у Acrididae могут происходить посредством других хромосомных перестроек, например тандемных слияний хромосом (Hewitt, 1979; Bugrov et al., 1994). Еще одним механизмом модификации хромосомных наборов у саранчовых являются перичентрические инверсии. При перичентрической инверсии количество хромосом в кариотипе остается исходным, но из-за «перемещения центромеры» изменяется число хромосомных плеч (FN). Перичентрическая инверсия изменяет морфологию акроцентрических хромосом в мета- субмета- или субacroцентрическую (White, 1951; Hewitt, 1979; John, 1983). Кариотипы, образованные перичентрическими инверсиями, описаны у саранчовых *Austroicetes interioris*, *Cryptobothrus chrysophorus* (Nankivell, 1967; John, King, 1977), *Oedaleus decorus*, *Helioscirtus moseri* (Бугров, 2010), а также многих североамериканских Acrididae (White, 1973; John, 1983).

Часто изменение хромосомных наборов у саранчовых определяется сочетанием робертсоновских слияний и перичентрических инверсий (White, 1951, 1973; Hewitt, 1979). Согласно классическим работам М. Уайта и Д. Хьюита таким образом были образованы хромосомные наборы саранчовых семейств Pamphagidae и Pyrgomorphidae Brunner von Wattenwyl, 1874 (White, 1951, 1973; Hewitt, 1979). Стандартный набор хромосом у представителей этих двух групп состоит из 19(♂) и 20(♀) акроцентрических хромосом при X0/XX типе определения пола. Такой кариотип у видов саранчовых семейств Pamphagidae и Pyrgomorphidae образовался из стандартного для всех Acridoidea набора хромосом: $2n=23(\text{♂})$; $24(\text{♀})$ акроцентрических хромосом. Авторы предположили, что при образовании такого кариотипа сначала в слияние вступили две пары акроцентрических хромосом и образовали двуплечие хромосомы, а затем двуплечие хромосомы в результате перичентрических инверсий вновь стали акроцентрическими.

Большую роль в изменении кариотипа у саранчовых играют робертсоновские транслокации или центрические слияния аутосом с половой X хромосомой. В результате робертсоновского слияния X хромосомы с одной из аутосом у саранчовых происходит изменение морфологии исходно акроцентрической X хромосомы на метацентрическую, а оставшаяся непарной акроцентрическая аутосома становится Y хромосомой (Рисунок 6). В этом случае говорят об образовании neo-XX/neo-XY типа определения пола (White, 1973; Hewitt, 1979; John, 1983; Mesa et al., 2001; Castillo et al., 2010a; Bidau et al., 2011). Впервые нео-половые хромосомы были описаны в 1917 Кларенс Эрвин Макклунгом при исследовании хромосомных наборов саранчовых *Hesperotettix speciosus* (Melanoplinae), *Mermiria bivittata* (Gomphocerinae) и *Anabrus* sp. (Tettigoniidae) (McClung, 1917). Анализ и вероятный механизм развития

гетерохромосом (нео-половых хромосом) у Acrididae был опубликован в 1940 году Майклом Вайтом (Michael James Denham White) (White, 1940). Возникновение нео-половых хромосом М. Вайт объяснял Робертсоновскими транслокациями (центрические слияния), которые были описаны Уильямом Робертсоном (William Robertson) при сравнении кариотипов близких видов саранчовых. Именно центрические слияния, по мнению У. Робертсона, являются главным механизмом структурной эволюции кариотипов саранчовых и самой распространенной формой хромосомных изменений у животных вообще (Robertson, 1916; White, 1940). Для описания образованных гетерохромосом у саранчовых М. Вайт предлагает использовать термины нео-Х и нео-У хромосомы. В метацентрической нео-Х хромосоме М. Вайт предлагает выделять XL-плечо, которое гомологично исходной Х хромосоме, и XR-плечо, которое представляет собой аутосому вступившую в слияние с исходной Х хромосомой. Оставшуюся непарной аутосомой, М. Вайт предлагает называть нео-У хромосомой (White, 1940). Стоит отметить, что данная номенклатура обозначения нео-хромосом и плеч нео-Х хромосом используется в настоящее время.

Анализ литературы показал, что нео-XX/нео-ХУ типом определения пола обладают более ста видов саранчовых из разных таксономических групп (White, 1951; Hewitt, 1979; Castillo et al., 2010ab). Однако очень редко бывает, когда группа видов, принадлежащих к одному роду или группе близких родов (трибе), имеет изменённый на основе этой транслокации тип определения пола. Это наблюдение привело к заключению о том, что возникшие *de novo* типы определения пола обрекают виды саранчовых на короткую эволюционную судьбу, не приводя к дальнейшей дивергенции (Mesa et al., 2001). Исключением из этого правила долгое время были неотропические саранчовые подсемейства Melanoplineae Scudder, 1897. Большое количество видов этого подсемейства, наряду с исходным Х0/ХХ типом определения пола, имеют нео-XX/нео-ХУ (Castillo et al., 2010ab; Vidau et al., 2011). Сравнительный анализ всех исследованных кариотипов видов из трибы *Dichroplini* (Melanoplineae) показал, что около 75% видов имеют нео-половые хромосомы (Mesa 1971; Mesa et al., 1982; Carbonell, Mesa, 2006). Среди палеарктических видов саранчовых подсемейства Melanoplineae нео-ХУ тип определения пола был выявлен у *Podisma pedestris* (John, Hewitt, 1968; Hewitt, 1979) и *Podisma sapporensis* (Bugrov, 1995). Еще одним примером эволюции нео-XX/нео-ХУ определения пола являются виды саранчовых из семейства Coriocerinae трибы *Aleuasini*. Все кариотипически исследованные виды трибы *Aleuasini* имеют только нео-XX/нео-ХУ тип определения пола (Mesa et al., 1982; Mesa et al., 2001).

Следующий вариант изменения хромосомных наборов у Melanoplineae связан с образованием множественных половых хромосом ($X_1X_2Y/X_1X_1X_2X_2$). Множественные $X_1X_2Y/X_1X_1X_2X_2$ системы определения пола у видов саранчовых формируются на основе нео-

XX/нео-XY типа. В этом случае в слияние с акроцентрической аутосомой вступает акроцентрическая нео-Y хромосома. Это приводит к образованию двулучей нео-Y хромосомы, YL-плечо которой является гомологом акроцентрической нео-Y хромосомы, а YR-плечо является гомологом второй вступившей в слияние аутосомы. Оставшаяся непарной аутосома становится акроцентрической нео-X₂ хромосомой (Рисунок 6) (White, 1940; 1951; Hewitt, 1979; Blackman, 1995; Castillo et al., 2010a). Множественные половые хромосомы были описаны у многих видов Melanoplinae (*Dichroplus dubius*; *Dichromatos lilloanus*, *D. schrottkyi*, *D. corupa*, *D. montanus*, *Scotussa daguerrei*, *Paratylotropidia morsei*, *Leiotettix politus*, *Ronderosia dubius*) (White, 1940; Hewitt, 1979; Mesa et al., 1982; Castillo et al., 2010ab; Palacios-Gimenez et al., 2013; 2015; 2018).

На приведенной ниже схеме наглядно показано, как в результате робертсоновского слияния между аутосомой и X хромосомой у саранчовых формируются нео-XX/нео-XY и X₁X₁X₂X₂/X₁X₂Y системы половых хромосомы (Рисунок 6).

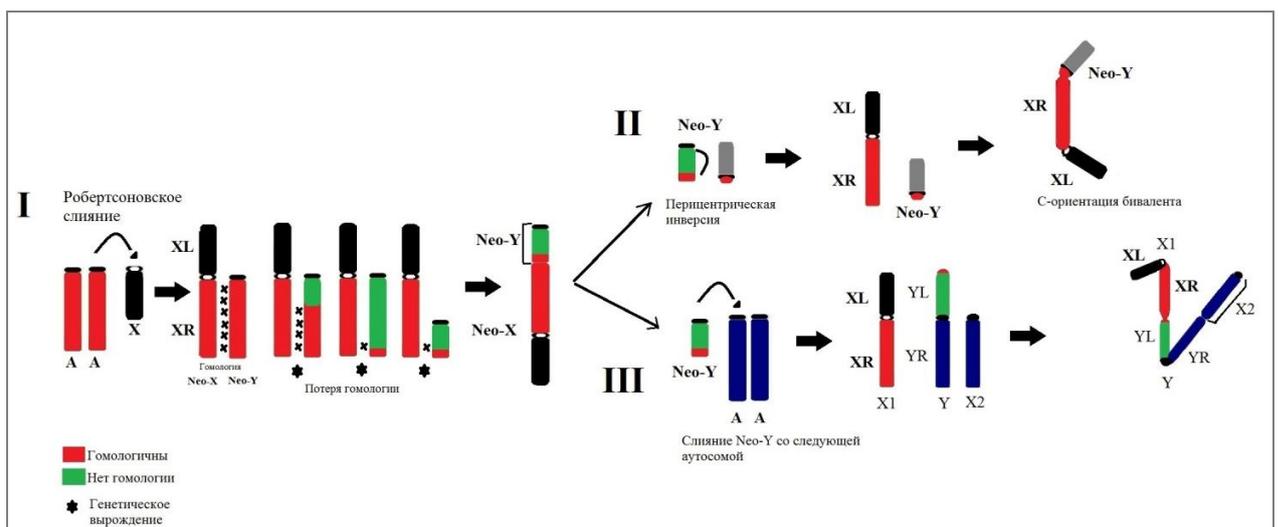


Рисунок 6. Схема образования нео-XX/нео-XY и нео-X₁X₂Y/нео-X₁X₁X₂X₂ систем половых хромосом по Castillo et al., 2010a с изменениями. I. Робертсоновское слияние между аутосомой (A) и X-хромосомой. После слияния XR-плечо и нео-Y хромосома сохраняют полную гомологию (нарисовано красным цветом). Постепенно в нео-Y хромосоме начинается вырождение генов, что приводит к потере гомологии (нарисовано зеленым цветом). II. Перичентрическая инверсия нео-Y хромосомы (нарисовано серым цветом) может привести к C-образной ориентации бивалента (в метафазе I). III. Второе робертсоновское слияние между образованной нео-Y хромосомой и еще одной парой аутосом (нарисовано синим цветом) приводит к образованию множественной системы половых хромосом.

Все описанные выше варианты изменений кариотипов у саранчовых семейства Acrididae были образованы на основе стандартного для них 23-хромосомного кариотипа (все хромосомы акроцентрические, X0\XX).

Саранчовые семейства Pamphagidae по признакам кариотипа образуют обособленную группу в надсемействе Acridoidea. Стандартный набор хромосом у видов саранчовых Pamphagidae состоит из 19 акроцентрических хромосом при X0/XX типе определения пола. Проводимые до 90-х годов цитогенетические исследования хромосомных наборов Pamphagidae привели к выводу о том, что эта группа саранчовых имеет консервативный кариотип. Кариотипы всех цитогенетически исследованных на то время видов Pamphagidae из Африки, Южной Европы и Китая состояли из 19 у самца и 20 у самки акроцентрических хромосом при X0/XX типе определения пола ($2n\♂=19X0$; $2n\♀=20XX$) (Chen, 1964; Alicata et al., 1976; Camacho et al., 1981; Santos et al., 1983; Cabrero et al., 1985; Fossey, 1985; Fu Peng, 1989; Vitturi et al., 1993; Warchałowska-Śliwa et al., 1994; Приложение 2). Однообразие кариотипов у Pamphagidae давало основание для вывода о том, что эта группа саранчовых обладает исключительно консервативным кариотипом (Cabrero et al., 1985). Тем не менее, при анализе хромосомных наборов саранчовых Pamphagidae исследователи отмечали некоторые видоспецифические различия. Эти различия относились к размерам хромосом (Camacho et al., 1981), расположению и величине C-гетерохроматиновых блоков в хромосомах (Camacho et al., 1981; Santos et al., 1983; Warchałowska-Śliwa et al., 1994), частоте и локализации хиазм (Alicata et al., 1976). Все накопленные результаты о кариотипических особенностях Pamphagidae давали основание предполагать особый путь эволюции хромосомных наборов у Pamphagidae, происходящий без изменения числа и морфологии хромосом (White, 1973; Hewitt, 1979).

Сравнительно-кариологическое исследование некоторых видов Pamphagidae из Центральной Азии, Болгарии, Кавказа и Закавказья показали, что стандартный тип хромосомного набора, в котором все хромосомы акроцентрические ($2n\♂=19X0$, $2n\♀=20XX$), обнаруживается не всегда. Один из возможных вариантов изменения 19 хромосомного кариотипа обнаружен у *Melanotmethis fuscipennis* (Bugrov, Warchałowska-Śliwa, 1997) и *Eremopeza festiva* (Bugrov et al., 2016). У *Melanotmethis fuscipennis* и *Eremopeza festiva* хромосомы в наборе имеют вторые плечи. Возникновение вторых плеч в кариотипах саранчовых с исходно акроцентрическими хромосомами обычно связывают с перичентрическими инверсиями (White, 1973). Другой путь эволюционного преобразования кариотипа у видов Pamphagidae связан с Робертсоновской транслокацией исходно акроцентрической X хромосомы и акроцентрической аутосомы с образованием нео-XY♂/нео-XX♀ механизма определения пола (Бугров, 1986; Bugrov, Warchałowska-Śliwa, 1997; Bugrov, Grozeva, 1998). В этом случае хромосомный набор состоит из 16 акроцентрических аутосом,

двух метацентрических нео-Х хромосом у самки, и одной метацентрической нео-Х и одной акроцентрической нео-У хромосом у самца ($2n\♂=16+\text{neo-XY}$; $2n\♀=16+\text{neo-XX}$). Такие кариотипы были описаны у видов *Pamphagidae* из подсемейств *Trinchinae* (*Thrinchini*) и *Pamphaginae* (триба *Nocarodeini*). При сравнении структурных особенностей нео-половых хромосом было отмечено, что нео-У хромосома у *Thrinchini* и *Nocarodeini* имеет разный уровень гомологии с аутосомным XR-плечом нео-Х хромосомы (Bugrov, Grozeva, 1998). У видов трибы *Thrinchini* (некоторые виды родов *Asiotmethis* и *Atrichotmethis*) были выявлены начальные признаки гетероморфизации XR-плеча и нео-У хромосомы. В проксимальной части нео-У хромосомы у видов из родов *Asiotmethis* и *Atrichotmethis* выявлены множественные чередующиеся между собой гетерохроматиновые и эухроматиновые районы, а в гомологичном нео-У хромосоме районе XR-плеча нео-Х хромосомы С-блоков нет (Рисунок 7А). У видов трибы *Nocarodeini* (*Pamphaginae*) нео-У хромосома по сравнению с исходно гомологичным ей XR-плечом нео-Х хромосомы значительно меньше и практически полностью гетерохроматинизирована (Рисунок 7Б) (Bugrov, Grozeva, 1998; Bugrov et al., 2016).

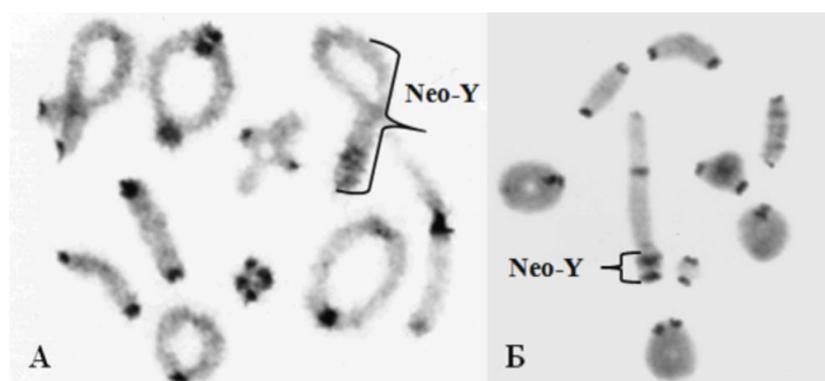


Рисунок 7. Neo-XY♂ тип определения пола у саранчовых *Pamphagidae*. А – Диакинез профазы мейоза у *Asiotmethis limbatus* (*Thrinchini*); Б – Метафаза I мейоза у *Paranocarodes straubei* (*Nocarodeini*). Neo-У хромосома выделена скобкой (из: Bugrov, Grozeva, 1998, с изменениями).

Следующий вариант изменения стандартного кариотипа описан у *Paranothrotres opacus* из трибы *Nocarodeini* (*Pamphaginae*). Кариотип *Paranothrotres opacus* состоит из 14 акроцентрических хромосом и нескольких половых хромосом нео- $X_1X_2Y♂/\text{neo-}X_1X_1X_2X_2♀$. Такой тип определения пола отражает наиболее продвинутый этап в формировании половых хромосом *de novo*. Он образуется в результате реципрокной транслокации мелкой, преимущественно С-позитивной У-хромосомы и одной из крупных аутосом, что приводит к превращению исходной акроцентрической нео-У хромосомы в субметацентрическую (Bugrov, et al. 2016).

Выявленные структурные особенности половых хромосом у саранчовых Pamphagidae показали, что представители этого семейства могут стать моделью эволюции XX/XУ гетерогаметного пола из исходного для этих насекомых XX/X0 типа определения пола.

Краткий обзор цитогенетических особенностей кариотипов у саранчовых надсемейства Acridoidea показал, что в некоторых группах происходят различные изменения хромосомных наборов. У большинства групп саранчовых изменения кариотипов связаны с робертсоновскими транслокациями, иногда перичентрическими инверсиями и тандемными слияниями. Детализация путей эволюции кариотипов невозможна без выявления различных маркёров линейной дифференциации хромосом. В помощь этому были разработаны методики, позволяющие идентифицировать как отдельные хромосомы, так и определенные их участки. Описание основных методических приемов, которые применяют для анализа хромосом, приводится в следующем разделе.

1.3. Краткий обзор методических приемов, используемых для идентификации хромосом и их районов

Долгое время основным методом анализа кариотипов было рутинное окрашивание хромосом различными ядерными красителями (Гимза, ацето-орсеин, кармин и др.). При таком способе все хромосомы в кариотипе равномерно окрашиваются по длине хроматиды, что позволяет получить только минимальную информацию о кариотипе (морфология, размер и число хромосом в наборе). Различить морфологически сходные хромосомы в наборе, оценить их внутреннюю структуру и ее изменения с помощью рутинного окрашивания было невозможно. В 70-х годах XX века были разработаны многочисленные методы дифференциального окрашивания хромосом (С-; G-; Q-; R-; T-; Ag- и др.), которые позволили идентифицировать хромосомы и их районы хромосомы (Дарлингтон, Ла Кур, 1980; Макгрегор, Варли, 1986; Рубцов, 2004, 2006; Hu et al., 2020). Методы дифференциального окрашивания основаны на том, что предварительно обработанные различными реактивами (трипсин, гидроксид бария, SSC и др.) при разных температурных условиях и рН хромосомы дифференцированно связываются с красителем (Гимза, азур-эозин или флуоресцентные красители: акрихин, DAPI, Hoechst 33258). В результате этого на хромосоме выявляются чередующиеся окрашенные и неокрашенные полосы или бэнды (от англ. «band»). Метод окрашивания стали называть бэндингом (от англ. «banding» – обозначение полосами, нанесение полос), например, С-, G-, R- бэндинг и др., а само окрашивание хромосом – бэндированием (Рубцов, 2004, 2006). Локализация полос и блоков на хромосоме, их ширина, количество, интенсивность окраски обычно являются специфическими для каждой пары хромосом в наборе

(Дарлингтон, Ла Кур, 1980; Рубцов, 2004, 2006; Hu et al., 2020). В цитогенетике млекопитающих чаще всего используют C-, G-, R-, T-, Q- методы окрашивания хромосом. Если хромосомы предварительно обработать горячим гидроксидом бария, а затем окрасить красителем Гимза, то на хромосомах выявляются блоки конститутивного гетерохроматина, или C-блоки (от англ. «Constitutive heterochromatin» – конститутивный гетерохроматин). Для получения G-бэндов, хромосомы предварительно обрабатывают трипсином, а затем окрашивают красителем Гимза (название от англ. «Giemsa»). Для получения R-полос, хромосомы перед окрашиванием красителем Гимза нагревают в растворе SSC, при этом на хромосомах появляется набор полос обратный по отношению к G-бэндам (название от англ. «Reverse» – обратный). При более жестких температурных условиях R-бэндинга интенсивнее окрашиваются теломерные районы. Такой вариант окрашивания называют, T-бэндинг (от англ. «telomere» – теломера). При окраске хромосом флуоресцентным красителем – акрихином в эухроматине выявляются чередующиеся ярко- и тусклоокрашиваемые районы, или Q-бэнды (от англ. «Quinacrine» – акрихин). Было установлено, что разные флуоресцентные красители имеют разное сродство к AT и GC-богатым участкам ДНК. Окрашивание хромосом флуоресцентными красителями, такими как акрихин, Hoechst 33258 и DAPI позволяет выявить районы хромосом, обогащенные AT парами оснований. Флуорохромы, такие как хромомицин А₃, 7-аминоактиномицин и др., позволяют выявлять GC-богатые районы ДНК (Рубцов, 2004, 2006; Hu et al., 2020). Разработанные методы дифференциального окрашивания хромосом существенно продвинули цитогенетические исследования млекопитающих, но для других групп организмов (растения, насекомые) действенными оказались лишь немногие из них. Для саранчовых эффективным методом окрашивания хромосом оказалось только C-дифференциальное окрашивание (John, King, 1977; Camacho et al., 1981; Santos et al., 1983; Cabrero, Camacho, 1985). Метод выявления районов гетерохроматина на хромосомах или C-дифференциальное окрашивание, был разработан в 1972 году А. Т. Sumner (Sumner, 1972). Для визуализации гетерохроматиновых блоков, хромосомы денатурируют в горячем щелочном растворе (Ba(OH)₂ или NaOH), при этом две цепи, составляющие двойную спираль разъединяются, а после охлаждения воссоединяются заново. После обработки хромосомы окрашивают красителем Гимза, который интенсивно окрашивает районы с большим содержанием повторяющихся последовательностей (Sumner, 1972). Полагают, что за счет значительного количества повторенных последовательностей в районах с высоким содержанием гетерохроматина ренатурация ДНК происходит быстро и образуется сетчкоподобная структура, которая препятствует вымыванию красителя и поэтому C-блоки приобретают темную интенсивную окраску. В эухроматиновых районах ренатурация идет медленнее, и, белковый материал вымывается в большей степени, чем в гетерохроматиновых районах, поэтому районы эухроматина окрашиваются слабо (светлые) (Holmquist, 1979). Кроме

различий в степени конденсации и интенсивности окраски, эухроматин и гетерохроматин различаются по содержанию повторённых последовательностей ДНК. Эухроматин обогащен уникальными кодирующими последовательностями, а гены, локализованные в эухроматине, обычно активно транскрибируются. Гетерохроматин считается обедненным кодирующими генами. В основном, он состоит из массивов высоко повторяющихся нуклеотидных последовательностей, сателлитных повторов, мобильных элементов и генов рибосомной РНК (Прокофьева-Бельговская, 1986; Жимулев, 1993; Hughes, Hawley, 2009). Обычно гетерохроматин концентрируется в прицентромерных и теломерных районах хромосом и участвует в их защите. Также считается, что гетерохроматин быстро эволюционирует, а состав его последовательностей может сильно различаться даже у близкородственных видов, что может играть роль в видообразовании (Hughes, Hawley, 2009). В целом, С-блоки являются хорошими маркерами, позволяющими идентифицировать хромосомы в кариотипе на разных стадиях клеточного цикла.

При С-дифференциальном окрашивании хромосом саранчовых было отмечено, что разные таксономические группы саранчовых имеют специфические различия в локализации и размерах блоков гетерохроматина в хромосомах. В настоящее время описаны особенности локализации С-блоков гетерохроматина более чем у 300 видов саранчовых из разных таксономических групп (Hewitt, 1979; King, John, 1980; Camacho et al., 1981; Santos et al., 1983; Cabrero et al., 1985; Lopez-Leon et al., 1989; Mansueto, Vitturi, 1989; Vitturi, 1993; Warchałowska-Śliwa et al., 1994; Bugrov, Warchałowska-Śliwa, 1997 и многие другие). В хромосомах саранчовых отмечают три основных типа расположения блоков гетерохроматина: прицентромерное, интеркалярное и теломерное (Hewitt, 1979; King, John, 1980; Camacho et al., 1981; Santos et al., 1983; Cabrero et al., 1985). Прицентромерные блоки гетерохроматина обычно выявляются на всех хромосомах набора. Интеркалярные блоки у большинства саранчовых расположены на одной, двух или трех парах аутосом любого размерного класса, а иногда на X хромосоме. На хромосоме интеркалярные блоки могут занимать проксимальное (ближе к центромере) или дистальное (ближе к теломерам) положение. Теломерные блоки чаще всего локализуются на средних и самых мелких парах аутосом. На больших аутосомах теломерные блоки отмечаются реже. В большинстве случаев самая мелкая пара аутосом в наборе имеет теломерные блоки большой или средней величины (King, John, 1980; Santos et al., 1983; Cabrero et al., 1985; Lopez-Leon et al., 1989; Бугров и др., 1991). При анализе гетерохроматиновых блоков на хромосомах саранчовых была отмечена относительная разница в их размерах. С-блоки могут быть крупной, средней или мелкой величины. Размеры С-блоков могут варьировать как между видами, так и у одной особи на гомологичных хромосомах (King, John, 1980; Santos et al., 1983; Cabrero et al., 1985; Бугров и др., 1991).

Несмотря на большое количество работ, направленных на выяснение особенностей локализации и содержания гетерохроматина на хромосомах саранчовых, нет единого мнения о возможности использования этих маркеров для выяснения вопросов таксономии, филогении и эволюции. Во многих работах авторы указывают на различия в расположении, размере и количестве блоков на хромосомах разных таксономических групп саранчовых. Например, анализ распределения С-блоков у 23-х видов саранчовых показал, что виды из разных таксономически далеких семейств значительно различаются по этому признаку (King, John, 1980). Вариации по локализации и размерам С-блоков были описаны и у близкородственных видов саранчовых (Shaw, 1971; Gosalvez et al., 1981; Bugrov et al., 1994). В том числе, вариации по локализации и размерам С-блоков выявлены у Pamphagidae из родов *Eumigus* и *Pamphagus* (Cabrero et al., 1981; Camacho et al., 1985; Vitturi, 1993; Warchałowska-Śliwa et al., 1994). Различия по данному хромосомному маркеру были обнаружены в разных популяциях одного вида (Shaw, 1976) и даже между особями одной популяции (Webb, 1976; Santos et al., 1983; Cabrero et al., 1985). Но с другой стороны, при анализе С-дифференциального окрашивания хромосом у саранчовых отмечают и то, что часто блоки практически одинаковы по локализации и относительным размерам, а четкую связь между сходством С-блоков и таксономической близостью видов установить сложно (Santos et al., 1983; Cabrero, Camacho, 1986; Бугров и др., 1991).

Следует отметить, что обычно при исследовании кариотипов саранчовых дифференциально окрашивают метафазные хромосомы, которые находятся в компактизованном состоянии. На метафазных хромосомах обычно можно увидеть только плотные прицентромерные, интеркалярные или теломерные С-блоки. Но при анализе хромосом на ранних стадиях мейоза или митотических эмбриональных хромосомах, вдобавок к компактным С-блокам часто выявляют многочисленные мелкие гетерохроматиновые полоски и узелки. Наличие мелких С-узелков на деспирализованных хромосомах объясняют тем, что в ходе профазы мейоза изменяется степень конденсации эухроматиновых участков и мелкие С-узелки сливаются между собой в кажущийся монолитным гетерохроматиновый блок. То, что в составе блоков гетерохроматина есть эухроматиновые районы, подтверждается включением ³H-уридина в прицентромерный гетерохроматиновый блок на стадии зиготены-пахитены (Высоцкая, 1979). Особенность поведения гетерохроматина на разных стадиях компактизации хромосом была выявлена при анализе кариотипов 57 видов Acrididae фауны Сибири, Средней Азии и Казахстана (Высоцкая, Бугров, 1985). Так, например, у *Conophyma semenovi semenovi* Zub. на стадии первой профазы мейоза С-узелки распределены равномерно по всей длине хромосомы, а на конденсированной стадии они собраны в единый небольшой прицентромерный блок. У *Dericorys albidula* Serv. на конденсированной стадии хромосомы

имеют крупные прицентромерные блоки, а на ранней стадии они состоят из двух С-блоков: прицентромерного и интеркалярного. Двойные прицентромерные блоки также были описаны на митотических хромосомах у некоторых австралийских видов саранчовых (King, John, 1980). У таксономически близких видов Acrididae выявлено сходство по локализации и образованию С-узелков. Например, некоторые виды трибы Gomphocerini (*Stauroderus scalaris*, *Aeropus sibiricus*, *Aeropedellus variegatus*) имеют большие плотные прицентромерные блоки практически на всех стадиях мейоза, и только на стадии пролептотены можно видеть мелкие отдельные С-узелки (Высоцкая, Бугров, 1985). Исходя из описанных особенностей, можно предположить, что различия размеров и локализации С-блоков иногда могут быть результатом того, на какой стадии были окрашены хромосомы. Иногда полиморфизм по С-блокам гетерохроматина может возникать в результате хромосомных перестроек (Bugrov et al., 1994). У особей одного вида различия в С-блоках можно отнести к генетико-стохастическим процессам, которые поддерживают их генетическое разнообразие (Cabrero et al., 1985).

Несмотря на различные точки зрения о диагностической ценности С-дифференциального окрашивания хромосом, этот метод широко применяют в сравнительной цитогенетике многих групп животных и растений (Schubert et al., 2001; Картавцева, 2002; Hughes et al., 2009; Shamurailatpam et al., 2015; Kuznetsova et al., 2017; Dutrillaux, Dutrillaux, 2019 и многие другие). Иногда С-метод помогает различать близкие виды и виды-двойники (крипто-виды) (Angus, 1982; Cabrero et al., 1985; Lukhtanov, 2014; Lukhtanov et al., 2019; Dutrillaux, Dutrillaux, 2019), маркировать хромосомные перестройки (Vitturi, 1993; Warchałowska-Śliwa et al., 1994; Bugrov et al., 1994). Основным недостатком С-дифференциального окрашивания является то, что он позволяет только визуализировать блок повторённых последовательностей ДНК на хромосомах, но не предоставляет информации о молекулярном составе этого блока. Наиболее полную информацию о составе нуклеотидных последовательностей на хромосомах удалось получить после разработки методов молекулярно-цитогенетического анализа, из которых в настоящее время массово применяют флуоресцентную *in situ* гибридизацию (Fluorescent *In Situ* Hybridization или FISH) (Leitch et al., 1994; Sharakhov, 2015; Shakoori 2017; Liehr et al., 2017).

В отличие от описанных выше методов дифференциального окрашивания хромосом, метод флуоресцентной *in situ* гибридизации позволяет точно определить локализацию практически любой последовательности ДНК или РНК в клетке, клеточном ядре, метафазных хромосомах и хроматиновых фибриллах. В первых экспериментах по гибридизации *in situ* на цитологическом препарате в качестве специальных элементов для выявления необходимых последовательностей ДНК или РНК использовали зонды, меченные радиоактивными изотопами (третий, ^{125}I) (Pradue, Gall, 1969) это значительно ограничивало использование метода. Разработка в начале 1980-х годов способов нерадиоактивного мечения зондов, основанная на

использовании флуорохромов, таких как биотин, дигоксигенин, родамин, FITC, цианиновые красители (Cy3, Cy5, Cy 7) и др., позволила существенно усовершенствовать и сделать безопасным метод гибридизации *in situ*. В настоящее время FISH широко применяют при исследовании хромосом растений (Schubert et al., 2001; Lamb et al., 2012), позвоночных (Meune et al., 1990; Leitch et al., 1994; Rubtsov et al., 2000; Shakoori 2017), беспозвоночных (Sahara et al., 1999; Traut et al., 2007) и, в частности насекомых (Cabrero et al., 2003ab; Lopez-Fernandes et al., 2004; Fujiwara et al., 2005; Cabrero, Camacho, 2008; Grozeva et al., 2011; Camacho et al., 2015; Sharakhov, 2015; Vershinina et al., 2015; Bugrov et al., 2016; Kuznetsova et al., 2019).

В основе метода FISH лежит взаимодействие между денатурированными нитями ДНК с комплементарными последовательностями нуклеотидов однонитевых ДНК-проб, добавленных к цитологическому препарату. На предварительно обработанный препарат наносят меченую флуоресцентным красителем ДНК-пробу, которая представляет собой небольшой фрагмент или фрагменты нуклеиновых кислот, меченые таким образом, чтобы было возможно выявить их при микроскопии после гибридизации *in situ* (Рубцов, 2004, 2006; Leitch et al., 1994; Shakoori, 2017). Фрагменты ДНК-проб могут быть клонированными последовательностями ДНК, имеющими различные размеры и происхождение, фрагментами индивидуальных хромосом или их районов, выделенных микродиссекцией метафазных хромосом, целыми индивидуальными хромосомами, фрагментами ДНК, выделенными из конкретной фракции геномной ДНК или представлять собой всю геномную ДНК (Halder et al., 2004; Liehr et al., 2017). При нагревании цитологического препарата с ДНК-пробой происходит денатурация ДНК хромосом и ДНК-пробы. После снижения температуры ДНК начинает ренатурировать в результате чего между гомологичными регионами хромосомной ДНК и ДНК-пробы образуется дуплекс хромосомы с ДНК-пробой. После этого слабо связавшаяся ДНК-проба отмывается и при микроскопии в хромосоме выявляются меченые флуоресцентным красителем места локализации дуплексов хромосомы с ДНК-пробой.

На основе метода флуоресцентной *in situ* гибридизации нуклеиновых кислот были разработаны многочисленные подходы к анализу кариотипов, такие как многоцветное кариотипирование (Speicher et al., 1996), многоцветный бэндинг (МСВ) (Chudoba et al., 1999), сравнительная геномная гибридизация (CGH) (Weiss et al., 1999) и другие. Все это способствовало накоплению новых знаний в различных областях цитогенетики, филогенетики и таксономии.

Для успешного анализа хромосом с помощью флуоресцентной *in situ* гибридизации нуклеиновых кислот в качестве ДНК-пробы необходимо использовать хорошо охарактеризованные и обладающие достаточным уровнем гомологии у разных видов повторы ДНК. Такими повторами могут быть повторы рибосомной и теломерной ДНК.

Рибосомная ДНК состоит из эволюционно консервативных кодирующих генов (28S, 18S, 5.8S) которые являются хорошими маркёрами для выявления межвидовых и внутривидовых различий. Особенности локализации генов рибосомной ДНК часто используют в сравнительном анализе хромосом во многих группах насекомых (Cabrero et al. 2003ab; Loreto et al. 2008; Jetybayev et al., 2012; Camacho et al., 2015; Kuznetsova et al., 2017). Гены рибосомной ДНК являются одними из немногих молекулярных маркёров, локализация которых описана в хромосомах у многих видов саранчовых Acridoidea. Особенности расположения рибосомной ДНК в хромосомах описаны у более 100 видов из восьми подсемейств саранчовых. Наиболее охарактеризованы в этом отношении виды из подсемейств Eurypteropteminae, Gomphocerinae и Oedipodinae (Cabrero et al., 2003a; Cabrero et al., 2003; Cabrero, Camacho, 2008; Jetybayev et al., 2012). У саранчовых из подсемейств Catantopinae, Cyrtacanthacridinae, Melanoplinae, Romaleinae, Pamphagidae особенности локализации кластеров рибосомной ДНК в хромосомах описаны только для единичных видов (López-León et al., 1999; Cabrero et al., 2003ab; Cabrero, Camacho, 2008; Keller et al., 2006; Bugrov et al., 2016).

Сравнительный анализ локализации кластеров рибосомной ДНК в хромосомах у Acridoidea показал, что кластеры рибосомной ДНК у разных видов и в разных таксономических группах чаще всего располагаются в одной, двух, трех парах аутосом. Редко кластеры рибосомной ДНК у Acridoidea локализованы во всех парах аутосом. Очень редко кластер рибосомной ДНК расположен в X хромосоме. В хромосоме у саранчовых кластер рибосомной ДНК может располагаться в проксимальном, интеркалярном или дистальном районе. У всех исследованных ранее видов саранчовых надсемейства Acridoidea в одной хромосоме локализован один кластер рибосомной ДНК (López-León et al., 1999; Cabrero et al., 2003ab; Cabrero, Camacho, 2008; Keller et al., 2006; Jetybayev et al., 2012). Очень редко в одной хромосоме локализованы два кластера рибосомной ДНК. Такая особенность была отмечена только в X хромосоме у *Omocestus bolivari* (в прицентромерном и теломерном районах) и *O. burri* (в прицентромерном и интеркалярном районе) (Gomphocerinae) (Cabrero, Camacho, 2008).

Сравнительный анализ расположения кластеров рибосомной ДНК в хромосомах саранчовых из подсемейств Eurypteropteminae, Gomphocerinae и Oedipodinae показал схожую локализацию кластеров рибосомной ДНК в хромосомах близкородственных видов. Например, у большинства видов из подсемейства Eurypteropteminae кластеры рибосомной ДНК локализованы в прицентромерном районе девятой и одиннадцатой пар аутосом. У большинства видов рода *Chorthippus* из подсемейства Gomphocerinae кластеры рибосомной ДНК располагаются в интеркалярном районе первой и второй пар аутосом. У большинства видов из подсемейства Oedipodinae кластеры рибосомной ДНК локализованы в дистальном и интеркалярном районах шестой и девятой пары аутосом (Cabrero, Camacho, 2008). Несмотря на сходства локализации

рибосомной ДНК в хромосомах саранчовых, описаны вариации по расположению и количеству кластеров рибосомной ДНК как среди близкородственных видов (Cabrero, Camacho, 2008), так и между географически изолированными популяциями (Cabrero et al., 2003ab; Keller et al., 2006; 2008). Внутривидовые и межвидовые изменения локализации рибосомной ДНК в хромосомах саранчовых объясняют 1) структурными перестройками хромосом, такими как транслокации или инверсии; 2) эктопической рекомбинацией между терминальными регионами хромосом (Pedrosa-Narand et al. 2006 Цит по: Cabrero et al., 2008); 3) переносом небольших повторов рибосомной ДНК в новые места в той же, или в другой хромосоме с последующей амплификацией этих минорных локусов и делецией исходных районов (Eickbush, Eickbush, 2007; Cabrero et al., 2008).

Особенности расположения рибосомной ДНК в хромосомах у Pamphagidae были описаны у шести видов из разных подсемейств и родов (Vitturi et al., 2008; Bugrov et al., 2016). Кластеры рибосомной ДНК в хромосомах у Pamphagidae локализованы в двух, трёх парах аутосом и X-хромосоме. В хромосоме они могут быть расположены в проксимальной, интеркалярной и дистальной части. У большинства описанных видов Pamphagidae в одной хромосоме локализован один кластер рибосомной ДНК, но у *Asiotmethis turritus* и *Pamphagus ortolaniae*, в одной хромосоме, выявлено несколько (два и три) кластера рибосомной ДНК (Vitturi et al., 2008; Bugrov et al., 2016).

Еще одним распространенным маркером для идентификации районов хромосом являются теломерные повторённые последовательности ДНК. Сравнительный анализ теломерных последовательностей ДНК показал, что в хромосомах у большинства эукариот теломеры образованы тандемом из множества 5-8 буквенных последовательностей (Коряков, Жимулев, 2009). Например, у большинства позвоночных они представляют собой тандемно организованные гексамеры (TTAGGG)_n (Meune et al., 1990; Blackburn, 1991, 2001), у растений – гептамеры (TTTAGGG)_n (Lamb et al., 2012). У большинства членистоногих, в том числе и насекомых, они представлены пентамерами (TTAGG)_n (Sahara et al., 1999; Vítková et al., 2005; Traut et al., 2007; Kuznetsova et al., 2019). Описаны и другие варианты организации теломер. Например, у Scarabaeidae (Coleoptera) теломерные повторы представлены иным сочетанием нуклеотидных последовательностей (TCAGG)_n (Frydrychová, Marec, 2002). У *Chironomus* и *Anopheles* (Diptera, Nematocera) в качестве теломер выступают длинные повторы сателлитной ДНК (LCTTR) (Rosén, Edström, 2002). У *Drosophila* (Diptera) теломеры состоят из множественных копий ретротранспозонов (Pardue, DeBaryshe, 2008), а у *Bombyx mori* (Lepidoptera) теломеры образованы пентамером (TTAGG)_n и ретротранспозонами (Fujiwara et al., 2005). Все исследованные виды саранчовых имеют стандартный для насекомых пентамер

(TTAGG)_n (Cabrero et al., 2003ab; Cabrero, Camacho, 2008; Jetybayev et al., 2012; Kuznetsova et al., 2019).

Обычно теломерные повторы расположены в терминальных районах хромосом, но иногда их выявляют и в интерстициальных районах – ITS (interstitial telomeric sequences). Интерстициальные теломерные повторы (ITS) были обнаружены у некоторых видов из разных отрядов позвоночных (Meune et al., 1990; Weber et al., 1991; Bolzán, 2017). Чаще всего ITS локализованы в районах ядрышкового организатора, конститутивного гетерохроматина и прицентромерных районах (Weber et al., 1991; Bolzán, 2017). При этом было отмечено, что локализация интерстициальных теломерных повторов обычно совпадает с районами слияний или разрывов хромосом, происходивших в кариотипической эволюции организмов (Жданова и др., 2007; Bolzán, 2017). Так, при исследовании кариотипа индийского мунтжака ITS были выявлены в районах слияний хромосом (Chi et al., 2005). Предполагают, что ITS могут возникать в результате различных хромосомных перестроек, например теломера-теломерных слияний или репарации двунитевых разрывов ДНК (Bolzán, 2017).

Среди саранчовых интерстициальные теломерные повторы в хромосомах выявлены у некоторых видов из подсемейства Gomphocerinae (Lopez-Fernandez et al., 2004; Jetybayev et al., 2012). Обнаружение ITS в хромосомах саранчовых Gomphocerinae помогло выявить парацентрические инверсии в эволюции кариотипов этой группы (Jetybayev et al., 2012). Среди Pamphagidae интерстициальные теломерные повторы выявлены у *Eremopeza festiva* (Bugrov et al., 2016). Локализация ITS в прицентромерном районе хромосом у *E. festiva* поддержало гипотезу о том, что короткие вторые плечи в хромосомах этого вида были образованы в результате перичцентрической инверсии (Bugrov et al., 2016).

Как было отмечено выше, для проведения FISH необходимы ДНК-пробы, специфичные для конкретных участков определенных хромосом или целых хромосом. Перспективным подходом для получения таких ДНК-проб является метод микродиссекции хромосом (Рубцов, 2004, 2006). Первая микродиссекция хромосом была проведена Ф. Скалендже с соавторами для получения районспецифичной ДНК-библиотеки дрозофилы (Scalenghe et al., 1981). В основе метода микродиссекции лежит вырезание отдельной хромосомы или ее участка с помощью микроманипулятора или лазера. После выделения районы ДНК амплифицируют в специально подобранных условиях ПЦР. В результате этих процедур получают хромосоמו- или районспецифичные ДНК-библиотеки (Рубцов 2004, 2006). Полученные ДНК-библиотеки в дальнейшем используют для проведения гибридизаций или кросс-гибридизаций хромосом или их районов у модельных организмов. В настоящее время районо- и хромосомоспецифичные ДНК-пробы широко используют в диагностике хромосомных перестроек и онкологических заболеваний у человека, а также исследованиях эволюции кариотипов млекопитающих

(Ferguson-Smith, Trifonov, 2007; Shakoori, 2017; Yang et al., 2017; Hu et al., 2020). С помощью полученных микродиссекционных ДНК-проб исследованы хромосомы и их районы у растений (Kazama, Matsunaga, 2008), рептилий (Giovannotti et al., 2006), рыб (Cocca et al., 2015) и насекомых (Джетыбаев и др. 2010; Wasserlauf et al., 2015; Pita et al., 2017).

Среди саранчовых метод микродиссекции ДНК-проб с последующей кросс-гибридизацией был использован для выяснения степени дивергенции последовательностей, локализующихся в прицентромерном гетерохроматине близких видов трибы Gomphocerini. В результате кросс-гибридизационного эксперимента было показано, что состав повторённых последовательностей ДНК в прицентромерных С-позитивных районах у близких видов саранчовых трибы Gomphocerini различается между таксономически близкими видами. Полученный результат указывает на быструю эволюцию повторов ДНК в С-позитивных прицентромерных районах хромосом у Gomphocerini (Джетыбаев и др. 2010). Таким образом, было показано, что метод микродиссекции ДНК-проб с последующей кросс-гибридизацией имеет перспективы при исследовании эволюции кариотипов саранчовых.

Все описанные выше методы дают представление о возможностях и перспективах использования классических цитогенетических и молекулярно-цитогенетических подходов для выяснения путей эволюции отдельных хромосом и кариотипов в целом. Особое значение имеет исследование эволюции половых хромосом, которые играют важную роль в цитологическом определении пола

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

2.1. Материал

В основу работы был положен материал, собранный и любезно предоставленный Александром Геннадьевичем Бугровым (НГУ, ИСиЭЖ СО РАН), Ильясом Еркиновичем Джетыбаевым (ИЦиГ СО РАН), Драганом Чобановым (Институт биоразнообразия и экосистемных исследований Болгарской академии наук, Болгария), Гаяне Карагян (Научный центр зоологии и гидроэкологии НАН РА, Армения).

Сборы саранчовых Pamphagidae проводили в горах Малого и Среднего Атласа (Северная Африка, Марокко) с мая по июнь 2013 года; Западной и Центральной Анатолии (Турция) в июне-июле 2014 года; в окрестностях города Спрингбок (ЮАР) в ноябре 2015 года; в Алматинской и Восточно-Казахстанской областях Казахстана в июне, июле и августе 2015 года; в окрестностях поселка Горован (Армении), лето 2015 года; в Крыму, июнь 2017 года; а также на территории Ирана в июне 2018 года.

Полный список исследованных в данной работе видов Pamphagidae и места их сбора приведены в Таблице 1.

Таблица 1. Список исследованных видов Pamphagidae и места их сбора

Таксон	Место сбора
Thrinchinae Stål, 1876	
Thrinchini Stål, 1876	
Glyphotmethis Bey-Bienko, 1951	
<i>Glyphotmethis adaliae</i> (Uvarov, 1928)	Турция; 37°37.518'N 29°13.948'E
<i>Glyphotmethis dimorphus</i> (Uvarov, 1934)	Турция; 38°18.438'N 31°43.676'E
<i>Glyphotmethis efe</i> Ünal, 2007	Турция; 39°03.285'N 29°26.741'E
<i>Glyphotmethis holtzi pulchripes</i> (Uvarov, 1943)	Турция; 38°46.688'N 34°51.215'E
Asiotmethis Uvarov, 1943	
<i>Asiotmethis heptapotamicus heptapotamicus</i> (Zubovskii, 1898)	Казахстан, Алма-атинская область. Левый берег реки Или, в 10–40 км ниже плотины Капчагайской ГЭС, полупустынный ландшафт
<i>Asiotmethis heptapotamicus songoricus</i> Shumakov, 1949	Казахстан, Восточно-Казахстанская область. Окрестности г. Аягоз, 26 км ниже по течению реки Аягоз, полупустынный ландшафт; 47°52.494'N 80°6.435'E
<i>Asiotmethis muricatus</i> (Pallas, 1771)	Казахстан; 50°45.377'N 51°37.493'E
<i>Asiotmethis tauricus</i> (Tarbinsky, 1930)	Крым, окрестности города Феодосия
Eremopeza Saussure, 1888	
<i>Eremopeza saussurei</i> (Uvarov, 1918)	Иран, провинция Фарс, горная система Загрос 1433 н.у.м. 29°25'54.9"N 052°46'20.0"E
<i>E. bicoloripes</i> (Moritz, 1928)	Иран, провинция Хорасан Резави, 60 км севернее от Мешхеда, окрестности поселка Феризи ~1800 н.у.м.

		Таблица 1. Продолжение	
Таксон		Место сбора	
<i>Thrinchus</i> Fischer von Waldheim, 1833			
<i>Tmethis cisti</i> (Fabricius, 1787)		Марокко; 33°41.25'N 3°40.82'W	
Pamphaginae Burmeister, 1840			
Nocarodeini Bolívar, 1916			
<i>Nocaracris idrisi</i> (Karabağ, 1956)		Турция; 40°35.385' N 31°17.293'E	
<i>Nocaracris sureyana</i> (Ramme, 1951)		Турция; 39°02.353'N 29°17.074'E	
<i>Nocaracris citripes</i> (Uvarov, 1949)		Турция; 37°05.779'N 28°50.972'E	
<i>Nocaracris furvus furvus</i> Mishchenko, 1951		Турция; 38°21.258'N 28°06.713'E	
<i>Nocaracris tardus</i> Ünal et al. 2016		Турция; 38°16.672' N; 31°19.491'E	
<i>Paranocarodes turkmen</i> Ünal, 2014		Турция; 39°54.453'N 30°41.477'E	
<i>Paranocarodes (straubei) paphlagonicus</i> Ramme, 1951		Турция; 39°54.453'N 30°41.477'E	
<i>Paranocarodes tolunayi tolunayi</i> Karabag, 1949		Турция; 40°40.937'N 31°46.489'E	
<i>Paranocarodes anatoliensis anatoliensis</i> Demirsoy, 1973		Турция; 37°48.527'N 30°45.472'E	
<i>Paranocarodes karabagi</i> Demirsoy, 1973		Турция; 39°03.285'N; 29°26.741'E	
<i>Nocarodes armenus</i> Ramme, 1951		Армения, окрестности села Гораван	
<i>Paranothrotes citimus</i> Mistshenko, 1951		Иран, провинция Казвин, горная система Эльбурс 2380 н.у.м.; 36°7'29.0"N 50°40' 25"E	
Tropidauchenini Zhang, Yin & Yin, 2003			
<i>Saxetania paramonovi</i> (Dirsh)		Иран, провинция Хорасан Резави. 60 км севернее от г. Мешхеда, окрестности поселка Феризи ~1800 н.у.м	
<i>Tropidauchen escalerae</i> Bolívar, 1912		Иран, провинция Фарс, окрестности поселка Руниз. Горная система Загрос ~2000 н.у.м полупустынный ландшафт	
<i>Tropidauchen</i> sp.		Иран провинция Фарс. Горная система Загрос, 2800-3200 н.у.м; 30°23'10.1"N 51°55'35.2"E	
Euryparyphini La Greca, 1993			
<i>Euryparyphes flexuosus</i> Uvarov, 1927		Марокко; 32°75.693'N 5°64.511'W	
<i>Eunapiodes atlantis</i> (Chopard, 1943)		Марокко; 33°68.745'N 3°68.032'W	
<i>Euryparyphes rungsi</i> Massa, 2013		Марокко; 33°2.12'N 5°4.32'W	
<i>Eunapiodes granosus</i> (Stål, 1876)		Марокко; 32°20.41'N 5°43.18'W	
<i>Paraeumigus fortius</i> (Bolivar, 1907)		Марокко; 31°68.238'N 7°06.324'W	
<i>Paraeumigus parvulus</i> (Bolívar, 1907)		Марокко; 30°51.98'N 8°21.48'W	
Pamphagini Burmeister, 1840			
<i>Paracinipe alticola</i> (Werner, 1932)		Марокко; 30°51.53'N 8°22.66'W	
<i>Paracinipe crassicornis</i> (Bolívar, 1907)		Марокко; 32°45.40'N 7°58.33'W	
<i>Paracinipe dolichocera</i> (Bolívar, 1907)		Марокко; 32°45.37'N 5°38.72'W	
<i>Paracinipe theryi</i> (Werner, 1931)		Марокко; 29°49.87'N 9°2.25'W	
<i>Pseudoglauia tarudantica</i> (Bolívar, 1914)		Марокко; 29°49.87'N 9°2.25'W	
<i>Pseudoglauia terrea</i> (Bolívar, 1912)		Марокко; 30°84.998'N 7°55.683'W	
<i>Acinipe hesperica lepinyei</i> Chopard, 1943		Марокко; 31°15.67'N 7°23.32'W	
<i>Acinipe tuberculata</i> Werner, 1932		Марокко; 34°95.247'N 2°59.960'W	
Porthetinae Bolívar, 1916			
<i>Lobosceliana</i> Dirsh, 1958	<i>Lobosceliana</i> sp.	ЮАР; окрестности города Спрингбок (Springbok)	

Пойманных особей Pamphagidae определяли согласно определителю саранчовых фауны СССР и сопредельных территорий (Бей-Биенко, Мищенко, 1951), определителю Pamphagidae Северной Африки (Massa, 2013), определителю Pamphagidae Палеарктики (Ünal, 2016) и справочным материалам, выложенным на официальном сайте Международного ортоптерологического общества (OSF) <http://orthoptera.speciesfile.org>.

За время работы исследованы кариотипы 41 вида Pamphagidae из трех подсемейств: Thrinchinae Stål, 1876, Pamphaginae, Burmeister, 1840, Porthetinae Bolívar, 1916. Из подсемейства Thrinchinae исследовано 11 видов из трибы Thrinchini Stål, 1876 относящихся к четырем родам: *Glyphotmethis* Bey-Bienko, 1951, *Asiotmethis* Uvarov, 1943, *Thrinchus* Fischer von Waldheim, 1833 и *Eremopeza* Saussure, 1888. Из подсемейства Pamphaginae исследовано 29 видов из четырех триб: Nocarodeini Bolívar, 1916, Pamphagini, Burmeister, 1840, Tropidauchenini, Zhang, Yin & Yin, 2003 и Euryaryphini La Greca, 1993. Из подсемейства Porthetinae Bolívar, 1916 исследован один вид рода *Lobosceliana* Dirsh, 1958.

Кроме перечисленных в таблице видов Pamphagidae для получения ДНК-проб и проведения кросс-гибридизации использовали семенники *Asiotmethis turritus* (Fischer von Waldheim, 1833) (Армения, 40°10.220' N 44°22.458' E), *Asiotmethis limbatus* (Charpentier, 1845) (Болгария, окрестности города Харманли), *Nocaracris cyanipes* (Fischer von Waldheim, 1846) (Армения, 40°39.116' N 44°58.525' E), *Nocaracris rubripes* (Fischer von Waldheim, 1846) (Армения, 40°23.111' N; 44°15.324' E), собранные и зафиксированные в летние сезоны 1994, 1995, 2013 годов Александром Геннадьевичем Бугровым.

2.2. Методы

2.2.1 Фиксация семенников саранчовых

Отловленным самцам Pamphagidae в брюшко вводили 0,1-0,2 мл 0,1% раствора колхицина на 1,5-2,0 ч. Затем из полости тела извлекали семенники и помещали их в 0,9% раствор цитрата натрия на 20 минут. На следующем этапе семенники фиксировали в смеси ледяной уксусной кислоты и 96% этанола (1:3) в течение 15 минут при комнатной температуре. После фиксации семенники отмывали в 70% этаноле в течение 15 минут. Фиксированные семенники переносили в пробирки с 70% этанолом и хранили в холодильнике при -20°C.

2.2.2 Приготовление хромосомных препаратов из семенных фолликул самцов

Хромосомные препараты были приготовлены в лаборатории кафедры общей биологии и экологии (НГУ) с использованием бинокулярного микроскопа Stemi 508 (Zeiss, ФРГ).

От зафиксированного семенника отделяли 3-5 семенных фолликулов и выдерживали их несколько минут в дистиллированной воде. После этого фолликулы переносили на чистое, предварительно обезжиренное в хромовой смеси предметное стекло, на которое наносили каплю 60% уксусной кислоты и накрывали покровным стеклом. Спустя 10-15 минут готовили давленные препараты. Давленные препараты замораживали на охлажденном жидким азотом металлическом столике. После замораживания покровное стекло снимали. Препараты высушивали на воздухе при комнатной температуре.

Полученные хромосомные препараты использовали для дифференциального окрашивания, флуоресцентной гибридизации *in situ* с микродиссекционной, теломерной или рибосомной ДНК-пробами и микродиссекции.

2.2.3 Дифференциальное окрашивание хромосом красителем Гимза для выявления С-позитивных районов гетерохроматина

Для выявления С-позитивных районов хромосом использовали методику Самнера (Sumner, 1972) с некоторыми модификациями. Высушенные при комнатной температуре хромосомные препараты выдерживали 15-20 минут в 0,2 М растворе соляной кислоты (HCl). Затем препараты промывали в дистиллированной воде и высушивали при комнатной температуре. Сухие препараты помещали в свежеприготовленный насыщенный раствор гидроокиси бария ($Ba(OH)_2 \times 8H_2O$) при температуре 60-61°C на 5 минут. После препараты тщательно промывали под струей проточной воды и выдерживали 3-5 минут в 2×SSC буфере (Standard Sodium Citrate Buffer) комнатной температуры. Затем препараты переносили в горячий 2×SSCбуфер (60°C) и инкубировали при температуре 60°C в течение 60-75 минут. После этого препараты

промывали в дистиллированной воде с добавлением раствора бикарбоната натрия (NaHCO₃) до pH=6,8-7,0 и высушивали при комнатной температуре. Сухие препараты окрашивали 2% красителем Gimsa на буфере Соренсена от 30 минут до 60 минут. Продолжительность окрашивания определяли по одному препарату из серии. Оптимально окрашенные препараты промывали в дистиллированной воде и высушивали на воздухе при комнатной температуре.

2.2.4 Получение и мечение 18S рибосомной и теломерной ДНК–проб

Для получения зонда 18S рибосомной ДНК из базы данных GenBank были взяты последовательности генов 18S рибосомной РНК разных видов саранчовых (gb|AY859546.1, gb|AY521797.1, gb|AY125286.1 и |gb|EU414723.1). Консенсуная последовательность генов 18S рибосомной РНК была получена с помощью программы Mulalign (<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin>) (Corpet, 1988). Праймеры, список которых приведен в таблице 2, были подобраны в программе PerlPremier (Marshall, 2004).

Таблица 2. Праймеры используемые для амплификации 18S рибосомой ДНК

Праймер	Последовательность	Размер продукта
18S-1f	5'-ATGGTTCCTTAGATCGTACCC-3'	741 п.н.
18S-1r	5'-TTGTCAAAGTAAACGTGC-3'	
18S-2f	5'-GCATGGAATAATGGAATAGGAC-3'	667 п.н.
18S-2r	5'-AGAACATCTAAGGGCATCAC-3'	
18S-3f	5'-TGATAGCTCTTTCTTGATTCGG-3'	506 п.н.
18S-3r	5'-AGTTTGGTCATCTTTCCGGT-3'	

Праймеры 18S рибосомой ДНК синтезированы научно-производственной компанией BIOSSET (Новосибирск). В качестве матрицы использована геномная ДНК *Chorthippus biguttulus* (Linnaeus, 1758) (Acrididae). Зонд рибосомной ДНК нарабатывали и метили с помощью ПЦР (25 циклов). Реакционная смесь для ПЦР соержит: 10 mM Трис HCl, 50 mM KCl, pH=8,3, 0.08% (v/v) Nonidet P40, 200 мкМ дАТФ, дЦТФ, дГТФ, 120 мкМ дТТФ, 80 мкМ биотин-16-дУТФ или дигоксигенин-11-дУТФ, по 0.5 мкМ праймеров, 2 mM MgCl₂, 0,03 ед/мкл Таq ДНК полимеразы и 40 нг ДНК-матрицы. ПЦР проводили в режиме «начальная денатурация» 3 мин при 95°C, затем 25 циклов по 1мин при 95°C, 40 сек при 58°C, 1 мин при 72°C, финальная элонгация – 8 мин при 72°C. Мечение полученного зонда проводили в дополнительных циклах ПЦР с добавлением в реакционную смесь 80 мкМ биотин-16-дУТФ или дигоксигенин-11-дУТФ.

Зонд теломерной (TTAGG)_n ДНК получен нематричным синтезом. В качестве праймеров использовали олигонуклеотиды Tel 1 (5'ТААССТААССТААССТААСС-3') и Tel 2 (5'-TTAGGTTAGGTTAGGTTAGG-3') (Ijdo et al., 1991; Sahara et al., 1999). Реакционная смесь для

ПЦР содержит: 10 mM Трис HCl, 50 mM KCl, pH=8,3, 0.08% (v/v) Nonidet P40, по 200 мкМ дАТФ, дЦТФ, дГТФ и ТТФ, по 0.5 мкМ праймеров, 1,5 mM MgCl₂ и 0,04 ед/мкл Taq ДНК-полимеразы. ПЦР проводили в режиме «начальная денатурация» 90 сек при 94°C, затем 30 циклов 45 сек при 94°C, 30 сек при 40°C, 1 мин при 72°C, и финальная элонгация 10 минут при 72°C.

Мечение полученного зонда проводили в дополнительных циклах ПЦР с добавлением в реакционную смесь красителя Tamra-dUTP.

2.2.5 Флуоресцентная *in situ* гибридизация нуклеиновых кислот (FISH)

Флуоресцентная *in situ* гибридизация нуклеиновых кислот на хромосомах Ramphagidae была проведена на базе ИЦиГ СО РАН под руководством и непосредственном участии И. Е. Джетыбаева.

FISH проводили в соответствии с протоколом Д. Пинкеля (Pinkel at al., 1986). Для приготовления зонда 0,4 мкг меченой ДНК пробы смешивали с 10 мкг ДНК лосося, а затем осаждали тремя объемами охлажденного 96% спирта при 14000 об/мин в течение 20 мин. После центрифугирования супернатант сливали, осадок подсушивали и ресуспендировали в 20 мкл гибридизационной смеси (50% формамид, 10% сульфат декстрана, 1% Твин-20, 2×SSC, pH=7,0). Денатурацию зонда проводили при 96°C в течение 3 минут, а отжиг повторяющихся последовательностей 1 час при 42°C. Цитологические препараты метафазных хромосом обрабатывали RNКазой А (100 мкг/мл) в 2×SSC 1 час в при 37°C. Затем препараты проводили по серии спиртов возрастающей концентрации (70%, 80%, 96%) и высушивали при комнатной температуре. Для удаления остатков цитоплазмы препараты обрабатывали раствором 0,02 % пепсина в 10 mM HCl в течение 10 мин при 37°C. После препараты отмывали дважды по 5 мин в фосфатном буфере (0,13 M NaCl; 0,27 mM KCl; 7 mM Na₂HPO₄; 3 mM NaH₂PO₄, pH=7,2) и один раз в фосфатном буфере, содержащем 50 mM MgCl₂. Денатурацию препаратов проводили в 70% формамиде (ФА) в 2×SSC в течение 2 мин при 70°C. Препараты немедленно переносили в серию охлажденных спиртов возрастающей концентрации (70%, 80%, 96%) и выдерживали в каждом по 3 минуты. После чего препараты высушивали на воздухе. На высушенные препараты наносили 20 мкл ДНК пробы в гибридизационном буфере, накрывали покровным стеклом (24мм×24мм) и инкубировали во влажной камере при 42°C в течение 16 часов.

Детекция ДНК-пробы на препаратах хромосом.

После окончания гибридизации покровные стекла с препаратов смывали в растворе 2×SSC. После этого препараты последовательно отмывали по 5 минут в трех растворах 50% формамида в 2×SSC; три раза в 2×SSC при 42°C; и три раза в 0,1×SSC при 60°C. Затем препараты помещали в буферный раствор 4×SSC; 0,1% Tween 20 и инкубировали при

комнатной температуре 5 минут. Затем препараты помещали в блок-буфер на 30 минут при 42°C. После инкубации препараты доставали из блока и, стараясь избежать высушивания, быстро раскапывали на каждый препарат по 30 мкл раствора конъюгата. Для детекции биотинилированных зондов использовали авидин-DCS, конъюгированный флуоресцеинизотиоцианатом (авидин-FITC; 5 мкг/мл), который предварительно разводили в блок-буфере в соотношении 1:200. Не растворившиеся частицы авидина осаждали центрифугированием при 18000 об/мин в течение 6 минут. После нанесения авидина препарат накрывали покровным стеклом, помещали во влажную камеру и оставляли в термостате на 30 минут при 42°C. После окончания реакции покровное стекло удаляли. Несвязавшийся конъюгат отмывали в растворе высокой ионной силы 4×SSC; 0,1% Tween 20 три раза по 5 минут. Общее окрашивание метафазных хромосом проводили красителем DAPI (4,6-diamidino-2-phenyl-indole). Для окрашивания хромосом DAPI предварительно растворяли в антифэйде VECTASHIELD до конечной концентрации 200 нг/мл.

2.2.6 Микродиссекция метафазных хромосом, приготовление ДНК-библиотек из диссектированных участков, мечение микродиссекционных ДНК-библиотек

Микродиссекция метафазных хромосом, получение и мечение ДНК-библиотек проводили на базе ИЦиГ СОРАН под руководством и непосредственном участии Николая Борисовича Рубцова и Ильяса Еркиновича Джетыбаева.

Оригинальные ДНК-библиотеки приготовлены микроманипуляционным сбором копий XL-плеч нео-Х хромосом и проксимальных частей нео-У хромосом (ДНК-пробы *AheXl* и *AheYcen*) *Asiotmethis h. heptapotamicus* (Thrinchini; Thrinchinae); из XL-плеч нео-Х хромосом и целых нео-У хромосом *Nocaracris cyanipes* (ДНК-пробы *NcyXl* и *NcyY*), *N. tardus* (ДНК-пробы *NtaXl* и *NtaY*), *N. rubripes* (ДНК-пробы *NruXl* и *NruY*) и *Paranocarodes tolunai tolunai* (ДНК-пробы *PtoXl* и *PtoY*) (Pamphaginae, Nocarodeini). Районы половых хромосом с хромосомных препаратов собирали с помощью инвертированного микроскопа AXIOVERT 10 (Zeiss, ФРГ), оснащенного двумя микроманипуляторами для проведения микродиссекции метафазных хромосом и сбора диссектированного материала (электронно-контролируемый микроманипулятор (Zeiss, ФРГ) и микроманипулятор (Leitz, ФРГ)).

При помощи микроманипулятора с хромосомного препарата вырезали не менее 15-20 копий хромосом или их районов. Затем их переносили в капилляр, содержащий примерно 40 нл раствора, состоящего из 15 мМ Трис HCl, 15 мМ NaCl, 0,1% Triton X-100, 0,13% SDS, 0,33 мг/мл протеиназы К и 30% глицерина. Содержимое капилляра инкубировали на водяной бане 2 часа при 60°C.

Приготовление ДНК-библиотек проводили в два этапа: 8 низкотемпературных с Sequenase T7 и 33 высокотемпературных цикла с AmpliTaq, Stoffel Fragment ДНК-полимеразой. Материал после обработки на водяной бане переносили в стерильную 0,5 мл пробирку (Eppendorf, Safe Lock), содержащую 5 мкл реакционной смеси следующего состава: 0,6-кратный секвеназный буфер (24 mM Трис HCl, pH=7,5; 12 mM MgCl₂; 30 mM NaCl), 5 мкМ DOP-праймера, 200 мкМ каждого из дНТФ. Инактивацию протеиназы К проводили одновременно с начальной денатурацией ДНК диссектированного материала 6 минут при 96°C в амплификаторе фирмы Eppendorf (Mastercycler personal) при температуре крышки 105°C.

Восемь низкотемпературных циклов проводили по следующей схеме: 25°C - 2 минуты, 36°C - 2 минуты, 94°C - 1 минута. Каждый цикл добавляли 0,25 мкл фермента при 25°C. Перед добавлением Sequenase Version 2.0 (13 ед/мкл) фермент разводили в буфере, содержащем 10 mM Трис HCl (pH=7,5), 5 mM DTT, 0,5 мг/мл БСА в соотношении 1:8. После завершения 8-го цикла добавляли 50 мкл реакционной смеси, содержащей 1×Stoffel буфер, 200 мкМ дНТФ, 1 мкМ DOP-праймера, 2,5 mM MgCl₂ и 5 ед. AmpliTaq, Stoffel Fragment ДНК-полимеразы. Затем эту смесь инкубировали 2 минуты при 94°C. После этого проводили 33 высокотемпературных цикла ПЦР: при 94°C – 1 минута; 56°C – 1 минута 30 секунд; 72°C – 2 минуты. По окончании циклов содержимое пробирки инкубировали в течение 8 минут при 72°C для полного завершения элонгации цепей. Все ПЦР проводили в амплификаторе фирмы Eppendorf (Mastercycler personal) с горячей крышкой (105°C). Качество и количество амплифицированного продукта проверяли методом электрофореза в 1,5% агарозном геле. На старт наносили 1/10 объема реакционной смеси. Гель окрашивали бромистым этидием (0,1 мкг/мл). Прокрашенный гель смотрели на трансиллюминаторе (Biometra).

Выделенную ДНК метили в 17 циклах полимеразной цепной реакции. Для этого 1 мкл реакционной смеси, в которой была получена ДНК-библиотека, добавляли к 20 мкл ПЦР-смеси: 10 mM Трис HCl, 50 mM KCl (pH=8,3), 200 мкМ дАТФ, дЦТФ, дГТФ и 100 мкМ дТТФ и 100 мкМ биотин-16-дУТФ или дигоксигенин-11-дУТФ, 2 мкМ DOP-праймера, 2,5 mM MgCl₂ и 1,5 ед. Ampli Taq ДНК полимеразы. ПЦР проводили в режиме: денатурация 94°C – 1 минута; отжиг 56°C - 1,5 минуты; элонгация цепей при 72°C – 2 минуты; с завершающей элонгацией цепей при 72°C – 8 минут. Меченые продукты анализировали методом электрофореза в 1,5% агарозном геле. На старт наносили 2 мкл реакционной смеси.

Полученные ДНК-пробы метили в дополнительных 25 циклах ПЦР с добавлением в реакционную смесь красителей Tamra-5-dUTP и Fluorescein-12-dUTP.

ДНК-пробы *AheXl* и *AheYcen* полученные из половых хромосом *Asiotmethis h. heptapotamicus* (Thrinchini, Thrinchinae) гибридизовали с хромосомами *Asiotmethis muricatus* (X0), *A. h. heptapotamicus* (neo-XY), *A. turittus* (neo-XY), *A. limbatus* (neo-XY), *Glyphotmethis*

adaliae (X0), *G. dimorfus* (neo-XY), *G. holtzi pukhripes* (neo-XY) и *G. efe* (neo-XY) (Thrinchini, Thrinchinae).

ДНК-пробы *NcyXl*, *NcyY*; *NtaXl*, *NtaY*; *NruXl*, *NruY*; *PtoXl*, *PtoY* полученные из половых хромосом *Nocaracris cyanipes*, *N. tardus*, *N. rubripes* и *Paranocarodes tolunai tolunai* (Pamphaginae, Nocarodeini) гибридизовали с хромосомами *Nocaracris cyanipes*, *N. rubripes*, *N. tardus*, *N. citripes*, *N. idrisi*, *N. sureyana*, *N. furvus*, *Paranocarodes t. tolunayi*, *P. anatoliensi*, *P. turkmen* и *P. karabagi* (все виды с нео-XY типом определения пола) (Pamphaginae, Nocarodeini).

Анализ локализации в хромосомах последовательностей, гомологичных полученным ДНК-пробам выполнен с помощью флуоресцентной *in situ* гибридизации. Метод впервые применён для анализа молекулярной композиции половых хромосом саранчовых семейства Pamphagidae.

2.2.7 Анализ хромосомных наборов

Для анализа хромосомных наборов Pamphagidae из семенных фолликулов самцов и эмбриональной ткани каждого исследованного в данной работе вида, было приготовлено не менее 15 хромосомных препаратов. На полученных препаратах анализировали не менее 10-15 клеток на разных стадиях деления ядра.

Подсчет числа и определение морфологии хромосом при анализе хромосом полученных из семенных фолликулов самцов проводили на стадиях сперматогониальной, первой и второй метафаз мейоза.

При описании кариотипов нами принята классификация размерных классов хромосом Pamphagidae в соответствии с работой Хуана Педро Мартинес Камачо с соавторами (Camacho et al., 1981). По принятой классификации, аутосомы пронумерованы в порядке убывания размера (1–9 у видов с X0 и 1–8 у видов с XY) и разделены на три размерные группы: L – большие, M – средние и S – мелкие. Морфологию хромосом определяли согласно традиционной классификации, основанной на соотношении длин плеч и положению центromеры. Традиционно выделяют следующие типы хромосом: метацентрические, когда центromера располагается посередине хромосомы и плечи практически равной длины; субметацентрические, когда центromера располагается ближе к концам хромосомы и плечи не равной длины; акроцентрические, когда центromера располагается очень близко к одному из концов хромосомы, второе плечо может быть очень маленьким. При анализе и описании морфологии нео-половых хромосом мы использовали терминологию предложенную Майклом Джеймсом Уайтом (White, 1940). Согласно ей, в субметацентрической нео-X хромосоме выделяют короткие (XL) и длинные (XR) плечи. Короткое плечо (XL) соответствует исходной акроцентрической X хромосоме, а длинное плечо (XR) транслоцированной акроцентрической

аутосоме. Не слившаяся аутосома, гомологичная длинному XR-плечу нео-X хромосомы, остается акроцентрической хромосомой и представляет собой нео-Y-хромосому (White, 1940). Множественные комплексы половых хромосом (нео- X_1X_2Y) описывали, используя номенклатуру, ранее использованную в работах White, 1973; Hewitt, 1979; Blackman, 1995. Согласно этой номенклатуре в метацентрической нео- X_1 хромосоме выделяют XL-плечо, гомологичное исходной акроцентрической X хромосоме и XR-плечо которое гомологично вступившей в первое слияние акроцентрической аутосоме. Метацентрическая нео-Y имеет YL-плечо, которое гомологично исходной нео-Y хромосоме и YR-плечо, которое является гомологом второй вступившей в слияние аутосомы. Оставшаяся непарной акроцентрическая аутосома является нео- X_2 хромосомой (White, 1973; Hewitt, 1979; Blackman, 1995).

Локализацию и относительные размеры блоков С-гетерохроматина на хромосомах определяли на основе ранее предложенной номенклатуры (King, John, 1980; Santos et al., 1983; Cabrero et al., 1985). При анализе блоков С-гетерохроматина обычно определяют расположение блока на хромосоме, оно может быть прицентромерным (проксимальным), интеркалярным (интерстициальным) и теломерным (дистальным). Абсолютные размеры блоков С-гетерохроматина не определяют, указывают лишь относительную величину блока. По относительному размеру блока гетерохроматина на хромосоме принято выделять средние блоки, размер которых не превышает ширину хромосомы, крупные блоки, размер которых больше ширины хромосомы и мелкие точечные блоки. Иногда на хромосоме может быть несколько рядом лежащих блоков, в таком случае говорят о множественных блоках (King, John, 1980; Santos et al., 1983; Cabrero et al., 1985; Бугров и др., 1991).

Аналогично описывают локализацию кластеров рибосомной и теломерной ДНК-проб. При анализе описывали кластеров рибосомной и теломерной ДНК-проб расположение этих маркёров на хромосоме. Стандартно выделяют прицентромерное, интеркалярное и теломерное положение данных молекулярных кластеров на хромосоме. В некоторых случаях указывают относительные размеры и интенсивность сигнала кластеров последовательностей ДНК (Cabrero, Camacho, 2008; Grozeva et al., 2011; Jetybayev et al., 2012; Maryańska-Nadachowska et al., 2013; Bugrov et al., 2016; Kuznetsova et al., 2017).

2.2.8 Микроскопический анализ

Предварительный микроскопический анализ хромосомных препаратов проведен в лаборатории кафедры общей биологии и экологии (НГУ) на микроскопе AxioStar plus (Zeiss, ФРГ). Микрофотографии полученных хромосомных пластинок были сделаны 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).

2.2.9 Компьютерная обработка микродиссекционных FISH изображений

Компьютерная обработка полученных в результате кросс-гибридизации FISH изображений проведена в ИЦиГ СО РАН при непосредственном участии А. Г. Богомолова и И. Е. Джетыбаева.

Геномы саранчовых содержат очень большое количество диспергированных повторённых последовательностей ДНК, которые не позволяют получить качественные хромосомоспецифичные ДНК-пробы (Bensasson et al., 2001). Большое количество диспергированных повторов в хромосомах саранчовых приводит к появлению интенсивного сигнала не только в тех районах или хромосомах, из которых были получены ДНК-пробы, но и во многих других районах и хромосомах. Для молекулярно-цитогенетического анализа хромосом млекопитающих эта проблема решается с помощью супрессии повторенных последовательностей Cot2 ДНК (CISS-гибридизация, от англ. «Chromosomal *In Situ* Suppression Hybridization») (Trifonov et al., 2017). Попытка использовать этот методический прием для подавления интенсивности диспергированных повторов у саранчовых не дала хороших результатов (Jetybayev et al., 2016b). Альтернативным методом подавления интенсивности диспергированных повторов в хромосомах при проведении гибридизации является компьютерная обработка полученных FISH-изображений с помощью различных программ (Rens et al., 2006). Для улучшения визуализации полученных нами FISH изображений мы использовали разработанный Антоном Геннадьевичем Богомоловым оригинальный компьютерный метод VISSIS (Visualization of Specific Signal *in Silico*, патент 2018662647, Visualization chromosome-specific signals in FISH-images (VisualCS)).

Компьютерный метод VISSIS основан на следующем принципе формирования изображений. На полученном FISH изображении обычно выделяют три типа сигналов: специфический, неспецифический и фоновый. Специфическим является FISH сигнал, полученный с последовательностей, представленных только в хромосоме, из которой были получены ДНК-пробы (хромосомоспецифичные последовательности ДНК). Неспецифическим сигналом является сигнал диспергированных повторов. Фоновым сигналом считаются сигналы обусловленные сорбцией на поверхности хромосомного препарата остатков клеточной мембраны, цитоплазмы и т.д. Районам хромосом, из которых была получена ДНК-проба, соответствует сумма специфического и неспецифического сигналов. Районам остальных хромосом соответствует только неспецифический сигнал. Флуоресцентный сигнал хромосомоспецифичных последовательностей оценивается как разница между суммарным и

неспецифическим сигналами. Интенсивность неспецифического сигнала в точке оценивается по результатам гибридизации с другими ДНК-пробами (Богомолов и др., 2012; 2014).

В результате проведенной кросс-гибридизации ДНК-проб с хромосомами исследованных видов были получены микроизображения, на которых ясно виден только сигнал от диспергированных повторяющихся последовательностей ДНК. Диспергированный сигнал покрывает все хромосомы, и выявить районы гомологии ДНК-проб в хромосомах на таких изображениях очень сложно (Рисунок 8А). После компьютерной обработки полученного изображения, нам удалось выявить в хромосомах достаточно интенсивные сигналы от гибридизуемых ДНК-проб (Рисунок 8Б).

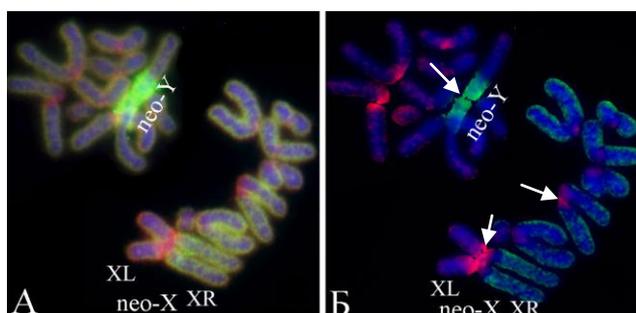


Рисунок 8. Гибридизация микродиссекционных ДНК-проб *AheXL* и *AheYcen* с мейотическими хромосомами *Asiotmethis heptapotamicus*. А – исходное FISH изображение; Б – изображение, обработанное в программе VISSIS. Красный сигнал – ДНК-проба *AheXL*; Зеленый сигнал – ДНК-проба *AheYcen*. Стрелки указывают на кластерированный сигнал.

При анализе полученных результатов гибридизации ДНК-проб с хромосомами исследованных видов можно выделить два типа сигналов. Первый тип: сигнал диспергирован по всей хромосоме. Примером такого типа является зеленый сигнал, диспергированный в аутосомах (Рисунок 8Б). Второй тип: сигнал кластерирован на определенном участке хромосомы. Примером кластерированного сигнала является интенсивный зеленый «блок» в нео-Y хромосоме, плотный красный «блок» в прицентромерном районе нео-X хромосомы и красные точечные сигналы в прицентромерных районах аутосом (Рисунок 8Б, см. на стрелки).

При описании полученных результатов проведенной кросс-гибридизации будут приведены только обработанные в программе VISSIS иллюстрации (см. Глава 3. Подглава 3.4 Кросс-гибридизация микродиссекционных ДНК-проб с аутосомами и половыми хромосомами *Pamphagidae*).

ГЛАВА 3. СРАВНИТЕЛЬНО-КАРИОТИПИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ХРОМОСОМ САРАНЧОВЫХ
PAMPHAGIDAE

В настоящей работе впервые описаны кариотипы 41 вида саранчовых Pamphagidae из трех подсемейств: Thrinchinae Stål, 1876, Pamphaginae Burmeister, 1840 и Porthetinae Bolívar, 1916. Анализ всех полученных хромосомных наборов Pamphagidae показал, что исходный кариотип, состоящий из 19 акроцентрических хромосом с X0 типом определения пола, имеют 22 вида. У остальных исследованных видов Pamphagidae выявлены изменения исходного хромосомного набора. Изменяться может только морфология хромосом (у *Eremopeza saussurei*, *E. bicoloripes*). Или морфология, число хромосом и тип определения пола (у 19 видов) ($2n♂=16+neo-XY$; $2n♂=14+neo-X_1X_2Y$). Количество хромосом в наборах может варьировать из-за наличия добавочных В-хромосом, которые были выявлены в кариотипах у *Asiotmethis heptapotamicus heptapotamicus*, *As. heptapotamicus songoricus* и *Nocaracris tardus*.

Подробная информация о числе, морфологии хромосом, типах определения пола всех исследованных в этой работе видов Pamphagidae представлена в Таблице 3.

Таблица 3. Число хромосом, тип определения пола и морфология хромосом у исследованных видов Pamphagidae

Таксон	2n♂	Определение пола	Морфология хромосом	В
Thrinchinae				
Thrinchini				
<i>Glyphotmethis adaliae</i> (Uvarov, 1928)	19	X0/XX	все acro	-
<i>Glyphotmethis dimorphus</i> (Uvarov, 1934)	18	neo-XY/neo-XX	L ₁ , L ₂ - subacro; L ₃ , L ₄ , M ₅ -M ₇ , S ₈ , neo-Y - acro; neo-X - meta	-
<i>Glyphotmethis efe</i> Ünal, 2007	18	neo-XY/neo-XX	все acro; neo-X - submeta	-
<i>Glyphotmethis holtzi pulchripes</i> (Uvarov, 1943)	18	neo-XY/neo-XX	все acro; neo-X - submeta	-
<i>Asiotmethis muricatus</i> (Pallas, 1771)	19	X0/XX	все acro	-
<i>Asiotmethis tauricus</i> (Tarbinsky, 1930)	19	X0/XX	все acro	-
<i>Asiotmethis heptapotamicus heptapotamicus</i> (Zubovski, 1898)	18	neo-XY/neo-XX	все acro; neo-X - submeta	0- 2
<i>Asiotmethis heptapotamicus songoricus</i> Shumakov, 1949	18	neo-XY/neo-XX	все acro; neo-X - submeta	0- 2
<i>Eremopeza saussurei</i> (Uvarov, 1918)	19	X0/XX	L ₁ -L ₄ ; M ₅ , M ₇ - subacro; M ₆ , S ₈ -S ₉ , X - acro	-
<i>Eremopeza bicoloripes</i> (Moritz, 1928)	19	X0/XX	все acro; X - submeta	-
<i>Tmethis cisti</i> (Fabricius, 1787)	19	X0/XX	все acro	-
Pamphaginae				
Nocarodeini				
<i>Nocaracris idrisi</i> (Karabağ, 1956)	18	neo-XY/neo-XX	все acro; neo-X - submeta	
<i>Nocaracris sureyana</i> (Ramme, 1951)	18	neo-XY/neo-XX	все acro; neo-X - submeta	-
<i>Nocaracris citripes</i> (Uvarov, 1949)	18	neo-XY/neo-XX	все acro; neo-X - submeta	-
<i>Nocaracris furvus furvus</i> Mishchenko, 1951	18	neo-XY/neo-XX	все acro; neo-X - submeta	-
<i>Nocaracris tardus</i> Ünal et al. 2016	18	neo-XY/neo-XX	все acro; neo-X - submeta	0- 4

Таксон	2n♂	Определение пола	Морфология хромосом	В
<i>Paranocarodes turkmen</i> Ünal, 2014	18	neo-XY/neo-XX	все ахро; neo-X - submeta	-
<i>Paranocarodes straubei paphlagonicus</i> Ramme, 1951	18	neo-XY/neo-XX	все ахро; neo-X - submeta	-
<i>Paranocarodes tolunayi tolunayi</i> Ramme, 1949	18	neo-XY/neo-XX	все ахро; neo-X - submeta	-
<i>Paranocarodes anatoliensis anatoliensis</i> Demirsoy, 1973	18	neo-XY/neo-XX	все ахро; neo-X - submeta	-
<i>Paranocarodes karabagi</i> Demirsoy, 1973	18	neo-XY/neo-XX	все ахро; neo-X - submeta	-
<i>Nocarodes armenus</i> Ramme, 1951	18	neo-XY/neo-XX	все ахро; neo-X - submeta	-
<i>Paranothrotres citimus</i> Mistshenko, 1951	14	neo-X ₁ X ₂ Y/ neo-X ₁ X ₁ X ₂ X ₂	все ахро; neoX ₁ , neo-Y - submeta	-
Tropidauchenini				
<i>Saxetania paramonovi</i> (Dirsh, 1927)	19	X0/XX	все ахро	-
<i>Tropidauchen escalerae</i> Bolívar, 1912	18	neo-XY/neo-XX	все ахро; neo-X - submeta	-
<i>Tropidauchen</i> sp.	18	neo-XY/neo-XX	L ₁ , L ₂ , L ₃ , M ₄ , M ₅ , S ₇ , S ₈ ахро; L ₄ subacro; neo-X - submeta	-
Euryparyphini				
<i>Paraeumigus fortius</i> (Bolívar, 1907)	19	X0/XX	все ахро	-
<i>Paraeumigus parvulus</i> (Bolívar, 1907)	19	X0/XX	все ахро	-
<i>Euryparyphes flexuosus</i> Uvarov, 1927	19	X0/XX	все ахро	-
<i>Eunapiodes atlantis</i> (Chopard, 1943)	19	X0/XX	все ахро	-
<i>Eunapiodes granosus</i> (Stål, 1876)	19	X0/XX	все ахро	-
<i>Euryparyphes rungsi</i> Massa, 2013	19	X0/XX	все ахро	-
Pamphagini				
<i>Pseudoglauia terrea</i> (Bolívar, 1912)	19	X0/XX	все ахро	-
<i>Pseudoglauia tarudantica</i> (Bolívar, 1914)	19	X0/XX	все ахро	-
<i>Acinipe tubericollis</i> Werner, 1932	19	X0/XX	все ахро	-
<i>Acinipe hesperica lepineyi</i> Chopard, 1943	19	X0/XX	все ахро	-
<i>Paracinipe alticola</i> (Werner, 1932)	19	X0/XX	все ахро	-
<i>Paracinipe crassicornis</i> (Bolívar, 1907)	19	X0/XX	все ахро	-
<i>Paracinipe dolichocera</i> (Bolívar, 1907)	19	X0/XX	все ахро	-
<i>Paracinipe theryi</i> (Werner, 1931)	19	X0/XX	все ахро	-
Porthetinae				
<i>Lobosceliana</i> sp.	19	X0/XX	все ахро	-

Условные обозначения в таблице: ахро – акроцентрическая хромосома; subacro – субacroцентрическая хромосома; submeta – субметацентрическая хромосома; meta – метацентрическая хромосома; X, neo-X, neo-Y – половые хромосомы; В – добавочные хромосомы; L – большая хромосома; М – средняя хромосома; S – мелкая хромосома; Цифрами (1–9) обозначены номера пар аутосом

3.1. Число, морфология хромосом и типы определения пола у саранчовых Pamphagidae

В результате проведенного сравнительно-кариологического анализа кариотипов Pamphagidae было выявлено несколько вариантов хромосомных наборов.

Исходный для Pamphagidae кариотип, состоящий из 19 акроцентрических хромосом с $X0♂$ типом определения пола, установлен у 22 из 41 исследованного вида (Таблица 3). Считается, что такой кариотип образовался из предкового для Acridoidea 23 хромосомного набора, в результате Робертсоновских слияний двух пар акроцентрических хромосом с последующим восстановлением акроцентрической морфологии двуплечих хромосом путём перичентрических инверсий (White, 1973). Данный кариотип имеют 4 вида из подсемейства Thrinchinae: *Glyphotmethis adalidae* (Турция), *Asiotmethis muricatus* (Казахстан), *As. tauricus* (Россия, Крым) и *Tmethis cisti* (Северная Африка, Марокко). В подсемействе Pamphaginae исходный кариотип был выявлен у 14 исследованных видов из Северной Африки и *Saxetania paramonovi* из Ирана. Также исходный кариотип установлен у единственного исследованного в данной работе вида из подсемейства Porthetinae: *Labosceliana* sp. (ЮАР). Хромосомные наборы всех этих видов представлены четырьмя крупными (L_1-L_4), тремя средними (M_5-M_7) и двумя (S_8-S_9) мелкими парами аутосом. X хромосома среднего размерного класса. Все хромосомы в наборе имеют акроцентрическую морфологию (Рисунок 9, 16, 17, 18, 24, 25). В целом особенности формирования хиазм в мейозе у видов со стандартным кариотипом были одинаковы. В профазе мейоза большие биваленты обычно формируют 2 или 3 хиазмы. Средние биваленты образуют две или одну хиазму. Мелкие биваленты образуют только одну хиазму (Рисунок 9, 16, 17, 18, 24, 25).

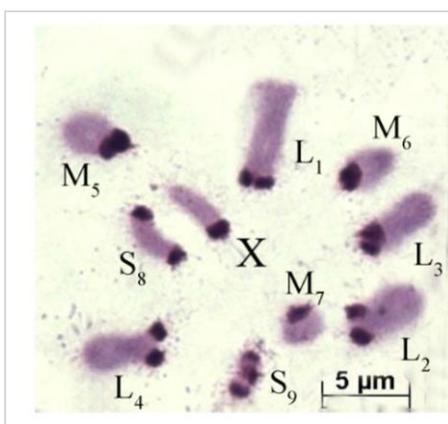


Рисунок 9. Стандартный для саранчовых Pamphagidae кариотип. Метафаза I мейоза у *Glyphotmethis adalidae*. С-дифференциальное окрашивание хромосом. Шкала: 5 мкм

В некоторых случаях у исследованных нами видов с исходным кариотипом происходит преобразование морфологии хромосом без изменения их числа и типа определения пола.

Обычно изменения морфологии хромосом в кариотипах групп с исходно акроцентрическими хромосомами связывают с перичентрическими инверсиями, которые в результате «перемещения центромеры» превращают акроцентрическую хромосому в мета-, субмета- или субacroцентрическую (White, 1951; Hewitt, 1979). Перестроенный таким образом кариотип был выявлен в подсемействе Thrinchinae у *Eremopeza bicoloripes* и *E. saussurei* (Рисунок 10). У *E. bicoloripes* изменение морфологии затрагивает только X-хромосому, которая имеет короткое второе плечо, то есть является субacroцентрической (Рисунок 10А). У *E. saussurei* все большие, средние пары аутосом (L_1 – L_4 ; M_5 – M_7) и X хромосома имеют короткие вторые плечи и являются субacroцентрическими и только две мелкие пары аутосом (S_8 – S_9) остаются акроцентрическими (Рисунок 10Б).

В профазе мейоза большие биваленты у *Eremopeza bicoloripes* и *E. saussurei* формируют 2 – 3 хиазмы. Средние биваленты обычно образуют две или одну хиазму. Мелкие биваленты образуют только одну хиазму (Рисунок 10).

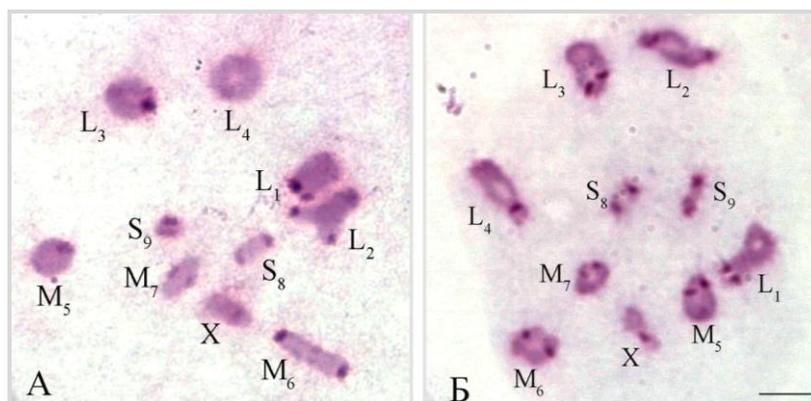


Рисунок 10. Изменение морфологии хромосом у саранчовых Pamphagidae с исходным кариотипом. С-дифференциальное окрашивание мейотических хромосом: А – *Eremopeza bicoloripes*; Б – *E. saussurei*. Шкала: 5 мкм

Большая группа исследованных Pamphagidae из подсемейств Thrinchinae (некоторые виды родов *Glyphotmethis* и *Asiotmethis*) и Pamphaginae (трибы Nocarodeini и Tropidauchenini) имеют иной вариант хромосомного набора, состоящий из 18 (σ) хромосом с нео-XY σ типом определения пола (Таблица 3). Считается, что этот вариант хромосомного набора сформировался на основе стандартного для Pamphagidae кариотипа в результате робертсоновской транслокации исходно акроцентрической X-хромосомы с одной из акроцентрических аутосом (Robertson 1916; White 1940; Hewitt 1979; Bugrov 1996). Перестройка такого типа приводит к формированию кариотипа, состоящего из 8 пар акроцентрических аутосом, двух субметацентрических нео-X хромосом у самки, одной субметацентрической нео-X и одной акроцентрической нео-Y хромосомы у самца ($2n=16$; нео-XY σ). Такой вариант

хромосомного набора был выявлен у пяти исследованных видов из подсемейства Thrinchinae (Thrinchini) и у 13 видов из подсемейства Pamphaginae (трибы Nocarodeini и Tropidauchenini). Кариотип видов из триб Thrinchini и Nocarodeini образован тремя большими (L_1-L_3), четырьмя средними (M_4-M_7) и одной мелкой (S_8) парами аутосом (Рисунок 8А, В). Кариотип видов из трибы Tropidauchenini состоит из четырех больших (L_1-L_4), двух средних (M_5-M_6) и двух мелких (S_7-S_8) пар аутосом (Рисунок 11Б).

Нео-Х хромосомы у видов триб Thrinchini, Nocarodeini и Tropidauchenini – двуплечие, образованные в результате транслокации исходной акроцентрической Х хромосомы (XL-плечо) с одной из аутосом (XR-плечо) (Рисунок 11А,Б,В). Нео-У хромосома акроцентрическая, ее размер различался у видов из разных подсемейств и триб. У видов из триб Thrinchini (Thrinchinae) и Tropidauchenini (Pamphaginae) нео-У хромосома крупная, практически равна своему гомологу XR-плечу нео-Х хромосомы (Рисунок 11А,Б). У видов из трибы Nocarodeini (Pamphaginae) нео-У хромосома значительно меньше своего гомолога XR-плеча нео-Х хромосомы (Рисунок 11В).

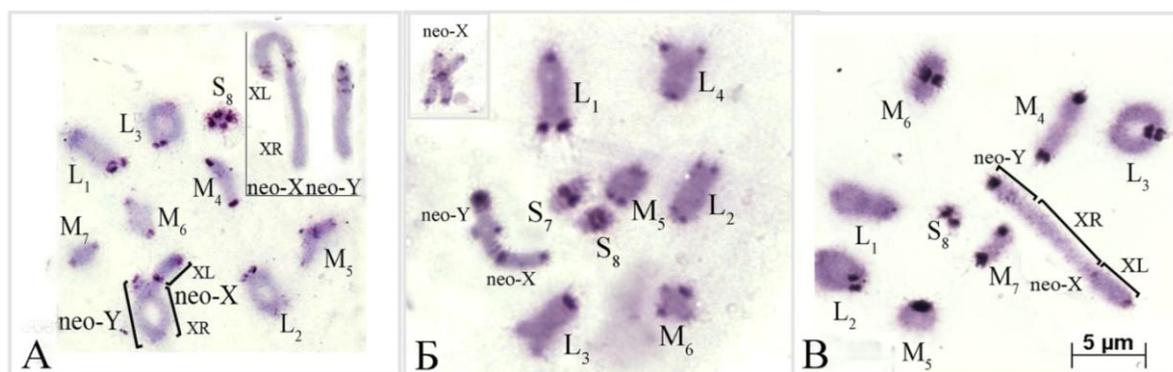


Рисунок 11. Кариотипы саранчовых Pamphagidae с нео-XY♂ типом определения пола. Метафаза I мейоза: А – *Glyptotmethis holtzi pulchripes* (Thrinchini); Б – *Tropidauchen escalerae* (Tropidauchenini); В – *Paranocarodes anatoliensis anatoliensis* (Nocarodeini). С-дифференциальное окрашивание. Шкала: 5 мкм

В профазе мейоза у видов с измененным кариотипом ($2n=16$; нео-XY♂) большие биваленты аутосом формируют 2 или 3 хиазмы, средние биваленты две или одну хиазму. Мелкие биваленты образуют одну хиазму (Рисунок 11). Основные различия в распределении хиазм в разных подсемействах и трибах касаются половых хромосом. У Thrinchini в профазе мейоза нео-У хромосома и XR-плечо нео-Х хромосомы формируют бивалент с двумя или тремя хиазмами (Рисунок 11А, 12А). У Tropidauchenini (Pamphaginae) в профазе мейоза нео-У хромосома и XR-плечо образуют одну или две хиазмы (Рисунок 11Б, 12Б). У видов трибы

Nocarodeini (Pamphaginae) в профазе мейоза XR-плечо и нео-Y хромосома образуют одну дистальную хиазму (Рисунок 11В, 12В).

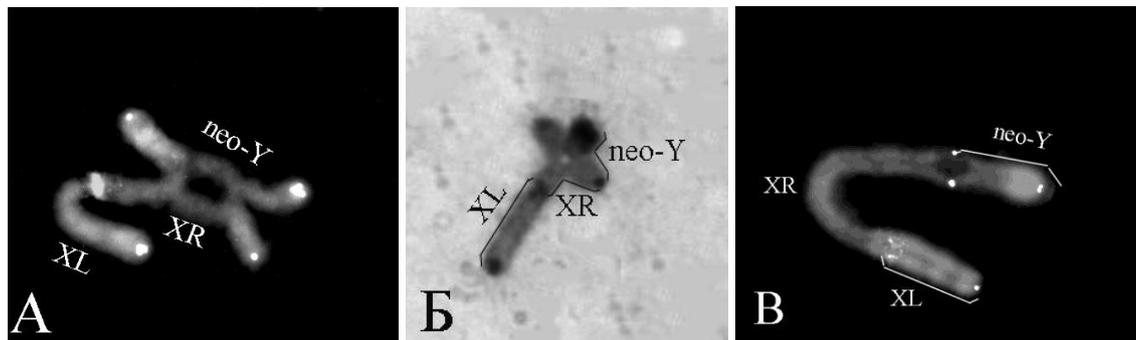


Рисунок 12. Морфология полового бивалента Pamphagidae. А – Thrinchini (Thrinchinae); Б – Tropidauchenini (Pamphaginae); В – Nocarodeini (Pamphaginae).

Аутосомы у большинства исследованных видов с нео-XY♂ типом определения пола имеют акроцентрическую морфологию. Но у *Glyphotmethis dimorphus* и *Tropidauchen* sp. выявлено изменение морфологии нескольких аутосом в наборе (Рисунок 13). У *Glyphotmethis dimorphus* первые две большие пары аутосом (L_1 и L_2) имеют маленькие плечи и являются субacroцентрическими (Рисунок 13А). У *Tropidauchen* sp. одна большая пара аутосом (L_4) имеет мелкие вторые плечи и является субacroцентрической (Рисунок 13Б).

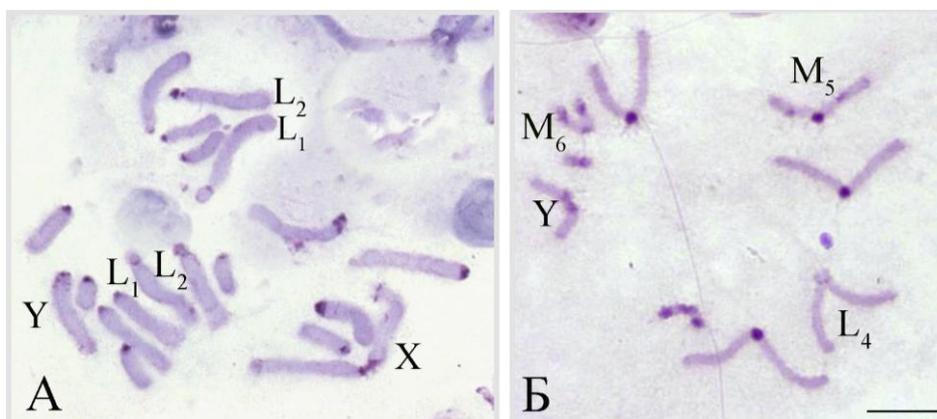


Рисунок 13. Изменение морфологии аутосом у саранчовых Pamphagidae с нео-XY♂ типом определения пола. А – Субacroцентрические L_1 и L_2 аутосомы у *Glyphotmethis dimorphus* (сперматогаональная метафаза); Б – Субacroцентрическая L_4 аутосома у *Tropidauchen* sp. (метафаза II). Шкала: 5 мкм

Следующий вариант изменения набора хромосом с нео-XY♂ типом определения пола, выявлен у *Paranothrotres citimus* (Pamphaginae, Nocarodeini). Кариотип этого вида представлен 14-ю акроцентрическими аутосомами, двумя X хромосомами и одной Y хромосомой у самца

($2n=14$; $X_1X_2Y♂$). Считается, что комплексы состоящие из нескольких пар половых хромосом ($X_1X_2X_3/X_1X_2Y$) возникают на основе образованного нео-XY♂ типа определения пола в результате еще одного центрического слияния (реципрокная транслокация) между акроцентрической нео-Y хромосомой с одной из акроцентрических аутосом (White, 1973; Hewitt, 1979; Blackman, 1995). В результате такого слияния образовался кариотип *Paranothrotres citimus* который состоит из двух больших (L_1-L_2), четырех средних (M_3-M_6) и одной мелкой (S_7) пар аутосом. Половые хромосомы у самца представлены двумя нео- X_1 и нео- X_2 хромосомами и одной нео-Y хромосомой (Рисунок 14). Все аутосомы в наборе и нео- X_2 имеют акроцентрическую морфологию. Нео- X_1 и Y-хромосомы в результате слияния становятся субметацентрическими. В субметацентрической нео- X_1 выделяют XL и XR-плечи (Рисунок 14). XL-плечо гомологично исходной акроцентрической X хромосоме, а XR-плечо является гомологом вступившей в слияние акроцентрической аутосоме. Субметацентрическая нео-Y хромосома двуплечая. В ней выделяют YL-плечо которое является гомологом исходной акроцентрической нео-Y хромосоме, а YR-плечо гомологично вступившей во второе слияние акроцентрической аутосоме. Непарная аутосома от второго слияния становится нео- X_2 хромосомой (Рисунок 14).



Рисунок 14. Хромосомы *Paranothrotres citimus* на стадии метафазы I мейоза ($2n=14$; ♂ нео- X_1X_2Y). С-дифференциальное окрашивание. Шкала: 5 мкм

В профазе мейоза аутосомы у *Paranothrotres citimus* формируют биваленты с одной или двумя хиазмами (Рисунок 14). XR-плечо нео- X_1 и YL- плечо нео-Y хромосом ассоциируют только дистальными участками, формируя одну хиазму. Нео- X_2 хромосома конъюгирует дистальным участком со своим гомологом YR-плечом нео-Y хромосомы (Рисунок 14).

Частным случаем изменения числа хромосом в кариотипе у *Paraphagidae* можно назвать наличие добавочных В-хромосом. Обычно В-хромосомы являются полиморфными и выявляются только у некоторых особей в популяции. Из всех исследованных в этой работе

видов добавочные В-хромосомы в кариотипе были выявлены у *Asiotmethis heptapotamicus heptapotamicus*, *A. heptapotamicus songoricus* (Thrinchinae, Thrinchini) и *Nocaracris* sp. (Pamphaginae, Nocarodeini) (Рисунок 15, 16). Из 20 исследованных особей *A. h. heptapotamicus* в кариотипе одного самца были выявлены две добавочные В-хромосомы, которые во время мейоза формировали нормальный бивалент (Рисунок 15А). Из пяти исследованных особей *A. h. songoricus* добавочные В-хромосомы были выявлены в кариотипах трех самцов. При этом два самца имели по две добавочные хромосомы, которые нормально конъюгировали в мейозе (Рисунок 15Б), а один самец имел одну добавочную В-хромосому представленную унивалентом. У *Asiotmethis h. heptapotamicus* и *A. heptapotamicus songoricus* В-хромосомы акроцентрические, среднего размера. В результате С-дифференциального окрашивания в них выявляется крупный гетерохроматиновый блок в проксимальной части (Рисунок 15).

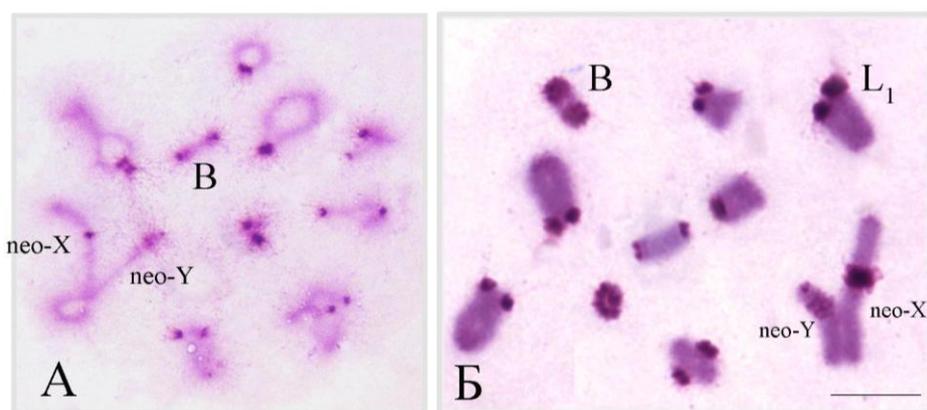


Рисунок 15. Добавочные В-хромосомы в кариотипах саранчовых *Asiotmethis* (Thrinchinae, Thrinchini). А – *A. h. heptapotamicus*, диакинез профазы I мейоза; Б – *A. heptapotamicus songoricus*, метафаза I мейоза. Шкала: 5 мкм

Из шести исследованных самцов *Nocaracris tardus* только у одного не было обнаружено добавочных хромосом. При этом в кариотипах двух самцов было обнаружено две добавочных хромосомы (Рисунок 16А). У других особей в кариотипе было выявлено четыре добавочных хромосомы (Рисунок 16Б). В-хромосомы у *Nocaracris tardus* мелкие, акроцентрические и практически полностью состоят из конститутивного гетерохроматина (Рисунок 16).

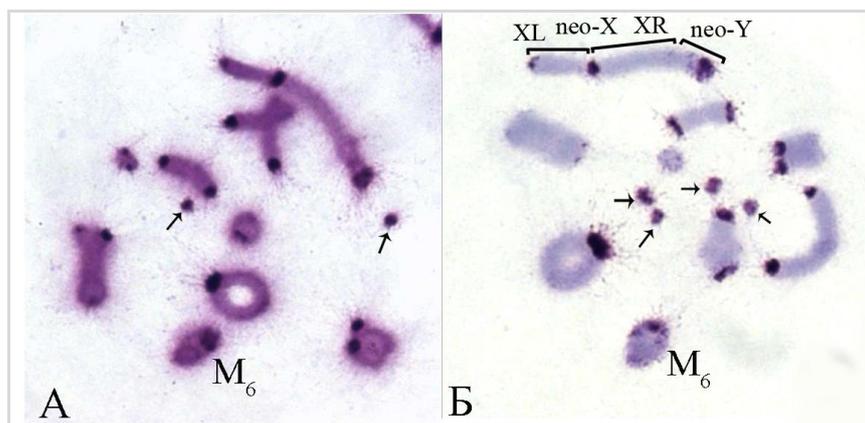


Рисунок 16. Добавочные В-хромосомы в кариотипах у *Nocaracris tardus* (Pamphaginae, Nocarodeini). Стрелки указывают на В-хромосомы.

Сравнительный анализ хромосомных наборов Pamphagidae выявил несколько вариантов их изменений, которые затрагивают как аутосомы, так и половые хромосомы. Представленное разнообразие кариотипов явно противоречит высказанному ранее мнению о том, что саранчовые семейства Pamphagidae обладают «единообразием кариотипов» (Camacho et al., 1981; Santos et al., 1983; Cabrero et al., 1985; Vitturi et al., 1993; Warchałowska-Śliwa et al., 1994 и др.). При сопоставлении полученных вариантов кариотипов и мест обитаний Pamphagidae можно отметить, что трансформация кариотипов происходит только у Pamphagidae, обитающих на территории Передней, Средней и Центральной Азии. У видов, распространенных на территории Африки и Европы, изменений кариотипов отмечено не было. Анализ кариотипических особенностей исследованных нами видов Pamphagidae позволяет предположить, что структурные изменения их хромосомных наборов произошли на территории Передней, Средней и Центральной Азии.

Для определения дополнительных маркёров эволюции кариотипов у исследованных видов саранчовых Pamphagidae, мы применили метод С-дифференциального окрашивания хромосом. Этот метод позволяет выявлять в хромосомах саранчовых блоки гетерохроматина (С-блоки) расположение которых может помочь в выявлении перестроек хромосом.

3.2. Особенности локализации блоков гетерохроматина в хромосомах Pamphagidae

Анализ С-дифференциального окрашивания хромосом у исследованных видов Pamphagidae (всего 41 вид), показал, что все хромосомы в наборе всегда имеют прицентромерные блоки С-гетерохроматина. У особей одного вида величина и локализация С-блоков в хромосомах в целом была одинакова. При сравнении величин и расположения С-позитивных блоков в аутосомах и половых хромосомах между разными видами, родами, трибами и подсемействами были отмечены некоторые различия. Особенности расположения С-

негативных блоков гетерохроматина на хромосомах у исследованных видов отображены в Приложение 3.

В пределах одного кариотипа прицентромерные С-блоки во всех хромосомах редко имеют одинаковую величину. Например, только крупные прицентромерные блоки во всех аутосомах выявлены у *G. adaliae* (Рисунок 9), *G. dimorphus* (Рисунок 13А), у видов рода *Asiotmethis* (*A. heptapotamicus heptapotamicus*, *A. heptapotamicus songoricus*, *A. muricatus*, *A. tauricus*) (Рисунок 15, 14) и *Eremopezsa saussurei* (Рисунок 10Б).

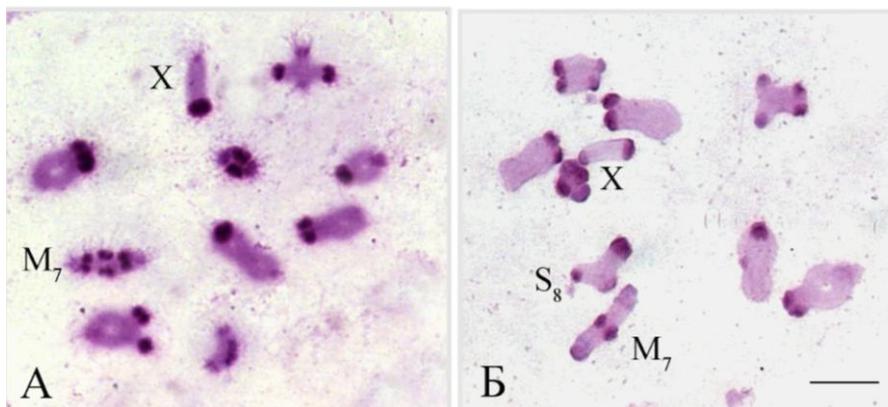


Рисунок 17. С-дифференциальная окраска мейотических хромосом: А – *Asiotmethis tauricus*; Б – *A. muricatus*. Шкала: 5 мкм

У большинства исследованных Рамфagini в пределах одного кариотипа в разных парах хромосом прицентромерные блоки имеют разную относительную величину (большие, средние и мелкие блоки) (Рисунок 10, 11, 14, 16, 18, 19, 20, 21, 22). Большие и мелкие пары аутосом в кариотипах Рамфagini чаще всего имеют крупные и средние прицентромерные блоки (Рисунок 11, 18, 22). Иногда прицентромерные блоки в гомологичных парах аутосом различаются по величине С-позитивного района. Например, у *Asiotmethis muricatus* в одной из хромосом S_8 пары, прицентромерный С-блок крупного размера, а её гомолог, имеет С-блок среднего размера (Рисунок 17Б). У *A. heptapotamicus songoricus* и *Saxetania paramonovi* полиморфизм по размеру прицентромерного блока отмечен в первой (L_1) паре аутосом (Рисунок 15Б, 18).

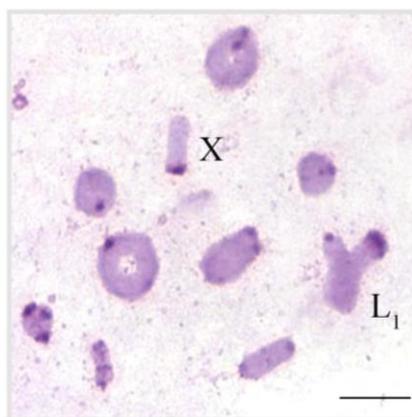


Рисунок 18. С-дифференциальная окраска мейотических хромосом *Saxetania paramonovi*. Шкала: 5 мкм

Прицентромерные блоки в X и нео-X хромосомах в кариотипах у видов из разных подсемейств и триб имеют различную величину. У видов триб *Euryaryphini* и *Pamphagini* (Pamphaginae), прицентромерный блок в X хромосоме был в основном мелким и средним (Рисунок 19).

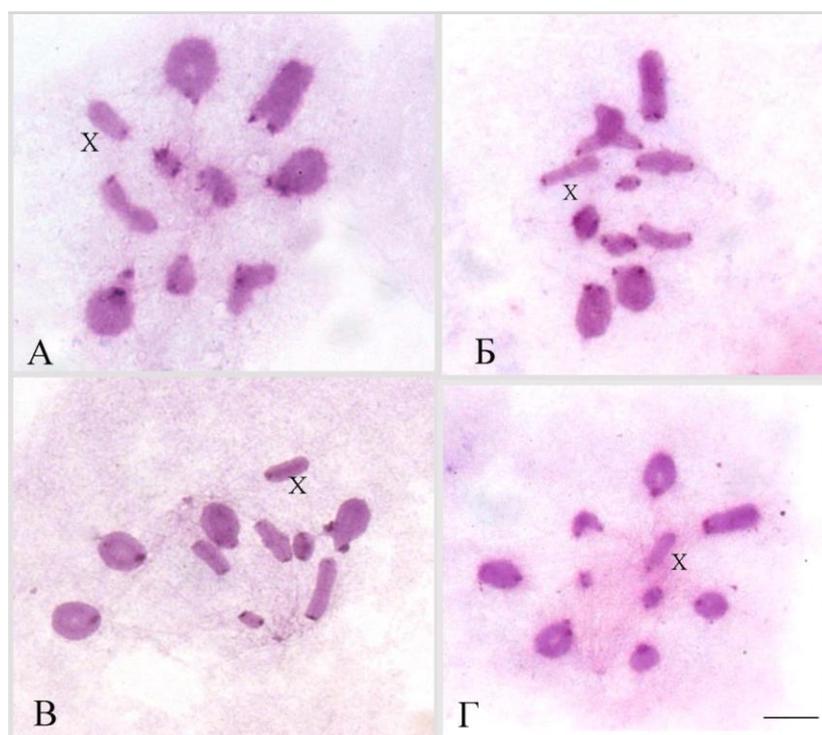


Рисунок 19. С-дифференциальная окраска мейотических хромосом видов *Euryaryphini* (Pamphagidae) с X0 типом определения пола. А – *Eunapiodes granosus*; Б – *Euryaryphes rungsi*; В – *Paraeumigus parvulus*; Г – *Paraeumigus fortius*. Шкала: 5 мкм

У видов трибы Thrinchini (Thrinchinae) прицентромерный блок в X и нео-X-хромосомах был крупным (Рисунок 9, 10; 11А, 15, 17, 20).

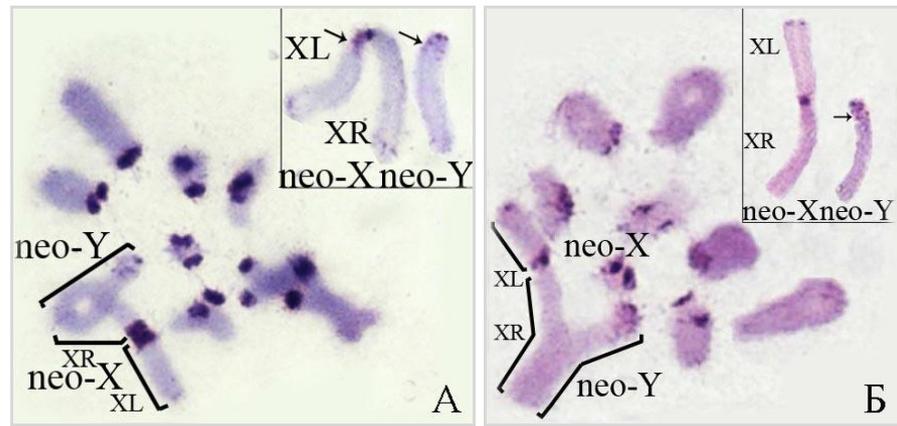


Рисунок 20. С-дифференциальная окраска мейотических хромосом видов *Thrinchini* (Thrinchinae) с нео-XY типом определения пола. А – *Glyphotmethis dimorphus*; Б – *G. efe*. Стрелки указывают на интеркалярные блоки гетерохроматина в половых хромосомах.

У видов трибы Tropidauchenini (Pamphaginae) прицентромерный блок в X и нео-X хромосоме был крупного или среднего размера (Рисунок 11Б, 18; 21).

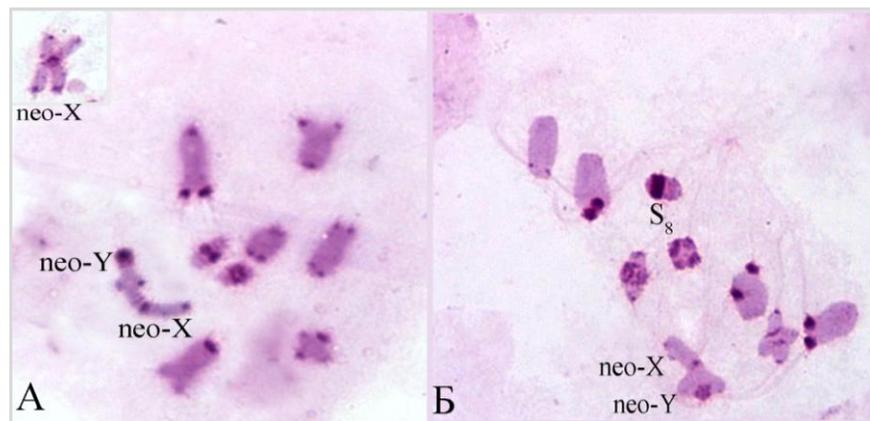


Рисунок 21. С-дифференциальная окраска мейотических хромосом видов трибы Tropidauchenini (Pamphaginae) с нео-XY типом определения пола. А – *Tropidauchen escaleraei*, в верхнем левом углу показана метацентрическая нео-X хромосома; Б – *Tropidauchen* sp.

У видов трибы Nocarodeini (Pamphaginae) размер С-позитивного блока в прицентромерном районе нео-X хромосомы был крупным и средним у представителей рода *Nocaracris* (Рисунок 16, 22А, Б, 23А,Б). У видов родов *Paranocarodes* и *Nocarodes*, прицентромерный блок в нео-X хромосоме был средним и мелким (Рисунок 11В, 22В, Г, Д, Е, 23В).

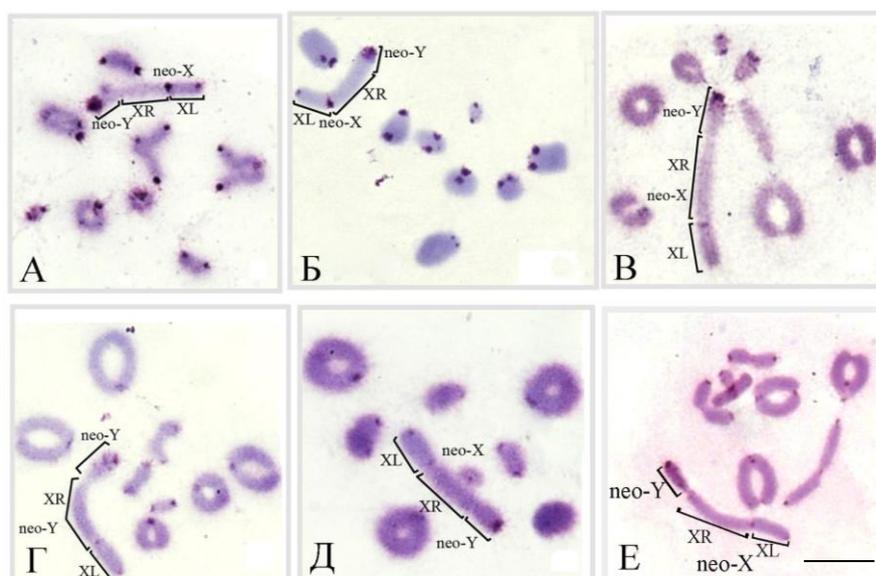


Рисунок 22. С-дифференциальная окраска мейотических хромосом у видов трибы Nocarodeini (Pamphaginae) с нео-XY типом определения пола. А – *Nocaracris citripes*; Б – *Nocaracris idrisi*; В – *Paranocarodes karabagi*; Г – *Paranocarodes straubei*; Д – *Paranocarodes turkmen*; Е – *Nocarodes armenus*.

При сравнении величин прицентромерного блока в нео-Y хромосоме между видами из триб Thrinchini (Thrinchinae), Tropidauchenini и Nocarodeini (Pamphaginae), были отмечены специфические для каждой группы особенности. У видов Thrinchini нео-Y хромосома имеет средний прицентромерный блок (Рисунок 11А, 15, 20). У Nocarodeini и Tropidauchenini прицентромерный блок нео-Y крупный (Рисунок 11Б,В, 16, 21, 22, 23).

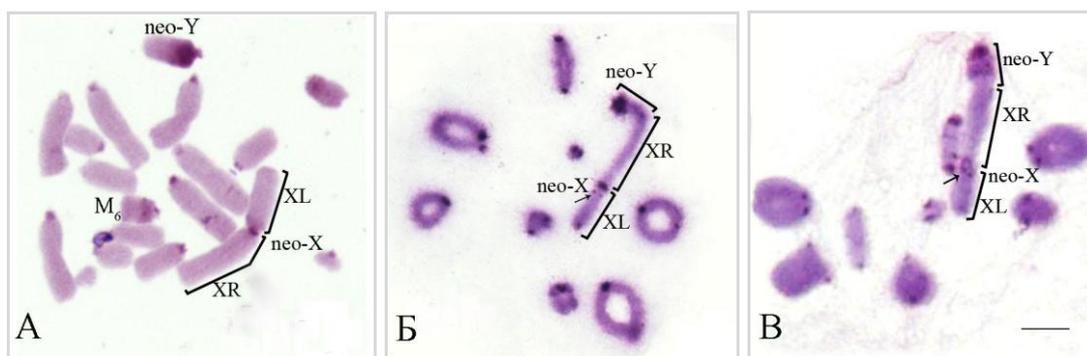


Рисунок 23. С-дифференциальная окраска хромосом видов трибы Nocarodeini (Pamphaginae). А – *Nocaracris furvus furvus* (митоз), Б – *Nocaracris sureyana* (метафаза I мейоза); В – *Paranocarodes tolunayi tolunayi* (метафаза I мейоза). Стрелки указывают на интеркалярные блоки гетерохроматина в XL-плече. Шкала: 5 мкм

У *Paranothrotres citimus* (нео- X_1X_2Y тип определения пола), YL-плечо метацентрической нео-Y хромосомы полностью гетерохроматинизировано, поэтому определить границы прицентромерного блока сложно (Рисунок 14, 24).

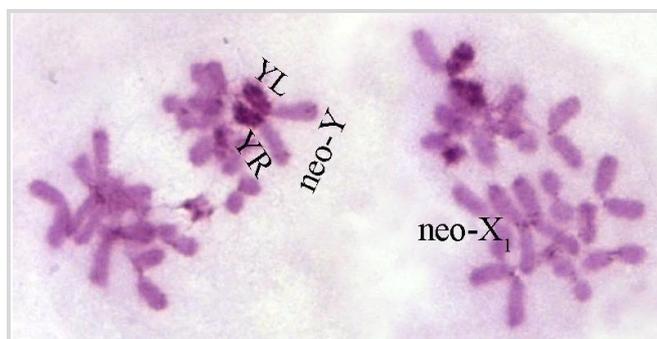


Рисунок 24. С-дифференциальная окраска мейотических хромосом (анафаза I) *Paranothrotres citimus* (нео- X_1X_2Y тип определения пола).

Интеркалярные блоки гетерохроматина в аутосомах были выявлены у 13 из 41 исследованного вида (Приложение 3). Число аутосом, в которых отмечены интеркалярные С-блоки, у разных видов Pamphagidae различно. Например, у *Asiotmethis muricatus*, *A. tauricus*, *Nocaracris f. furvus* интеркалярные блоки выявлены в одной средней паре аутосом (Рисунок 17, 23А). У *Nocaracris citripes* (L_2 , M_4 , M_5) (Рисунок 22А) и *Tropidauchen* sp. (M_5 , M_6 , S_8) (Рисунок 21Б, 27), интеркалярные С-блоки выявлены в трех парах аутосом. У *Acinipe hesperica lepineyi*, интеркалярные С-блоки, располагаются в четырех (L_2 , L_3 , L_4 , M_6) парах аутосом (Рисунок 26Б). Чаще всего интеркалярные блоки у исследованных видов Pamphagidae локализованы в первых двух больших (L_1 , L_2) и двух средних (M_5 , M_6) парах аутосом. Обычно интеркалярные блоки гетерохроматина у Pamphagidae располагаются около прицентромерного района (Рисунок 23А, 25А). Реже, интеркалярные блоки локализованы в средней части хромосомы (Рисунок 13Б, 25Б).

Величина интеркалярных С-блоков в аутосомах у исследованных Pamphagidae различна. Иногда интеркалярные блоки в хромосоме крупные, как например, у *Asiotmethis tauricus* (M_7) (Рисунок 17А), *Paracinipe dolichocera* (L_4 , M_6) и *Paracinipe alticola* (L_1 , L_2 , L_4) (Рисунок 25).

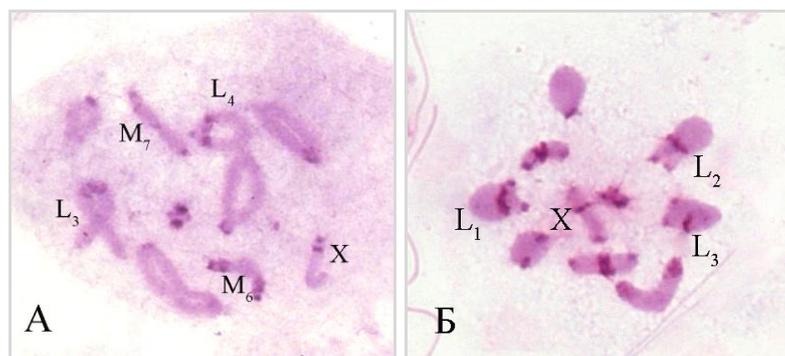


Рисунок 25. С-дифференциальная окраска мейотических хромосом Pamphagidae с X0 типом определения пола. А – *Paracinipe dolichocera*; Б – *Paracinipe alticola*. Номерами обозначены пары аутосом с интеркалярными блоками.

Чаще всего размер интеркалярных блоков в хромосомах Pamphagidae средний или мелкий, как, например, у *Pseudoglauiia terrea* (M_6), *Acinipe hesperica lepineyi* (L_1 , L_2 , L_4 , M_6), *Paracinipe crassicornis* (L_2) (Рисунок 26) и других Pamphagidae (Рисунок 13Б, 23А(M_6)).

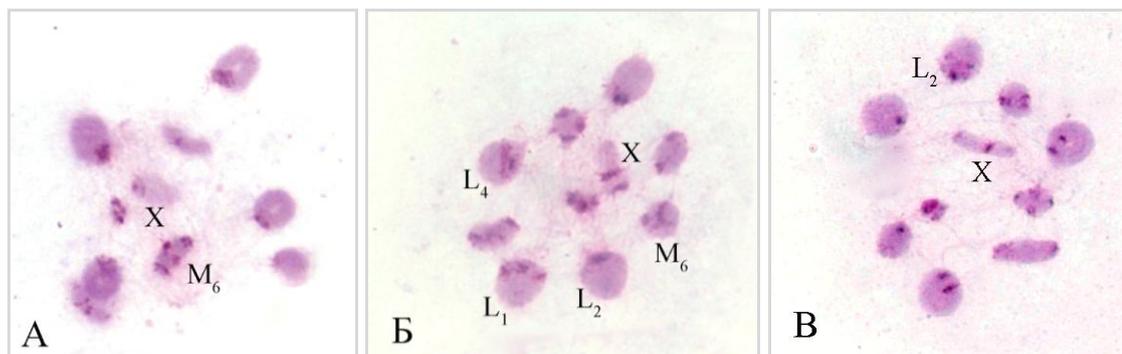


Рисунок 26. С-дифференциальная окраска мейотических хромосом Pamphagidae с X0 типом определения пола. А – *Pseudoglauiia terrea*; Б – *Acinipe hesperica lepineyi*; В – *Paracinipe crassicornis*. Номерами обозначены пары аутосом с интеркалярными блоками.

Иногда интеркалярный С-блок локализован только в одном из гомологов. Например, у *Paracinipe dolichocera* интеркалярный блок выявлен в одном гомологе L_3 и M_7 (Рисунок 25А), у *Paracinipe alticola* в L_3 (Рисунок 25Б).

У одного из трех исследованных самцов *Tropidauchen* sp. отмечен полиморфизм по величине интеркалярного блока в мелкой S_8 паре аутосом (Рисунок 27). Интеркалярный блок в одном гомологе S_8 аутосомы очень большого размера, в другом гомологе, он состоит из нескольких мелких (2-3) интеркалярных блоков (Рисунок 24А). У двух других самцов *Tropidauchen* sp., S_8 пара аутосом имеет мелкие интеркалярные блоки в обоих гомологах (Рисунок 27Б).

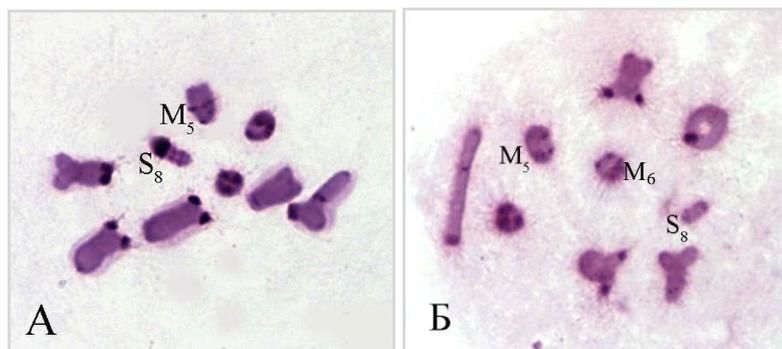


Рисунок 27. Интеркалярные блоки гетерохроматина на S_8 паре аутосом в кариотипах двух самцов *Tropidauchen* sp. С-дифференциальная окраска мейотических хромосом.

В X хромосоме интеркалярные блоки выявлены у *Paracinipe dolichocera*, *P. alticola*, *P. crassicornis*, *Pseudoglauiia terrea*, *Acinipe hesperica lepineyi* (Pamphagini) (Рисунок 25, 26). У *P. dolichocera*, *P. terrea* и *A. hesperica lepineyi* интеркалярный блок расположен рядом с прицентромерным районом X хромосомы (Рисунок 25А, 26А,Б). У *P. alticola* и *P. crassicornis*, С-блок локализован в средней части X хромосомы (Рисунок 25Б, 26В). У *Pseudoglauiia terrea* интеркалярный блок в X хромосоме мелкий (Рисунок 26А), у остальных видов блок средней величины.

В нео-X хромосоме у *Glyphotmethis dimorphus* (Thrinchini) (Рисунок 20А), *Nocaracris sureyana* и *Paranocarodes tolunayi tolunayi* (Nocarodeini) (Рисунок 23Б,В), выявлены мелкие, интеркалярные блоки, расположены рядом с прицентромерным районом XL-плеча нео-X хромосомы. Точечные интеркалярные блоки, в обоих плечах нео-X хромосомы, отмечены у *Tropidauchen escalerae* (Tropidauchenini) (Рисунок 11А, вклейка в левом верхнем углу).

Нео-Y хромосома имеет интеркалярные блоки у всех исследованных видов Pamphagidae, с нео-XY и нео- X_1X_2Y типами определения пола (Рисунок 11, 14, 15, 16, 20, 21, 22, 23). Интеркалярные блоки в нео-Y хромосоме, в зависимости ее конденсации в мейозе, имеют различную структуру и размер. В слабо конденсированной нео-Y хромосоме, вблизи прицентромерного С-позитивного района, можно видеть один или несколько лежащих рядом небольших интеркалярных блоков (Рисунок 11А, 15Б, 20Г). Иногда интеркалярный блок в нео-Y хромосоме состоит из мелких «глыбок» гетерохроматина, которые чередуются с эухроматином (Рисунок 22В, Е, 23В). Часто интеркалярные блоки в нео-Y хромосоме сливаются с прицентромерным районом, в результате этого образуется один большой гетерохроматиновый блок (11Б, 16, 22А, Б, 23Б).

Сравнительный анализ интеркалярных С-блоков в нео-Y хромосоме у видов из разных подсемейств и триб Pamphagidae показал гетерогенность по их относительной величине и структуре. У видов трибы Thrinchini (Thrinchinae, некоторые виды из родов *Glyphotmethis* и

Asiotmethis) нео-У хромосома имеет несколько небольших интеркалярных С-блоков, которые расположены рядом друг с другом вблизи прицентромерного района. Между блоками хорошо видны тонкие районы эухроматина (11А, 20). У видов рода *Asiotmethis* С-блок в проксимальной части нео-У хромосомы по сравнению с *Glyphotmethis* имеет больший размер (Рисунок 15).

У видов из триб Tropidauchenini и Nocarodeini (Pamphaginae) нео-У хромосома имеет большой блок гетерохроматина (Рисунок 11Б, В, 14, 16, 21, 22, 23). При анализе конденсированных стадий нео-У хромосом, видно, что сплошной интеркалярный блок состоит из нескольких мелких и средних блоков, между которыми расположены тонкие районы эухроматина (28А, В). Тогда как на конденсированных стадиях спирализации нео-У хромосом, районы гетерохроматина и эухроматина сливаются между собой, в результате этого большая часть нео-У хромосомы кажется полностью С-позитивной (Рисунок 28Б, Г).

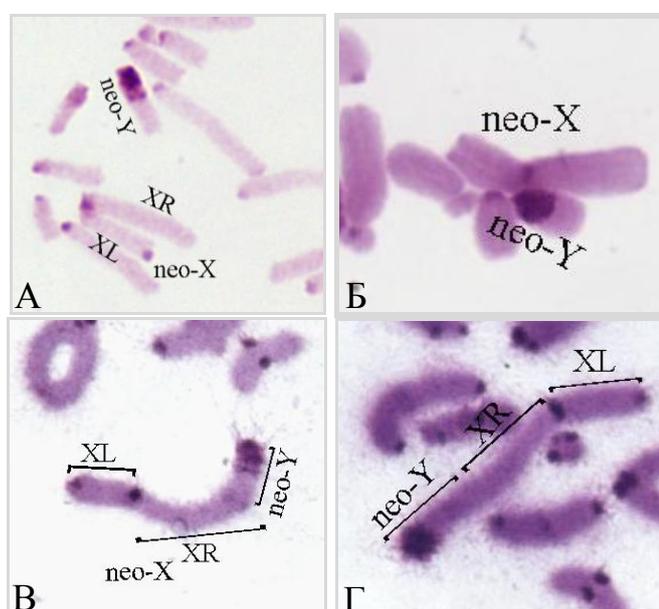


Рисунок 28. Примеры конденсации интеркалярного и прицентромерного блоков в нео-У хромосоме у Nocarodeini (Pamphaginae). А – анафаза митоза; Б – митоз; В – мейоз; Г – мейоз.

Теломерные блоки гетерохроматина в аутозомах выявлены у большинства исследованных видов (Приложение 3). Обычно, теломерные блоки локализованы в одной или двух, реже трех или четырех парах аутосом в кариотипе. Чаще всего теломерные блоки расположены в средних (M_5 , M_6 , M_7), и практически всегда в мелких (S_8 , S_9) парах аутосом (Рисунок 9, 10, 11, 14, 15, 17). Редко теломерные блоки бывают в крупных парах аутосом (Рисунок. 21А, 22А).

В X хромосоме теломерные блоки отмечены у *Asiotmethis tauricus* и *A. muricatus* (Рисунок 17). Нео-Х хромосома имеет мелкие или средние теломерные блоки в XL-плече у всех исследованных видов с нео-половыми хромосомами (Рисунок 8, 13, 17, 18, 20) кроме

Asiotmethis heptapotamicus heptapotamicus и *A. heptapotamicus songoricus* (Рисунок 15). В XL- и XR-плечах нео-X хромосом теломерные блоки отмечены у *G. dimorphus* (Рисунок 20А), *Tropidauchen escaleraei* (21А) и *Nocarodes armenus* (Рисунок 22Е). У *Paranothrotetes citimus*, мелкие теломерные блоки в обоих плечах нео-X₁ (Рисунок 14).

В результате анализа полученных результатов С-дифференциального окрашивания хромосом у всех исследованных нами видов Pamphagidae можно сделать следующее обобщение.

Прицентромерные блоки гетерохроматина выявлены во всех хромосомах, у всех исследованных нами видов Pamphagidae. У особей одного вида локализация и величина прицентромерных С-блоков на хромосомах была одинакова. У *A. muricatus*, *A. h. songoricus* и *S. paramonovi* отмечен полиморфизм по величине прицентромерного блока в одной паре аутосом.

При сравнении кариотипов разных видов, можно отметить, что прицентромерные блоки имеют разные размеры. Размер прицентромерного блока в нео-Y хромосоме в разных подсемействах и трибах различен. У видов Thrinchini (Thrinchinae) прицентромерный блок в нео-Y хромосоме мелкий или средний, а у Nocarodeini и Tropidauchenini (Pamphaginae) - крупный.

Интеркалярные блоки в аутосомах выявлены у 13 из 41 исследованного вида Pamphagidae (Приложение 3). Чаще всего интеркалярные блоки располагаются в средних (M₆, M₇) и крупных (L₁, L₂, L₄) парах аутосом, редко они локализованы на мелких (S₇, S₈) парах аутосом. В хромосомах интеркалярные блоки обычно располагаются около прицентромерного района, реже в средней части аутосомы. Размер интеркалярных блоков в хромосомах Pamphagidae в основном был мелким.

Интеркалярные блоки в X и нео-X хромосомах у Pamphagidae редки. В X хромосоме интеркалярный блок выявлен только у видов трибы Pamphagini (Pamphaginae). В XL-плече нео-X хромосом интеркалярные блоки выявлены у *Glyphotmethis dimorphus* (Thrinchini), *Nocaracris sureyana*, *Paranocarodes t. tolunayi* (Nocarodeini), *Tropidauchen escaleraei* (Tropidauchenini). В нео-Y хромосоме, интеркалярные блоки выявлены у всех исследованных Pamphagidae. Часто интеркалярный блок в нео-Y хромосоме состоит из нескольких мелких С-негативных блоков. Степень гетерохроматинизации нео-Y хромосомы среди представителей разных подсемейств варьирует. У видов Thrinchini в нео-Y хромосоме локализованы несколько мелких интеркалярных С-блоков. У видов Nocarodeini и Tropidauchenini нео-Y хромосома чаще всего содержит несколько рядом лежащих интеркалярных блоков среднего и мелкого. В

конденсированной нео-У хромосоме эти блоки сливаются между собой и с прицентромерным блоком в один большой блок.

Теломерные блоки выявлены в хромосомах у большинства исследованных Pamphagidae. В мелких парах аутосом практически всегда выявляются крупные и средние теломерные блоки. Часто теломерные блоки локализованы в средних парах аутосом, редко в крупных парах аутосом. В X хромосоме теломерный блок выявлен у *Asiotmethis tauricus* и *A. muricatus*. В XL-плече нео-X хромосомы мелкие или средние теломерные блоки выявлены практически у всех исследованных видов с нео-половыми хромосомами (за исключением *A. h. heptapotamicus* и *A. h.s songoricus*). В XR-плече нео-X хромосомы теломерные блоки выявлены у *G. dimorphus*, *T. escalerai* и *N. armenus*.

Обнаруженный нами полиморфизм по расположению и величине блоков гетерохроматина у Pamphagidae может быть результатом хромосомных перестроек. У особей одного вида различия в расположении и величине С-блоков в хромосомах могут быть связаны с генетико-стохастическими процессами в популяциях, которые поддерживают их генетическое разнообразие. Полиморфизм по расположению и величине С-блоков в хромосомах отмечали в популяциях многих Acridoidea, и в ряде случаев этот полиморфизм послужил маркером эволюционной дивергенции популяций и процессов видообразования (White, 1973; Bugrov et al., 2000). Вероятно, что и для Pamphagidae полиморфизм по С-блокам может являться отражением эволюционной дивергенции.

Нео-У хромосомы у Pamphagidae демонстрируют несколько стадий гетероморфизации. У видов из подсемейства Thrinchinae (Thrinchini, некоторые виды из родов *Glyphotmethis* и *Asiotmethis*) мы наблюдаем начальные этапы гетероморфизации половых хромосом. Нео-У хромосома, у этих видов одинакового размера со своим гомологом (XR-плечо нео-X хромосомы). В профазе мейоза нео-У хромосома и XR-плечо нео-X хромосомы рекомбинируют по всей длине формируя две или три хиазмы. Блок гетерохроматина в проксимальной части нео-У хромосомы состоит из нескольких мелких С-блоков. Гомологичное нео-У хромосоме XR-плечо нео-X хромосом не имеет С-блоков. Выявленные различия между гомологами у видов трибы Thrinchini соответствуют начальным стадиям гетероморфизации половых хромосом, описанных в классических работах по эволюции половых хромосом (Muller, 1914; Ohno 1967; Charlesworth, 1996; Charlesworth et al., 2005).

В подсемействе Pamphaginae в трибах Tropidauchenini и Nocarodeini мы наблюдаем разные стадии эволюции нео-У хромосом. У видов трибы Tropidauchenini нео-У хромосома практически одного размера с гомологичным ей XR-плечом нео-X хромосомы. В профазе мейоза нео-У хромосома и XR-плечо нео-X хромосомы рекомбинируют почти по всей длине и образуют бивалент с двумя хиазмами. В отличие от начальных стадий гетероморфизации

половых хромосом, выявленных у видов подсемейства Thrinchini (Thrinchinae), у Tropidauchenini (Pamphaginae) в прицентромерном и интеркалярном районах нео-Y хромосомы локализованы крупные C-позитивные блоки гетерохроматина. Кроме того, среди всех исследованных видов подсемейства Pamphaginae только у видов трибы Tropidauchenini был выявлен исходный (X0) тип определения пола (у *Saxetania paramonovi*). Все эти выявленные особенности позволяют говорить о том, что половые хромосомы видов Tropidauchenini являются исходным этапом эволюции гетероморфных половых хромосом в подсемействе Pamphaginae.

У всех исследованных видов трибы Nocarodeini (Pamphaginae) пол определяется только нео-половыми хромосомами. Нео-Y хромосома у видов этой трибы 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. Выявленные признаки соответствуют заключительным стадиям эволюции гетероморфных половых хромосом. Особое место занимают нео-половые хромосомы у видов с множественными половыми хромосомами. При нео-X₁X₂Y типе определения пола YL-плечо нео-Y хромосомы (исходная Y-хромосома) очень сильно гетерохроматинизирована и не содержит C-негативных районов.

Выявленные структурные особенности нео-Y хромосомы у видов подсемейства Pamphaginae позволяют проследить основные этапы эволюции нео-Y хромосомы от ее исходного состояния в трибе Tropidauchenini, до частично гетерохроматинизированной у большинства видов трибы Nocarodeini к полностью гетерохроматинизированного YL-плеча в нео-Y хромосоме у вида *Paranothrotres citimus* из этой трибы.

Возможно, что выявленные различия систем половых хромосом у видов подсемейства Pamphaginae могут отражать филогенетические отношения в ряду: Pamphagini (X0) – Tropidauchenini (X0, нео-XY) – Nocarodeini (нео-XY, нео-X₁X₂Y).

C-дифференциальное окрашивание хромосом является одним из основных методов позволяющих выявлять различия в консервативных кариотипах саранчовых. В результате C-дифференциального окрашивания хромосом у исследуемых Pamphagidae были установлены важные особенности гетерохроматинизации половых хромосом. Выявлены некоторые видовые различия в расположении C-блоков в аутосомах и половых хромосомах. Но для детального описания структурных перестроек в хромосомах Pamphagidae необходимы **более специфичные** молекулярные маркёры. Такими маркёрами могут служить теломерные последовательности и кластеры рибосомной ДНК. Дальнейший анализ эволюции половых хромосом и аутосом у саранчовых Pamphagidae связан определением районов локализации теломерного повтора (TTAGG)_n и кластеров рибосомной ДНК.

3.3. Особенности локализации теломерной (TTAGG)_n и рибосомной ДНК-проб в хромосомах Pamphagidae

Для выявления дополнительных маркёров линейной дифференциации и молекулярной композиции районов с повторёнными последовательностями ДНК в хромосомах у исследованных видов Pamphagidae применен метод флуоресцентной *in situ* гибридизации нуклеиновых кислот (FISH). В качестве ДНК-проб использованы повторы рибосомной и теломерной (TTAGG)_n ДНК. Полученные результаты локализации кластеров рибосомной ДНК и теломерного (TTAGG)_n повтора в хромосомах всех исследованных видов Pamphagidae представлены в Приложении 4.

3.3.1 Локализация теломерной (TTAGG)_n ДНК-пробы в хромосомах Pamphagidae

Анализ гибридизации теломерной ДНК-пробы с хромосомами исследованных видов показал, что у Pamphagidae как с исходным (2n=19; X0), так и изменёнными (2n=18; neo-XY♂ и 2n=14;♂neo-X₁X₂Y) кариотипами, теломерные повторённые последовательности локализованы в терминальных районах всех хромосом (Рисунок 29, 30, 31, 32).

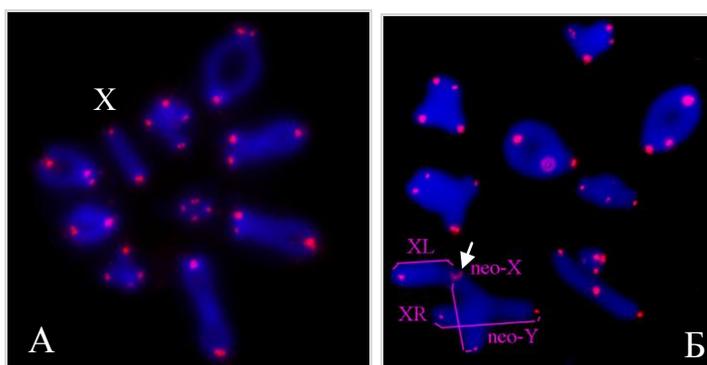


Рисунок 29. Локализация теломерного повтора (TTAGG)_n (красный сигнал) в хромосомах Pamphagidae. А – *Asiotmethis tauricus* (X0); Б – *Glyphotmethis efe* (neo-XY). Стрелка указывает на прицентромерный район нео-Х хромосомы.

У *Eremopezsa saussurei* и *E. bicoloripes* теломерные повторы выявлены не только в терминальной позиции, но и в прицентромерном районе двуплечих хромосом (Рисунок 30).

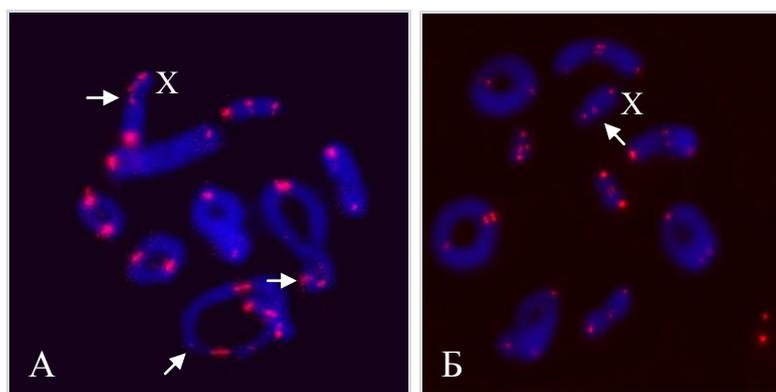


Рисунок 30. Локализация теломерного повтора (TTAGG)_n (красный сигнал) в хромосомах видов рода *Eremopezina*. А – *Eremopezina saussurei*; Б – *E. bicoloripes*. Стрелки указывают на прицентромерный район двуплечих хромосом.

Интенсивность FISH сигнала теломерной ДНК-пробы в хромосомах Pamphagidae в целом была одинакова. Но иногда в некоторых аутосомах из набора сигнал теломерной ДНК-пробы мог быть слабым (Рисунок 31А) или очень сильным (Рисунок 31Б).

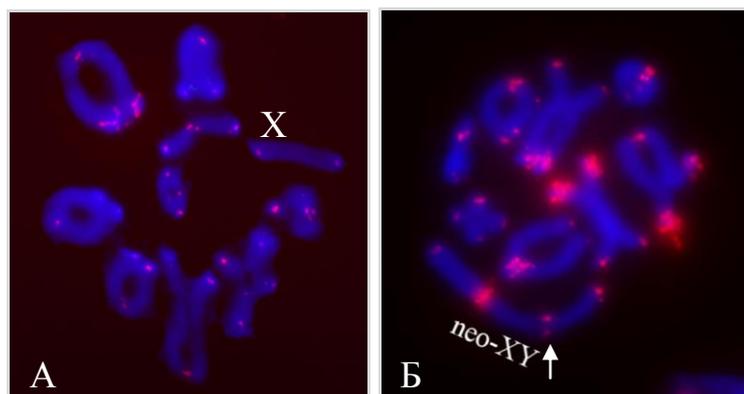


Рисунок 31. Локализация теломерного повтора (TTAGG)_n (красный сигнал) в хромосомах Pamphagidae. А – *Acinipe tuberculata* (X0); Б – *Tropidauchen* sp (neo-XY). Стрелка указывает на прицентромерный район нео-Х хромосомы.

В терминальном районе X хромосомы сигнал теломерного повтора выявлен у всех исследованных Pamphagidae с X0 типом определения пола (Рисунок 29А, 31А, 32). Иногда интенсивность сигнала в терминальном районе X хромосомы очень слабая (Рисунок 32).

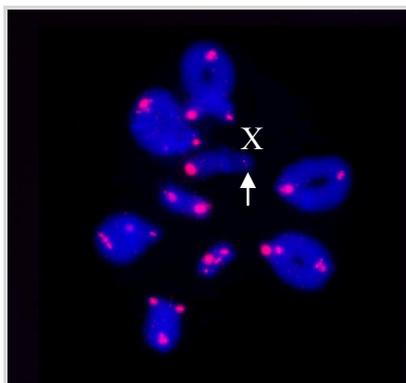


Рисунок 32. Локализация теломерного повтора (TTAGG)_n (красный сигнал) в хромосомах *Paracinipe crassicornis* (X0). Стрелка указывает на терминальный район X-хромосомы.

В прицентромерном районе нео-X, FISH сигнал теломерного повтора выявлен у *Glyphotmethis efe*, *G. holtzipulchripes* и *G. dimorphus* (Thrinchinae, Thrinchini) (Рисунок 29Б), *Tropidauchen* sp. (Pamphaginae, Tropidauchenini) (Рисунок 31Б), *Paranocarodes fieberi tolnayi* и *P. karabagi* (Pamphaginae, Nocarodeini) (Рисунок 38А, В).

3.3.2 Локализация кластеров рибосомной ДНК-пробы в хромосомах Pamphagidae

Анализ локализации кластеров рибосомной ДНК-пробы в хромосомах у исследованных нами Pamphagidae показал, что они могут быть расположены в одной, двух, трёх, четырех, пяти, шести, восьми парах аутосом, X хромосоме при X0 типе определения пола, в XL-плече нео-X хромосомы при нео-XY типе определения пола, и в XL-плече нео-X₁ хромосомы, у видов с нео-X₁X₂Y типом определения пола. На одной паре аутосом может быть локализован один (Рисунок 33), два (Рисунок 35) или три (Рисунок 34) кластера рибосомной ДНК.

В результате анализа локализации кластеров рибосомных ДНК в хромосомах Pamphagidae выявлены кариотипы в хромосомах которых есть только с один кластер рибосомной ДНК (Рисунок 33). Чаще всего в кариотипах Pamphagidae хромосомы имели как единичные так и множественные кластеры рибосомной ДНК (Рисунок 35).

Единичные кластеры рибосомной ДНК как у видов с X0, так и с нео-XY типами определения пола в пределах одного кариотипа локализованы в одной (Рисунок 33А), двух (Рисунок 33Б), трех (Рисунок 33В), четырех (Рисунок 33Г), пяти (Рисунок 33Д), шести (Рисунок 36Б) и восьми (Рисунок 33Е) парах аутосом. В хромосоме единичный кластер рибосомной ДНК может занимать прицентромерное (Рисунок 33А, В(L₂,L₄), Г(L₁,L₂), Д, Е) и интеркалярное расположение (Рисунок 33Б, В(L₃), Г(L₃,M₆)).

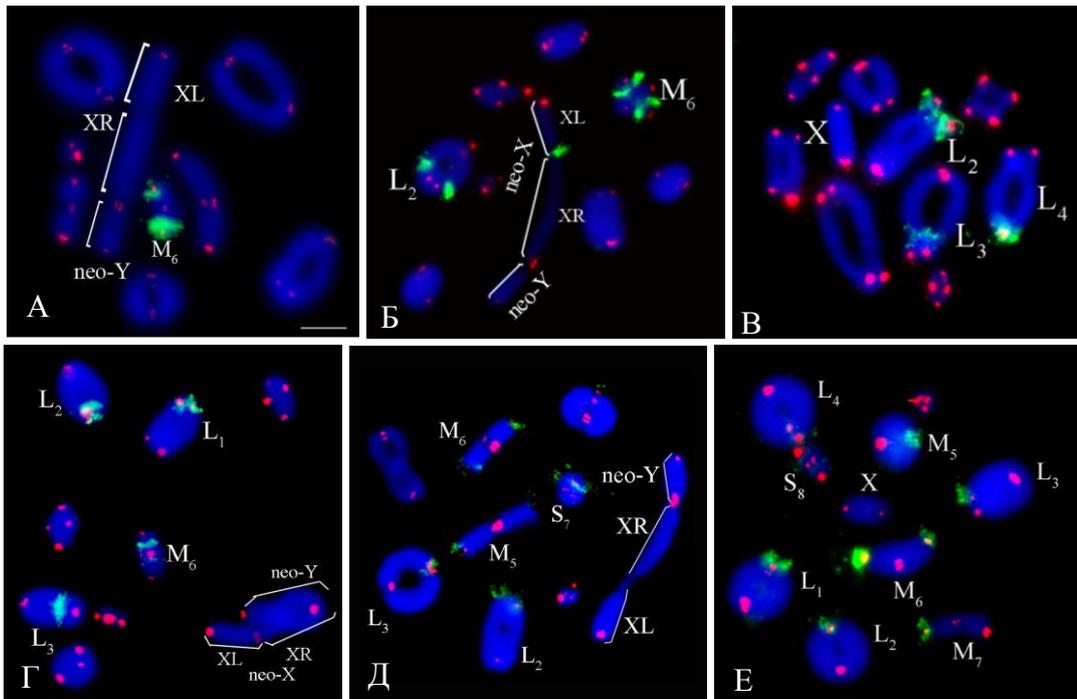


Рисунок 33. Локализация рибосомной (зеленый сигнал) и теломерной (красный сигнал) ДНК-проб в хромосомах: А – *Paranocarodes turkmen* (Pamphaginae, Nocarodeini, $2n=18$; neo-XY); Б – *Nocaracris sureyana* (Pamphaginae, Nocarodeini, $2n=18$; neo-XY); В – *Saxetania paramonovi* (Pamphaginae, Nocarodeini, $2n=19$; X0); Г – *G. efe* (Thrinchinae, Thrinchini, $2n=18$; neo-XY); Д – *Paranocarodes anatoliensis anatoliensis* (Pamphaginae, Nocarodeini, $2n=18$; neo-XY); Е – *Eretopeza saussurei* (Thrinchinae, Thrinchini, $2n=19$; X0). Пронумерованы пары аутосом с одним кластером рибосомной ДНК.

У *Pseudoglaucia terrea* (Pamphaginae, Pamphagini, $2n=19$; X0) в одной большой паре аутосом локализованы три кластера рибосомной ДНК. Один кластер локализован в терминальном районе, два кластера расположены рядом друг с другом в интеркалярном районе первой пары аутосом (Рисунок 34). На стадии метафазы мейоза интерклярные кластеры в первой паре аутосом сливаются в один большой кластер (Рисунок 34А). На стадии пахитены мейоза, между интеркалярными кластерами виден эухроматиновый район (Рисунок 34Б).

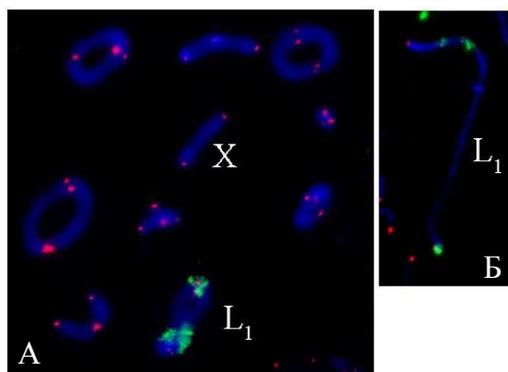


Рисунок 34. Локализация рибосомной (зеленый сигнал) и теломерной (красный сигнал) ДНК-проб в хромосомах *Pseudoglaucia terrea* (Pamphaginae, Pamphagini, $2n=19$; X0). А – метафаза I мейоза; Б – L_1 аутосома на стадии пахитены мейоза.

У большинства исследованных видов Pamphagidae, как с X0, так и с нео-XY типами определения пола в пределах кариотипа есть хромосомы как с единичными, так и с множественными кластерами рибосомной ДНК (Рисунок 35). Единичные кластеры рибосомной ДНК могут быть локализованы в любой паре аутосом (L, M, S) (Рисунок 35). Два кластера рибосомной ДНК чаще всего наблюдали в L_2 (Рисунок 35, 36А, 37А). В аутосоме два кластера рибосомной ДНК могут располагаться по-разному. Например, в L_2 паре аутосом они могут быть локализованы в области центромеры и в интеркалярной части рядом с прицентромерным районом (Рисунок 35А). Следующий тип расположения кластеров рибосомной ДНК в L_2 показан на Рисунке 35Б. В этом случае, один кластер рибосомной ДНК, локализован в области центромеры, а второй в средней части аутосом. Еще один вариант локализации кластеров рибосомной ДНК, в L_2 , представлен на Рисунок 35В. При этом типе один кластер расположен в дистальной, а второй в терминальной части хромосомы. Иногда в одной хромосоме из пары (L_2) наблюдали полиморфизм по размеру кластера рибосомной ДНК (Рисунок 35Б,В).

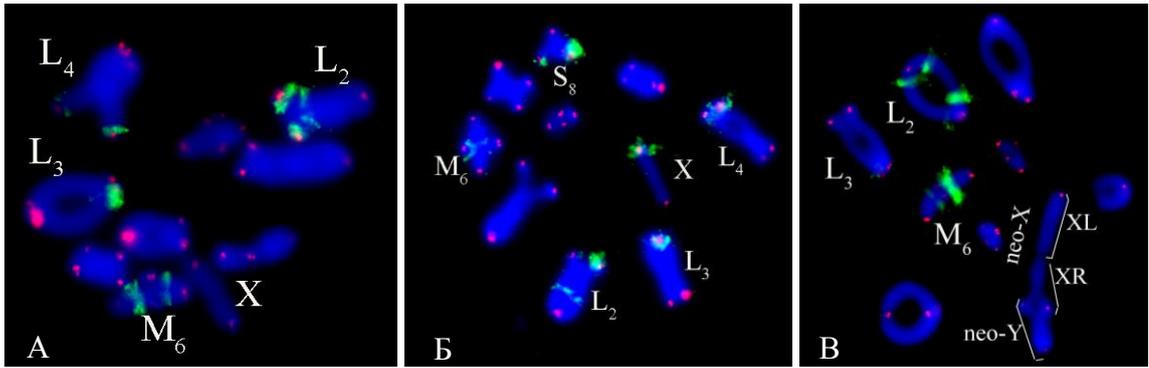


Рисунок 35. Локализация рибосомной (зеленый сигнал) и теломерной (красный сигнал) ДНК-проб в хромосомах: А – *Glyphotmethis adaliae* (Thrinchinae, Thrinchini, 2n=19; X0); Б – *Asiotmethis tauricus* (Thrinchinae, Thrinchini, 2n=19; X0); В – *Tropidauchen escaleraei* (Pamphaginae, Tropidauchenini, 2n=18; neo-XY).

В половых X, neo-X и neo-X₁ хромосомах у Pamphagidae выявлены единичные кластеры рибосомной ДНК (Рисунок 30Б, 32Б, 33, 34, 35, 36). Кластер рибосомной ДНК в X-хромосоме при X0 типе определения пола выявлен у *Asiotmethis muricatus*, *A. tauricus*, *Eremopeza saussurei* (Thrinchinae, Thrinchini) (Рисунок 33А,Б) и *Paracinipe dolichocera* (Pamphaginae, Pamphagini) (Рисунок 33В). Локализацию кластера рибосомной ДНК в X хромосомах на стадии метафазы I мейоза определить сложно из-за её акроцентрической морфологии. У *Eremopeza saussurei* кластер рибосомной ДНК расположен в прицентромерном районе субacrocentрической X хромосомы (Рисунок 33Б).

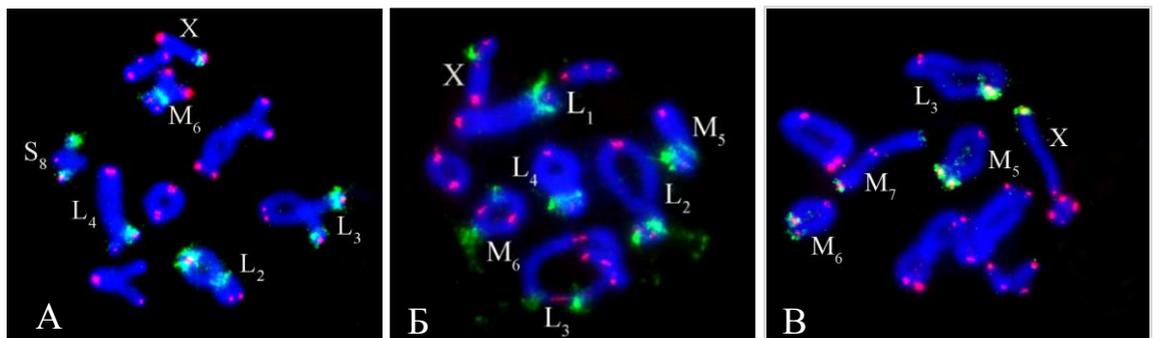


Рисунок 36. Локализация рибосомной (зеленый сигнал) и теломерной (красный сигнал) ДНК-проб в хромосомах Pamphagidae с 2n=19; X0: А – *Asiotmethis muricatus*; Б – *Eremopeza saussurei*; В – *Paracinipe dolichocera*.

У Pamphagidae с neo-XY типом определения пола, кластеры рибосомной ДНК, выявлены в прицентромерном районе neo-X-хромосомы у *Glyphotmethis holtzipulchripes*, *Asiotmethis h. heptapotamicus* (Thrinchinae, Thrinchini) (Рисунок 37А,Б), *Nocarodes armenus* (Рисунок 37В),

Nocaracris sureyana (Рисунок 37Г), *N. f. furvus*, *N. citripes*, *N. idrisi* и *N. tardus* (Pamphaginae, Nocarodeini) (Приложение 4).

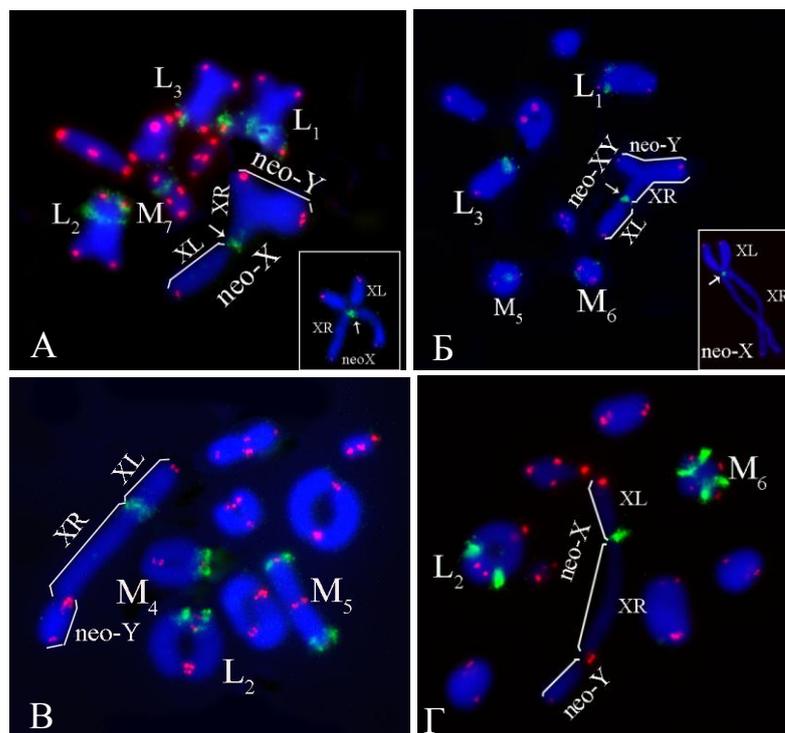


Рисунок 37. Локализация рибосомной (зеленый сигнал) и теломерной (красный сигнал) ДНК-проб в хромосомах Pamphaginae с $2n=18$; neo-XY: А – *Glyphotmethis holtzipulchripes* (Thrinchini, Thrinchinae); Б – *Asiotmethis heptapotamicus heptapotamicus* (Thrinchini, Thrinchinae); В – *Nocarodes armenus*; Г – *Nocaracris sureyana*.

В интеркалярном районе XL-плеча нео-Х-хромосомы кластер рибосомной ДНК, выявлен у *Paranocarodes t. tolunai* (Рисунок 38А), *P. pahlagonicus* (Рисунок 38Б) и *P. karabagi* (Рисунок 38В)

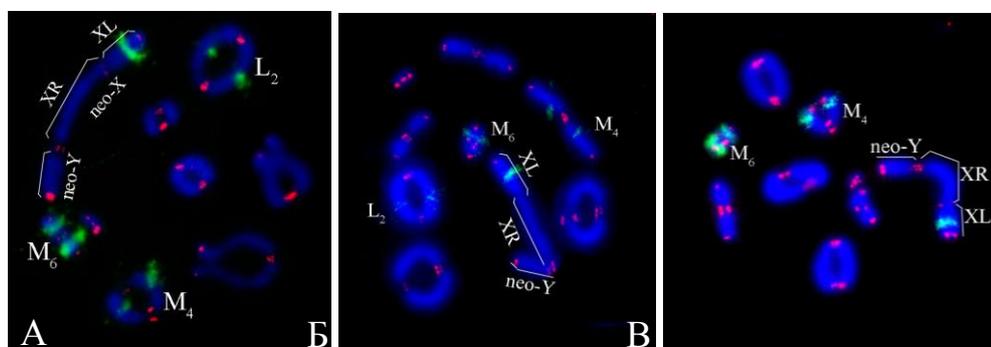


Рисунок 38. Локализация рибосомной (зеленый сигнал) и теломерной (красный сигнал) ДНК-проб в хромосомах видов трибы Nocarodeini (Pamphaginae) с $2n=18$; neo-XY: А – *Paranocarodes tolunai tolunai*; Б – *Paranocarodes pahlagonicus*; В – *Paranocarodes karabagi*.

У *Paranothrotres citimus* (Pamphaginae, Nocarodeini) с neo-X₁X₂Y типом определения пола кластер рибосомной ДНК расположен в теломерном районе XL-плеча нео-X₁ хромосомы (Рисунок 39).

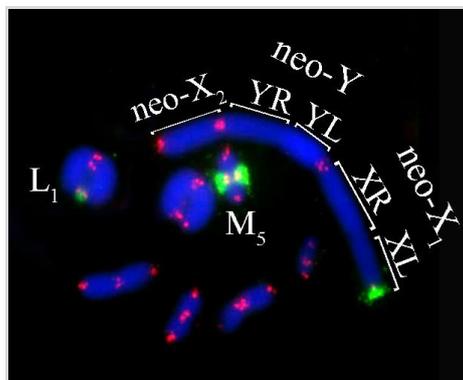


Рисунок 39. Локализация рибосомной (зеленый сигнал) и теломерной (красный сигнал) ДНК-проб в хромосомах *Paranothrotres citimus* с 2n=14; neo-X₁X₂Y.

Ни у одного вида Pamphaginae с neo-XY и neo-X₁X₂Y типами определения пола в нео-Y хромосоме кластеров рибосомной ДНК не выявлено.

В результате анализа полученных данных о локализации теломерного повтора и кластеров рибосомной ДНК в хромосомах исследованных нами видов Pamphaginae, можно сделать следующее обобщение.

Теломерные (TTAGG)_n повторы ДНК у Pamphaginae локализованы в терминальных районах всех аутосом и в X хромосоме у видов с XO типом определения пола. У *Eremopeza saussurei* и *E. bicoloripes* теломерные повторы выявлены не только в терминальной позиции, но и в прицентромерном районе двуплечих хромосом (ITS). Появление теломерного повтора в прицентромерном районе двуплечих хромосом у видов *Eremopeza* можно объяснить разрывом ДНК в районе хромосомы с теломерными повторами и последующей его инверсией. Результатом такой инверсии, также может быть и образование мелких вторых плеч в исходно акроцентрических хромосомах у видов *Eremopeza*. Мелкие вторые плечи на одной паре аутосом у *Glyphotmethis dimorphus* и *Tropidauchen* sp., не имеют в прицентромерном районе теломерных последовательностей. Можно предположить, что при образовании вторых плеч у *Glyphotmethis dimorphus* и *Tropidauchen* sp. разрыв хроматид произошел в районе хромосомы, не содержащем теломерных повторов.

У большинства исследованных видов Pamphaginae с нео-половыми хромосомами, сигнал теломерных последовательностей в прицентромерном районе нео-X хромосомы, отсутствовал.

Отсутствие теломерного повтора в прицентромерном районе нео-Х хромосомы можно объяснить утерей терминальных районов акроцентрических хромосом при транслокации Х-хромосомы и аутосомы. Это объяснение соответствует классическим представлением о робертсоновской транслокации (Robertson, 1916; White, 1940; Ohno 1967), в результате которой прицентромерная часть одной из хромосом, вступивших в слияние, утрачивается.

Сигнал теломерного повтора в прицентромерном районе нео-Х хромосомы (предполагаемое место транслокации исходной Х хромосомы и аутосомы) выявлен у *G. dimorphus*, *Glyphotmethis efe*, *G. holtzipulchripes* (Thrinchinae, Thrinchini), *Tropidauchen* sp., *Paranocarodes fieberi tolunayi* и *P. karabagi* (Pamphaginae, Nocarodeini). Появление интерстициального повтора (ITS) в прицентромерном районе нео-Х хромосомы можно объяснить инверсией плеча Х хромосомы и перемещением теломерных последовательностей в прицентромерный район. Так как сигнал теломерного повтора выявлен только у единичных видов Pamphagidae, можно предположить, что эта перестройка произошла с последующей утратой мелких теломерных повторов ДНК.

Кластеры рибосомной ДНК у исследованных нами видов Pamphagidae локализованы на одной, двух, трёх, четырех, пяти, шести и восьми парах аутосом, Х хромосоме при Х0 типе определения пола, и в ХL-плече нео-Х и нео-Х₁ хромосом, у видов с нео-ХУ и нео-Х₁Х₂У типами определения пола. Кластеры рибосомной ДНК в хромосомах исследованных видов располагаются очень разнообразно. Эта особенность не позволяет использовать кластеры рибосомной ДНК в качестве маркера пары аутосом, вступившей в слияние с предковой Х-хромосомой. У видов из трибы Thrinchini (Thrinchinae), локализация кластеров рибосомной ДНК в Х и в нео-Х хромосомах также варьирует, как и в аутосомах. Поэтому мы не можем говорить о закономерностях распространения в геноме видов трибы Thrinchini кластеров рибосомной ДНК.

У большинства видов подсемейства Pamphaginae из трибы Pamphagini в Х хромосоме повторов рибосомной ДНК нет. Исключением является только *Paracinipe dolichocera* (Х0). У видов трибы Tropidauchenini (Х0, нео-ХУ), кластеров рибосомной ДНК не выявлено не в Х хромосоме у видов с Х0 типом определения пола, ни в ХL-плече нео-Х хромосомы у видов с нео-ХУ типом определения пола. В трибе Nocarodeini (нео-ХУ), кластеры рибосомной ДНК выявлены у большинства видов, за исключением *Paranocarodes anatoliensis anatoliensis* и *P. turkmen*. Кластеры рибосомной ДНК в ХL-плече нео-Х хромосомы у Nocarodeini, локализованы либо в прицентромерном, либо в интеркалярном районе ХL-плеча нео-Х хромосомы. Перемещение кластера рибосомной ДНК в интеркалярное положение, скорее всего, является результатом инверсии в этом районе нео-Х хромосомы. Отсутствие кластера рибосомной ДНК

в нео-Х хромосоме у *Paranocarodes a. anatoliensis* и *P. turkmen*, можно объяснить, например, делецией района хромосомы, маркированного этим кластером.

На основе анализа локализации кластеров рибосомной ДНК у видов подсемейства Pamphaginae можно сделать предположение, что плезиоморфным признаком этого подсемейства является отсутствие кластера ДНК в Х и ХL-плече нео-Х хромосомы. Возникновение рибосомной ДНК в ХL-плече нео-Х хромосомы у видов трибы Nocarodeini, является апоморфным признаком, который отражает его развитие на пути эволюции нео-половых хромосом.

С помощью метода флуоресцентной *in situ* гибридизации нуклеиновых кислот (FISH) нам удалось определить особенности локализации маркёров структурных перестроек хромосом. Следующим шагом нашего исследования эволюции кариотипов Pamphagidae стало выявление степени гомологии повторённых последовательностей ДНК в половых хромосомах и аутосомах у разных видов этой группы саранчовых.

3.4. Кросс-гибридизация микродиссекционных ДНК-проб с половыми хромосомами и аутосомами саранчовых Pamphagidae

Для выявления степени гомологии повторённых последовательностей ДНК в половых хромосомах и аутосомах у разных видов Pamphagidae были приготовлены оригинальные микродиссекционные ДНК-пробы из ХL-плеч нео-Х хромосом и нео-У хромосом видов *Asiotmethis heptapotamicus* (Thrinchinae, Thrinchini), *Nocaracris cyanipes*, *N. tardus*, *N. rubripes* и *Paranocarodes tolunai tolunai* (Pamphaginae, Nocarodeini). Подробное описание получения микродиссекционных ДНК-проб представлено в Главе 2. Материалы и методы.

ДНК-пробы, полученные из половых хромосом *Asiotmethis heptapotamicus*, гибридизовали с хромосомами восьми видов родов *Asiotmethis* и *Glyphotmethis* (Thrinchini, Thrinchinae) (Рисунок 40, 41). ДНК-пробы, полученные из половых хромосом *Nocaracris cyanipes*, *N. tardus*, *N. rubripes* и *Paranocarodes tolunai tolunai* (Pamphaginae, Nocarodeini), гибридизовали с хромосомами семи видов из рода *Nocaracris* и четырех видов из рода *Paranocarodes* (Pamphaginae, Nocarodeini) (Рисунок 42, 43).

Для улучшения визуализации полученных в результате кросс-гибридизации FISH изображений, мы использовали оригинальный компьютерный метод VISSIS. Подробное описание VISSIS представлено в Главе 2. Материалы и методы.

Гибридизация микродиссекционных ДНК-проб полученных из половых хромосом Asiotmethis heptapotamicus с хромосомами видов родов Asiotmethis и Glyphotmethis (Thrinchini, Thrinchinae).

Для того, чтобы проверить чистоту приготовления полученных микродиссекционных ДНК-проб, пробы **AheXI** и **AheYcen**, полученные из половых хромосом *A. h. heptapotamicus*, гибридизовали с хромосомами *A. h. heptapotamicus*. Гибридизация ДНК-пробы **AheXI** (проба, полученная из XL-плеча нео-X хромосомы *A. h. heptapotamicus*) с хромосомами *A. h. heptapotamicus* выявила интенсивный сигнал ДНК-пробы **AheXI** в С-позитивных прицентромерных районах аутосом и нео-X хромосомы, а также в терминальных районах XL-плеча нео-X хромосомы. В аутосомах и XL-плече нео-X хромосомы повторы этой пробы давали диспергированный сигнал (Рисунок 41А, красный сигнал).

Гибридизация ДНК-пробы **AheYcen** (проба получена из проксимальной части нео-Y хромосомы *Asiotmethis h. heptapotamicus*) с хромосомами *Asiotmethis h. heptapotamicus*, показала диспергированные повторы ДНК-пробы **AheYcen** в эухроматиновых районах аутосом и XR-плече нео-X хромосомы (Рисунок 41А, зеленый сигнал). Локальное усиление гибридизационного сигнала, наблюдали в проксимальной части нео-Y хромосомы и XR-плече нео-X хромосомы (Рисунок 41А, зеленый сигнал). Анализ гибридизации ДНК-проб с хромосомами *Asiotmethis h. heptapotamicus* показал, что пробы по молекулярному составу гомологичны хромосоме, из которой они были получены (Рисунок 41А).

Для того, чтобы определить гомологию повторённых последовательностей ДНК в хромосомах у видов с X0 и нео-XY системами определения пола мы провели кросс-гибридизацию проб полученных из нео-половых хромосом *Asiotmethis h. heptapotamicus* с хромосомами *Asiotmethis muricatus* и *Glyphotmethis adaliae* (X0).

Кросс-гибридизация ДНК-пробы **AheXI** (проба, полученная из XL-плеча нео-X хромосомы *A. h. heptapotamicus*) с хромосомами *A. muricatus* (X0) выявила диспергированный гибридизационный сигнал во всех хромосомах. Локальное усиление гибридизационного сигнала этой ДНК-пробы наблюдали в X хромосоме (Рисунок 37А, красный сигнал). Кросс-гибридизация ДНК-пробы **AheYcen** (проба получена из проксимальной части нео-Y хромосомы *A. h. heptapotamicus*) с хромосомами *A. muricatus* показала слабо диспергированный гибридизационный сигнал во всех аутосомах (Рисунок 40А, зеленый сигнал).

Кросс-гибридизация ДНК-пробы **AheXI** с хромосомами *G. adaliae* (X0), выявила диспергированный гибридизационный сигнал ДНК-пробы **AheXI** во всех аутосомах и X хромосоме (Рисунок 40Б). Локальное усиление гибридизационного сигнала ДНК-пробы **AheXI**, наблюдали в прицентромерных районах аутосом. Интенсивный гибридизационный сигнал ДНК-пробы **AheXI**, выявлен в X хромосоме (Рисунок 40Б, красный сигнал). Кросс-

гибридизация ДНК-пробы *AheYcen* с хромосомами *G. adaliae*, выявила диспергированный гибридационный сигнал ДНК-пробы *AheYcen* во всех аутосомах (Рисунок 40Б, зеленый сигнал).

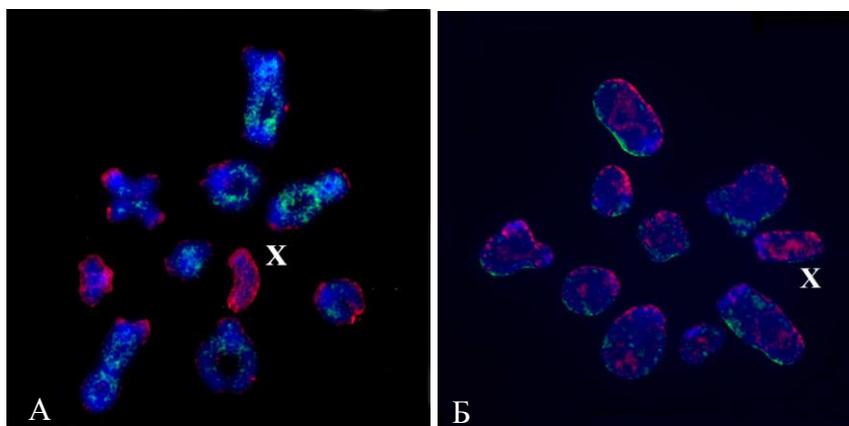


Рисунок 40. Гибридизация микродиссекционных ДНК-проб *AheXL* и *AheYcen* с хромосомами видов родов *Asiotmethis* и *Glyphotmethis* (Thrinchinae, Thrinchini) с $2n=19$; X0: А – *A. muricatus*; Б – *G. adaliae* (X0); Красный сигнал – ДНК-проба *AheXL*; Зеленый сигнал – ДНК-проба *AheYcen*.

В результате кросс-гибридизации проб, полученных из нео-половых хромосом *A. h. heptapotamicus*, с хромосомами *Asiotmethis muricatus* и *Glyphotmethis adaliae* с X0 типом определения пола выявлена гомология ДНК-пробы *AheXL*, полученной из XL-плеча нео-X хромосомы, с X хромосомой. Повторы ДНК-пробы *AheYcen* полученной из проксимальной части нео-Y хромосомы *A. h. heptapotamicus*, давали слабый диспергированный гибридационный сигнал ДНК-пробы во всех аутосомах у *Asiotmethis muricatus* и *Glyphotmethis adaliae* с X0 типом определения пола.

Для того, чтобы определить гомологию повторённых последовательностей ДНК в хромосомах у видов с нео-XY системой определения пола, мы провели кросс-гибридизацию ДНК-проб полученных из нео-половых хромосом *Asiotmethis h. heptapotamicus* (*AheXL* и *AheYcen*) с хромосомами *A. turittus*, *A. limbatus*, *G. dimorfus*, *G. holtzi pukhripes*, *G. efe* с нео-XY типом определения пола.

Кросс-гибридизация ДНК-пробы *AheXL* (проба, полученная из XL-плеча нео-X хромосомы *A. h. heptapotamicus*) с хромосомами *A. turittus*, *A. limbatus*, *G. dimorfus*, *G. holtzi pukhripes*, *G. efe* с нео-XY типом определения пола выявила диспергированный гибридационный сигнал ДНК-пробы *AheXL* в аутосомах и нео-X хромосоме (Рисунок 41, красный сигнал). У всех перечисленных видов в XL-плече нео-X хромосомы выявлен интенсивный гибридационный сигнал ДНК-пробы *AheXL* (Рисунок 41, красный сигнал). В

XR-плечо нео-X хромосом у всех видов с нео-половыми хромосомами гибридационный сигнал ДНК-пробы *AheXL*, отсутствовал (Рисунок 41). В нео-Y хромосомах у видов родов *Asiotmethis* и *Glyphotmethis* с нео-половыми хромосомами гибридационный сигнал ДНК-пробы *AheXL*, не выявлен (Рисунок 41, красный сигнал).

Кросс-гибридизация ДНК-пробы *AheYcen* (проба получена из проксимальной части нео-Y хромосомы *A. heptapotamicus*) с хромосомами видов родов *Asiotmethis* и *Glyphotmethis* с нео-половыми хромосомами выявила диспергированный гибридационный сигнал ДНК-пробы *AheYcen* во всех аутосомах (Рисунок 41, зеленый сигнал). Интенсивный гибридационный сигнал ДНК-пробы *AheYcen* наблюдали в нео-Y хромосомах и проксимальной части XR-плеча нео-X хромосом у всех видов родов *Asiotmethis* и *Glyphotmethis* с нео-половыми хромосомами (Рисунок 41, зеленый сигнал).

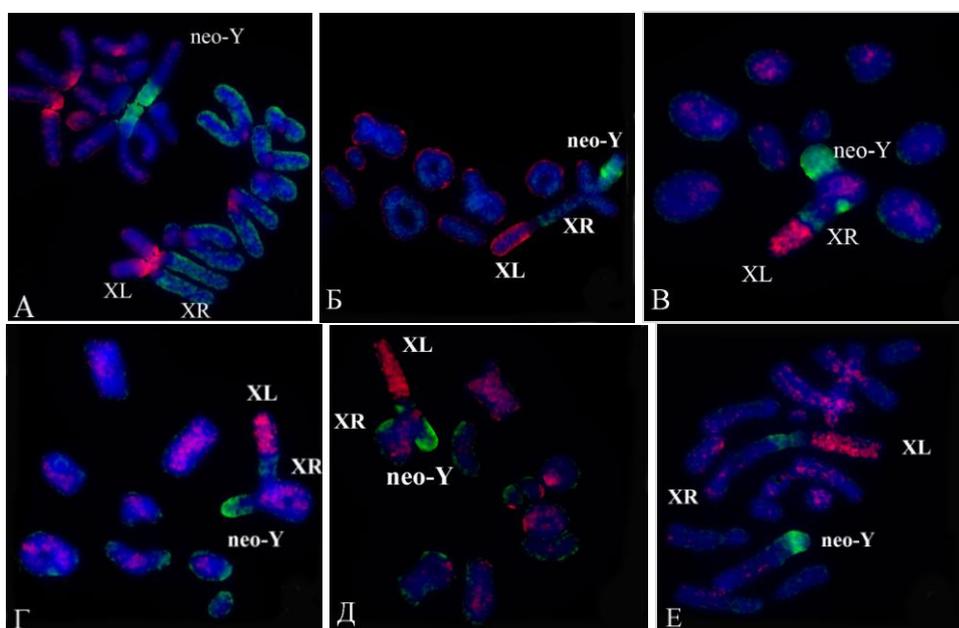


Рисунок 41. Гибридизация микродиссекционных ДНК-проб *AheXL*, *AheYcen* с хромосомами видов из родов *Asiotmethis* и *Glyphotmethis* (Thrinchinae, Thrinchini) с нео-XX/нео-XY типом определения пола. А – *A. heptapotamicus*; Б – *A. turritus*; В – *A. limbatus*; Г – *G. dimorfus*; Д – *G. holtzi pukhripes*; Е – *G. efe*. Красный сигнал – ДНК-проба *AheXL*; Зеленый сигнал – ДНК-проба *AheYcen*.

Кросс-гибридизация ДНК-пробы *AheXL* (полученной из XL-плеча нео-X хромосомы) с хромосомами видов родов *Asiotmethis* и *Glyphotmethis* позволила установить гомологию повторённых последовательностей ДНК-пробы *AheXL* с X хромосомами у видов с X0 типом определения пола и с XL-плечом нео-X хромосом у видов с нео-XY типом определения пола (Рисунок 40, 41). Такой результат указывает на сходство молекулярного состава исходной X хромосомы как у видов с X0, так и у видов с нео-XY типами определения пола. У видов с X0

типом определения пола последовательности ДНК-пробы *AheXI* были равномерно диспергированы во всех аутосомах. Поэтому в результате гибридизации не удалось идентифицировать аутосому, которая вошла в транслокацию с исходной X хромосомой.

Интенсивность сигнала ДНК-пробы *AheYcen* в прицентромерных районах нео-Y хромосом была высокой у всех исследованных *Thrinchini* с нео-половыми хромосомами. Это свидетельствует о слабой дивергенции молекулярного состава нео-Y хромосом у разных видов родов *Asiotmethis* и *Glyphotmethis* с нео-половыми хромосомами. В проксимальной части XR-плеча нео-X хромосом у *Asiotmethis* и *Glyphotmethis* выявлен интенсивный сигнал повторов пробы *AheYcen*, что указывает на гомологию повторённых последовательностей ДНК в XR-плечах нео-X хромосом и нео-Y хромосомах. Гетерологичный пэинтинг ДНК-проб доказывает, что XR-плечо нео-X хромосомы и нео-Y хромосома исходно являлись гомологичной парой хромосом. Повторяющиеся последовательности ДНК-пробы *AheYcen* в небольшом количестве есть и в аутосомах. Об этом можно судить по слабому диспергированному сигналу в аутосомах. Исходя из этого можно сделать вывод, что кластеры повторённых последовательностей ДНК в С-позитивном районе нео-Y хромосомы формируются в результате амплификации тех же повторов ДНК, которые есть и в аутосомах, но в значительно меньшем количестве.

Гибридизация микродиссекционных ДНК-проб полученных из половых хромосом видов рода Nocaracris с хромосомами видов рода Nocaracris (Pamphaginae, Nocarodeini).

Кросс-гибридизация ДНК-пробы *NcyXI* (получена из XL-плеча нео-X хромосомы *Nocaracris cyanipes*) с хромосомами видов рода *Nocaracris* (*N. cyanipes*, *N. rubripes*, *N. tardus*, *N. citripes*, *N. idrisi*, *N. sureyana* и *N. furvus*) выявила интенсивный гибридизационный сигнал ДНК-пробы *NcyXI* в **XL-плече** нео-X хромосомы у всех видов рода *Nocaracris* (Рисунок 42а,д,и,н,с,х,щ). У всех *Nocaracris* диспергированный гибридизационный сигнал ДНК-пробы *NcyXI* выявлен в **XR-плече** нео-X хромосомы (Рисунок 42а,д,и,н,с,х,щ). В **нео-Y** хромосомах у большинства видов рода *Nocaracris* гибридизационный сигнал ДНК-пробы *NcyXI* либо отсутствовал (Рисунок 42а,и,х,щ) либо был очень слабым (Рисунок 42д,н,с). В **аутосомах** у *N. rubripes*, *N. tardus*, *N. citripes*, *N. idrisi* и *N. furvus* выявлен диспергированный гибридизационный сигнал ДНК-пробы *NcyXI* (Рисунок 42д,и,н,с,щ). В аутосомах, у *N. sureyana*, гибридизационный сигнал ДНК-пробы *NcyXI* очень слабый (Рисунок 42х). В аутосомах, у *N. cyanipes*, сигнала ДНК-пробы *NcyXI*, не выявлено (Рисунок 42а).

Кросс-гибридизация ДНК-пробы *NcyY* (получена из целой нео-Y хромосомы *Nocaracris cyanipes*) с хромосомами видов рода *Nocaracris* выявила интенсивный гибридизационный сигнал этой ДНК-пробы в С-позитивных районах **нео-Y** хромосом у всех исследованных видов (Рисунок 42а,д,и,с,х,щ, зеленый сигнал), кроме нео-Y хромосомы *N. citripes*. В нео-Y хромосоме

у *N. citripes* гибридационный сигнал ДНК-пробы *NcyY*, отсутствовали (Рисунок 42н, зеленый сигнал)

В **XL-плече** нео-Х хромосом у видов рода *Nocaracris*, гибридационный сигнал ДНК-пробы *NcyY*, не выявлен (Рисунок 42а,д,и,н,с,х,щ).

В проксимальном районе **XR-плеч** нео-Х хромосомы, диспергированный сигнал ДНК-пробы *NcyY*, выявлен у *N. rubripes* и *N. furvus* (Рисунок 42д, щ). В дистальных районах **XR-плеч** нео-Х хромосом сигнала ДНК-пробы *NcyY* не выявлено ни у одного вида рода *Nocaracris* (Рисунок 42а,д,и,н,с,х,щ).

В **аутосомах** диспергированный гибридационный сигнал ДНК-пробы *NcyY* выявлен у *N. rubripes*, *N. sureyana* и *N. furvus* (Рисунок 42д,х,щ). Локальное усиление гибридационного сигнала ДНК-пробы *NcyY* отмечено в С-позитивных районах аутосом у *N. cyanipes*, *N. citripes* и *N. idrisi* (Рисунок 42а,с,н).

Кросс-гибридизация ДНК-пробы *NruXI* (получена из XL-плеча нео-Х хромосомы *Nocaracris rubripes*) с хромосомами видов рода *Nocaracris* выявила интенсивный гибридационный сигнал ДНК-пробы в **XL-плече** нео-Х хромосомы у *N. citripes*, *N. sureyana* и *N. furvus* (Рисунок 42о,ц). У *N. cyanipes*, *N. tardus* и *N. idrisi*, в XL-плече нео-Х хромосом выявлен диспергированный гибридационный сигнал ДНК-пробы *NruXI*. Эта ДНК-проба давала локальное усиление сигнала в прицентромерном районе нео-Х хромосом у *N. cyanipes*, *N. tardus* и *N. idrisi* (Рисунок 42б,к,т).

У *N. rubripes*, в прицентромерном районе нео-Х хромосомы, и в терминальном районе XL-плеча нео-Х хромосом, выявлено точечное усиление гибридационного сигнала ДНК-пробы *NruXI* (Рисунок 42е). У *N. tardus*, *N. citripes*, *N. idrisi* и *N. furvus* в **XR-плече** нео-Х хромосом выявлен диспергированный гибридационный сигнал ДНК-пробы *NruXI* (Рисунок 42к,о,т,э). У *Nocaracris cyanipes*, *N. rubripes*, *N. sureyana* сигнал ДНК-пробы *NruXI* в **XR-плече** нео-Х хромосомы, отсутствовал (Рисунок 42б,е,ц). В **нео-Y** хромосомах, у видов рода *Nocaracris* гибридационного сигнала ДНК-пробы *NruXI*, не выявлено (Рисунок 42б,е,к,о,т,ц,э). Диспергированный гибридационный сигнал ДНК-пробы *NruXI* выявлен в **аутосомах** у *N. cyanipes* (Рисунок 42б). Точечное усиление гибридационного сигнала ДНК-пробы *NruXI* отмечено в С-позитивных районах аутосом у *N. rubripes*, *N. citripes*, *N. idrisi*, *N. sureyana* и *N. furvus* (Рисунок 42е,о,т,ц,э).

Кросс-гибридизация ДНК-пробы *NruY* (получена из целой нео-Y хромосомы *Nocaracris rubripes*, зеленый сигнал) с хромосомами видов рода *Nocaracris* показала интенсивный кластеризованный сигнал ДНК-пробы в С-позитивных районах нео-Y хромосом у всех видов рода *Nocaracris* (Рисунок 42,б,е,к,о,т,ц,э, зеленый сигнал).

В **XL-плече** нео-Х хромосом у видов *Nocaracris* гибридационного сигнала ДНК-пробы *NruY*, не выявлено (Рисунок 42б,е,к,о,т,ц,э). Диспергированный гибридационный сигнал ДНК-пробы *NruY* отмечен в проксимальном районе **XR-плеч** нео-Х хромосом у *N. cyanipes* и *N. sureyana* (Рисунок 42б,ц). Диспергированный гибридационный сигнал ДНК-пробы *NruY* выявлен в **аутосомах** у *N. cyanipes* и *N. furvus* (Рисунок 42б,э).

Кросс-гибридизация ДНК-пробы *NtaXI* (получена из XL-плеча нео-Х хромосомы *Nocaracris tardus*, красный сигнал) с хромосомами видов рода *Nocaracris* выявила интенсивный гибридационный сигнал ДНК-пробы *NtaXI* в **XL-плече** нео-Х хромосом у всех видов *Nocaracris* (Рисунок 42в,л,п,у,и, ю) кроме *N. rubripes* (Рисунок 42ж). У всех видов *Nocaracris*, кроме *N. cyanipes*, гибридационный сигнал ДНК-пробы *NtaXI* в **XR-плече** нео-Х хромосомы, отсутствовал. У *N. cyanipes* в **XR-плече** нео-Х хромосомы выявлен диспергированный гибридационный сигнал ДНК-пробы *NtaX* (Рисунок 42в). В **нео-У** хромосомах у видов *Nocaracris*, гибридационный сигнал ДНК-пробы *NtaXI* либо отсутствовал (Рисунок, 42л,п,у,ч,ю), либо был слабо диспергирован (Рисунок 42в,ж).

Диспергированный гибридационный сигнал ДНК-пробы *NtaXI* выявлен во всех аутосомах у *N. cyanipes* (Рисунок 42в). Точечное усиление гибридационного сигнала ДНК-пробы *NtaXI* в С-позитивных районах аутосом выявлено у *N. citripes*, *N. idrisi*, *N. sureyana* и *N. furvus* (Рисунок 42п,у,ч,ю). В аутосомах у *N. tardus* гибридационный сигнал ДНК-пробы *NtaX*, отсутствовал (Рисунок 42л).

Кросс-гибридизация ДНК-пробы *NtaY* (получена из нео-У хромосомы *Nocaracris tardus*) выявила интенсивный гибридационный сигнал этой ДНК-пробы в С-позитивных районах нео-У хромосом у *N. tardus*, *N. citripes*, *N. idrisi*, *N. sureyana* и *N. furvus* (Рисунок 42л,п,у,ч,ю). В нео-У хромосоме у *N. cyanipes* выявлен диспергированный гибридационный сигнал ДНК-пробы *NtaY* (Рисунок 42в).

Повторы ДНК-пробы *NtaY*, полученной из нео-У хромосомы *Nocaracris tardus* не гибридовались с повторами в **XL-плече** нео-Х хромосом видов рода *Nocaracris* (Рисунок 42в,ж,л,п,у,ч,ю). У всех видов рода *Nocaracris*, кроме *N. furvus*, повторы ДНК-пробы *NtaY* не гибридовались с повторами в **XR-плече** нео-Х хромосом (Рисунок 42в,ж,л,п,у,ч). У *N. furvus* в терминальном районе **XR-плеча** нео-Х хромосомы выявлен слабый гибридационный сигнал ДНК-пробы *NtaY* (Рисунок 42ю). В **аутосомах** у всех видов рода *Nocaracris*, кроме *N. cyanipes* и *N. rubripes*, гибридационный сигнал ДНК-пробы *NtaY*, отсутствовал (Рисунок 42л,п,у,ч,ю). У *N. cyanipes* и *N. rubripes* в аутосомах выявлен диспергированный гибридационный сигнал ДНК-пробы *NtaY* (Рисунок 42в,ж).

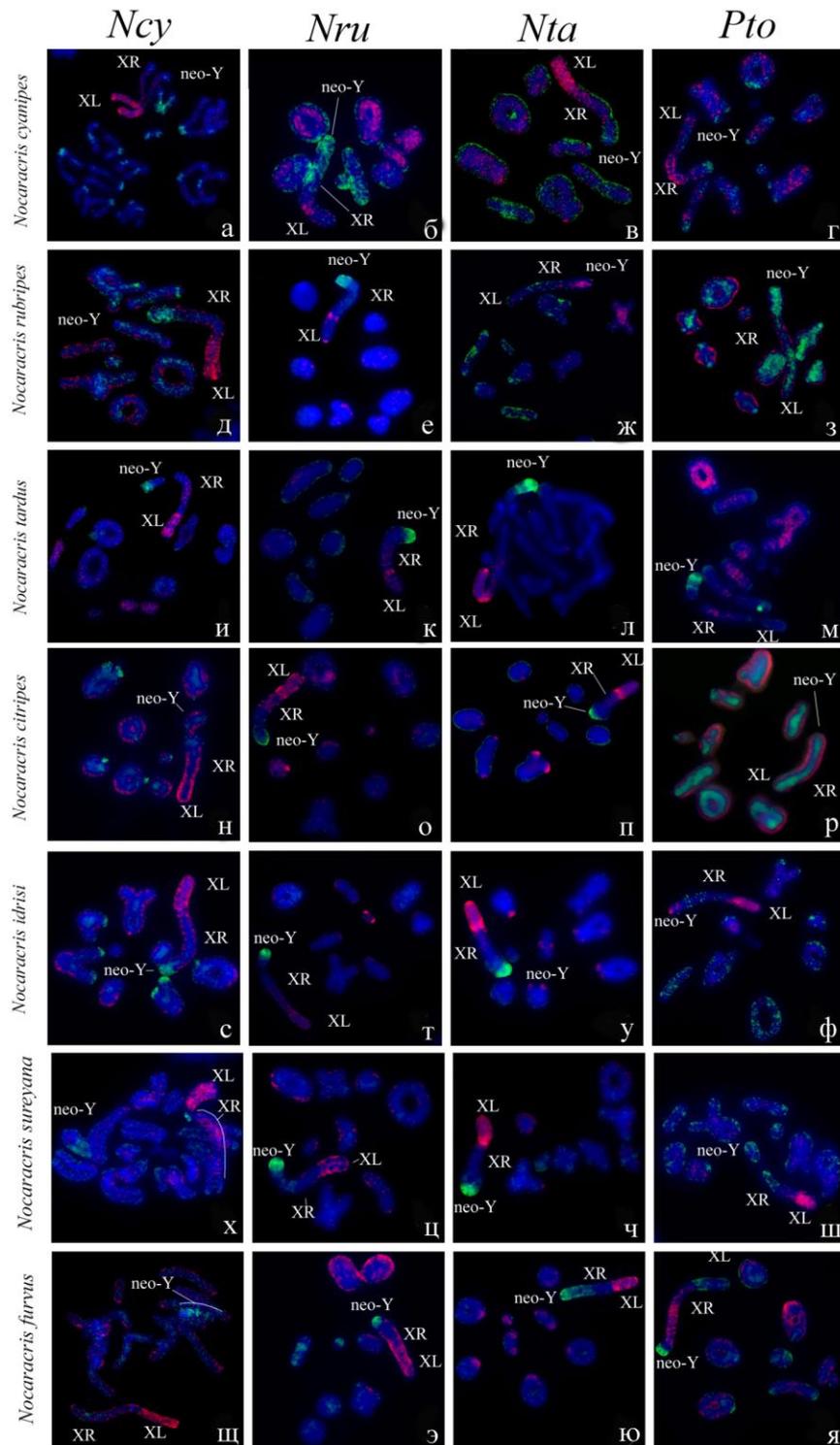


Рисунок 42. Гибридизация микродиссекционных ДНК-проб с мейотическими хромосомами видов рода *Nocaracris* (Pamphaginae, Nocarodeini): *Nocaracris cyanipes* (а–г); *Nocaracris rubripes* (д–з); *Nocaracris tardus* (и–м); *Nocaracris citripes* (н–р); *Nocaracris idrisi* (с–ф); *Nocaracris sureyana* (х–ш); *Nocaracris furvus*; (щ–я). Красный сигнал – ДНК-проба полученная из нео-XL плеча нео-хромосомы; Зеленый сигнал – ДНК-проба полученная из нео-Y хромосомы. Название видов указано в строках, название проб в колонках.

Анализ кросс-гибридизации ДНК-проб (*NcyXI*, *NruXI*, *NtaXI*), с хромосомами видов рода *Nocaracris* выявил сходство молекулярного состава повторённых последовательностей ДНК XL-плеч нео-X хромосом у всех видов этого рода. Разные пробы, полученные из XL-плеч нео-X хромосом видов рода *Nocaracris*, гибридизовались с XL-плечем нео-X хромосом видов *Nocaracris* по-разному. У большинства видов *Nocaracris* повторы ДНК-проб *NcyXI*, *NruXI* и *NtaXI* на всем протяжении XL-плеча нео-X хромосом гибридизовались с повторами ДНК этого плеча. Реже наблюдали точечный гибридизационный сигнал повторов этих проб с повторами, содержащимися в терминальных районах XL-плеч и в прицентромерных районах нео-X хромосом (как например у *Nocaracris tardus* см Рисунок 42к). Этот результат дает основание предположить, что состав повторённых последовательностей ДНК XL-плеч нео-X хромосом у большинства видов *Nocaracris* содержат гомологичные повторяющиеся последовательности ДНК. Это, в свою очередь, указывает на сходство молекулярного состава X хромосомы у видов *Nocaracris*. С другой стороны, у некоторых *Nocaracris* мы наблюдали только частичную гибридизацию повторов проб, полученных из XL-плеч нео-X хромосом, с повторами XL-плеч нео-X хромосом. Исходя из этого замечания можно предположить, что в ходе эволюции количество тех или иных повторов в XL-плечах X хромосом изменяется. Показателем этого могут служить выявленные как в диспергированном, так и кластеризованном состоянии повторы проб в XL-плечах у разных видов рода *Nocaracris*.

Повторы ДНК-проб *NcyXI*, *NruXI*, *NtaXI* у видов рода *Nocaracris* были либо слабо диспергированы в проксимальной части XR-плеч (в прицентромерном районе), либо не гибридизовались с повторами XR-плеч X хромосом. Этот результат, указывает на различия повторённых последовательностей ДНК в XL- и XR-плечах нео-X хромосом у видов *Nocaracris*. В аутосомах у большинства видов рода *Nocaracris* повторы ДНК-проб, полученные из **XL-плеч** нео-X хромосом давали диспергированный сигнал повторов, либо точечное усиление сигнала в прицентромерных и терминальных районах аутосом. Вероятно, состав повторяющихся последовательностей ДНК в аутосомах и **XL-плечах** нео-X хромосом у *Nocaracris* гомологичен, но в **XL-плечах** нео-X хромосом и в прицентромерных районах аутосом эти повторы кластеризованы и поэтому дают точечное усиление гибридизационного сигнала. Тогда как в аутосомах повторы ДНК-проб *NcyXI*, *NruXI*, *NtaXI* диспергированы и поэтому дают диспергированный сигнал.

Повторённые последовательности ДНК-проб, полученные из нео-Y хромосом видов рода *Nocaracris* (*NcyY*, *NruY*, *NtaY*), давали интенсивный гибридизационный сигнал в C-позитивных районах нео-Y хромосом у всех видов рода *Nocaracris*. Это указывает на слабую дивергенцию молекулярного состава гетерохроматинизированных районов нео-Y хромосом у *Nocaracris*. Повторяющиеся последовательности из этих проб не гибридизовались с проксимальными

районами XR-плеч нео-X хромосом у всех *Nocaracris*. В дистальных районах XR-плеч нео-X хромосом, которые в мейозе конъюгируют с нео-Y хромосомой, выявляется небольшой район гомологи повторённых последовательностей с ДНК-пробами, полученными из нео-Y хромосом. Это результат свидетельствует о том, что гомологи - XR-плечо нео-X хромосомы и нео-Y хромосома сохранили частичную гомологию повторённых последовательностей лишь в терминальном районе (псевдоаутосомный район). В **аутосомах** у большинства видов рода *Nocaracris* повторы проб, полученные из нео-Y хромосом, давали диспергированный гибридационный сигнал. Это доказывает гомологию повторённых последовательностей ДНК в аутосомах и нео-Y хромосомах. Однако в С-позитивных районах нео-Y хромосом эти повторы сильно амплифицированы, поэтому мы видим массивный кластер, а в аутосомах эти повторы точно распределены и дают диспергированный сигнал.

Гибридизация микродиссекционных ДНК-проб, полученных из половых хромосом Paranocarodes tolunai tolunai с хромосомами видов рода Paranocarodes (Pamphaginae, Nocarodeini).

Кросс-гибридизация ДНК-пробы **PtoXI** (получена из XL-плеча нео-X хромосомы *Paranocarodes tolunai tolunai*, красный сигнал) с хромосомами видов *Paranocarodes t. tolunayi*, *P. anatoliensi*, *P. turkmen* и *P. karabagi* выявила гомологию повторов ДНК-пробы **PtoXI** с повторами XL-плеч нео-X хромосом у всех перечисленных видов (Рисунок 43г,з,м,р). В **XR-плече** нео-X хромосом у всех видов рода *Paranocarodes*, кроме *Paranocarodes tolunayi*, выявлен диспергированный гибридационный сигнал ДНК-пробы **PtoXI** в ее проксимальной части (в прицентромерном районе) (Рисунок 43з,м,р). У *Paranocarodes tolunayi* повторы ДНК-пробы **PtoXI** не гибридовались с повторами XR-плеч нео-X хромосомы (Рисунок 43г). У всех видов *Paranocarodes* повторы ДНК-пробы **PtoXI**, полученные из XL-плеча нео-X хромосомы, не давали гибридационного сигнала в **нео-Y** хромосомах (Рисунок 43г,з,м,р).

Диспергированный гибридационный сигнал ДНК-пробы **PtoXI**, полученной из XL-плеч нео-X хромосомы, выявлен в аутосомах всех видов рода *Paranocarodes* (Рисунок 43г,з,м,р). У *P. anatoliensi*, *P. turkmen* и *P. karabagi*, в одной средней паре аутосом (M₇), наблюдали интенсивный гибридационный сигнал ДНК-пробы **PtoXI** (Рисунок 43з,м,р).

Повторяющиеся последовательности ДНК-пробы **PtoY** (получена из целой нео-Y хромосомы *Paranocarodes t. tolunai*, зеленый сигнал) давали интенсивный гибридационный сигнал в проксимальных районах нео-Y хромосом у всех видов рода *Paranocarodes* (Рисунок 43г,з,м,р). В XL-плечах нео-X хромосом у всех видов рода *Paranocarodes* гибридационный сигнал ДНК-пробы **PtoY**, отсутствовал (Рисунок 43г,з,м,р). В терминальных районах XR-плеч нео-X хромосом у всех *Paranocarodes*, выявлен слабый диспергированный гибридационный сигнал ДНК-пробы **PtoY**. В проксимальных районах XR-плеч нео-X хромосом у всех видов рода

Paranocarodes повторов, гомологичных ДНК-пробе *PtoY*, не выявлено (Рисунок 43г,з,м,р). Диспергированный гибридационный сигнал ДНК-пробы *PtoY* наблюдали во всех аутосомах у всех исследованных видов рода *Paranocarodes* (Рисунок 43г,з,м,р).

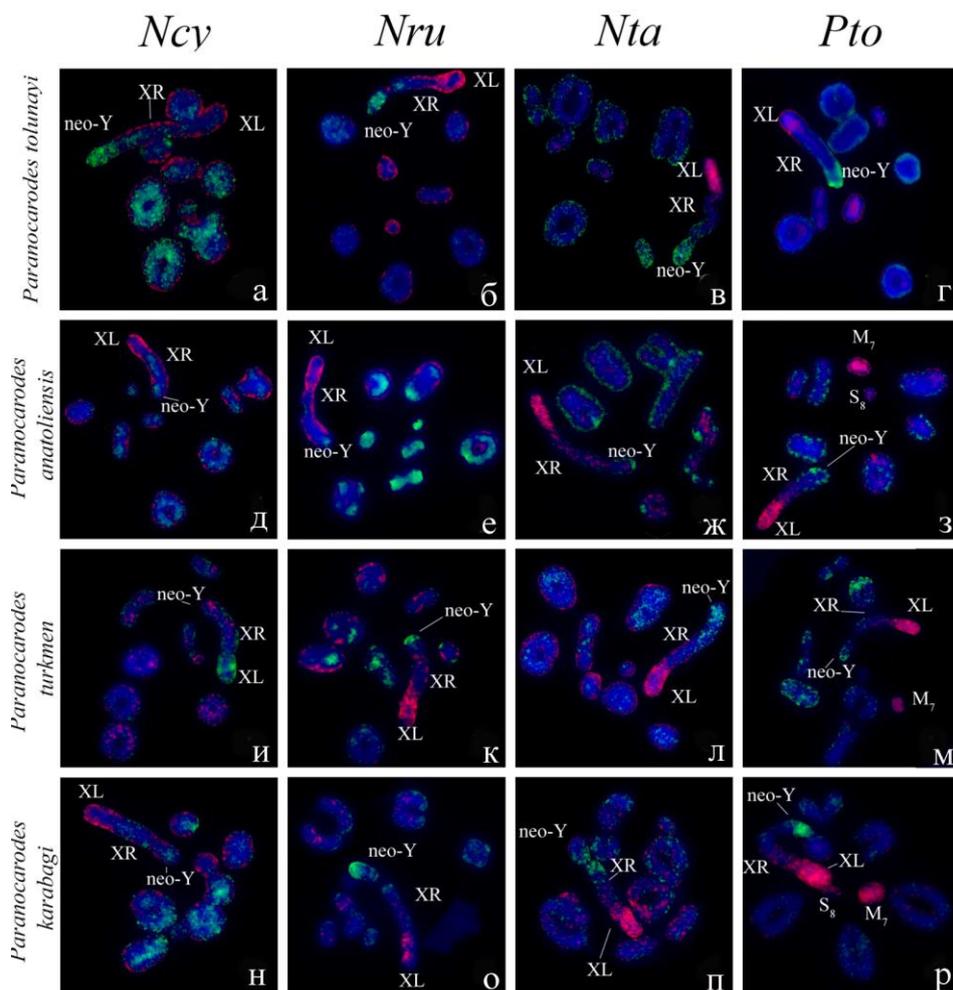


Рисунок 43. Гибридизация микродиссекционных ДНК-проб с мейотическими хромосомами видов *Paranocarodes* (Pamphaginae, Nocarodeini). Название видов указано в строках, название проб в колонках: *Paranocarodes tolunayi* (а-г); *Paranocarodes anatoliensis*; (д-з); *Paranocarodes turkmen*; (и-м); *Paranocarodes karabagi* (н-р). Красный сигнал – ДНК-проба полученная из neo-XL плеча neo-хромосомы; Зеленый сигнал – ДНК проба полученная из neo-Y хромосомы.

Анализ гибридизации микродиссекционных ДНК-проб, полученных из половых хромосом *Paranocarodes tolunayi tolunayi*, с хромосомами видов рода *Paranocarodes* позволил установить сходство молекулярного состава повторённых последовательностей ДНК в XL-плечах neo-X хромосом у всех видов этого рода. Это свидетельствует о сходстве молекулярного состава исходной X хромосомы у видов рода *Paranocarodes*. У всех видов этого рода повторы пробы *PtoXI* дают слабый диспергированный гибридационный сигнал в проксимальной части XR-плеча (в прицентромерном районе). В дистальной части XR-плеча гомологии с этой пробой

не выявлено. Полученный результат указывает на отличия повторённых последовательностей ДНК в XL- и XR-плечах нео-X хромосом у видов рода *Paranocarodes*.

В аутосомах всех видов рода *Paranocarodes* выявлен слабо диспергированный гибридизационный сигнал пробы *PtoXI*. Это значит, что в аутосомах и в XL-плече нео-X хромосом есть небольшое количество одинаковых повторов. ДНК-проба *PtoXI* не гибридизовалась с повторами **нео-Y** хромосом у видов рода *Paranocarodes*. Что говорит о различии молекулярного состава XL-плеч нео-X хромосом и нео-Y хромосом у видов рода *Paranocarodes*.

Гибридизация пробы *PtoY*, полученной из целой нео-Y хромосомы *Paranocarodes tolunai tolunai*, с нео-X хромосомами видов рода *Paranocarodes* не выявила гомологии между нео-Y и XL-плечом нео-X хромосомы. Такой результат говорит о гетерогенном молекулярном составе нео-Y хромосомы и XL-плеча нео-X хромосом у *Paranocarodes*.

Гибридизация ДНК-пробы *PtoY* с хромосомами видов рода *Paranocarodes* показала значительную гомологию С-позитивных районов нео-Y хромосом у всех видов этого рода. Полученный результат позволяет говорить о гомологии повторённых последовательностей в гетерохроматинизированных районах нео-Y хромосом у разных видов рода *Paranocarodes*. В терминальных районах XR-плеч нео-X хромосом у всех видов рода *Paranocarodes* выявлен небольшой район гомологии повторов пробы *PtoY* с последовательностями ДНК в XR-плече нео-X хромосомы. Небольшое количество диспергированных повторов пробы *PtoY* выявлено в аутосомах всех видов рода *Paranocarodes*. Исходя из этого можно говорить о гомологии повторённых последовательностей ДНК в аутосомах и нео-Y хромосомах у видов рода *Paranocarodes*.

Гибридизация микродиссекционных ДНК-проб, полученных из половых хромосом видов рода Nocaracris, с хромосомами видов из рода Paranocarodes (Pamphaginae, Nocarodeini).

Повторы ДНК-пробы *NcyXI* (получена из XL-плеча нео-X хромосомы *Nocaracris cyanipes*, красный сигнал) интенсивно гибридизовались с повторами **XL-плеч** нео-X хромосом у *P. anatoliensi*, *P. turkmen* и *P. karabagi* (Рисунок 43д, и-зеленый сигнал). У *P. t. tolunai* повторы пробы *NcyXI* в **XL-плече** нео-X хромосомы давали слабый диспергированный гибридизационный сигнал (Рисунок 43а). В **XR-плече** нео-X хромосом у всех *Paranocarodes* повторы ДНК-пробы *NcyXI* давали слабый гибридизационный сигнал (Рисунок 43а,д,и,н). Диспергированный гибридизационный сигнал пробы *NcyXI* выявлен во всех аутосомах у всех видов рода *Paranocarodes* (Рисунок 43а,д,и,н). Слабо диспергированный гибридизационный сигнал ДНК-пробы *NcyXI* выявлен в нео-Y хромосомах у *P. anatoliensi*, *P. turkmen* и *P. karabagi* (Рисунок 43д,и,н).

Повторы ДНК-пробы *NcyY* (получена из целой нео-Y хромосомы *Nocaracris cyanipes*, зеленый сигнал) интенсивно гибридизовались с повторами С-позитивного района нео-Y хромосомы у *P. tolunayi* (Рисунок 43а). В гетерохроматиновом районе нео-Y хромосом у *P. anatoliensis*, *P. turkmen* и *P. karabagi* повторы ДНК-пробы *NcyY* давали слабый диспергированный гибридизационный сигнал (Рисунок 43д,и,н). В XL-плече нео-X хромосомы у видов рода *Paranocarodes* повторов, гомологичных ДНК-пробе *NcyY*, не выявлено (Рисунок 43а,д,и,н). В **XR-плече** нео-X хромосом выявлен слабый диспергированный гибридизационный сигнал этой пробы (Рисунок 43а,д,и,н).

Гибридизация ДНК-пробы *NruXI* (получена из XL-плеча нео-X хромосомы *Nocaracris rubripes*, красный сигнал) с хромосомами видов рода *Paranocarodes*, выявила значительную гомологию повторов ДНК-пробы *NruXI* и повторов XL-плеч нео-X хромосомы у всех исследованных видов (Рисунок 43б,е,к,о). Диспергированный гибридизационный сигнал ДНК-пробы *NruXI* выявлен в **XR-плече** нео-X хромосом и в аутосомах у всех видов *Paranocarodes* (Рисунок 43б,е,к,о). В нео-Y хромосомах у всех видов *Paranocarodes* повторов, гомологичных *NruXI* пробе, не выявлено (Рисунок 43б,е,к,о).

Повторы ДНК-пробы *NruY* (получена из целой нео-Y хромосомы *Nocaracris rubripes*, зеленый сигнал) давали интенсивный гибридизационный сигнал в С-позитивном районе нео-Y хромосомы у *P. tolunayi*, *P. turkmen* и *P. karabagi* (Рисунок 43б,к,о). В нео-Y хромосоме у *P. anatoliensis* повторы ДНК-пробы *NruY* гибридизовались только с повторами прицентромерного района нео-Y (Рисунок 43е). В XL-плече нео-X хромосомы у видов рода *Paranocarodes* повторов, гомологичных ДНК-пробе *NruY*, не выявлено (Рисунок 43б,е,к,о). В терминальном районе **XR-плеч** нео-X хромосом ДНК-проба *NruY* давала слабый диспергированный гибридизационный сигнал (Рисунок 43б,е,к,о). В аутосомах у видов рода *Paranocarodes* выявлен слабый диспергированный гибридизационный сигнал ДНК-пробы *NruY* (Рисунок 43б,е,к,о).

Повторы ДНК-пробы *NtaXI* (получена из XL-плеча нео-X хромосомы *Nocaracris tardus*, красный сигнал) интенсивно гибридизовались с повторами XL-плеч нео-X хромосом у всех видов *Paranocarodes* (Рисунок 43в,ж,л,п). В XR-плече нео-X хромосом и в аутосомах видов рода *Paranocarodes* выявлен диспергированный гибридизационный сигнал ДНК-пробы *NtaXI* (Рисунок 43в,ж,л,п).

У всех видов рода *Paranocarodes*, кроме *Paranocarodes anatoliensis*, гомологии повторов ДНК-пробы *NruXI* с повторами нео-Y хромосомы не выявлено (Рисунок 43в,ж,л,п). У *Paranocarodes anatoliensis* в нео-Y хромосоме выявлен слабый диспергированный гибридизационный сигнал ДНК-пробы *NruXI* (Рисунок 43ж).

Диспергированный гибридизационный сигнал ДНК-пробы *NtaY* (получена из целой нео-У хромосомы *Nocaracris tardus*, зеленый сигнал) выявлен в С-позитивных районах нео-У хромосом у всех видов рода *Paranocarodes* (Рисунок 43в,ж,л,п). В **XL-плече** нео-Х хромосомы у видов рода *Paranocarodes* повторов, гомологичных ДНК-пробе *NtaY*, полученной из нео-У хромосомы, не выявлено (Рисунок 43в,ж,л,п). В терминальном районе **XR-плеч** нео-Х хромосом у всех видов рода *Paranocarodes* выявлен слабый диспергированный гибридизационный сигнал ДНК-пробы *NruY* (Рисунок 43в,ж,л,п). В аутосомах всех видов *Paranocarodes*, ДНК-проба *NtaY* давала диспергированный гибридизационный сигнал (Рисунок 43в,ж,л,п).

Анализ гибридизации микродиссекционных ДНК-проб, полученных из половых хромосом видов рода *Nocaracris* с хромосомами видов из рода *Paranocarodes* показал сходство повторённых последовательностей ДНК в XL-плечах нео-Х хромосом видов родов *Nocaracris* и *Paranocarodes*. При этом ДНК-пробы, полученные из XL-плеч нео-Х хромосом видов родов *Nocaracris*, гибридизовались с повторами XL-плеч нео-Х хромосом видов рода *Paranocarodes* менее интенсивно, чем при кросс-гибридизации ДНК-проб, полученных из XL-плеч нео-Х хромосом видов *Nocaracris* с хромосомами видов рода *Nocaracris*. В **XR-плечах** нео-Х хромосом и в аутосомах всех видов рода *Paranocarodes* выявлен диспергированный и слабодиспергированный гибридизационный сигнал ДНК-проб полученных из XL-плеч нео-Х хромосом видов рода *Nocaracris*. Полученный результат указывает на сходство повторённых последовательностей **XR-плеч** нео-Х хромосом и аутосом у видов родов *Nocaracris* и *Paranocarodes*.

Необычный результат показала гибридизация ДНК-проб полученных, из XL-плеч нео-Х хромосом видов рода *Nocaracris* с нео-У хромосомой видов рода *Paranocarodes*. Повторы ДНК-проб *NruXI* и *NcyXI* давали диспергированный гибридизационный сигнал в нео-У хромосоме у некоторых видов рода *Paranocarodes*. Этот результат указывает на сходство молекулярного состава XL-плеч нео-Х хромосом (исходная Х хромосома) видов *Nocaracris* и *Paranocarodes* с нео-У хромосомой (аутосома) видов родов *Nocaracris* и *Paranocarodes*. Эту особенность можно объяснить тем, что в диспергированном состоянии повторы ДНК-проб из XL-плеч нео-Х хромосом есть и в нео-У хромосоме, а амплифицироваться в нео-У хромосоме может любой повтор, даже тот, который был в минимальном количестве. Вероятно, что у видов родов *Nocaracris* и *Paranocarodes* в нео-У хромосомах амплифицировались разные повторы ДНК.

Повторы ДНК-проб, полученные из нео-У хромосом видов рода *Nocaracris*, гибридизовались с повторами нео-У хромосом разных видов рода *Paranocarodes* с разной степенью интенсивности. У большинства видов рода *Paranocarodes*, повторы ДНК-проб *NcyY*, *NruY*, *NtaY* давали диспергированный гибридизационный сигнал в С-позитивном районе нео-У

хромосом. Полученный результат позволяет говорить о сходстве повторённых последовательностей в С-позитивных районах нео-У хромосом у видов рода *Nocaracris* и *Paranocarodes*. В терминальных районах XR-плеч нео-Х хромосом у всех видов рода *Paranocarodes* выявлен небольшой район гомологичный повторам ДНК-проб полученных из нео-У хромосом видов рода *Nocaracris*. Этот результат указывает на сходство повторённых последовательностей терминальных районов XR-плеч нео-Х хромосом и нео-У хромосом, у видов родов *Nocaracris* и *Paranocarodes*.

Гибридизация микродиссекционных ДНК-проб, полученных из половых хромосом Paranocarodes tolunai tolunai, с хромосомами видов из рода Nocaracris (Pamphaginae, Nocarodeini).

Повторы ДНК-пробы ***PtoXI*** (получена из XL-плеча нео-Х хромосомы *Paranocarodes tolunai tolunai*, красный сигнал) давали интенсивный гибридационный сигнал в **XL-плечах** нео-Х хромосом *N. idrisi* и *N. sureyana* (Рисунок 42ф,ш). У *N. cyanipes*, *N. rubripes*, *N. citripes* в XL-плечах нео-Х хромосом повторы ДНК-пробы ***PtoXI*** давали диспергированный гибридационный сигнал (Рисунок 42г,з,р). У *N. tardus* и *N. furvus* в XL-плечах нео-Х хромосом повторов, гомологичных пробе ***PtoXI***, не выявлено (Рисунок 42м,я). У *N. tardus* и *N. furvus* диспергированный сигнал ДНК-пробы ***PtoXI*** выявлен в **XR-плече** нео-Х хромосом (Рисунок 42м,я). У *N. idrisi* выявлено локальное усиление гибридационного сигнала ДНК-пробы ***PtoX*** в С-позитивном прицентромерном районе нео-У хромосомы (Рисунок 42ф). У *N. cyanipes* и *N. furvus* выявлен диспергированный гибридационный сигнал ДНК-пробы ***PtoXI*** в дистальной части нео-У хромосомы (Рисунок 42г,я). У остальных исследованных видов рода *Nocaracris* в нео-У хромосоме повторов гомологичных ДНК-пробе ***PtoXI***, не выявлено (Рисунок 42з,м,ш). Повторы ДНК-пробы ***PtoXI*** давали гибридационный сигнал разной степени интенсивности во всех аутосомах у всех видов рода *Nocaracris* (Рисунок 42г,з,м,р,ф,ш,я).

Повторы ДНК-пробы ***PtoY*** (получена из целой нео-У хромосомы *Paranocarodes tolunai tolunai*, зеленый сигнал) давали интенсивный гибридационный сигнал в С-позитивном районе нео-У хромосом у *N. citripes*, *N. rubripes*, *N. tardus*, *N. sureyana* и *N. furvus* (Рисунок 42г,з,м,ш,я). У *N. idrisi* в нео-У хромосоме выявлен слабо диспергированный гибридационный сигнал ДНК-пробы ***PtoY*** (Рисунок 42ф). В XL-плече нео-Х хромосом слабо диспергированный гибридационный сигнал ДНК-пробы ***PtoY*** выявлен у *N. rubripes*, *N. citripes*, и *N. furvus* (Рисунок 42з,р,я). В XR-плече нео-Х хромосом гибридационный сигнал ДНК-пробы ***PtoY*** диспергирован у *N. rubripes*, *N. idrisi*, *N. sureyana* и *N. furvus* (Рисунок 42з,ф,ш,я). Повторы ДНК-пробы ***PtoY*** давали разной степени интенсивности диспергированный сигнал в аутосомах у всех видов рода *Nocaracris* (Рисунок 42г,з,м,р,ф,ш,я), кроме *N. tardus* (Рисунок 42м).

Гибридизация микродиссекционных ДНК-проб, полученных из половых хромосом *Paranocarodes tolunai tolunai* с хромосомами видов из рода *Nocaracris*, указывает на сходство повторённых последовательностей ДНК в XL-плечах нео-X хромосом только у некоторых видов из рода *Nocaracris*. ДНК-проба, полученная из XL-плеча нео-X хромосомы *Paranocarodes t. tolunai* давала интенсивный гибридизационный сигнал в XL-плече нео-X хромосомы только у *N. idrisi* и *N. sureyana*. У остальных видов рода *Nocaracris* повторы ДНК-пробы *PtoXl* давали либо в диспергированный сигнал, либо отсутствовали. В то же время, у некоторых видов рода *Nocaracris* выявлена гомология повторов ДНК-пробы *PtoXl*, полученной из XL-плеча нео-X хромосомы *Paranocarodes t. tolunai* с повторами XR-плеч нео-X хромосом и С-позитивными районами нео-Y хромосом видов *Nocaracris*. Это указывает на сходство повторённых последовательностей XL- и XR-плеч нео-X хромосом и С-позитивных районов нео-Y хромосом, у некоторых видов родов *Paranocarodes* и *Nocaracris*.

Повторы ДНК-проб, полученные из нео-Y хромосомы *Paranocarodes t. tolunai*, гибридизовались с повторами нео-Y хромосом разных видов рода *Nocaracris* с разной степенью интенсивности. У одних видов рода *Nocaracris* повторы ДНК-пробы *PtoY* интенсивно гибридизовались с С-позитивными районами нео-Y хромосом, а у других эти же повторы были слабо диспергированы в С-позитивном районе нео-Y хромосом. Несмотря на различия в степени гомологии повторов ДНК-пробы *PtoY* и нео-Y хромосом у разных видов рода *Nocaracris*, полученный результат позволяет говорить о сходстве повторённых последовательностей в С-позитивных районах нео-Y хромосом у видов родов *Paranocarodes* и *Nocaracris*.

У всех видов рода *Nocaracris* в аутосомах есть повторы гомологичные ДНК-пробам *PtoXl* и *PtoY*. Исходя из этого результата, можно говорить о сходстве молекулярного состава аутосом и половых хромосом у видов родов *Paranocarodes* и *Nocaracris*.

В результате проведенных экспериментов по кросс-гибридизации ДНК-проб, полученных из половых хромосом видов родов *Nocaracris* и *Paranocarodes*, можно сделать следующие заключения. Молекулярный состав повторённых последовательностей ДНК XL-плеч нео-X хромосом у видов *Nocarodeini* (Pamphaginae) в целом сходен. Несмотря на то, что у всех исследованных видов был выявлен гибридизационный сигнал от проб, полученных из XL-плеч нео-X хромосом, в XL-плечах нео-X хромосом, интенсивность гибридизационного сигнала была выше в группе видов, принадлежащих к одному роду *Nocaracris* или *Paranocarodes*. То есть, молекулярный состав акроцентрической X хромосомы, которая после транслокации с аутосомой стала XL-плечом нео-X хромосомы, вероятно был одинаков у всех видов трибы *Nocarodeini*, а различия в степени гомологии у исследованных видов *Nocaracris* или *Paranocarodes* могут отражать эволюционную дивергенцию этих родов.

Молекулярный состав XR-плеч нео-X хромосом у большинства Nocarodeini отличается от состава повторённых последовательностей ДНК XL-плеч нео-X хромосом. Это подчеркивает то, что XR-плечо нео-X хромосомы и XL-плечо нео-X хромосомы исходно не являются гомологами. В дистальном районе XR-плеча нео-X хромосомы у большинства видов был выявлен гибридационный сигнал ДНК-проб, полученных из нео-Y хромосом. Это указывает на сходство последовательностей XR-плеч нео-X хромосом и нео-Y хромосом.

ДНК-пробы (*NcyY*, *NruY*, *NtaY*) полученные из нео-Y хромосом видов рода *Nocaracris*, давали интенсивный гибридационный сигнал в С-позитивных районах нео-Y хромосом видов рода *Nocaracris*. ДНК-проба (*PtoY*), полученная из нео-Y хромосомы *Paranocarodes t. tolunai* давала интенсивный гибридационный сигнал в С-позитивном районе нео-Y хромосом видов рода *Paranocarodes*. Это указывает на слабую дивергенцию молекулярного состава гетерохроматинизированных районов нео-Y хромосом у близкородственных видов (*Nocaracris* и *Paranocarodes*). Гибридация проб, полученных из нео-Y хромосом видов *Nocaracris*, с хромосомами видов *Paranocarodes*, не дала однозначного ответа на сходство последовательностей нео-Y хромосом у этих видов. У одних видов рода *Nocaracris* или *Paranocarodes* повторы ДНК-проб, полученных из нео-Y хромосом, интенсивно гибридовались с С-позитивными районами нео-Y хромосом. У других видов рода *Nocaracris* или *Paranocarodes* повторы ДНК-проб, полученные из нео-Y хромосом давали слабый гибридационный сигнал в С-позитивном районе нео-Y хромосом. Иногда повторы ДНК-проб, полученных из нео-Y хромосом видов рода *Nocaracris* или *Paranocarodes*, не гибридовались с С-позитивными районами нео-Y хромосом видов рода *Nocaracris* или *Paranocarodes*. Такой результат говорит о том, что в гетерохроматиновом районе нео-Y хромосом могут амплифицироваться различные повторы.

У видов родов *Nocaracris* и *Paranocarodes* повторяющиеся последовательности ДНК-проб, полученные из нео-Y хромосом, не гибридовались или очень слабо гибридовались с проксимальными районами XR-плеч нео-X хромосом. В дистальных районах XR-плеч нео-X хромосом, которые в мейозе конъюгируют с нео-Y хромосомой, выявляется небольшой район гомологи повторённых последовательностей с ДНК-пробами, полученными из нео-Y хромосом. Это результат свидетельствует о том, что исходные гомологи - XR-плечо нео-X хромосомы и нео-Y хромосома у видов родов *Paranocarodes* и *Nocaracris* сохранили частичную гомологию повторённых последовательностей лишь в терминальном районе (псевдоаутосомный район). Это еще раз подтверждает то, что нео-половые хромосомы у видов трибы Nocarodeini находятся на продвинутом этапе эволюции по сравнению половыми хромосомами видов трибы Thrinchini (*Thrinchinae*), которые сохранили большую гомологию XR-плеча нео-X хромосомы с нео-Y хромосомой. В аутосомах у большинства видов рода *Nocaracris* повторы ДНК-проб,

полученные из нео-Y хромосом, присутствовали в диспергированном состоянии. Исходя из этого, можно говорить о гомологии повторённых последовательностей ДНК в аутосомах и нео-Y хромосомах. Следует отметить, что степень представленности ДНК-повторов в аутосомах и нео-Y хромосомах, различна. В С-позитивных районах нео-Y хромосом эти повторы сильно амплифицированы, поэтому мы видим массивный кластер. В аутосомах повторы точно распределены, что отображается диспергированным сигналом.

Впервые, для саранчовых семейства Pamphagidae была показана возможность определения в хромосомах гомологичных повторённых последовательностей ДНК. Ранее, из-за большого количества повторяющихся последовательностей ДНК в геномах саранчовых, этого сделать не удавалось (Jetybayev, et al., 2017b). Использование метода кросс-гибридизации ДНК-проб с последующей компьютерной обработкой (VISSIS) полученных микроизображений, позволило провести сравнительный анализ локализации повторяющихся последовательностей ДНК в хромосомах Pamphagidae из подсемейств Thrinchinae и Pamphaginae, а так же выявить гомологичные повторы. Полученные результаты в значительной мере расширяют возможности реконструкции этапов молекулярной эволюции половых хромосом и аутосом у Pamphagidae.

ОБСУЖДЕНИЕ

При решении исследовательских задач нами впервые были получены сведения о числе, морфологии хромосом, типах определения пола, распределении С-позитивных и С-негативных районов у 41 вида саранчовых Pamphagidae из пустынных, полупустынных и горных районов России, Казахстана, Армении, Турции, Ирана, Северной и Южной Африки. Применение молекулярно-цитологических методов позволило выявить локализацию теломерных повторённых последовательностей и кластеров рибосомной ДНК у этих видов, а использование технологии кроссгибридизации микродиссекционных ДНК проб дало возможность найти гомологичные районы хромосом у разных видов и использовать эти данные для решения задач, связанных с выяснением эволюции половых хромосом и аутосом в модельной группе насекомых.

Давно известно, что исходный для Pamphagidae кариотип состоит из 19 акроцентрических хромосом у самца и 20 акроцентрических хромосом у самок при XX/X0 типе определения пола (Chen, 1964; Alicata et al., 1976; Camacho et al., 1981; Santos et al., 1983; Cabrero et al., 1985; Fossey, 1985; Fu Peng, 1989; Vitturi et al., 1993; Warchałowska-Śliwa et al., 1994; Приложение 1). Из всей совокупности исследованных нами видов, таким типом хромосомного набора обладают 14 видов из подсемейства Pamphaginae (трибы Pamphagini и Euryparyphini) из Марокко и *Saxetania paramonovi* (триба Tropidauchenini) из Ирана. Из подсемейства Thrinchinae (триба Thrinchini) стандартный кариотип имеют *Glyphotmethis adalidae* из Турции, *Asiotmethis muricatus* из Казахстана, *As. tauricus* из Крыма и *Tmethis cisti* из Марокко. Такой же тип хромосомного набора выявлен у *Lobosceliana* sp. из подсемейства Porthetinae (ЮАР).

Отличия от стандартного кариотипа у Pamphagidae с X0 типом определения пола были выявлены у видов рода *Eremopeza* (подсемейство Thrinchinae). У *E. bicoloripes* и *E. saussurei* одна или несколько хромосом в кариотипе были двуплечие, субacroцентрические. У *E. bicoloripes* короткие вторые плечи имеет только X хромосома. У *E. saussurei* большинство хромосом субacroцентрические за исключением двух мелких пар аутосом. Ранее изменение морфологии хромосом у Pamphagidae со стандартным кариотипом, было описано у *Eremopeza festiva* из Армении (Bugrov et al., 2016) и *Melanotmethis fuscipennis*, из Туркменистана (Bugrov, Warchałowska-Śliwa, 1997). У *E. festiva* все аутосомы и X хромосома имеют короткие плечи, а у *Melanotmethis fuscipennis*, четыре пары крупных аутосом и X хромосома субacroцентрические (Bugrov, Warchałowska-Śliwa, 1997). У подавляющего большинства Acridoidea, хромосомы имеют акроцентрическую морфологию (Robertson, 1916; White, 1973; Hewitt, 1979; John, 1983). Традиционно, изменение морфологии акроцентрических хромосом, без изменения их числа, в

кариотипах саранчовых объясняют перичентрическими инверсиями. Перичентрические инверсии в результате перемещения центромеры изменяют морфологию акроцентрической хромосомы на мета- или субметацентрическую (White, 1951; Hewitt, 1979). Результатом такой инверсии, может быть образование коротких вторых плеч в исходно акроцентрических хромосомах у видов *Eremopeza*. Молекулярно-цитогенетический анализ хромосом у видов этого рода показал, что в прицентромерных районах двуплечих хромосом локализованы интеркалярные теломерные повторы (ITS). Обнаружение, интеркалярного теломерного повтора, в прицентромерном районе двуплечих хромосом у *Eremopeza*, поддерживает гипотезу, возникновения вторых плеч в результате перичентрических инверсий, в которые был вовлечён район, содержащий теломерный повтор. Анализ локализации кластеров рибосомной ДНК в двуплечих хромосомах у *E. festiva* показал, что короткие С-позитивные плечи обогащены повторами рибосомной ДНК. На основе этого было высказано предположение, что короткие плечи у этого вида сформировались в результате амплификации повторов рибосомной ДНК (Bugrov et al., 2016). У исследованных нами *E. bicoloripes* и *E. saussurei*, не все хромосомы в кариотипах имели вторые плечи. У *E. bicoloripes*, двуплечей является только X хромосома, в которой повторов рибосомной ДНК обнаружено не было. У *E. saussurei* большинство хромосом в кариотипах имеют мелкие вторые плечи, но кластеры рибосомной ДНК выявлены только в их прицентромерных районах. Эти наблюдения свидетельствуют о том, что формирование вторых плеч у *E. bicoloripes* и *E. saussurei*, не связано с амплификацией повторов рибосомной ДНК, а является результатом перичентрической инверсии. Вероятно, первично подобные хромосомные перестройки имели место и в эволюции кариотипа *E. festiva*, а обогащение коротких плеч последовательностями рибосомной ДНК у этого вида – результат инвазии этих повторов в короткие плечи с последующей амплификацией. Вполне вероятно, что формирование вторых плеч в кариотипах саранчовых рода *Eremopeza*, является их отличительной особенностью среди других Pamphagidae с исходным кариотипом ($2n=19\text{♂}/20\text{♀}$). Для подтверждения этой догадки, необходимо исследовать кариотипы других видов рода *Eremopeza*. Виды рода *Eremopeza* могут стать хорошей моделью для исследования механизмов образования вторых плеч у саранчовых.

Изменение морфологии акроцентрических аутосом также было обнаружено у *Glyphotmethis dimorphus* (подсемейство Thrinchinae) и *Tropidauchen* sp. (подсемейство Pamphaginae) с нео-XY/нео-XX типом определения пола. У *G. dimorphus*, короткие плечи имеют две большие пары аутосом, а у *Tropidauchen* sp., – самая крупная пара аутосом. Анализ локализации теломерного повтора в хромосомах *G. dimorphus* и *Tropidauchen* sp., не выявил в прицентромерном районе двуплечих хромосом, интеркалярных теломерных последовательностей. Вероятно, при образовании вторых плеч, у этих видов, разрыв хроматид произошел в районе хромосомы, не содержащем теломерных повторов. Кластеров рибосомной

ДНК, в коротких эухроматиновых плечах, у *G. dimorphus* и *Tropidauchen* sp., также выявлено не было. У *G. dimorphus*, кластеры рибосомной ДНК, располагались в прицентромерном районе двуплечих хромосом, а у *Tropidauchen* sp., в субacroцентрической паре аутосом повторов рибосомной ДНК не выявлено. Видимо, и в этом случае основным механизмом образования вторых плеч в некоторых аутосомах кариотипа стала перичентрическая инверсия. Как видим, перичентрические инверсии спорадически могут отмечаться в разных группах Pamphagidae, но только у видов рода *Eremopeza* они могут служить диагностическим цитогенетическим признаком.

Большая часть исследованных нами видов из подсемейств Thrinchinae (триба Thrinchini) и Pamphaginae (трибы Nocarodeini и Tropidauchenini) имеют хромосомные наборы, состоящие из 18 хромосом у самцов и самок при нео-XX/нео-XY типе определения пола. Сравнительный анализ структурных особенностей половых хромосом, у Pamphagidae обладающих нео-XY/нео-XX типом определения пола, из подсемейств Thrinchinae (Thrinchini, некоторые виды родов *Glyphotmethis* и *Asiotmethis*) и Pamphaginae (Nocarodeini и Tropidauchenini) выявил, разные стадии гетероморфизации первоначальных гомологов XR-плеча нео-X хромосомы и нео-Y хромосомы. У видов Thrinchinae (Thrinchini, некоторые виды родов *Glyphotmethis* и *Asiotmethis*), отмечены начальные признаки гетероморфизации XR-плеча и нео-Y хромосомы. Нео-Y хромосома по длине равна своему гомологу – XR-плечу нео-X хромосомы. В профазе мейоза нео-Y хромосома и XR-плечо нео-X хромосомы нормально конъюгируют и формируют бивалент с двумя, тремя хиазмами. Нео-Y хромосома имеет небольшой прицентромерный С-блок, а в ее проксимальной части выявляются один или несколько мелких интеркалярных блоков гетерохроматина, отсутствующие в гомологичном ей XR-плече нео-X хромосомы.

У видов трибы Tropidauchenini из подсемейства Pamphaginae половые хромосомы также демонстрируют высокий уровень гомологии XR-плеча нео-X хромосомы с нео-Y хромосомой. Нео-Y хромосома у этих видов по длине практически равна XR-плечу нео-X хромосомы. В профазе мейоза нео-Y хромосома и XR-плечо нео-X хромосомы нормально конъюгируют и образуют бивалент с двумя хиазмами, реже с одной интерстициальной хиазмой. В отличие от нео-Y хромосомы видов Thrinchini (Thrinchinae), у Tropidauchenini (Pamphaginae) в прицентромерном районе нео-Y хромосомы локализованы единичные крупные С-позитивные блоки, а у Thrinchini кроме прицентромерного блока имеются множественные интеркалярные блоки, приближенные к центромерному району.

На другом этапе эволюции половых хромосом в подсемействе Pamphaginae находятся виды трибы Nocarodeini. В этой группе нео-Y хромосома у всех исследованных видов, значительно меньше исходно гомологичного ей XR-плеча нео-X хромосомы. Независимо от особенностей поведения в мейозе аутосомных бивалентов, XR-плечо и нео-Y хромосома

ассоциируют только дистальными участками и образуют единственную хиазму. Neo-Y хромосома имеет прицентромерный блок и множественные интеркалярные блоки, разделенные эухроматиновыми зонами. На сильно конденсированных стадиях интеркалярные блоки кажутся слившимися в единый блок, как между собой, так и с прицентромерным блоком. При этом, проксимальный район, нео-Y хромосомы остается С-негативным. По аналогии с хорошо исследованными половыми хромосомами млекопитающих (Ohno, 1967; Charlesworth et al., 2005), этот эухроматиновый участок у саранчовых Pamphagidae, можно считать псевдоаутосомным районом.

Дальнейший этап эволюции кариотипа в подсемействе Pamphaginae связан с образованием множественных половых хромосом у видов рода *Paranothrotres* из трибы Nocarodeini. Кариотип *P. citimus* состоит из 14 акроцентрических аутосом у самцов и самок при $X_1X_2Y/X_1X_1X_2X_2$ типе определения пола. Этот вариант хромосомного определения пола возникает на основе нео-XX/нео-XY в результате транслокации между акроцентрической нео-Y и одной из аутосом. В результате этого слияния акроцентрическая нео-Y становится субметацентрической хромосомой. Короткое плечо (YL) субметацентрической нео-Y хромосомы является исходной С-позитивной Y-хромосомой, а длинное плечо (YR) это эухроматиновая аутосома вступившая в транслокацию. Из всех ранее исследованных видов Pamphagidae, такой же тип определения пола был выявлен у близкородственного вида из рода *Paranothrotres* – *P. opacus* (Bugrov et al., 2016). При сравнении цитогенетических характеристик этих двух видов, можно отметить, что они практически идентичны, различия касаются только самой мелкой пары аутосом, которая у *P. citimus* имеет значительно больший герерохроматиновый С-блок, чем у *P. opacus*. Следует обратить внимание на то, что эта разница может быть связана с полиморфизмом по величине и локализации С-блоков на самой мелкой паре аутосом, который очень часто отмечается при анализе дифференциально окрашенных хромосом (Santos et al., 1983; Cabrero et al., 1985).

Для установления механизмов которые приводят к изменению кариотипов необходимы маркёры изменение положения которых позволит сделать вывод о типе хромосомной перестройки. Одним из таких маркёров является теломерный повтор ДНК. У большинства исследованных видов Pamphagidae с нео-половыми хромосомами, сигнал теломерных последовательностей в прицентромерном районе нео-X хромосомы отсутствовал. Отсутствие теломерного повтора в прицентромерном районе нео-X хромосомы, можно объяснить, утерей терминальных районов акроцентрических хромосом при транслокации X хромосомы и аутосомы. На этой основе 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-Х и нео-У хромосомой.

Полученные данные позволяют по-новому взглянуть на начальные этапы формирования XX/XY гетерогаметного пола из исходного XX/X0. Вероятно, что причиной утраты гомологии между парными хромосомами у саранчовых Pamphagidae могла быть не инверсия изменяющая группы сцепления генов (Charlesworth et al., 1999, 2005), а делеция небольшого района хромосомы содержащей теломерный повтор. В результате делеции хромосома могла либо элиминировать, либо слиться с другой хромосомой (робертсоновская транслокация). При робертсоновской транслокации пары акроцентрических аутосом и двух акроцентрических Х хромосом у самок образуются две двуплечие нео-Х хромосомы, которые состоят из исходных Х хромосом и гомологичных аутосом, вступивших в транслокацию. У самцов единственная Х хромосома может слиться только с одной аутосомой из пары, а вторая аутосома из этой пары становится гетерохромосомой или нео-У хромосомой. Гетерохромосома (нео-У хромосома) в отличие от своего бывшего гомолога (аутосомной части нео-Х хромосомы) содержит на обоих концах хромосомы повторы теломерной ДНК, что приводит к возникновению структурных различий между первоначально изоморфными гомологами. У исследованных нами Pamphagidae из разных триб и подсемейств, выявлены разные степени гетероморфизации первоначальных гомологов XR-плеча нео-Х хромосомы и нео-У хромосомы. У представителей трибы Thrinchini (Thrinchinae) и Tropidauchenini (Pamphaginae) XR-плечо и нео-У хромосома изоморфны, за исключением кластера теломерного повтора, что позволяет им нормально рекомбинировать в профазе I мейоза и формировать бивалент с двумя или тремя хиазмами. Такой вариант гетероморфизации половых хромосом можно считать исходным на пути эволюции XY гетерогаметного пола из исходного X0. Вариант более продвинутой стадии гетероморфизации половых хромосом выявлен у Pamphagidae из трибы Nocarodeini (Pamphaginae). У всех исследованных видов трибы Nocarodeini нео-У хромосома не только значительно меньше исходно гомологичного ей XR-плеча нео-Х хромосомы, но и сильно гетерохроматинизирована, такие различия ведут к блокированию рекомбинации между этими хромосомами. Блокирование рекомбинации у видов трибы Nocarodeini распространилось практически по всей длине нео-У хромосомы и это привело к её структурной и генетической деградации. Нео-У хромосома у видов трибы Nocarodeini стала похожа на У хромосому млекопитающих, которая сохранила гомологию с исходно гомологичной ей хромосомой только в маленьком псевдоаутосомном районе (Ohno, 1967; Charlesworth et al., 2005).

Еще одним молекулярным маркером, который часто применяют для определения структурных перестроек хромосом, у Acridoidea, являются кластеры рибосомной ДНК (Cabrerо, Camacho, 2008). Основным перемещающим механизмом кластеров рибосомной ДНК, у

Acridoidea, являются структурные перестройки, в том числе перицентрические инверсии (Cabrero, Camacho, 2008). У большинства Acridoidea кластеры рибосомной ДНК располагаются на одной, двух парах хромосом, причем на одной хромосоме всегда расположен только один кластер рибосомной ДНК (López-León et al., 1999; Cabrero et al., 2003ab; Cabrero, Camacho, 2008; Keller et al., 2006; Jetybayev et al., 2012). Такое постоянство в расположении кластеров рибосомной ДНК в хромосомах Acridoidea, натолкнуло на мысль, о том, что с помощью этого маркера, возможно, выявить пару аутосом вступившую в слияние с предковой X-хромосомой. Анализ данных о локализации кластеров рибосомной ДНК в хромосомах у исследованных нами видов Pamphagidae показал, что они расположены очень разнообразно как у видов с XO так и у видов с нео-XY типом определения пола. В отличие от видов саранчовых семейства Acrididae, у саранчовых семейства Pamphagidae кластеры рибосомной ДНК могут быть локализованы на нескольких парах аутосом (1-6, 8, X, XL-плечо), причем на одной хромосоме может быть локализовано от одного до трех кластеров рибосомной ДНК. Такое расположение кластеров рибосомной ДНК в хромосомах Pamphagidae, несомненно, является специфической характеристикой кариотипов этого семейства саранчовых. Однако эта особенность, расположения кластеров ДНК в хромосомах у Pamphagidae, не позволила использовать их в качестве маркера пары аутосом вступивших в слияние с предковой X хромосомой. У видов из трибы Thrinchini (Thrinchinae) локализация кластеров рибосомной ДНК и в X, и в нео-X хромосомах варьирует так же, как и в аутосомах. Поэтому мы не можем говорить о закономерностях распространения кластеров рибосомной ДНК в геноме видов трибы Thrinchini. У большинства видов подсемейства Pamphaginae из трибы Pamphagini в акроцентрической X хромосоме кластера рибосомной ДНК нет. Исключением является только *Paracinipe dolichocera*. У видов трибы Tropidauchenini кластеры рибосомной ДНК не выявлено ни в X хромосоме у видов с XO типом определения пола, ни в нео-X хромосоме у видов с нео-XY типом определения пола. Тогда как у большинства видов, видов трибы Nocarodeini, за исключением *Paranocarodes anatoliensis anatoliensis* и *P. turkmen*, кластеры рибосомной ДНК выявлены в XL-плече нео-X хромосомы (исходная X хромосома). Кластеры рибосомной ДНК в XL-плече нео-X хромосомы у видов Nocarodeini локализованы либо в прицентромерном, либо в интеркалярном районе XL-плеча нео-X хромосомы. Перемещение кластера рибосомной ДНК в интеркалярное положение, скорее всего, является результатом инверсии в этом районе нео-X хромосомы. Отсутствие кластера рибосомной ДНК в нео-X у *Paranocarodes a. anatoliensis* и *P. turkmen* можно объяснить, делецией района хромосомы, маркированного этим кластером. На основе анализа локализации кластеров рибосомной ДНК у видов подсемейства Pamphaginae, можно сделать предположении, что плезиоморфным признаком этого подсемейства является отсутствие кластера ДНК в X и XL-плече нео-X хромосомы. Возникновение кластера

рибосомной ДНК в XL-плече нео-X хромосомы у видов трибы *Nocarodeini* является апоморфным признаком, который отражает его развитие на пути эволюции нео-половых хромосом.

Сравнительный анализ, структурных особенностей половых хромосом, у исследованных нами видов *Pamphagidae*, позволяет высказать предположение, о том, что половые хромосомы в группах *Thrinchini* (*Thrinchinae*), *Tropidauchenini* и *Nocarodeini* (*Pamphaginae*), находятся на разных этапах дифференциации. Вероятно, у *Thrinchini* (*Thrinchinae*) слияние X хромосомы с одной из аутосом, произошло относительно недавно, на это указывает сходный размер нео-Y хромосомы с её гомологом и небольшие районы гетерохроматина. Подтверждением ранних этапов эволюции половых хромосом у *Thrinchini*, также, может являться то, что, в этой трибе были описаны кариотипы как с исходным X0/XX, так и с измененным, нео-XX/нео-XY типом определения пола.

Долгое время, начальные стадии половых хромосом у видов подсемейства *Pamphaginae* не были известны. Впервые полученные нами данные о кариотипических особенностях видов трибы *Tropidauchenini*, из Ирана, позволяют считать их исходным этапом эволюции нео-половых хромосом в подсемействе *Pamphaginae*. На это указывают не только, описанные выше структурные особенности половых хромосом видов *Tropidauchenini*, но и то, что у *Saxetania paramonovi*, из этой трибы, был описан исходный X0/XX тип определения пола.

Все исследованные виды трибы *Nocarodeini* из этого подсемейства (*Pamphaginae*) имеют только нео-XY тип определения пола. Причем, структурные особенности нео-Y хромосомы соответствуют продвинутым стадиям эволюции нео-Y хромосомы в подсемействе *Pamphaginae* (см. выше). Следующий этап эволюции нео-половых хромосом в трибе *Nocarodeini*, выявлен у видов рода *Paranothrotetes*, у которых акроцентрическая нео- Y хромосома, вступает в слияние с аутосомой (см. выше).

Сходная тенденция эволюции половых хромосом, была описана и у саранчовых подсемейства *Melanoplinae*, распространённых в неотропической области (*Acrididae*) (Castillo et al., 2010ab; Bidau et al., 2011). В отличие от *Pamphagidae*, исходным, для *Melanoplinae* (как и для всех *Acrididae*), является кариотип, состоящий из 23 у самца и 24 у самки акроцентрических хромосом при XX/X0 типе определения пола. Этот тип определения пола является обычным для палеарктических видов этого подсемейства. Тогда как у подавляющего большинства видов *Melanoplinae* из неотропического региона, был описан нео-XX♀/нео-XY♂ тип определения пола (Mesa, 1971; Mesa et al., 1982; Carbonell, Mesa, 2006; Castillo et al., 2010ab; Bidau et al., 2011; Palacios-Gimenez et al., 2013, 2015, 2018). Основным механизмом образования нео-половых хромосом у неотропических видов *Melanoplinae*, как и у других организмов (насекомых, рыб, млекопитающих, растений) с нео-XX♀/нео-XY♂ типом определения пола,

является робертсоновская транслокация исходно акроцентрической X хромосомы с одной из акроцентрических аутосом (Mesa, 1971; Mesa et al., 1982; Carbonell, Mesa, 2006; Castillo et al., 2010ab). В результате робертсоновской транслокации, у большинства неотропических Melanoplinae, образуется метацентрическая нео-X, а непарная аутосома становится акроцентрической нео-Y хромосомой (Díaz, Sáez, 1968; Cardoso, Dutra, 1979; Mesa et al., 1982; Martí, Bidau, 2001; Carbonell, Mesa, 2006; Castillo et al., 2010a,b). Чаще всего в транслокацию с акроцентрической X-хромосомой, у видов Melanoplinae, вступает одна из больших пар аутосом. Анализ структурных особенностей нео-половых хромосом у 51 вида неотропических Меланоплин показал, что у 28 видов (55%) в образование нео-половых систем вовлекается одна из больших пар аутосом (L), а у 20 видов (39%) в слияние вступает средняя пара аутосом (M). И только у 3 видов (6%) в транслокацию вступает мелкая пара аутосом (S) (Castillo et al., 2010a).

Большое число видов саранчовых подсемейства Melanoplinae с нео-половыми хромосомами именно в неотропическом регионе объясняют тем, что местом возникновения группы Melanoplinae считается Северная Америка, на территории которой произошла хромосомная перестройка, приведшая к трансформации половых хромосом. Дальнейшая дивергенция видов на основе нео-половых хромосом привела к формированию широкого кариотипического спектра у Melanoplinae, в том числе и появлению множественных половых хромосом (Castillo et al., 2010a).

Нео-половые хромосомы в подсемействе Melanoplinae, демонстрируют разную степень гомологии нео-Y и XR-плеча нео-X хромосомы. На ранних этапах эволюции нео-XY системы определения пола, как у палеарктических, так и неотропических видов этой группы нео-Y хромосома и XR-плечо нео-X хромосомы в мейозе сохраняют полный синапсис, формируя одну или две хиазмы. Необходимо отметить, что на этом этапе нео-Y хромосома не отличается от своего гомолога XR-плеча нео-X хромосомы по степени гетерохроматинизации (*Podisma pedestris*, *P. sapporensis*, *Baeacris punctulatus*, *Leiotettix sanguineus*) (John, Hewitt, 1968; Mesa et al., 1982; Vugrov, 1995; Castillo et al., 2010a). Более продвинутые нео-системы у Melanoplinae, демонстрируют ограничение рекомбинации между Y хромосомой и XR-плечом X хромосомы, которые поддерживают дистально-терминальную ассоциацию для мейотической сегрегации. В этих случаях нео-Y почти полностью гетерохроматиновая (*Ronderosia bergi*) (Díaz, Sáez, 1968). В редких случаях и XR-плечо становится гетерохроматным (*Aleuas*, *Zygoclistron*) (Mesa et al., 2001). Иногда даже XL-плечо нео-X хромосомы может быть вовлечено во внутреннюю хромосомную перестройку (*Dichroplus vittatus*) (Bidau, Martí, 2001). Дальнейшее изменение образованных нео-XX/XY систем у Melanoplinae, связано с образование множественных X1X2Y/♀X1X1X2X2 систем половых хромосом (*Dichromatos lilloanus*, *D. schrottkyi*, *Dichroplus dubius*, *Leiotettix politus*) (Mesa, 1962; Mesa, Mesa, 1967; Ferreira, Mesa, 2010; Palacios-Gimenez et

al., 2013). Множественные системы определения пола у *Melanoplinae*, возникают на основе нео-XX/нео-XY механизма определения пола в результате центрического слияния между нео-Y хромосомой и одной из аутосом. В итоге повторного слияния образуются, метацентрическая нео-X₁ хромосома, метацентрическая нео-Y хромосома, а оставшаяся непарной, акроцентрическая аутосома становится нео-X₂ хромосомой. X₁L, X₁R и YL плечи позитивно гетерохроматинизированы, YR-плечо и X₂ эухроматиновые (Mesa, 1962; Mesa, Mesa, 1967).

Сравнительный анализ двух моделей эволюции типов определения пола у саранчовых показывает, что нео-половые хромосомы в семействе *Acrididae* (подсемейство *Melanoplinae*) и в исследованном нами семействе *Pamphagidae*, образуются на основе робертсоновской транслокации исходной акроцентрической X-хромосомы и одной из акроцентрических аутосом. И в подсемействе саранчовых *Melanoplinae*, и в подсемействах *Thrinchinae* и *Pamphaginae* (*Pamphagidae*) в слияние с X-хромосомой вступает одна из крупных акроцентрических аутосом кариотипа. Непарная аутосома становится нео-Y хромосомой. В обеих группах прослеживается эволюция нео-Y хромосомы от аутосомы до сильно гетерохроматинизированной и миниатюризированной гоносомы. В ходе эволюции половых хромосом прослеживается тенденция блокирования рекомбинации между XR-плечом нео-X хромосомы и нео-Y хромосомой в мейозе, уменьшения размера и гетерохроматинизации нео-Y хромосомы. Выявленные тенденции могут служить критерием эволюционной продвинутой той или иной группы в своём историческом развитии.

На основе анализа литературных источников, можно отметить, что у неотропических видов *Melanoplinae*, по сравнению с исследуемыми нами *Pamphagidae*, описано больше различных вариантов формирования половых хромосом. Это может быть отражением более длительной эволюции системы половых хромосом у *Melanoplinae* по сравнению с каждым из двух подсемейств семейства *Pamphagidae* – *Thrinchinae* и *Pamphaginae*.

Анализируя этапы эволюции половых хромосом, следует подчеркнуть, что X – аутосомная транслокация описана у более чем 100 видов саранчовых, но только у саранчовых подсемейства *Melanoplinae* и семейства *Pamphagidae* на основе такого перестроенного кариотипа происходит дивергенция, приведшая к появлению широкого спектра видов с разными вариантами дифференциации исходных гомологов между XR-плечом нео-X хромосомы и нео-Y хромосомой. Дальнейшее исследование этих моделей позволит установить формы и темпы структурно-функционально и молекулярной эволюции половых хромосом у саранчовых.

Предпринятый нами анализ степени гомологии микродиссекционных ДНК-проб, приготовленных из половых хромосом *Pamphagidae*, позволил выявить частичную гомологию проксимальной части нео-X и нео-Y хромосом у видов родов *Asiotmethis* и *Glyphotmethis*

(Trinchinae, Thrinchini). В результате кросс-гибридизации ДНК-пробы полученной из XL-плеча нео-X хромосомы было показано, что X и нео-X хромосомы являются гомологами. Данный результат указывает на единство предковой X хромосомы, как у видов с XX/X0, и так и с нео-XY/нео-XX типами определения пола, по крайней мере у видов родов *Asiotmethis* и *Glyphotmethis*. Выявить район аутосомы который, как предполагается, вошел в транслокацию с исходной X хромосомой в результате гибридизации с хромосомами данных видов нам не удалось. С-позитивные районы нео-Y хромосом у видов *Asiotmethis* и *Glyphitmethis* сохраняют большую гомологию в дистальной части, в то время как непосредственно в прицентромерной части сходство с микродиссекционной ДНК-пробой было значительно меньше. Гомология повторов в дистальной части нео-Y хромосом, еще раз указывает на эволюционную близость родов *Glyphotmethis* и *Asiotmethis*. Можно предположить, что дивергенция отдельных видов *Glyphotmethis* и *Asiotmethis*, произошла сравнительно недавно и дистальные С-позитивные районы хромосом еще не успели накопить достаточно отличий, чтобы микродиссекционная ДНК-проба не гибридизовалась с ними. Малая степень гомологии повторённых последовательностей прицентромерных районов хромосом у видов родов *Glyphotmethis* и *Asiotmethis* еще раз подтверждает, что состав ДНК в прицентромерных С-позитивных районах различен даже у таксономически близких видов саранчовых (Abdelaziz et al., 2007; Джетыбаев и др., 2010). Это свидетельствует о высокой скорости эволюции ДНК в прицентромерных районах хромосом саранчовых.

У видов трибы *Nocarodeini*, анализ кросс-гибридизации ДНК-проб выявил частичную гомологию повторённых последовательностей ДНК XL-плеч нео-X хромосом. Это указывает на монофилию XL-плеч нео-X хромосом у исследованных видов трибы *Nocarodeini*. Интенсивность гибридизационного сигнала в С-позитивных районах нео-Y хромосом в пределах исследованной выборки видов *Nocarodeini* была различна. Неравномерность гибридизационного сигнала в кросс-гибридизационных экспериментах, может говорить о различии в молекулярной организации нео-Y хромосом у близких видов саранчовых трибы *Nocarodeini*. Вероятно, что с увеличением эволюционного расстояния, снижается степень гомологии последовательностей и интенсивность гибридизационного сигнала падает. Обнаружение кластеризованных повторов, гомологичных микродиссекционным ДНК-пробам в прицентромерных районах аутосом внутри родов *Paranocaracris* и *Nocaracris* указывает на родство и сильную дивергенцию, но только в пределах группы видов.

В целом, проведенная кросс-гибридизация показала, что полученные ДНК-пробы содержат большое количество повторённых последовательностей, диспергированных в эухроматиновой части генома. ДНК-пробы полученные из гетерохроматинизированных нео-Y хромосом также содержат повторы, кластеризованные в С-позитивном районе этих хромосом.

С-позитивные блоки на других хромосомах не обогащены повторами представленными в нео-Y ДНК-пробе. Это указывает на независимую молекулярную эволюцию С-позитивных районов аутосом и нео-Y хромосом. Установленная гомология повторенных последовательностей ДНК в Y-хромосоме у разных видов родов *Asiotmethis* и *Glyphotmethis* показывает слабую дивергенцию молекулярной композиции Y-хромосомы в этой группе видов. Кросс-гибридизация ДНК-проб *Nocarodeini* также выявила сходства последовательностей ДНК в Y-хромосоме но, только в видовых группах (*Paranocaracris* и *Nocaracris*) между этими группами гомология повторов ДНК крайне низка. Степень гомологии повторенных последовательностей оценивается нами как содержательный филогенетический сигнал в трибе *Nocarodeini*. При этом, скорее всего гетерохроматинизация Y-хромосомы в той или иной монофилетической группе видов происходила на основе амплификации случайных, быстро эволюционирующих повторов ДНК.

При сопоставлении всех известных данных о кариотипах саранчовых Pamphagidae (Приложение 2) с их географическим распространением можно увидеть, что Pamphagidae, обитающие в Южной и Северной Африке, обладают только исходным для этого семейства числом хромосом и типом определения пола ($2n\♂=19/X0$, $2n\♀=20/XX$) (Рисунок 44. синие значки). Значительная часть видов, населяющих территорию Передней, Средней, Малой и сопредельных регионов Центральной Азии имеют другие кариотипы ($2n=18\text{нео-XY}/\text{нео-XX}$; $2n=14X_1X_2Y/X_1X_1X_2X_2$) (Рисунок 44. красные значки).



Рисунок 44. Ареал и цитогенетические данные Pamphagidae из подсемейств Thrinchinae, Pamphaginae, Porthetinae, Echinotropinae, Akicerinae. Красной линией показан ареал видов

Thrinchinae. Зеленым выделен ареал видов Pamphaginae. Черной линией обозначен ареал видов Porthetinae, Akicerinae и Echinotropinae. Значками отмечены цитогенетически исследованные виды. Синий цвет значка – X0, красный – нео-XY. P – Pamphaginae; Точка – Thrinchinae; Квадрат – Porthetinae; Звезда – Akicerinae. Ареал нарисован на основе данных приведенных на сайте Orthoptera Species File, работах В. Massa (2013); М. Ünal (2016) и Г.Я. Бей-Биенко, Л.Л. Мищенко (1951).

Исходя из этого замечания, можно предположить, что перестройка, которая привела к образованию нео-Х, нео-У и более сложных комплексов половых хромосом у Pamphagidae из подсемейства Pamphaginae (Tropidauchenini и Nocarodeini) произошла и эволюционировала на территории Западной и Центральной Азии. Закреплению хромосомных перестроек в популяциях Pamphaginae (Tropidauchenini и Nocarodeini) могли способствовать активные горообразовательные процессы, происходившие на границе олигоцена-миоцена на территории Передней и Средней Азии (Çırlak et al., 1993). В ледниковые и межледниковые периоды популяции Pamphaginae (Tropidauchenini и Nocarodeini), с перестроенными кариотипами, могли сохраняться в рефугиумах, где эти перестройки быстро фиксировались из-за ограниченного распространения популяции. Дальнейшая эволюция половых хромосом, могла быть связана нарушением гомологии и накоплением повторяющихся последовательностей ДНК в нео-У хромосоме, что мы наблюдаем у видов триб Tropidauchenini и Nocarodeini, обитающих на территории Передней Азии. Именно на территории Передней Азии, нами было выявлено основное разнообразие типов определения пола (Рисунок 45).



Рисунок 45. Ареал (черта) и цитогенетические данные (кружки) саранчовых подсемейства Pamphaginae. Синие кружки – X0, красные – нео-XY. Ареал нарисован на основании данных приведенных на сайте Orthoptera Species File, в работах М. Ünal (2016) и Г.Я. Бей-Биенко, Л.Л. Мищенко (1951).

Когда и где произошла и закрепились перестройка половых хромосом у видов трибы *Thrinchini* (*Thrinchinae*), обитающих на территории Центральной Азии, на данное время, сказать сложно. Но, если судить по степени структурной гомологии половых хромосом, то вероятно, что перестройка у *Thrinchini* является относительно недавним событием. Можно предположить, что, в более благоприятных условиях обитания *Pamphagidae*, например, на территории Северной Африки, популяции имели возможность свободного обмена генетической информацией. Поэтому, даже если и перестройка и возникала в популяциях, то она элиминировалась естественным отбором. В пользу этого говорит и то, что Северо-африканские виды *Pamphagidae* имеют только исходный для этого семейства кариотип (Рисунок 44, 46).



Рисунок 46. Ареал (черта) и цитогенетические данные (кружки) саранчовых подсемейства *Thrinchinae*. Синие кружки – X0, красные – нео-XY. Ареал нарисован на основании данных приведенных на сайте *Orthoptera Species File*, в работах М. Ünal (2016) и Г.Я. Бей-Биенко, Л.Л. Мищенко (1951).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Исходя из всех полученных нами данных об особенностях кариотипов *Pamphagidae*, можно сказать, что эта группа саранчовых является хорошей моделью для выяснения путей эволюции половых хромосом. На примере половых хромосом *Pamphagidae* нам удалось проследить разные этапы появления структурных различий между первоначально изоморфными гомологами - аутосомой и Y хромосомой при формировании XX/XY гетерогаметного типа определения пола из исходного для этих насекомых XX/X0. Это утверждение основано на том, что в разных группах *Pamphagidae* нами были зафиксированы различные стадии структурной гомологии нео-X и нео-Y хромосом и гетерохроматинизации нео-Y хромосом. У видов *Thrinchini* (*Thrinchinae*) слияние X хромосомы с одной из аутосом, вероятно произошло недавно, на что указывает сходный размер нео-Y хромосомы с её гомологом и небольшие районы гетерохроматина. Кроме того, в этой группе видов были

найжены виды как с X0/XX, так и с neo-XX/neo-XY типами определения пола. Половые хромосомы Tropidauchenini (Pamphaginae) так же находятся на начальных этапах развития, но в отличие от половых хромосом видов Thrinchinae (Thrinchini), neo-Y хромосома имеет крупные блоки гетерохроматина. Это может указывать на то, что neo-Y хромосома по своему молекулярному составу значительно обособилась от своего гомолога и подавление рекомбинации между ними впоследствии будет только нарастать. Тем самым у Tropidauchenini мы наблюдаем еще один вариант дифференциации половых хромосом. У Nocarodeini (Pamphaginae), neo-Y хромосома демонстрирует продвинутую стадию гетероморфизма, она значительно меньше своего гомолога, а районы гетерохроматина занимают практически всю ее длину. Кроме того, все исследованные нами виды этой группы имеют только neo-XX/neo-XY тип определения пола. Выявленные различия в развитии половых хромосом у Thrinchini (*Asiotmethis* и *Glyphotmethis*), Tropidauchenini и Nocarodeini могут говорить о независимых путях и времени возникновения Y-хромосомы в этих группах. Анализ географического распространения Pamphagidae с X0/XX и neo-XY/neo-XX типами определением пола позволяет предположить, что эволюционные события, приведшие к трансформации исходного определения пола (X0/XX), произошли на территории Передней Азии. Так как в других частях ареала этого семейства, а именно в Северной и Южной Африке, Европа, все описанные до настоящего времени кариотипы Pamphagidae представлены только исходным для этой группы набором хромосом.

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 тип хромосомного набора, состоящий из 19 акроцентрических хромосом ($2n^{\text{♂}}=19; X0$). У 18 видов кариотип состоит из 16 акроцентрических хромосом, одной метацентрической neo-X и одной акроцентрической neo-Y хромосом ($2n^{\text{♂}}=16; \text{neo-XY}$). Такой кариотип образовался в результате робертсоновской транслокации исходной акроцентрической X хромосомы с одной из акроцентрических аутосом. У *Paranothrotus citimus* (Pamphaginae, Nocarodeini) кариотип состоит из 14 акроцентрических аутосом, одной метацентрической neo-X хромосомы, одной акроцентрической neo-X хромосомы и одной субметацентрической neo-Y хромосомы ($2n^{\text{♂}}=14; X_1X_2Y$). Кариотип такой

морфологии образовался в результате слияния акроцентрической нео-Y хромосомы с одной из акроцентрических аутосом.

3. В трибе *Thrinchini* подсемейства *Thrinchinae* выявлен как исходный (X0), так и нео-XY тип определения пола. У видов этой трибы нео-Y хромосома по длине равна своему гомологу (XR-плечу нео-X-хромосомы). В профазе мейоза нео-Y хромосома и XR-плечо нео-X хромосомы рекомбинируют по всей длине формируя две или три хиазмы. С-позитивный район в проксимальной части нео-Y хромосомы состоит из нескольких мелких гетерохроматиновых блоков.

4. В подсемействе *Pamphaginae* выявлены разные стадии эволюции нео-Y хромосом. В трибе *Tropidauchenini* обнаружен как исходный (X0), так и нео-XY тип определения пола. У видов этой трибы нео-Y хромосома одного размера с гомологичным ей XR-плечом нео-X хромосомы. Нео-Y хромосома и XR-плечо нео-X хромосомы рекомбинируют почти по всей длине формируя одну или две хиазмы. В прицентромерном и интеркалярном районах нео-Y хромосомы локализованы крупные С-позитивные блоки гетерохроматина. Все виды трибы *Nocarodeini* (кроме *Paranothrotres citimus*) имеют только нео-XY тип определения пола. У видов этой трибы нео-Y хромосома значительно меньше своего гомолога (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. *Paranothrotres citimus* имеет множественные половые хромосомы $\text{♂}X_1X_2Y/\text{♀}X_1X_1X_2X_2$. У этого вида нео-Y хромосома (YL-плечо нео-Y хромосомы) намного меньше своего гомолога, и полностью гетерохроматинизирована.

5. Анализ структурной эволюции половых хромосом у саранчовых *Pamphagidae* позволил обнаружить разные стадии формирования половых хромосом в подсемействах *Thrinchinae* и *Pamphaginae*. Триба *Thrinchini* в подсемействе *Thrinchinae* и триба *Tropidauchenini* в подсемействе *Pamphaginae* находятся на начальных этапах гетероморфизации половых хромосом. Продвинутую стадию миниатюаризации и гетерохроматинизации нео-Y хромосомы в подсемействе *Pamphaginae* демонстрируют саранчовые трибы *Nocarodeini*.

6. Теломерные повторённые последовательности $(TTAGG)_n$ у саранчовых *Pamphagidae* как с X0 так и с нео-XY, нео- X_1X_2Y типами определения пола локализованы в терминальных районах хромосом. В районе транслокации акроцентрической X хромосомы с акроцентрической аутосомой (прицентромерный район нео-X хромосомы) у большинства видов *Pamphagidae* кластер теломерных последовательностей отсутствует. Можно предположить, что транслокация X хромосомы и аутосомы произошла с делецией районов акроцентрических хромосом с теломерными повторами. В дальнейшем это событие могло привести к утрате структурной гомологии между аутосомным XR-плечом нео-X и нео-Y хромосомы.

7. Кластеры рибосомной ДНК в хромосомах саранчовых семейства Pamphagidae локализованы очень разнообразно. У многих видов отмечены множественные кластеры на одной хромосоме. Выявленные особенности локализации кластеров рибосомной ДНК являются специфической характеристикой кариотипов саранчовых Pamphagidae в отличие от кариотипов других семейств надсемейства Acridoidea.

8. Кросс-гибридизация уникальных микродиссекционных ДНК-проб приготовленных из половых хромосом *Asiotmethis heptapotamicus heptapotamicus* с хромосомами других видов трибы Thrinchini (Thrinchinae) выявила гомологию исходной X хромосомы с XL-плечом нео-X. Гомология проксимальных участков нео-Y хромосом у видов Thrinchini указывает на монофилетическое происхождение нео-Y хромосомы в этой группе.

9. Кросс-гибридизация микродиссекционных ДНК-проб, полученных из половых хромосом видов родов *Nocaracris* и *Paranocarodes*, с хромосомами видов трибы Nocarodeini выявила лишь частичную гомологию XL-плеч нео-X хромосом у видов трибы Nocarodeini. Гомология проксимальных участков нео-Y хромосом у видов трибы Nocarodeini выявлена только между видами, относящихся к одному роду. Эти результаты отражают длительную дивергенцию видов этой трибы на основе нео-XY-типа определения пола.

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

11. Анализ географического распространения саранчовых семейства Pamphagidae с X0 и нео-XY типами 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. Благодаря находке в Иране исходного этапа эволюции нео-половых хромосом в подсемействе Pamphaginae (триба Tropidauchenini), можно предложить гипотезу, что центром происхождения групп с нео-XY типом определения пола в этом подсемействе является Иранское нагорье.

ЛИТЕРАТУРА

Бей-Биенко Г.Я., Мищенко Л.Л. Саранчовые фауны СССР и сопредельных стран. Определитель по фауне СССР, издаваемые Зоологическим институтом Академии наук СССР. Ч. 1. Москва: Ленинград: Изд-во Акад. наук СССР. – 1951. – 378 с.

Богомолов А.Г., Задесенец К.С., Карамышева Т.В., Подколотный Н.Л., Рубцов Н.Б. Визуализация хромосомоспецифичных последовательностей ДНК при проведении FISH микродиссекционных ДНК-проб с метафазными хромосомами // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2012 – Т. 16. – №2. – С. 202–211.

Богомолов А.Г., Карамышева Т.В., Рубцов Н.Б. Флуоресцентная гибридизация *in situ* ДНК-проб, полученных из индивидуальных хромосом и хромосомных районов // Молекулярная биология. – 2014 – Т. 48. – №6. – С. 881–890.

Бугров А.Г. Нео-ХУ-хромосомное определение пола у саранчовых семейства Pamphagidae // Цитология. – 1986. – Т. 28. №1. – С. 117–119.

Бугров А.Г. Кариотипы саранчовых России и сопредельных территорий // Евразийский энтомологический журнал. – 2010. – Т. 9. №2. – С. 169–179.

Бугров А.Г., Гусаченко А.М., Высоцкая Л.В. Кариотипы и С-гетерохроматиновые районы саранчовых трибы Gomphocerini (Orthoptera, Acrididae, Gomphocerinae) фауны СССР // Зоологический журнал. 1991. – Т. 70. – №12. – С. 55–63

Бугров А.Г., Высоцкая Л.В. Опыт реконструкции филогенеза короткоусых прямокрылых насекомых (Orthoptera, Caelifera) на основе признаков кариотипа // Успехи энтомологии в СССР: экология и фаунистика, небольшие отряды насекомых. 1993. – С. 79–80.

Бугров А.Г., Джетыбаев И. Е. Теломерный пентамер (TTAGG)_n как молекулярный маркер реципрокной транслокации хромосом при формировании *de novo* нео-XY/нео-XX механизма определения пола у саранчовых // Евразийский энтомологический журнал. – 2014. – Т. 13. №5. – С. 473–477.

Бугров А.Г., Сухих И.С., Унал М., Блинов А.Г. Филогенетические отношения саранчовых семейства Pamphagidae с нео-XY/нео-XX определением пола, реконструированные на основе анализа нуклеотидных последовательностей митохондриального гена COI // Евразийский энтомологический журнал. – 2013. – Т. 12. №5. – С. 451–456.

Высоцкая Л.В., Бугров А.Г. Распределение С-гетерохроматина в профазе мейоза у саранчовых // Цитология. – 1985. – Т. 27. №10. – С. 1118–1122.

Высоцкая Л.В. Поведение С-гетерохроматиновых районов хромосом в первой профазе мейоза у саранчового *Stauroderus scalaris* // Цитология. – 1979. – Т. 21. №11. – С. 1279–1282.

Дарлингтон С.Д., Ла Кур Л.Ф. Хромосомы. Методы работы. – М.: Атомиздат, 1980. – 216 с.

Джетыбаев И. Е., Карамышева Т.В., Бугров А.Г., Рубцов Н.Б. Кросс-гибридизация повторенных последовательностей ДНК прицентромерного гетерохроматина *Chorthippus apricarius* (L.) с хромосомами саранчовых трибы Gomphocerini. // Евразийский энтомологический журнал. – 2010. – Т. 9. №3. – С. 433–436.

Жданова Н.С., Рубцов Н.Б., Минина Ю.М. Терминальные районы хромосом млекопитающих: пластичность и роль в эволюции // Генетика. – 2007. – Т. 43. №7. – С. 873–886.

Жимулев И. Ф. Гетерохроматин и эффект положения гена. – РАН, Сиб. отд-ние, Ин-т цитологии и генетики Новосибирск: Наука, 1993. – 490 с.

Картавцева И. В. Кариосистематика лесных и полевых мышей (Rodentia: Muridae). – Владивосток: Дальнаука, 2002. – 141 с.

Коряков Д.Е., Жимулев И.Ф. Хромосомы. Структура и функции. – Новосибирск: Изд-во СО РАН, 2009. – 258 с.

Макгрегор Г., Варли Дж. Методы работы с хромосомами животных. / Пер. с англ. В. М. Гиндилиса, Ю. Б. Юрова; Под ред. Н. Н. Воронцова. – М.: Мир, 1986. – 272 с.

Прокофьева-Бельговская А.А. Гетерохроматические районы хромосом. – М.:«Наука», 1986. – 430 с.

Рубцов Н. Б. Методы работы с хромосомами млекопитающих. – Новосибирск: Редакционно-издательский центр НГУ, 2006. – 147 с. ISBN 5-94356-376-8.

Рубцов Н. Б. Хромосомы млекопитающих: методы цитогенетического анализа: Учеб. пособие / Новосиб. гос. ун-т. Новосибирск, 2004. – 108 с.

Тарбинский С.П. Прыгающие прямокрылые насекомые Азербайджанской ССР. – М.: Л., 1940. – 245 с.

Шаров А.Г. Филогения ортоптероидных насекомых. – М.: Наука, 1968. – 217 с.

Шумаков Е. М. Саранчовые Афганистана и Ирана. – Москва; Ленинград: Изд-во Акад. наук СССР. Труды Всес. энтомол. общ-ва. – Т. 49. – 1963. – 248 с.

Alicata P., Messina A., Oliveri S. Frequenza e distribuzione dei chiasmi in *Pamphagus marmoratus* Burm., *Acinipe calabra* (Costa) e *Ocneridia canonica* (Fish.) (Orthoptera Pamphagidae) // *Animalia*. – 1976. – V. 3. – P. 171–193.

Bensasson D., Petrov D.A., Zhang D.X., Hartl D.L., Hewitt G.M. Genomic gigantism: DNA loss is slow in mountain grasshoppers // *Molecular Biology and Evolution*. – 2001. V. 18(2). – P. 246–253.

Beukeboom L.W., Perrin N. The evolution of sex determination. – Oxford University Press., 2014. – 222 p.

Bidau C.J., Dardo A.M., Castillo E.R. Inexorable spread: inexorable death? The fate of neo-XY chromosomes of grasshoppers // *Journal of Genetics*. – 2011. – V. 90(3). – P. 1–4.

Bidau C.J., Martí D.A. Geographic distribution of Robertsonian fusions in *Dichroplus pratensis* (Melanoplinae, Acrididae): the central-marginal hypothesis reanalyzed // *Cytogenetic and Genome Research*. – 2001. V. 96. – P. 66–74.

Blackburn E. H. Structure and function of telomeres // *Nature*. – 1991. – V. 350. – P. 569–573.

Blackburn E. H. Switching and signaling at the telomere // *Cell*. – 2001. V. 106(6). – P. 661–673.

Blackman R.L. Sex determination in insects. – Leather, S.R. & Hardie, J. (eds.), *Insect Reproduction*. CRC Press, Boca Raton (Florida), 1995. – 255 p.

Blackmon H., Ross L., Bachtrog, D. Sex Determination, Sex Chromosomes, and Karyotype Evolution in Insects // *J Hered.* – 2017. V. 108(1). – P. 78–93.

Bolzán A.D. Interstitial telomeric sequences in vertebrate chromosomes: Origin, function, instability and evolution // *Mutat. Res.* – 2017. V. 773. – P. 51–65.

Bugrov A. G. Interpopulation sex-chromosome polymorphism in the grasshopper *Podisma sapporensis* Shir. from Sakhalin and the Kurile Islands // *Folia biol.(Krakow)*. – 1995. V. 43(1–2). – P. 51–53.

Bugrov A., Grozeva, S. Neo-XY chromosome sex determination in four species of the pamphagid grasshoppers (Orthoptera, Acridoidea, Pamphagidae) from Bulgaria // *Caryologia*. – 1998. V. 51(2). – P. 115–121.

Bugrov A.G. Karyotypes of the short-horned Orthopteran insects (Orthoptera, Caelifera) from Russia, Kazakhstan, Central Asia, and the Caucasus // *Folia biologica (Krakow)*. – 1996. V. 44(1–2). – P. 15–25.

Bugrov A.G., Jetybayev I.E., Karagyan G.H., Rubtsov N.B. Cytogenetics Sex chromosome diversity in Armenian toad grasshoppers (Orthoptera, Acridoidea, Pamphagidae) // *Comparative cytogenetics*. – 2016. V. 10(1). – P. 45–59.

Bugrov A.G., Karamysheva T.V., Rubtsov D.N., Andreenkova, O.V. Comparative FISH analysis of distribution of B chromosome repetitive DNA in A and B chromosomes in two subspecies of *Podisma sapporensis* (Orthoptera, Acrididae) // *Cytogenet. Genome Res.* – 2004. – V. 106. – P. 284–288.

Bugrov A.G., Warchałowska-Śliwa E. Chromosome numbers and C-banding patterns in some Pamphagidae grasshoppers (Orthoptera, Acrididae) from the Caucasus, Central Asia, and Transbaikalia // *Folia biologica (Krakow)*. – 1997. V. 45(3–4). – P. 133–138.

Bugrov G.A., Warchałowska-Śliwa E., Maryńska-Nadachowska A. Karyotype evolution and chromosome C-banding patterns in some *Podismini* grasshoppers (Orthoptera, Acrididae) // *Caryologia*. – 1994. – V. 47. – P. 183–191.

Cabrero J., Camacho J. P. M. Location and expression of ribosomal RNA genes in grasshoppers: Abundance of silent and cryptic loci // *Chromosome Research*. – 2008. – V. 16(4). – P. 595–607.

Cabrero J., Camacho J.P.M. Cytogenetic studies in gomphocerinae grasshoppers. II. Chromosomal location of active nucleolar organizing regions // *Can. J. Genet. Cytol.* – 1986. V. – 28. P. 540–544.

Cabrero J., Camacho J.P.M., Pascual F. Cytotaxonomic studies on Pamphagids Genus *Eumigus*. Detection of two chromosomal races in *E. monticola* (Rambur) (Insecta, Orthoptera) // *Caryologia*. – 1985. – V. 38(1). – P. 1–12.

Camacho J.P.M., Cabrero J., López-León M.D., Cabral-de-Mello D. C., Ruiz-Ruano F.J. Grasshoppers (Orthoptera) In: Sharakhov IV (ed.). *Protocols for cytogenetic mapping of Arthropod genomes*. CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton, London, New York, 2015. 381–438 pp.

Camacho J.P.M., Cabrero J., Viseras E. C-heterochromatin variation in the genus *Eumigus* (Orthoptera, Pamphagoidea) // *Genetica*. – 1981. – V. 56. (3). – P. 185–188.

Carbonell C.S., Mesa A. *Ronderosia ommexeoides*: a new species of Brazilian Dichroplini (Orthoptera: Acrididae, Melanoplinae) // *Neotropical Entomology*. – 2006 – V. 35. – P. 632–637.

Cardoso H., Dutra A. The neo-X neo-Y sex pair in Acrididae, its structure and association // *Chromosoma*. – 1979. – V. 70. – P. 323–336.

Castillo E.R., Marti D.A., Bidau C.J., Castillo E.R., Bidau J. Sex and neo-sex chromosomes in Orthoptera: a review Sex and neo-sex chromosomes in Orthoptera // *Journal of Orthoptera Research*. – 2010a. – V. 19(2). – P. 213–231.

Castillo E.R.D., Bidau C.J., Martí D. Neo-sex chromosome diversity in Neotropical melanopline grasshoppers (Melanoplinae, Acrididae) // *Genetica*. – 2010b. – V. 138. – P. – 775–86.

Charlesworth B. Sex determination: primitive Y chromosomes in fish // *Current Biology*. – 2004. – V. 14. – P. 745–747.

Charlesworth B. The evolution of chromosomal sex determination and dosage compensation // *Curr. Biol*. – 1996. V. 6. – P. – 149–162.

Charlesworth B., Charlesworth D. The degeneration of Y chromosomes // *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. – 2000. V. 355(1403). – P. – 1563–1572.

Charlesworth D., Charlesworth B., Marais G. Steps in the evolution of heteromorphic sex chromosomes // *Heredity*. – 2005. V. 95. – P. – 118–128.

Chen Shi-Ni Chromosomal studies of *Pseudotmethis alashanicus* B.-Bienk. // *Acta Zoologica Sinica*. – 1964. – V. 6(1). - P. 1–3.

Chi J.X., Huang L., Nie W., Wang J., Su B., Yang F. Defining the orientation of the tandem fusions occurred during the evolution of Indian muntjak chromosomes by BAC mapping // *Chromosoma*. – 2005. – V. 114. – P. 167–172.

Chudoba I., Plesch A., Lörch T., Lemke J., Claussen U., Senger G. High resolution multicolor-banding: a new technique for refined FISH analysis of human chromosomes // *Cytogenetic and Genome Research*. – 1999. – V. 84(3–4). – P. 156– 160.

Cigliano M.M., Braun H., Eades D.C., Otte D. Orthoptera Species File. Version 5.0/5.0. [Электронный ресурс] / Режим доступа <http://Orthoptera.SpeciesFile.org/> (дата обращения 07. 05. 2020).

Çıplak B., Demirsoy A., Bozcuk A.N. Distribution of Orthoptera in relation to the Anatolian Diagonal in Turkey // *Articulata*. – 1993. V. 8(1). – P. 1–20.

Cocca E., Petraccioli A., Morescalchi M.A., Odierna G., Capriglione T. Laser microdissection-based analysis of the Y sex chromosome of the Antarctic fish *Chionodraco hamatus* (Notothenioidei, Channichthyidae) // *Comparative Cytogenetics*. – 2015. – V. 9(1). – P. 1–15.

Colombo P.C. Micro-evolution in grasshoppers mediated by polymorphic Robertsonian translocations // *Journal of Insect Science*. – 2013. – V. 13(43). – P. 1–22.

Darlington C. D. Recent advances in cytology – Philadelphia: P. Blacistons son and Co. Inc., 1932. – 559 p.

Díaz M.O., Sáez F.A. DNA synthesis in the neo-X neo-Y sex determination system of *Dichroplus bergi* (Orthoptera: Acrididae) // *Chromosoma*. – 1968 – V. 24. - P. 10–16.

Dirsh D.V.M. Classification of the Acridomorphoid insects – London: Cambridge University Press., Antilocust Centre, 1975. – 171 p.

Dirsh V.M. The phallic complex in Acridoidea (Orthoptera) in relation to taxonomy // *Trans. Roy. Entomol. Soc. Lond.* – 1956. – V. 108(7). – P. 223–356.

Dutrillaux A.M., Dutrillaux B. Different behaviour of C-banded peri-centromeric heterochromatin between sex chromosomes and autosomes in Polyphagan beetles // *Comparative Cytogenetics*. – 2019. – V. 13(2). – P. 179–192.

Eades D.C. Evolutionary relationships of phallic structures of Acridomorpha (Orthoptera) // *Journal of Orthoptera Research*. – 2000. – V. 9. – P. 181–210.

Eickbush T.H., Eickbush D.G. Finely Orchestrated Movements: Evolution of the Ribosomal RNA Genes // *Genetics*. – 2007. – V. 175. – P. 477–485.

Ferguson-Smith M.A., Trifonov V. Mammalian karyotype evolution // *Nat. Rev. Genet.* – 2007. – V. 8(12). – P. 950–962.

Ferreira A., Mesa A. Cytotaxonomy of the genus *Dichromatos* Cigliano 2007 (Orthoptera, Acridoidea, Melanoplinae) // *Journal of Orthoptera Research*. – 2010. – V. 19. – P. 233–237.

Flook P.K., Rowell C.H.F. The phylogeny of the Caelifera (Insecta, Orthoptera) as deduced from mtrRNA gene sequences // *Molecular Phylogenetics and Evolution*. – 1997. – V. 8. – P. 89–103.

Fontana P. G., Vickery V. R. Cytotaxonomic studies on the genus *Boonacris*. I. The "eastern taxa taxa and a comparison with the related genera *Dendrotettix* and *Appalachia* (Orthoptera: Catantopidae: Podismini) // *Can. J. Genet. Cytol.* 1976. – V. 18(5). – P. 625–652.

Fossey A. Cytogenetic research of the short-horned Orthoptera insect from South Africa - Pretoria (In Afrikaans): Dr Sci. Thesis, Pretoria University, 1985. – 106 p.

Frydrychová R., Marec F. Repeated losses of TTAGG telomere repeats in evolution of beetles (Coleoptera) // *Genetica*. – 2002. – V. 115. – P. 179–187.

Fujiwara, H., Osanai, V., Matsumoto, T., Kojima, K. Telomere-specific non-LTR retrotransposons and telomere maintenance in the silkworm, *Bombyx mori* // *Chromosome Research*. – 2005. – V. 13. – P. 455–467.

Giovannotti M., Caputo V., O'Brien P.C.M., Lovell F.L., Trifonov V., Cerioni P.N., Olmo E., Ferguson-Smith M.A., Rens W. Skinks (Reptilia: Scincidae) have highly conserved karyotypes as revealed by chromosome painting // *Cytogenet. Genome Res.* – 2009. – V. 127(2–4). – P. 224–231.

Gosalvez J., Mason, P.L., Lopez-Fernandez C. Differentiation of Individuals, Populations and Species of Orthoptera: the Past, Present and Future of Chromosome Markers. In: Gangwere, S. K. (ed.). *The Bionomics of Grasshoppers, Katydid and their Kin*. M.C. Muralirangan and Muralirangan. Cambridge University Press, 1997. 355–377 pp.

Granata L. Le cinesi spermatogenetiche di *Pamphagus marmoratus* (Burm.) // *Arch. Zooloforsch.* – 1910. – V. 5(3). – P. 182–214.

Grozeva S. Kuznetsova V.G., Anokhin B.A. Karyotypes, male meiosis and comparative FISH mapping of 18S ribosomal DNA and telomeric (TTAGG)_n repeat in eight species of true bugs (Hemiptera, Heteroptera) // *Comparative Cytogenetics.* – 2011. – V. 5(4). – P. 355–374.

Halder A., Halder S., Fauzdar A., Kumar A. Molecular approaches of chromosome analysis: an overview // *Proc. Indian Nat. Sci. Acad.* – 2004. – V. 70(2). – P. 153–221.

Harz K. *The Orthoptera of Europa (Die Orthopteren Europas)* – Dr. W. Junk, The Hague, 1975. – 939 p.

Helwig E.R. *Cytology and Taxonomy* // *Bios*, 1958. – V.29. – P. 57–62.

Hewitt G.M. *Grasshoppers and cricket* // *Animal cytogenetics. Insecta I Orthoptera.* – Berlin, Stuttgart. – 1979. – V. 3. – P. 170.

Hodjat S.H. 'An update list of Pamphagidae Brumster 1840 (Insecta: Orthoptera) of Iran with a key to genera' // *J. Crop Prot.* – 2012. V. 1(3). – P. 261–270.

Holmquist G. The mechanism of C-banding: depurination and β -elimination // *Chromosoma.* – 1979. – V. 72(2). – P. 203–224.

Hu Q., Maurais E.G., Ly P. Cellular and genomic approaches for exploring structural chromosomal rearrangements. // *Chromosome Res.* – 2020. – V. – 28(1). – P. 19–30.

Hughes S.E., Hawley R.S. Heterochromatin: A Rapidly Evolving Species Barrier // *PLoS Biol.* – 2009. – V. 7(10). – P. 1–4.

Jetybayev I. E., Bugrov A. G., Karamysheva T. V., Camacho J. P. M., Rubtsov N. B. Chromosomal localization of ribosomal and telomeric DNA provides new insights on the evolution of Gomphocerinae grasshoppers // *Cytogenetic and Genome Research.* – 2012. – V. 138. – P. 36–45.

John B. The role of chromosome change in the evolution of orthopteroid insects // *Chromosomes in Evolution of Eukaryotic Groups*. CRC Press, Inc. Boca Raton. (Florida). – 1983. – P. 254.

John B., Freeman, M. Causes and consequences of Robertsonian exchange // *Chromosoma.* – 1975. – V. 52. – P. 123–126.

John B., Hewitt, G.M. Patterns and pathways of chromosome evolution within the Orthoptera // *Chromosoma*. – 1968. – V. 25. – P. 40–74.

John B., King M. Heterochromatin variation in *Cryptobothrus chrysophorus*. Chromosome differentiation in natural populations // *Chromosoma*. – 1977. – V. – 64(2). – P. 219–239.

Kaiser V.B., Bachtrog D. Evolution of sex chromosomes in insects // *Annual Review of Genetics*. – 2010. – V. 44. – P. 91–112.

Kazama Y., Matsunaga S. The use of repetitive DNA in cytogenetic studies of plant sex chromosomes. // *Cytogenet Genome Res*. – 2008. – V. – 120(3–4). – P. 247–254.

Keller I., Chintauan-Marquier I.C., Veltsos P., Nichols R.A. Ribosomal DNA in the grasshopper *Podisma pedestris*: escape from concerted evolution // *Genetics*. – 2006. – V. 174. – P. 863–874.

Keller I., Veltsos P., Nichols R.A. The frequency of rDNA variants within individuals provides evidence of population history and gene flow across a grasshopper hybrid zone // *Evolution*. – 2008. – V. 62(4). – P. 833–844.

King M., John B. Regularities and restrictions governing C-band variation in Acridoid grasshoppers // *Chromosoma (Berl.)*. – 1980. – V. 76. – P. 123–150.

Kuznetsova V., Grozeva S., Gokhman V. Telomere structure in insects: A review // *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*. – 2019. V. 00. – P. 1–32.

La Greca, M. Biogeography of the Palaearctic Pamphagidae (Orthoptera) // *Memorie della Societa Entomologica Italiana*. – 1999. – V. 77. – P. 105–121.

Lamb J.C., Shakirov E.V., Shippen D.E. Plant Telomeres – New York.: Springer, Plant Genetics and Genomics: Crops and Models, 2012. – V. 9. – 145–193.

Leitch A.R., Schwarzacher T., Jackson D., Leitch I.J. *In Situ* Hybridisation. A Practical Guide – Oxford: BIOS Sci. Publ. Ltd., 1994. – 118 p.

Li X.J., Zhang D.C., Wang W.Q. Chromosomal C-banding karyotype of 2 species of genus *Asiotmethis* (Acridoidea: Pamphagidae) from China // *JGG*. – 2005. – V. 27(5). – P. 735–740.

Li X.J., Zhang, D.C., Wang, W.Q., Zheng J.Y. The chromosomal C-banding karyotypes of two pamphagid species from China // *Chinese Bulletin of Entomology*. – 2008. V. 45(4). – P. 549–553.

Li X.J., Zhang, D.C., Zhang K., Yin C.X. Study on the Chromosomal C-banding karyotype of two species of *Filchnerella* from China (Acridoidea:Pamphagidae) // *Sichuan Journal of Zoology*. – 2011. – V. 5(9).

Liehr T. Classification of FISH Probes // *Fluorescence In Situ Hybridization (FISH) - Application Guide*. / Liehr T. – Jena: Springer Berlin Heidelberg, 2017. – P. 43–47.

Liehr T., Kosyakova N., Weise A. FISH Banding Techniques // Fluorescence *In Situ* Hybridization (FISH) - Application Guide. / Liehr T. - Jena: Springer Berlin Heidelberg, 2017. – P. 561–565.

Lopez-Fernandez C., Pradillo E., Zabal-Aguirre Fernandez J.L., Garcia de la Vega, C. Gosalvez J. Telomeric and interstitial telomeric-like DNA sequences in Orthoptera genomes // Genome. – 2004. – V 47. – P.757–763.

López-León M.D., Camacho J.P.M., Cabrero J. Variation of C-banding patterns and localization of nucleolar organiser regions in *Acinipe hesperica* (Orthoptera Pamphagidae) // Cytobios. – 1989. – V. 57. – P. 163–167.

Loreto V., Cabrero, J., López-León, M.D., Camacho, J.P.M., Souza, M.J. Comparative analysis of rDNA location in five Neotropical gomphocerine grasshopper species // Genetica. – 2008. –V. 132. – P. 95–101.

Lukhtanov V. Chromosome number evolution in skippers (Lepidoptera, Hesperiiidae) // Comparative Cytogenetics. – 2014. – V. 8(4). – P. 275–29.

Lukhtanov V.A., Efetov K.A., Dantchenko, A.V. Karyotype reinvestigation does not confirm the presence of two cryptic species and interspecific hybridization in the *Polyommatus* (*Agrodiaetus*) *damocles* complex in the Crimea (Lepidoptera, Lycaenidae) // Comparative Cytogenetics. – 2019. –V. 13(3). – P. 311–319.

Makino S. An atlas of the chromosome number in animals – Ames.: Iowa State College Press, 1951. – V.1. – 288 p.

Mansueto C., Vitturi I.R. NORs location and C-banding pattern in spermatogenesis of *Pamphagus ortholanii* (Orthoptera, Acrididae) // Caryologia. – 1989. – V. 42(3–4). – P. 303–311.

Massa B. Pamphagidae (Orthoptera: Caelifera) of North Africa: key to genera and the annotated check-list of species // Zootaxa. – 2013. – V. 3700(3). – P. 435–475.

Massa B. The role of the Krauss's organ in sound production in Pamphagidae (Caelifera: Orthoptera) // Italian Journal of Zoology. – 2012. – V. 79(3). – P. 441–449.

McClung C. E. The chromosome complex of orthopteran spermatocytes // Biol. Bull. (Woods Hole, Mass.). – 1905. – V. 9(2). P. – 304 – 340.

McClung C.E. The multiple chromosomes of *Hesperotettix* and *Mermiria* // Journal of Morphology. – 1917. – V. 29 – P. 519–605.

Mesa A. Cariología de tres especies de acridios del género *Dichroplus* (Orthoptera, Acrididae) // Revista Peruana de Entomología. – 1971. – V. 14. – P. 233–237.

Mesa A., de Mesa R.S. Complex sex-determining mechanism in three species of South American grasshoppers (Orthoptera, Acridoidea) // Chromosoma. – 1967. – V. 21. – P.163–180.

Mesa A., Ferreira A., Carbonell C.S. Cariología de los acridoideos neotropicales: estado actual de su conocimiento y nuevas contribuciones // *Annales de la Société Entomologique de France (N.S.)*. – 1982. – V. 18. – P. 507–526.

Mesa A., Fontanetti C.S., García-Novo P. Does an X-autosome centric fusion in Acridoidea condemn the species to extinction? // *J. Orthoptera Res. Orthopterists' Society*. – 2001. – V. 10. – P. 141–6.

Meyne J., Baker R.J., Hobart H.H., Hsu T.C., Ryder O.A., Ward O.G., Wiley J.E, Wurster-Hill D.H., Yates T.L., Moyzis R.K. Distribution of non-telomeric sites of the (TTAGGG)_n telomeric sequences in vertebrate chromosomes // *Chromosoma*. – 1990. – V. 99. – P. 3–10.

Mirzayans H. Insects of Iran: The list of Orthoptera in the insect collection of Plant Pests & Diseases Research Institute. Orthoptera (10): Pamphagidae (8) and Pyrgomorphidae (10). Publication of Plant Pests & Diseases Research Institute, Tehran, Iran. – 1998. – 40 p.

Muller H. J. A gene for the fourth chromosome of *Drosophila* // *J. Exp. Zool.* – 1914. – V. 17. – P. 325–336.

Nankivell R. N. A terminal association of two pericentric inversions in first metaphase cell of the Australian grasshoppers *Austroicetes interioris* (Acrididae) // *Chromosoma (Berl.)*, 1967. – V. 22. (1). – P. 42–68.

Ohno S. Sex Chromosomes and Sex-Linked Genes – Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag, 1967. – 192 p.

Otte D. Orthoptera Species File 3. Grasshoppers [Acridomorpha] B. Pamphagoidea – Orthopterists' Society and Academy of Natural Sciences of Philadelphia, 1994. – V. 3. – 241 p.

Palacios-Gimenez O.M., Castillo E.R., Martí D.A., Cabral-de-Mello D.C. Tracking the evolution of sex chromosome systems in Melanoplinae grasshoppers through chromosomal mapping of repetitive DNA sequences // *BMC Evol. Biol.* – 2013. V. 13(167). – P. 1–12.

Palacios-Gimenez O.M., Milani D., Lemos B., Castillo E.R., Martí D.A., Ramos E. Martins C., Cabral-de-Mello D.C. Uncovering the evolutionary history of neo-XY sex chromosomes in the grasshopper *Ronderosia bergii* (Orthoptera, Melanoplinae) through satellite DNA analysis // *BMC Evol. Biol.* – 2018. – V. 18(2).

Pardue M.L., DeBaryshe, P.G. *Drosophila* telomeres: A variation on the telomerase theme // *Fly*. – 2008. V. 2. – P. 101–110.

Pinkel D., Straume T., Gray J.W. Cytogenetical analysis using quantitative, high sensitivity, fluorescence hybridization // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 1986. – V. 83. – P. 2934–2938.

Pita S., Panzera F., Sánchez A., Palomeque T., Lorite P. Chromosome Painting in Triatomine Insects Reveals Shared Sequences Between X Chromosomes and Autosomes. // *J. Med Entomol.* – 2017. – V. 54(1). – P. 44–49.

Rens W., Moderegger K., Skelton H., Clarke O., Trifonov V., Ferguson-Smith M.A. A procedure for image enhancement in chromosome painting // *Chromosome Research*. – 2006. – V. 14(5). – P. 497–503.

Rice W.R. Evolution of the Y sex chromosome in animals // *BioScience*. – 1996. – V. 46. – P. 331–343.

Roberts H.R. A comparative study of the subfamilies of the Acrididae (Orthoptera) primarily on the bases of their phallic structures // *Proceedings of the Academy of Natural Sciences of Philadelphia* – 1941. – V. 93. – P. 201–246.

Robertson W. Chromosome studies. I. Taxonomic relationships shown in the chromosomes of Tettigidae and Acrididae. V-shaped chromosomes and their significance in Acrididae, Locustidae and Gryllidae: chromosomes and variation // *Journal of Morphology* – 1916. – V. 27 – P. 179–331.

Rosén M., Edström, J. E. Chromosome ends in *Chironomus tentans* do not have long single-stranded overhangs characterizing canonical telomeres // *Chromosome Research*. 2002. – V. 10(1). – P. 21–31.

Rubtsov N. B., Karamisheva T. V., Astakhova N. M., Liehr T., Claussen U., Zhdanova N. S. Zoo-FISH with region-specific paints for mink chromosome 5q: delineation of inter- and intrachromosomal rearrangements in human, pig, and fox // *Cytogenetic and Genome Research*. – 2000. – V. 90(3–4). – P. 268–270.

Sahara K., Marec F., Traut W. TTAGG telomeric repeats in chromosomes of some insects and other arthropods // *Chromosome Res.* – 1999. – V. 7(6). – P. 449–460.

Sánchez L. Sex-determining mechanisms in insects // *Int. J. Dev. Biol.* – 2008. – V. 52. – P. 837–856.

Santos J.L., Arana, P., Giraldez, R. Chromosome C-banding patterns in Spanish Acridoidea // *Genetica*. – 1983. – V. 61(1). – P. 65–74.

Scalenghe F., Turco E., Edström J.E., Pirrotta V., Melli M. Microdissection and cloning of DNA from a specific region of *Drosophila melanogaster* polytene chromosomes // *Chromosoma*. – 1981. – V. 82(2). – P. 205–216.

Schubert I., Fransz P.F., Fuchs J., Hans de Jong, J. Chromosome painting in plants // *Chromosome Painting* / Sharma A.K., Sharma A. – Dordrecht: Springer Netherlands. – 2001. – P. 57–69.

Sergeev M.G. The general distribution of Orthoptera in the eastern parts of the Saharan-Gobian and Scythian Subregions // *Acta zoologica cracoviensia*. – 1995. – V. 38(2). – P. 213–256.

Shakoori A.R. Fluorescence *In Situ* Hybridization (FISH) and Its Applications // In: Bhat T., Wani A. (eds) *Chromosome Structure and Aberrations*. Springer, New Delhi. – 2017. – P. 343–367.

Shamurailatpam A., Madhavan L., Yadav S.R., Bhat K.V., Rao S.R. Heterochromatin distribution and comparative karyo-morphological studies in *Vigna umbellata* Thunberg, 1969 and *V. aconitifolia* Jacquin, 1969 (Fabaceae) accessions // *Comparative Cytogenetics*. – 2015. – V. 9(1). – P. 119–132.

Sharakhov I.V. (ed.) *Protocols for cytogenetic mapping of Arthropod genomes* // CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton, London, New York, 2015. – 478 p.

Shaw D.D. Population cytogenetics of the genus *Caledia* (Orthoptera, Acridinae) I. inter and intraspecific karyotype diversity // *Chromosoma*. – 1976. – V. 54. – P. 221–243.

Shaw D.D. The supernumerary segment system of *Stethophyma*. II. Heterochromatin polymorphism and chiasma variation // *Chromosoma*. – 1971. – V.34. – P.19–39.

Song H. Grasshopper systematics: Past, present and future // *Journal of Orthoptera Research*. – 2010. – V. 19(1). – P. 57–68.

Song H., Mariño-Pérez R. Re-evaluation of taxonomic utility of male phallic complex in higher-level classification of Acridomorpha (Orthoptera: Caelifera) // *Insect Syst. Evol.* – 2013. – V. 44. – P. 241–260.

Speicher M. R., Ballard S. G., Ward D. C. Computer image analysis of combinatorial multicolor FISH // *Bioimaging*. 1996. V. 4(2). P. 52-64.

Storozhenko S.Yu., Paik J.Ch. Review of the genus *Haplotropis* Saussure, 1888 (Orthoptera: Pamphagidae), with notes on classification of the subfamilies Pamphaginae and Thrinchinae // *Zootaxa*. – 2011. V. 2897. – P. 1–68.

Sumner A.T. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin // *Exp. Cell Res.* – 1972. – V. 75. – P. 304–306.

Sun Ji-Ying, Fu Peng, Zheng Zhe-Min Researches on C-banding karyotypes of two species of genus *Eotmethis* // *Hereditas* (Beijing). – 2004. – V. 26(6). – P. 870–874.

Traut W., Sahara K., Marec F. Sex chromosomes and sex determination in Lepidoptera // *Sex. Dev.* – 2008. – V.1. – P. 332–346.

Traut W., Szczepanowski M., Vítková M., Opitz C., Marec F., Zrzavý J. The telomere repeat motif of basal Metazoa // *Chromosome Research*. – 2007. – V. 15. – P. 371–382. <https://doi.org/10.1007/s10577-007-1132-3>

Trifonov V.A., Vorobieva N.N., Serdyukova N.A., Rens W. FISH with and without COT1 DNA // *Fluorescence In Situ Hybridization (FISH) – Application Guide*. / Liehr T. – Jena: Springer Berlin Heidelberg, 2017. – P. 123–134.

Ünal M. Pamphagidae (Orthoptera: Acridoidea) from the Palaearctic Region: taxonomy, classification, keys to genera and a review of the tribe Nocarodeini I. Bolívar // *Zootaxa*. – 2016. – V. 4206 (1). – P. 1–223. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.4206.1.1>

Uvarov B.P. Grasshoppers and locusts. A handbook of general acridology – Cambridge: The Cambridge University Press. 1966. – V.1. 481 p.

Uvarov B.P. The tribe Thrinchini of the subfamily Pamphaginae, and the interrelations of the Acridid subfamilies (Orthoptera) // Transactions of the Royal Entomological Society London. – 1943. – V. 93(1). – P. 1–72. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2311.1943.tb00429.x>

Vershinina A.O., Anokhin B.A., Lukhtanov V.A. Ribosomal DNA clusters and telomeric (TTAGG)_n repeats in blue butterflies (Lepidoptera, Lycaenidae) with low and high chromosome numbers // Comparative Cytogenetics. – 2015. V. 9. – P. 161–171. <https://doi.org/10.3897/CompC>

Vítková M., Král J., Traut W., Zrzavý J., Marec F. The evolutionary origin of insect telomeric repeats, (TTAGG)_n // Chromosome Research. – 2005. – V. 13. – P. 145–156.

Vitturi R., Lannino A., Mansueto C., Mansueto V., Stella M. Silver-negative NORs in *Pamphagus ortolaniae* (Orthoptera: Pamphagidae) // European Journal of Entomology. – 2008. – V. – 105. – P. 35–39.

Vitturi R., Mansueto C., Ficarella P. Heterochromatin variation in four species of the genus *Pamphagus* (Orthoptera: Pamphagidae) analyzed by C-banding // Biol. Zent. Bl. – 1993. – V. 112. – P. 335–341.

Warchałowska-Śliwa E., Maryńska-Nadachowska A., Massa B. Some new data on C-bands and NORs in three species of Pamphagidae (Orthoptera) // Folia biologica (Krakow). – 1994. – V. 42. (1). – P. 13–18.

Wasserlauf I., Usov K., Artemov G. Specific features in linear and spatial organizations of pericentromeric heterochromatin regions in polytene chromosomes of the closely related species *Drosophila virilis* and *D. kanevici* (Diptera: Drosophilidae) // Genetica – 2015. – V. 143. – P. 331–342.

Weber B., Allen L., Magenis R.E., Goodfellow P.J., Smith L., Hayden M.R. Intrachromosomal location of the telomeric repeat (TTAGGG)_n // Mamm. Genome. – 1991. – V. 1. – P. 211–216.

Weiss M.M., Hermsen M.A., Meijer G.A., van Grieken N.C., Baak J.P., Kuipers E.J., Van Diest P.J. Comparative genomic hybridisation // Molecular pathology. – 1999. – V. – 52(5). – P. 243–251.

Weissman D.B., Rentz D.C.F. Cytological, morphological, and crepitational characteristics of the Trimerotropine (*Aerchoreutes*, *Circotettix*, and *Trimerotropis*) grasshoppers (Orthoptera; Oedipodinae) // Trans. Amer. Entomol. Soc. 1980. – V. 106. – 253–272.

White M.J.D. Animal cytology and evolution. 3-rd ed. – London.: Cambridge University Press, 1973. – 961 p.

White M.J.D. Cytogenetics of orthopteroid insects // Adv. in Genet., – 1951.– V.4(2). – P. 267–330.

White M.J.D. The origin and evolution of multiple sex-chromosome mechanisms // Journal of Genetics. – 1940. – V. 40. – P. 303–336.

Wilson E.B. Studies on chromosomes I. The behaviour of the idiochromosomes in Hemiptera // Journal of Experimental Zoology. – 1905. – V. 2. – P. 371–405.

Zhang D.C., Yin H., Yin X.C. On the taxonomic system of Eurasian Pamphagidae (Orthoptera:Caelifera) // Acta Entomologica Sinica. – 2003. – V. 46(20). – P. 218–221.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Публикации в журналах из списка ВАК и Web of Science:

Булэу 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., **Булэу 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>

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>

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://imbiosom.ru/konf/symbiosis2019>

**ПРИЛОЖЕНИЕ 1. КЛАССИФИКАЦИЯ САРАНЧОВЫХ СЕМЕЙСТВА ПАМФАГИДАЕ
BURMEISTER, 1840**

- I. подсемейство Akicerinae Bolívar, 1916
 - триба Akicerini Bolívar, 1916
 - род *Adephagus* Saussure, 1887
 - род *Batrachornis* Saussure, 1884
 - род *Batrachotetrix* Burmeister, 1838
 - род *Eremotettix* Saussure, 1888
- II. подсемейство Echinotropinae Dirsh, 1961
 - род *Echinotropis* Uvarov, 1944
 - род *Geloiomimus* Saussure, 1899
 - род *Parageloiomimus* Dirsh, 1961
 - род *Thrincotropis* Saussure, 1899
- III. подсемейство Pamphaginae Burmeister, 1840
 - триба Euryaryphini La Greca, 1993
 - триба Finotiini Bolívar, 1916
 - триба Nocarodeini Bolívar, 1916
 - триба Pamphagini Burmeister, 1840
 - триба Tropidauchenini Zhang, Yin & Yin, 2003
 - род *Acrostira* Enderlein, 1929
 - род *Purpuraria* Enderlein, 1929
- IV. подсемейство Porthetinae Bolívar, 1916
 - триба Trachypetrellini Uvarov, 1943
 - род *Aphantotropis* Uvarov, 1924

- род *Bolivarella* Saussure, 1887
 род *Cultrinotus* Bolívar, 1915
 род *Hoplolopha* Stål, 1876
 род *Lamarckiana* Kirby, 1910
 род *Lobosceliana* Dirsh, 1958
 род *Pagopedilum* Karsch, 1896
 род *Porthetis* Serville, 1831
 род *Puncticornia* Dirsh, 1958
 род *Transvaaliana* Dirsh, 1958
 род *Vansoniacris* Dirsh, 1958
 род *Xiphoceriana* Dirsh, 1958
 V. подсемейство Thrinchinae Stål, 1876
 триба Naplotropidini Sergeev, 1995
 триба Thrinchini Stål, 1876

ПРИЛОЖЕНИЕ 2. КАРИОТИПЫ САРАНЧОВЫХ PAMPHAGIDAE

Таксон	Место сбора	Определение пола	Источник данных
Thrinchinae Stål, 1876			
Thrinchini Stål, 1876			
<i>Asiotmethis heptapotamicus</i> (Zubovski, 1898)	Юго-восточный Казахстан	нео-XY/нео-XX	Bugrov 1986, Бугров и др., 2016
<i>Asiotmethis jubatus</i> (Uvarov, 1926)	Китай	X0/XX	Li et al. 2005
<i>Asiotmethis limbatus</i> (Charpentier, 1845)	Болгария	нео-XY/нео-XX	Bugrov, Grozeva 1998
<i>Asiotmethis tauricus</i> (Tarbinsky, 1930)	Крым (Феодосия)	X0/XX	Эта работа
<i>Asiotmethis muricatus</i> (Pallas, 1771)	Западный Казахстан	X0/XX	Эта работа
<i>Asiotmethis turratus</i> (Fischer von Waldheim, 1833)	Армения	нео-XY/нео-XX	Bugrov et al. 2016
<i>Asiotmethis zacharjini</i> (Bey-Bienko, 1926)	Китай	нео-XY/нео-XX	Li et al. 2005
<i>Atrichotmethis semenovi</i> (Zubovski, 1899)	Таджикистан (около Курган-Тюбе)	нео-XY/нео-XX	Bugrov 1986; Bugrov, Warchalowska-Śliwa 1997
<i>Beybienkia songorica</i> Tsyplenkov, 1956	Китай	X0/XX	Li et al. 2008
<i>Eotmethis jintaiensis</i> Xi & Zheng, 1984	Китай	X0/XX	Sun et al. 2004
<i>Eotmethis tientuensis</i> (Chang, Wang & Kan, 1978)	Китай	X0/XX	Sun et al. 2004
<i>Eremopeza festiva</i> (Saussure, 1884)	Армения	X0/XX	Bugrov et al. 2016
<i>Eremopeza saussurei</i> (Uvarov, 1918)	Иран (Фарс)	X0/XX	Bugrov et al. 2020
<i>Eremopeza bicoloripes</i> (Moritz, 1928)	Иран (Хорасан)	X0/XX	Bugrov et al. 2020
<i>Filchnerella amplivertica</i> Li, Zhang & Yin, 2009	Китай	X0/XX	Peng 1991; Li et al. 2011
<i>Filchnerella rubrimargina</i> Zheng, 1992	Китай	X0/XX	Wang, 2011
<i>Filchnerella beicki</i> Ramme, 1931	Китай	X0/XX	Peng 1991; Li et al. 2011
<i>Filchnerella rubimarginis</i> syn. <i>Pseudotmethis rubimarginis</i> (Li, 1986)	Китай	X0/XX	Li et al. 2008

<i>Glyphotmethis adaliae</i> (Uvarov, 1928)	Турция	X0/XX	Jetybayev et al. 2017
<i>Glyphotmethis dimorphus</i> (Uvarov, 1934)	Турция	neo-XY/neo-XX	Jetybayev et al. 2017
<i>Glyphotmethis efe</i> Ünal, 2007	Турция	neo-XY/neo-XX	Jetybayev et al. 2017
<i>Glyphotmethis holtzi pulchripes</i> (Uvarov, 1943)	Турция	neo-XY/neo-XX	Jetybayev et al. 2017
<i>Melanomethis fuscipennis</i> (Redtenbacher, 1889)	Туркменистан	X0/XX	Bugrov, Warchałowska-Śliwa 1997
<i>Pezotmethis ferghanensis</i> (Uvarov, 1925)	Узбекистан	X0/XX	Bugrov, Warchałowska-Śliwa 1997
<i>Pseudomethis alashanicus</i> Bey-Bienko, 1948	Китай	X0/XX	Chen Shi-Ni, Shen Muh, 1964
<i>Prionotropis flexuosa</i> (Serville, 1838)	Испания (Мадрид)	X0/XX	Santos et al. 1983
<i>Strumiger desertorum</i> Zubovski, 1896	Туркменистан	X0/XX	Bugrov, Warchałowska-Śliwa 1997
<i>Tmethis cisti</i> (Fabricius, 1787)	Северная Африка (Марокко)	X0/XX	Buleu et al. 2019
<i>Trinchus arenosus</i> B-Bienko 1948	Казахстан (пустыня Сарыесик-Атырау)	X0/XX	Bugrov, Warchałowska-Śliwa 1997
<i>Sinotmethis amicus</i> B-Bienko syn. <i>Beybienkia amica</i> (Bey-Bienko, 1959)	Китай	X0/XX	Fu Peng et al. 1989
<i>Sinotmethis brachypennis</i> syn. <i>Beybienkia brachypennis</i> (Zheng & Xi, 1985)	Китай	X0/XX	Fu Peng et al. 1989
Haplotropiini Sergeev, 1995			
<i>Haplotropis brunneriana</i> Saussure, 1888	Китай; Россия (Забайкальский край)	♂X0/♀XX	Chen 1937; Bugrov, Warchałowska-Śliwa, 1997
Продолжение. Приложение 2. Кариотипы саранчовых Pamphagidae			
Таксон	Место сбора	Определение пола	Источник данных
Pamphaginae Burmeister, 1840			
Nocarodeini Bolívar, 1916			
<i>Nocaracris bulgaricus</i> (Ebner & Drenowski, 1936)	Болгария	neo-XY/neo-XX	Bugrov, Grozeva 1998;
<i>Nocaracris citripes</i> (Uvarov, 1949) syn. <i>Paranocaracris citripes</i> (Uvarov, 1949)	Турция	neo-XY/neo-XX	Jetybayev et al. 2017
<i>Nocaracris cyanipes</i> (Fischer von Waldheim, 1846)	Армения; Россия (Карачаево-Черкессия)	neo-XY/neo-XX	Bugrov, Warchałowska-Śliwa 1997; Bugrov et al. 2016
<i>Nocaracris rubripes</i> (Fischer von Waldheim, 1846) syn. <i>Paranocaracris rubripes</i>	Армения	neo-XY/neo-XX	Bugrov et al. 2016
<i>Nocaracris sabulosa</i> Ramme, 1951 syn. <i>Paranocaracris citripes idrisi</i> (Karabağ, 1953)	Турция	neo-XY/neo-XX	Jetybayev et al. 2017
<i>Nocaracris tardus</i> Ünal, Bugrov & Jetybayev, 2016	Турция	neo-XY/neo-XX	Jetybayev et al. 2017
<i>Nocaracris idrisi</i> (Karabag, 1956) syn. <i>Paranocaracris citripes idrisi</i>	Турция	neo-XY/neo-XX	Jetybayev et al. 2017
<i>Nocaracris sureyana</i> Ramme, 1951 syn. <i>Paranocaracris sureyanus</i> (Ramme, 1951)	Турция	neo-XY/neo-XX	Jetybayev et al. 2017
<i>Nocaracris furvus</i> Mishchenko, 1951 syn. <i>Oronothrotus furvus</i> Mishchenko, 1951	Турция	neo-XY/neo-XX	Jetybayev et al. 2017
<i>Paranocarodes chopardi</i> Peshev, 1965	Болгария & Турция	neo-XY/neo-XX	Bugrov, Grozeva 1998
<i>Paranocarodes fieberi anatoliensis</i> Demirsoy, 1973 syn. <i>Paranocarodes anatoliensis anatoliensis</i>	Турция	neo-XY/neo-XX	Jetybayev et al. 2017
<i>Paranocarodes fieberi tolunayi</i> Karabag, 1949 syn. <i>Paranocarodes tolunayi tolunayi</i>	Турция	neo-XY/neo-XX	Jetybayev et al. 2017

<i>Paranocarodes pahlagonicus</i> (Ramme, 1951)	Турция	neo-XY/neo-XX	Jetybayev et al. 2017
<i>Paranocarodes straubei</i> (Fieber, 1853)	Болгария	neo-XY/neo-XX	Bugrov, Grozeva 1998
<i>Paranocarodes turkmen</i> Ünal, 2014	Турция	neo-XY/neo-XX	Jetybayev et al. 2017
<i>Paranothrotres opacus</i> (Brunner von Wattenwyl, 1882)	Армения	neo-X ₁ X ₂ Y/neo-X ₁ X ₁ X ₂ X ₂	Bugrov et al. 2016
<i>Paranothrotres citimus</i> Mistshenko, 1951	Иран (Казвин)	neo-X ₁ X ₂ Y/neo-X ₁ X ₁ X ₂ X ₂	Bugrov et al. 2020
<i>Paranocarodes karabagi</i> Demirsoy, 1973 syn. <i>Pseudosavalania karabagi</i>	Турция	neo-XY/neo-XX	Jetybayev et al. 2017
<i>Nocarodes armenus</i> Ramme, 1951	Армения (Горован)	neo-XY/neo-XX	Эта работа
Tropidauchenini Zhang, Yin & Yin, 2003			
<i>Saxetania cultricolis</i> (Saussure, 1887)	Туркменистан (рядом с Ашхабадом)	neo-XY/neo-XX	Bugrov, Warchałowska-Śliwa, 1997
<i>Saxetania paramonovi</i> (Dirsh)	Иран (Хорасан)	X0/XX	Bugrov et al. 2020
<i>Tropidauchen escaleraei</i> Bolívar, 1912	Иран (Фарс)	neo-XY/neo-XX	Bugrov et al. 2020
<i>Tropidauchen</i> sp.	Иран (Фарс)	neo-XY/neo-XX	Bugrov et al. 2020
Pamphagini Burmeister, 1840			
<i>Acinipe calabara</i> (Costa, 1836)	Италия (Сицилия)	X0/XX	Alicata et al., 1976; Warchałowska-Śliwa et al. 1994
<i>Acinipe hesperica</i>	нет данных	X0/XX	López-León et al., 1989 (Цит. по: Warchałowska-Śliwa et al. 1994)
Продолжение. Приложение 2. Кариотипы саранчовых Pamphagidae			
Таксон	Место сбора	Определение пола	Источник данных
<i>Acinipe hesperica lepineyi</i> Chopard, 1943	Северная Африка	X0/XX	Buleu et al. 2019
<i>Acinipe tuberculata</i> Werner 1932	Северная Африка (Марокко)	X0/XX	Buleu et al. 2015
<i>Eumigus punctatus</i> (Bolívar, 1902)	Испания (Альбасете)	X0/XX	Camacho et al. 1981
<i>Eumigus cucullatus</i> (Bolívar, 1878)	Испания (Аликанте)	X0/XX	Camacho et al. 1981
<i>Eumigus monticola</i> (Rambur, 1838)	Испания (Сьерра Невада)	X0/XX	Camacho et al. 1981; Cabrero et al. 1985
<i>Eumigus ruboi</i> Harz, 1973	Испания	X0/XX	Cabrero et al., 1985
<i>Eumigus</i> sp.	Испания (Гранда)	X0/XX	Santos et al. 1983
<i>Ocnerodes brunnei</i> (Oliv.) (?) (Bolívar, 1876)	Испания (Мадрид)	X0/XX	Santos et al. 1983
<i>Ocneridia canonica</i> (Fischer, 1853)	нет данных	X0/XX	Alicata et al., 1976;
<i>Pamphagus marmoratus</i> Burmeister, 1838	Италия (Сицилия)	X0/XX	Alicata et al., 1976; Vitturi et al. 1993; Warchałowska-Śliwa et al. 1994
<i>Pamphagus ortolaniae</i> Cusimano&Massa, 1977	Италия (Юго-Западная Сицилия)	X0/XX	Mansueto, Vitturi 1989; Vitturi et al. 1993
<i>Pamphagus sardeus</i> (Herrich-Schäffer, 1840)	Италия (Сардиния)	X0/XX	Vitturi et al. 1993
<i>Pamphagus cristatus</i> Descamps & Mounassif, 1972	Северная Африка (Тунис, near Sakiet Youssef)	X0/XX	Warchałowska-Śliwa et al. 1994
<i>Pamphagus tunetanus</i> Vosseler, 1902	Северная Африка	X0/XX	Sofraduzua, Miksic, 1980 (Цит. по: Warchałowska-

			Śliwa et al. 1994)
<i>Paracinipe alticola</i> (Werner, 1932)	Северная Африка (Марокко)	X0/XX	Buleu et al. 2019
<i>Paracinipe crassicornis</i> (Bolívar, 1907);	Северная Африка (Марокко)	X0/XX	Buleu et al. 2019
<i>Paracinipe dolichocera</i> (Bolívar, 1907);	Северная Африка (Марокко)	X0/XX	Buleu et al. 2019
<i>Paracinipe theryi</i> (Werner, 1931)	Северная Африка (Марокко)	X0/XX	Buleu et al. 2019
<i>Pseudoglauiia terrea</i> (Bolivar, 1912)	Северная Африка (Марокко)	X0/XX	Buleu et al. 2015
<i>Pseudoglauiia tarudantica</i> (Bolívar, 1914)	Северная Африка (Марокко)	X0/XX	Buleu et al. 2019
<i>Eunapiodes atlantis</i> (Chopard, 1943)	Северная Африка (Марокко)	X0/XX	Buleu et al. 2015
Euryaryphini La Greca, 1993			
<i>Eunapiodes granosus</i> (Stål, 1876)	Северная Африка (Марокко)	X0/XX	Buleu et al. 2019
<i>Euryaryphes flexuosus</i> Uvarov, 1927	Северная Африка (Марокко)	X0/XX	Buleu et al. 2015
<i>Euryaryphes rungsi</i> Massa, 2013;	Северная Африка (Марокко)	X0/XX	Buleu et al. 2019
<i>Paraeumigus parvulus</i> (Bolívar, 1907)	Северная Африка (Марокко)	X0/XX	Buleu et al. 2019
<i>Paraeumigus fortis</i> (Bolivar,1912)	Северная Африка (Марокко)	X0/XX	Buleu et al. 2015
Продолжение. Приложение 2. Кариотипы саранчовых Pamphagidae			
Таксон	Место сбора	Определение пола	Источник данных
Porthetinae Bolívar, 1916			
Trachypetrellini Uvarov, 1943			
<i>Lobosceliana</i> sp.	Южная Африка (Springbok)	X0/XX	Buleu et al. 2019
<i>Stolliana angusticornis</i> Dirsh, 1958	Южная Африка (Richmond)	X0/XX	Fossey, 1985
<i>Hoplolopha asina</i> (Saussure, 1887)	Южная Африка (De Aar, Potfontein)	X0/XX	Fossey, 1985
<i>Hoplolopha karasensis</i> Sjöstedt, 1932	Южная Африка (Kimberley)	X0/XX	Fossey, 1985
<i>Hoplolopha reflexa</i> (Walker, 1870)	Южная Африка (De Aar, Kraankuil)	X0/XX	Fossey, 1985
<i>Lamarckiana bolivariana</i> (Saussure, 1887)	Южная Африка (Entabeni)	X0/XX	Fossey, 1985
<i>Transvaaliana distanti</i> (Saussure, 1892)	Южная Африка (Nylstroom)	X0/XX	Fossey, 1985
<i>Transvaaliana</i> n. sp. (A342)	Южная Африка (Barberton)	X0/XX	Fossey, 1985
Echinotropinae Dirsh, 1961			
<i>Thrinotropis karruensis</i> Brown, 1960	Южная Африка (Aberdeen, Murraysburg)	X0/XX	Fossey, 1985
Akicerinae Bolívar, 1916			
<i>Batrachotetrix stollii</i> Saussure, 1884	Южная Африка (Aberdeen)	X0/XX	Fossey, 1985
<i>Batrachotetrix turneri</i> Uvarov, 1931	Южная Африка (Aberdeen)	X0/XX	Fossey, 1985

ПРИЛОЖЕНИЕ 3. ОСОБЕННОСТИ ЛОКАЛИЗАЦИИ С-БЛОКОВ В ХРОМОСОМАХ ИССЛЕДОВАННЫХ ВИДОВ PAMPHAGIDAE

Таксон	2n♂	Определение пола	Локализация С-блока в хромосоме		
			Прицентромерный	Теломерный	Интеркалярный
Thrinchinae					
Thrinchini					
<i>Glyphotmethis adaliae</i> (Uvarov, 1928)	19	X0/XX	1-9, X	9	-
<i>Glyphotmethis dimorphus</i> (Uvarov, 1934)	18*	XY/XX	1-8, neo-X, neo-Y	neo-X	neo-X (XL), neo-Y
<i>Glyphotmethis efe</i> Ünal, 2007	18	neo-XY/neo-XX	1-8, neo-X, neo-Y	neo-X (XL)	neo-Y
<i>Glyphotmethis holtzi pulchripes</i> (Uvarov, 1943)	18	neo-XY/neo-XX	1-8, neo-X, neo-Y	neo-X (XL)	neo-Y
<i>Asiotmethis tauricus</i> (Pallas, 1771)	19	X0/XX	1-9, X	5, 6, 7, 8, 9, X	7
<i>Asiotmethis muricatus</i> (Tarbinsky, 1930)	19	X0/XX	1-9, X	5, 6, 7, 8, 9, X	7
<i>Asiotmethis heptapotamicus heptapotamicus</i> (Zubovskii, 1898)	18	neo-XY/neo-XX	1-8, neo-X, neo-Y	8, neo-X (XL)	neo-Y
<i>Asiotmethis heptapotamicus songoricus</i> Shumakov, 1949	18	neo-XY/neo-XX	1-8, neo-X, neo-Y	7, 8 neo-X (XL)	neo-Y
<i>Eremopezsa saussurei</i> (Uvarov, 1918)	19*	X0/XX	1-9, X	2, 3, 8, 9, X	-
<i>Eremopezsa bicoloripes</i> (Moritz, 1928)	19	X0/XX	1-9, X	2, 6, 7	-
<i>Tmethis cisti</i> (Fabricius, 1787)	19	X0/XX	1-9, X	1-4, 5-7, 8-9, X	-
Pamphaginae					

Nocarodeini					
<i>Nocaracris idrisi</i> (Karabağ, 1956)	18	neo-XY/neo-XX	1-8, neo-X, neo-Y	neo-X (XL)	neo-Y
<i>Nocaracris sureyanus</i> (Ramme, 1951)	18	neo-XY/neo-XX	1-8, neo-X, neo-Y	3, neo-X (XL)	6, neo-X (XL), neo-Y
<i>Nocaracris citripes</i> Uvarov, 1949	18	neo-XY/neo-XX	1-8, neo-X, neo-Y	2, 4, 8, neo-X (XL)	2, 4, 5, neo-Y
<i>Nocaracris furvus furvus</i> Mishchenko, 1951	18	neo-XY/neo-XX	1-8, neo-X, neo-Y	neo-X (XL)	6, neo-Y
<i>Nocaracris tardus</i> Ünal et al. 2016	18+B (0-4)	neo-XY/neo-XX	1-8, neo-X, neo-Y	6, neo-X (XL)	6, neo-Y
<i>Paranocarodes turkmen</i> Ünal, 2014	18	neo-XY/neo-XX	1-8, neo-X, neo-Y	neo-X (XL)	-
<i>Paranocarodes staubei</i> (Fieber, 1853)	18	neo-XY/neo-XX	1-8, neo-X, neo-Y	neo-X (XL)	neo-Y
<i>Paranocarodes fieberi tolunayi</i> Ramme, 1949	18	neo-XY/neo-XX	1-8, neo-X, neo-Y	neo-X (XL)	neo-X(XL), neo-Y
<i>Paranocarodes fieberi anatoliensis</i> Demirsoy, 1973	18	neo-XY/neo-XX	1-8, neo-X, neo-Y	neo-X (XL)	neo-Y
<i>Paranocarodes karabagi</i> Demirsoy, 1973	18	neo-XY/neo-XX	1-8, neo-X, neo-Y	neo-X (XL)	neo-Y
<i>Nocarodes armenus</i> Ramme, 1951	18	neo-XY/neo-XX	1-8, neo-X, neo-Y	2, 5, neo-X (XL)	neo-Y
<i>Paranothrotus citimus</i> Mistshenko, 1951	14	neo-X ₁ X ₂ Y/ neo-X ₁ X ₁ X ₂ X ₂	1-7, neo-X ₁ ; X ₂ , neo-Y	2, 4, 6, neo-X ₁ (XL) neo-Y (YR)	neo-Y (YR)
Продолжение. Приложение 3. Особенности локализации С-блоков в хромосомах исследованных видов Pamphagidae					
Таксон	2n♂	Определение пола	Локализация С-блока в хромосоме		
			Прицентромерный	Теломерный	Интеркалярный
Tropidauchenini					
<i>Saxetania paramonovi</i> (Dirsh)	19	X0/XX	1-9, X	6, 7, 8, 9	-
<i>Tropidauchen escaleraei</i>	18	neo-XY/neo-XX	1-8, neo-X, neo-Y	1, 3, 5, 6, 7, 8, neo-X	7, neo-Y
<i>Tropidauchen</i> sp.	18*	neo-XY/neo-XX	1-8, neo-X, neo-Y	6, 7, neo-X (XL)	5, 6, 8
Euryparyphini					
<i>Paraemigus fortius</i> (Bolivar, 1907)	19	X0/XX	1-9, X	8, 9	-
<i>Paraemigus parvulus</i> (Bolivar, 1907)	19	X0/XX	1-9, X	-	-
<i>Euryparyphes flexuosus</i> Uvarov, 1927	19	X0/XX	1-9, X	-	-
<i>Eunapiodes atlantis</i> (Chopard, 1943)	19	X0/XX	1-9, X	9	-
<i>Eunapiodes granosus</i> (Stål, 1876)	19	X0/XX	1-9, X	9	-
<i>Euryparyphes rungsi</i> Massa, 2013	19	X0/XX	1-9, X	9	-
Pamphagini					
<i>Pseudoglaucia terrea</i> (Bolivar, 1912)	19	X0/XX	1-9, X	8,9	6, X
<i>Pseudoglaucia tarudantica</i> (Bolivar, 1914)	19	X0/XX	1-9, X	7, 8, 9	-
<i>Acinipe tuberculata</i> Werner, 1932	19	X0/XX	1-9, X	6, 7, 9	-
<i>Acinipe hesperica lepineyi</i> Chopard, 1943	19	X0/XX	1-9, X	6, 7, 8, 9	1, 2, 4, 6, X
<i>Paracinipe alticola</i> (Werner, 1932)	19	X0/XX	1-9, X	5, 7, 8, 9	1, 2, 3, 6, X

1932)					
<i>Paracinipe crassicornis</i> (Bolivar, 1907)	19	X0/XX	1-9, X	6, 8, 9	2, X
<i>Paracinipe dolichocera</i> (Bolivar, 1907)	19	X0/XX	1-9, X	7, 9	3, 4, 6, 7, X
<i>Paracinipe theryi</i> (Werner, 1931)	19	X0/XX	1-9, X	6, 7, 8, 9	-
Porthetinae					
<i>Lobosceliana</i> sp.	19	X0/XX	1-9, X	-	-

Условные обозначения в таблице: Цифрами (1-9) обозначены номера пар аутосом; X – хромосома; neo-X (XL) – XL-плечо нео-X хромосомы; neo-Y (YR) – YR- плечо нео-Y хромосомы

ПРИЛОЖЕНИЕ 4. ЛОКАЛИЗАЦИЯ РИБОСОМНОГО И ТЕЛОМЕРНОГО ПОВТОРОВ ДНК В ХРОМОСОМАХ ИССЛЕДОВАННЫХ ВИДОВ PAMPHAGIDAE

Таксон	2n ♂	Определение пола	Расположение молекулярных повторов в хромосомах	
			Рибосомный	Теломерный (TTAGG) _n
Thrinchinae				
Thrinchini				
<i>Glyphotmethis adaliae</i> (Uvarov, 1928)	19	X0/XX	Cen 2, 3,4; Int 2, 6	All ter
<i>Glyphotmethis dimorphus</i> (Uvarov, 1934)	18	neo-XY/neo-XX	Int p 1, 2, 3; Int di 2, 3, 6	All ter, cen neo-X (XL)
<i>Glyphotmethis efe</i> Ünal, 2007	18	neo-XY/neo-XX	Cen 1, 2; Int p 3; Int di 6	All ter, cen neo-X (XL)
<i>Glyphotmethis holtzi pulchripes</i> (Uvarov, 1943)	18	neo-XY/neo-XX	Cen 1, 2, 3, neo-X (XL); Int p 1, 2; Int di 6	All ter
<i>Asiotmethis muricatus</i> (Pallas, 1771)	19	X0/XX	Cen 2, 8, X; Int p 3, 4; Int di 2, 6	All ter
<i>Asiotmethis tauricus</i> (Tarbinsky, 1930)	19	X0/XX	Cen 2, 8, X; Int p 3, 4; Int di 2, 6	All ter
<i>Asiotmethis heptapotamicus heptapotamicus</i> (Zubovskii, 1898)	18	neo-XY/neo-XX	Cen 3; Int p 1, neo-X; Int di 5, 6	All ter
<i>Asiotmethis heptapotamicus songoricus</i> Shumakov, 1949	18	neo-XY/neo-XX	Cen 1, 2, 3; Int p 3, 6; Int di 2, 6	All ter
<i>Eremopeza saussurei</i> (Uvarov, 1918)	19	X0/XX	Cen 1, 2, 3, 4, 5, X	All ter; cen 2, 3; X
<i>Eremopeza bicoloripes</i> (Moritz, 1928)	19	X0/XX	Cen 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8	All ter, cen X
<i>Tmethis cisti</i> (Fabricius, 1787)	19	X0/XX	Cen 3; Int p 4, 5, 6	All ter
Pamphaginae				
Nocarodeini				
<i>Nocaracris idrisi</i> (Karabağ, 1953)	18	neo-XY/neo-XX	Int p 3, 6; neo-X (XL); Int di 3	All ter
<i>Nocaracris sureyana</i> (Ramme, 1951)	18	neo-XY/neo-XX	Int p 2, 6, neo-X (XL)	All ter
<i>Nocaracris citripes</i> Uvarov, 1949	18	neo-XY/neo-XX	Int p 6, neo-X (XL); Int di 3	All ter
<i>Nocaracris furvus furvus</i>	18	neo-XY/neo-XX	Int p neo-X (XL); Int di 2, 6	All ter

Mishchenko, 1951				
<i>Nocaracris tardus</i> Ünal et al. 2016	18	neo-XY/neo-XX	Int p 3, 6, neo-X (XL)	All ter
<i>Paranocarodes turkmen</i> Ünal, 2014	18	neo-XY/neo-XX	Int p 6	All ter, cen neo-X (XL)
<i>Paranocarodes pahlagonicus</i> (Ramme, 1951)	18	neo-XY/neo-XX	Int p 2, 4; Int di 6, neo-X (XL)	All ter
<i>Paranocarodes tolunayi tolunayi</i> Karabag, 1949	18	neo-XY/neo-XX	Int di 2, 4, 6, neo-X (XL)	All ter, cen neo-X (XL)
<i>Paranocarodes anatoliensis anatoliensis</i> Demirsoy, 1973	18	neo-XY/neo-XX	Cen 2, 3, 5, 6, 7	All ter
<i>Paranocarodes karabagi</i> Demirsoy, 1973	18	neo-XY/neo-XX	Int p 4, 6; Int di neo-X (XL);	All ter
<i>Nocarodes armenus</i> Ramme, 1951	18	neo-XY/neo-XX	Cen 2, 4, 5, neo-X (XL)	All ter
Tropidauchenini				
<i>Saxetania paramonovi</i>	19	X0/XX	Cen 2, 4; Int p 3	All ter
<i>Tropidauchen escalerae</i>	18	neo-XY/neo-XX	Cen 3, Int p 2, 6; Int di 2	All ter
<i>Tropidauchen</i> sp.	18	neo-XY/neo-XX	Cen 2; Int di 2, 7, 8	All ter
Продолжение. Приложение 4. Особенности локализации рибосомного и теломерного повторов ДНК в хромосомах исследованных видов Pamphagidae				
Euryparyphini				
Таксон	2n ♂	Определение пола	Расположение молекулярных повторов в хромосомах	
			Рибосомный	Теломерный (TTAGG) _n
<i>Paraemigus fortius</i> (Bolivar, 1907)	19	X0/XX	Cen 4; Int p 2, 3	All ter
<i>Paraemigus parvulus</i> (Bolivar, 1907)	19	X0/XX	Cen 4; Int p 2	All ter
<i>Euryparyphes flexuosus</i> Uvarov, 1927	19	X0/XX	Cen 4; Int p 2, 3	All ter
<i>Eunapiodes atlantis</i> (Chopard, 1943)	19	X0/XX	Cen 5, Int p 3, 4	All ter
<i>Eunapiodes granosus</i> (Stål, 1876)	19	X0/XX	Cen 3, 6 Int p 2	All ter
<i>Euryparyphes rungsi</i> Massa, 2013	19	X0/XX	Cen 7; Int p 2, 4	All ter
Pamphagini				
<i>Pseudoglauiia terrea</i> (Bolivar, 1912)	19	X0/XX	Cen 1; Int p 1, Int di 1	All ter
<i>Pseudoglauiia tarudantica</i> (Bolivar, 1914)	19	X0/XX	Int p 2, Int p 2; Int p 6	All ter
<i>Acinipe tubericollis</i> Werner, 1932	19	X0/XX	Cen 5; Int p 2, 4	All ter
<i>Acinipe hesperica lepineyi</i> Chopard, 1943	19	X0/XX	Cen 1, 4, 6	All ter
<i>Paracinipe alticola</i> (Werner, 1932)	19	X0/XX	Cen 1, 2, 8	All ter
<i>Paracinipe crassicornis</i> (Bolivar, 1907)	19	X0/XX	Cen 1, 4; Int p 4	All ter
<i>Paracinipe dolichocera</i> (Bolivar, 1907)	19	X0/XX	Cen 3, 5, 6, 7, X	All ter
<i>Paracinipe theryi</i> (Werner, 1931)	19	X0/XX	Cen 1, 4, 8	All ter
Porthetinae				
<i>Lobosceliana</i> sp.	19	X0/XX	Cen 2, 6; Int di 6	All ter

Условные обозначения в таблице: All ter – все терминальные; Cen – кластер расположено в прицентромерном районе хромосомы; Int di – кластер расположен интеркалярно в дистальном районе хромосомы; Int p – кластер расположен интеркалярно около центромеры; цифрами (1–9) обозначены номера пар аутосом. neo-X (XL) – XL-плечо neo-X хромосомы.