

Хромосомный полиморфизм в популяциях
семиреченской кобылки *Asiotmethis heptapotamicus* (Zub.)
(Pamphagidae, Thrinchinae) из Казахстана

Chromosome polymorphism in populations of *Asiotmethis*
heptapotamicus (Zub.) (Pamphagidae, Thrinchinae) from
Kazakhstan

А.Г. Бугров^{*,**}, О.Г. Булэу^{*,**}, И. Е. Джетыбаев^{*,***}
A.G. Bugrov^{*,**}, O.G. Buleu^{*,**}, I.E. Jetybayev^{*,***}

* Институт систематики и экологии животных Сибирского отделения Российской академии наук, ул. Фрунзе 11, Новосибирск 630091 Россия. E-mail: bugrov04@yahoo.co.uk.

* Institute for Systematics and Ecology of Animals, Siberian Branch of Russian Academy of Sciences, Frunze Str. 11, Novosibirsk 630091 Russia.

** Новосибирский государственный университет, ул. Пирогова 2, Новосибирск 630090 Россия.

** Novosibirsk State University, Pirogova Str. 2, Novosibirsk 630090 Russia.

*** Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, пр. ак. Лаврентьева 10, Новосибирск 630090 Россия.

*** Institute of Cytology and Genetics, Russian Academy of Sciences, Siberian Branch, Pr. Lavrentjeva, 630090 Novosibirsk, Russia.

Ключевые слова: саранчовые, Pamphagidae, популяция, кариотип, С-дифференциальная окраска хромосом.

Key words: Pamphagidae grasshoppers, population, karyotype, C-banding.

Резюме. Цитогенетический анализ популяций, относящихся к двум подвидам семиреченской кобылки *Asiotmethis heptapotamicus songoricus* Shum. и *A. heptapotamicus heptapotamicus* (Zub.) ($2n\sigma = 18$; $2n\varphi = 18$; neo-XY σ /neo-XX φ) выявил различия между этими подвидами по уровню гетерохроматинизации прицентромерных районов neo-Y хромосомы. Описан полиморфизм по локализации и величине С-позитивных районов хромосом и добавочным (В-) хромосомам в кариотипах исследованных популяций. Предполагается, что полиморфизм отражает эволюционную дивергенцию популяций в процессе видообразования.

Abstract. Cytogenetic analysis of the populations belonging to two subspecies of *Asiotmethis heptapotamicus* (Zub.) namely *A. heptapotamicus songoricus* Shum. and *A. heptapotamicus heptapotamicus* (Zub.) ($2n\sigma = 18$; $2n\varphi = 18$; neo-XY σ /neo-XX φ) revealed differences between the subspecies in heterochromatinization level of centromeric regions of the neo-Y chromosome. Polymorphism on the B-chromosomes, localization and size of the C-positive regions in the karyotypes were described. It is assumed that the chromosome polymorphism reflects the evolutionary divergence of populations in the speciation process.

Введение

Саранчовые рода *Asiotmethis* Uv. распространены в степных, полупустынных и пустынных ланд-

шафтах низкогорий Центральной Азии и сопредельных частях Малой и Западной Азии. В настоящее время описано 12 видов этого рода [<http://orthoptera.speciesfile.org/>]. По авторитетному мнению Г.Я. Бей-Биенко «различия между видами нерезкие, что затрудняет их определение» [Bei-Bienko, Místhchenko, 1951, p. 305]. Некоторые виды этого рода подразделяются на подвиды. Один из таких политипических видов — *Asiotmethis heptapotamicus* (Zubovskii, 1898). Пять слабо различающихся подвидов этого вида распространены в разных регионах Казахстана и Киргизии [Bei-Bienko, Místhchenko, 1951]. Обитание на относительно небольшой территории нескольких подвидов, отличающихся деталями строения грудного отдела, длиной крыльев и сигнальной окраской голени задних ног позволяет предполагать активные микроэволюционные процессы в популяциях *Asiotmethis heptapotamicus*.

Зачастую морфологическая дивергенция сопровождается хромосомными перестройками и цитогенетическим полиморфизмом в популяциях [White, 1973; King, 1993]. Хромосомный полиморфизм обнаружен в популяциях многих видов саранчовых. В ряде случаев этот полиморфизм послужил маркером эволюционной дивергенции популяций и процесса видообразования [Shaw, Wilkinson, 1980; White, 1978; Hewitt, Barton, 1980; Bugrov et al., 2001]. При-

стальное внимание к каждому случаю хромосомного полиморфизма обусловлено тем, что хромосомные перестройки или другие цитогенетические отличия зачастую становятся причиной репродуктивной изоляции между зарождающимися видами.

Представители семейства Pamphagidae оставались до недавнего времени одной из наименее изученных групп саранчовых в цитогенетическом отношении. При этом подчеркивалась исключительная кариотипическая консервативность этого семейства ($2n\sigma = 19$; $2n\varphi = 20$; $XO\sigma/XX\varphi$ определения пола), что давало основание предполагать особый путь эволюции кариотипа в этой группе, не связанный с изменением числа и морфологии хромосом [White, 1973; Hewitt, 1979; Camacho et al., 1981]. Тем не менее было выявлено межвидовое разнообразие по величине и локализации С-позитивных районов хромосом у нескольких видов Pamphagidae, распространённых в Южной Европе [Santos et al., 1983; Cabrero et al., 1985; Warchalowska-Sliwa et al., 1994]. Популяционные отличия по величине С-позитивных районов в трёх парах крупных аутосом и половой Х-хромосоме были обнаружены только у *Eumigus monticola* (Rambur 1838) в горах Сьерра-Невада (Испания) [Cabrero et al., 1985].

Сравнительно-кариологические исследования саранчовых семейства Pamphagidae из Центральной Азии, Болгарии, Армении и Турции опровергли мнение об этой группе как исключительно единообразной по структуре кариотипа. Для ряда видов из подсемейств Pamphaginae и Thrinchinae, были описаны хромосомные наборы, возникшие в результате реципрокной транслокации исходно акроцентрической Х-хромосомы и одной акроцентрической аутосомы с образованием нео-XY σ /нео-XX φ механизма определения пола ($2n\sigma = 18$; $2n\varphi = 18$) [Bugrov, 1996; Bugrov, Warchalowska-Sliwa, 1997; Bugrov, Grozeva, 1998; Bugrov et al., 2016]. Особое место в этих исследованиях занимает род *Asiotmethis* Uvarov, 1943, поскольку один вид этого рода — *A. muricatus* (Pall.) обладает исходным типом хромосомного набора, а другие (*A. limbatus* (Charp.), *A. turritus* (F.-W) и *A. heptapotamicus* (Zub.)) — производным, на основе упомянутой выше хромосомной перестройки [Bugrov, Jetybayev, 2014]. Кариотипическое разнообразие в одном из родов семейства Pamphagidae позволяет предполагать наличие популяционного хромосомного полиморфизма, то есть одновременного присутствия в популяции двух или нескольких морфологических вариантов хромосом, в том числе за счёт вариации величины и локализации блоков конститутивного гетерохроматина.

В данной работе приводятся результаты анализа признаков кариотипа (число и морфология хромосом, локализация и величина С-позитивных районов хромосом) в популяциях двух подвидов *A. heptapotamicus* (Zub.) из Казахстана.

Материал и методика

20 самцов *Asiotmethis heptapotamicus songoricus* Shum. были отловлены в Восточно-Казахстанской области Казахстана в окрестностях г. Аягоз (26 км ниже по течению реки Аягоз) в полупустынном ландшафте в июне 2007 и 2015 годов.

5 самцов *Asiotmethis heptapotamicus heptapotamicus* (Zub.) были отловлены в Алматинской области Казахстана, на левом берегу реки Или, в 10–40 км ниже плотины Капчагайской ГЭС в полупустынном ландшафте в июне 2015 года.

Прижизненно самцам в полость тела вводили инсулиновым шприцем 0,1–0,2 мл 0,1 % раствора колхицина на 1,5–2,0 часа. Затем извлекали семенники и после гипотонии в 0,9 % растворе цитрата натрия в течение 20 мин. при комнатной температуре их фиксировали 15 мин. в смеси ледяной уксусной кислоты и 96 % этанола (1:3). Фиксированный материал отмывали и хранили в 70 % этаноле. Давленные препараты из семенных фолликулов делали с помощью покровного стекла в капле 50 % уксусной кислоты на предметном стекле. Покровное стекло снималось после замораживания на металлическом столике, охлаждённом в жидком азоте. Затем препараты высушивались при комнатных условиях. Воздушно-сухие препараты окрашивались по С-методу дифференциальной сегментации хромосом [Sumner, 1972] с некоторыми модификациями.

При описании кариотипов нами принята классификация размерных классов хромосом Pamphagidae в соответствии с работой Хуана Педро Камачо с соавторами [Camacho et al., 1981]. Локализацию и относительные размеры блоков С-гетерохроматина определяли на основе ранее предложенной номенклатуры [King, John, 1980].

Микроскопический анализ был проведён в Центре микроскопических исследований СО РАН на микроскопе AXIOSKOP 2Plus (Zeiss, Германия). Для регистрации и обработки микроизображений использовали CCD-камеру AxioCam и программное обеспечение Axiovision (Zeiss, Германия).

Результаты

Стандартный кариотип саранчовых из исследованных выборок *Asiotmethis heptapotamicus heptapotamicus* (Zub.) и *Asiotmethis heptapotamicus songoricus* Shum. состоит из 18 хромосом ($2n\sigma = 18$; $2n\varphi = 18$). Механизм определения пола нео-XY σ /нео-XX φ . Хромосомный набор самца представлен 16 акроцентрическими аутосомами, субметацентрической нео-Х хромосомой и акроцентрической нео-У хромосомой. Структура кариотипа включает три пары крупных аутосом (L_1 – L_3), четыре — среднего размерного класса (M_4 – M_7), и одну пару мелких аутосом (S_8). Половая нео-Х хромосома большая, субметацентрическая. Нео-У хромосома акроцентрическая, может быть отнесена к крупному размерному классу (рис. 1, 2).

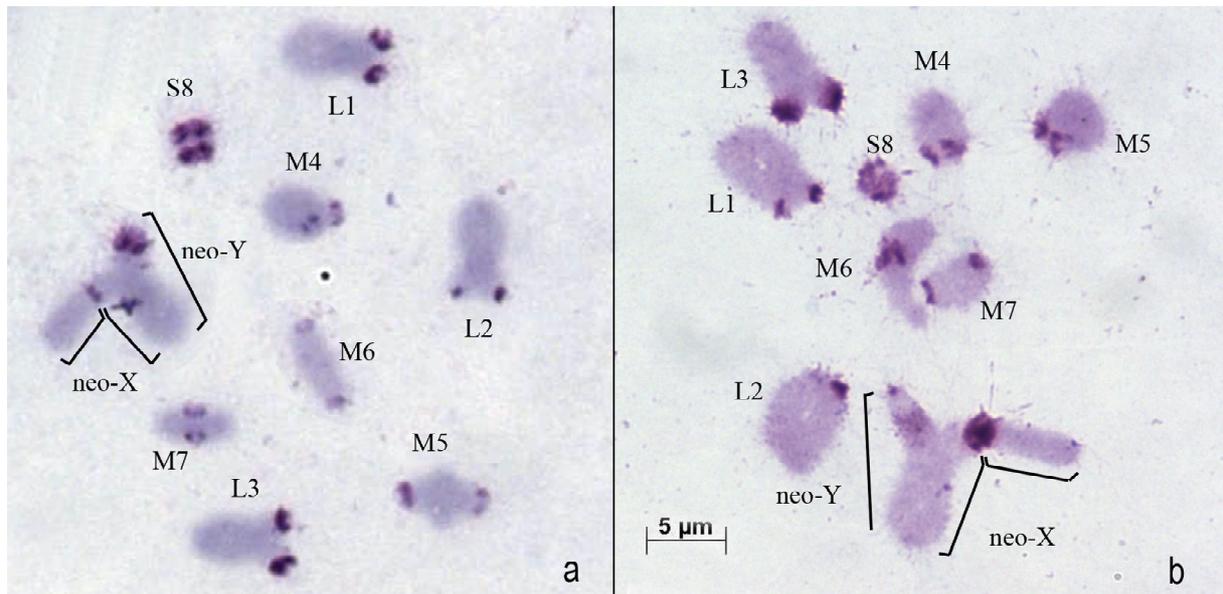


Рис. 1. С-дифференциальная окраска мейотических хромосом *Asiotmethis heptapotamicus heptapotamicus* (a) и *Asiotmethis heptapotamicus songoricus* (b).

Fig. 1. C-banding of meiotic chromosomes *Asiotmethis heptapotamicus heptapotamicus* (a) and *Asiotmethis heptapotamicus songoricus* (b).

Применение С-метода дифференциального окрашивания хромосом выявило величину и локализацию блоков конститутивного (С-) гетерохроматина. Во всех хромосомах исследованных особей локализован облигатный гетерохроматиновый блок в при-

центромерном районе. В ходе сравнительного исследования были выявлены различия в размерах и положении этих и других С-позитивных высокоповторяющихся районов ДНК в хромосомах исследованных особей. Прежде всего, эти различия связаны

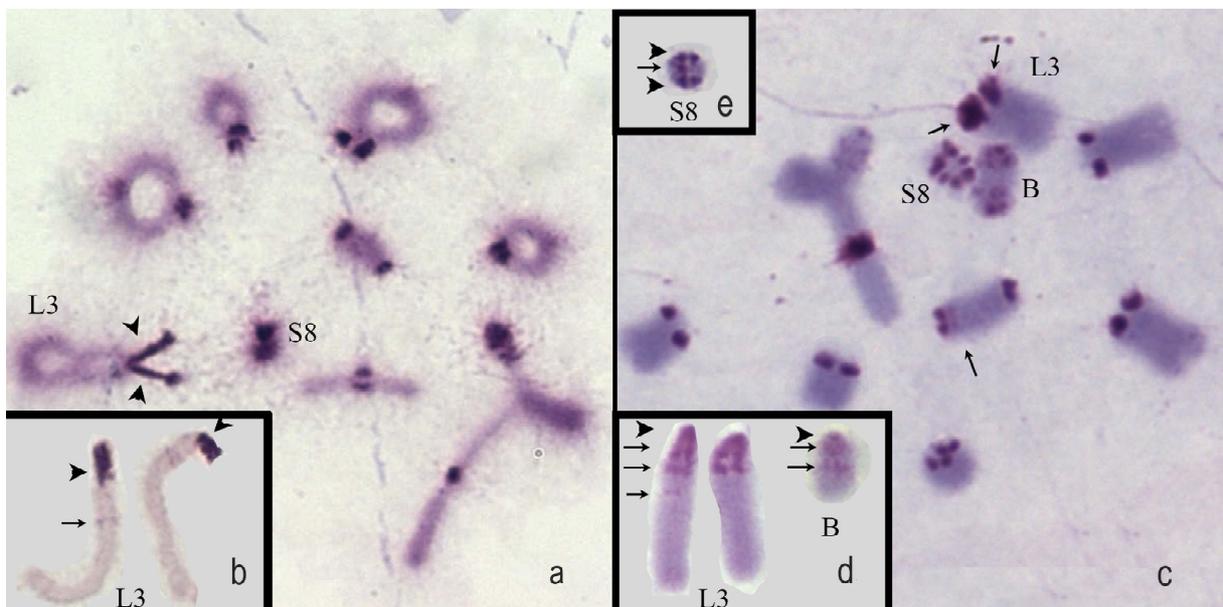


Рис. 2. Полиморфизм по С-позитивным блокам в исследованных популяциях *Asiotmethis heptapotamicus heptapotamicus* (a, b) и *Asiotmethis heptapotamicus songoricus* (c, d, e). a, b — гомозигота по вторым С-позитивным плечам в L3 паре хромосом; c, d — В-хромосомы и полиморфизм по интеркалярным С-блокам в L3 хромосоме; e — гетерозигота по теломерному блоку в S8 биваленте. Треугольниками указаны центромеры хромосом, стрелочками указаны интеркалярные С-позитивные блоки.

Fig. 2. Polymorphism on C-bands in studied populations of *Asiotmethis heptapotamicus heptapotamicus* (a,b) and *Asiotmethis heptapotamicus songoricus* (c, d, e). a, b — homozygote for the second C-positive arms in L3 chromosome pair; c, d — B-chromosomes and polymorphism on intercalary C-blocks in L3 chromosome pair, e — heterozygote for telomeric C-block in S8 bivalent. Arrowheads indicate centromeres, arrows indicate polymorphic interstitial C-bands.

с величиной прицентромерных блоков в нео-У хромосоме. В исследованной популяции *A. h. songoricus* степень гетерохроматинизации прицентромерного района этой хромосомы явно меньше, чем в популяции *A. h. heptapotamicus* (рис. 1а, б; 2а, с). По принятой классификации размерных классов С-позитивных районов хромосом у саранчовых (см. раздел «Материал и методика») блоки конститутивного гетерохроматина в нео-У хромосоме *A. h. heptapotamicus* хромосомах могут быть отнесены к размерному классу «крупные», а у *A. h. songoricus* к размерному классам «мелкие».

Другие внутри- и межпопуляционные отличия связаны с величиной и локализацией С-позитивных районов хромосом. В популяции *A. h. heptapotamicus* выявлен полиморфизм по дополнительным гетерохроматиновым сегментам в одной крупной паре аутосом (L3). В кариотипе четырёх особей эта пара хромосом представлена нормальной гомозиготой (рис. 1а), одна особь имеет дополнительное плечо в L3 в гомозиготном состоянии (рис. 2а, б), гетерозигот по этому признаку обнаружено не было. В популяции *A. h. songoricus* гомеологичная пара хромосом у всех исследованных особей не имеет дополнительных гетерохроматиновых плечей (рис. 1б, 2с, d). Однако в этой популяции выявлен полиморфизм по величине прицентромерного блока в L2 и L3 парах хромосом. О полиморфизме свидетельствует присутствие гомо- и гетерозигот в популяции по этому признаку (рис. 1б, 2с). В популяции *A. h. heptapotamicus* полиморфизм по этому признаку не выявлен. В изученной популяции *A. h. songoricus* был обнаружен также полиморфизм по интеркалярным С-блокам в крупных парах L2 и L3 аутосом. В популяциях выявлены гомо- и гетерозиготы по этим признакам (рис. 2с, d).

Для обеих исследованных популяций выявлен полиморфизм по теломерному С-блоку в самой мелкой паре хромосом (S8) (рис. 2с, е) и интеркалярному С-блоку в крупной паре L3 аутосом. В популяциях найдены гомо- и гетерозиготы по этим признакам (рис. 2с, d).

У трёх особей из популяции *A. h. songoricus* и одной особи из популяции *A. h. heptapotamicus* обнаружены добавочные (В-) хромосомы. Во всех случаях В-хромосомы акроцентрические, относятся к среднему размерному классу, с двумя крупными гетерохроматиновыми блоками в проксимальной части. При этом у двух особей *A. h. songoricus* и одной *A. h. heptapotamicus* были обнаружены две добавочные хромосомы, которые во время мейоза формировали бивалент. У одной особи *A. h. songoricus* добавочная хромосома представлена унивалентом (рис. 2 с, d).

Обсуждение

Цитогенетический анализ популяций, относящихся к двум подвидам семиреченской кобылки *A. hep-*

tapotamicus, показал гетерогенность популяций по локализации и величине С-позитивных районов хромосом, добавочным хромосомам. Полученные нами данные свидетельствуют, что морфологическое разнообразие политипического вида сопровождается цитогенетическим полиморфизмом по функционально значимым районам хромосом и, прежде всего, по гетерохроматиновым блокам в парацентромерных, интеркалярных и теломерных районах некоторых хромосом. Дискретное отличие хромосомных наборов популяций разных подвигов *A. heptapotamicus* по величине облигатного прицентромерного гетерохроматинового блока в нео-У хромосоме отражает, по-видимому, относительно быструю фиксацию разных уровней амплификации повторённых последовательностей ДНК в условиях репродуктивной изоляции популяций. К сходному выводу пришли и испанские исследователи двух хромосомных рас *E. monticola*, отличающихся количеством С-гетерохроматина в некоторых парах аутосом и X-хромосоме [Cabrero et al., 1985]. В немногочисленных работах по сравнительной кариологии саранчовых семейства Pamphagidae такие отличия обычно характеризуют как межвидовые [Camacho et al., 1981; Santos et al., 1983]. Однако в нашем исследовании были выявлены не только фиксированные, но и полиморфные модальности некоторых цитогенетических признаков. Полиморфизм по прицентромерным, интеркалярным и теломерным С-позитивным районам в нескольких парах хромосом можно отнести к генетико-стохастическим процессам, поддерживающим генетическое разнообразие. При этом следует учесть, что полиморфизм по таким блокам может приводить к нарушению мейоза между гетероморфными хромосомами в биваленте и, как следствие, к нарушению онтогенеза у потомков, как это было показано в генетических экспериментах на саранчовых из популяций *Caledia captiva* (семейство Acrididae) [Shaw, Wilkinson, 1980]. Низкий уровень полиморфизма по величине и локализации С-блоков в разном положении на хромосомах в исследованных нами популяциях свидетельствует в пользу предположения об естественном отборе против гетерозигот по тем или иным цитогенетическим признакам. Фиксации разных вариантов величины и локализации С-блоков в гомозиготном состоянии способствует, вероятно, относительная изоляция популяций этого вида саранчовых. К сожалению, внутренняя структура ареалов подвигов семиреченской кобылки до сих пор детально не выявлена, что не позволяет оценить влияние изоляции на микроэволюционные процессы в популяциях этого вида.

Особое место в выявленной системе хромосомного полиморфизма у *A. heptapotamicus* занимают В-хромосомы, представляющие собой дополнение к основному набору хромосом в популяциях многих видов животных и растений. В-хромосомы, обнаруженные у разных видов, отличаются структурной

организацией, происхождением, а также механизмами, поддерживающими их полиморфизм в популяциях. Известно более сотни видов саранчовых, в популяциях которых встречаются добавочные хромосомы. Обычно это мелкие хромосомы, состоящие преимущественно из гетерохроматинового материала [Camacho, 2005]. Ранее именно такие мелкие гетерохроматиновые добавочные хромосомы неясной морфологии были обнаружены в популяциях некоторых видов саранчовых семейства Pamphagidae [Bugrov, Warchalowska-Śliwa, 1997; Bugrov, Grozeva, 1998; Jetybaev et al., in press]. Добавочные хромосомы в популяциях двух подвидов *A. heptapotamicus* отличаются от ранее описанных В-хромосом некоторых видов Pamphagidae более крупными размерами и ясной дифференциацией на С-позитивные и С-негативные районы. По типу распределения эухроматиновых и гетерохроматиновых блоков эти В-хромосомы схожи с полиморфными участками хромосомы L3. Мы не исключаем, что этот факт является отражением гомологии В-хромосом и полиморфного проксимального участка L3 хромосомы. Однако для доказательства этой гипотезы необходимы молекулярно-цитогенетические исследования. Обнаруженные нами новые морфотипы добавочных хромосом в популяциях *A. heptapotamicus* могут свидетельствовать об автохтонном становлении системы полиморфизма по В-хромосомам в ареале этого вида и стать цитогенетическим маркером формирования структуры ареала вида. Это же значение для познания микроэволюционных процессов вида имеют и другие выявленные нами элементы хромосомного полиморфизма в исследованных популяциях *A. heptapotamicus*.

Таким образом, вид *A. heptapotamicus* может стать перспективной моделью исследования морфологической и генетической дивергенции популяций на начальных этапах видообразования.

Благодарности

Работа поддержана грантом РФФИ (проект №15-04-04816-а) и программой фундаментальных научных исследований на 2013–2020 гг., проект № VI.51.1.5.

Литература

- Bey-Bienko G.Ya., Mishchenko L.L. 1951. [Locusts fauna of the USSR and adjacent countries]. Vol.1–2. М.–Л.: Izdatel'stvo AN SSSR. 667 p. [In Russian].
- Bugrov A.G. 1996. Karyotypes of the short-horned Orthopteran insects (Orthoptera, Caelifera) from Russia, Kazakhstan, Central Asia, and the Caucasus // *Folia biologica* (Krakow). Vol.44. No.1–2. P.15–25.
- Bugrov A.G., Grozeva S. 1998. Neo-XY chromosome sex determination in four species of the Pamphagid grasshoppers (Orthoptera, Acridoidea, Pamphagidae) from Bulgaria // *Caryologia*. Vol.51. No.2. P.115–121.
- Bugrov A.G., Jetybayev I.E. 2014. Telomeric (TTAGG)_n repeats as molecular markers of a chromosome translocation in origin of the neo-XY/neo-XX sex determination in grasshoppers // *Euroasian Entomological Journal*. Vol.16. No.5. P.461–466. [In Russian]
- Bugrov A.G., Jetybayev I.E., Karagyan G.H., Rubtsov N.B. 2016. Sex chromosome diversity in Armenian toad grasshoppers (Orthoptera, Acridoidea, Pamphagidae) // *Comparative Cytogenetics*. Vol.10. No.1. P.45–59.
- Bugrov A.G., Warchalowska-Śliwa E. 1997. Chromosome numbers and C-banding patterns in some Pamphagidae grasshoppers (Orthoptera, Acrididae) from the Caucasus, Central Asia, and Transbaikalia // *Folia biologica* (Krakow). Vol.45. Nos 3–4. P.133–138.
- Bugrov A.G., Warchalowska-Śliwa E., Tatsuta H., Akimoto S. 2001. Chromosome polymorphism and banding variation of the brachypterous grasshopper *Podisma sapporensis* Shir. (Orthoptera, Acrididae) in Hokkaido, northern Japan // *Folia Biologica* (Krakow). Vol.40. Nos 1–2. P.137–152.
- Cabrero J., Camacho J.P.M., Pascual F. 1985. Cytotaxonomic studies on pamphagids genus *Eumigus*. Detection of two chromosomal races in *E. monticola* (Rambur) (Insecta, Orthoptera) // *Caryologia*. Vol.38. No.1. P.1–12.
- Camacho J.P.M. 2005. B chromosomes. Elsevier, San Diego: In Gregory T.R. (Ed.). The evolution of the genome. 223–286 p.
- Camacho J.P.M., Cabrero J., Viseras E. 1981. C-heterochromatin variation in the genus *Eumigus* (Orthoptera, Pamphagoidea) // *Genetica*. Vol.56. No.3. P.185–188.
- Hewitt G.M., 1979. Grasshoppers and cricket // *Animal cytogenetics, Insecta I, Orthoptera* Berlin-Stuttgart: Gebruder Borntraeger. Vol.3. P.170.
- Hewitt G. M., Barton N. H. 1980. The Structure and maintenance of hybrid zones as exemplified by *Podisma pedestris*. Blackwell, Oxford: In Blackman R.C., Hewitt G.M., Ashburner M. (Eds). *Insect Cytogenetics*. P.149–170.
- Jetybayev I.E., Bugrov A.G., Unal M., Buleu O.G., Rubtsov N.B. 2017. Molecular cytogenetic analysis reveals the existence of two independent neo-XY sex chromosome systems in Anatolian Pamphagidae grasshoppers // *BMC Evolutionary Biology*, in press.
- King M. 1993. *Species Evolution: the role of chromosome change*. Cambridge: Cambridge University Press. 336 p.
- King M., John B. 1980. Regularities and restrictions governing C-band variation in acridoid grasshoppers // *Chromosoma*. Vol.76. No.2. P. 123–150.
- Santos J.L., Arana P., Giraldez R. 1983. Chromosome C-banding patterns in Spanish Acridoidea // *Genetica*. Vol.61. No.1. P.65–74.
- Shaw D.D., Wilkinson P. 1980. Chromosome differentiation, hybrid breakdown and the maintenance of a narrow hybrid zone in *Caledia captiva* // *Chromosoma*. Vol.80. No.1. P.1–31.
- Sumner A.T. 1972. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin // *Experimental Cell Research*. Vol.75. P.304–306.
- Warchalowska-Śliwa E., Maryńska-Nadachowska A., Massa B. 1994. Some new data on C banding and NORs in three species of Pamphagidae (Orthoptera) // *Folia Biologica* (Krakow) Vol.42. Nos 1–2. P.13–18.
- White M.J.D. 1973. *Animal Cytology and Evolution*. London: The Cambridge University Press. 961 p.
- White M.J.D. 1978. *Modes of speciation*. Freeman, San Francisco, WH. VIII + 456 pp.