

На правах рукописи

Сухих Игорь Сергеевич

**ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ВИДОВ САРАНЧОВЫХ
СЕМЕЙСТВ ACRIDIDAE И RAMPHAGIDAE НА ОСНОВЕ
МИТОХОНДРИАЛЬНЫХ И ЯДЕРНЫХ МАРКЕРОВ**

03.02.07 – генетика

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Новосибирск 2020

Работа выполнена в лаборатории молекулярно-генетических систем Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения российской академии наук», г. Новосибирск.

**Научный
руководитель:**

Блинов Александр Геннадьевич
к.б.н., ведущий научный сотрудник сектора
молекулярно-генетических механизмов регенерации
ФГБНУ «ФИЦ Институт цитологии и генетики СО
РАН», г. Новосибирск

**Официальные
оппоненты:**

Сибатаев Ануарбек Каримович
д.б.н., профессор, с.н.с. Института биологии, экологии,
почвоведения, сельского и лесного хозяйства,
Национальный исследовательский Томский
государственный университет, г. Томск

Щербаков Дмитрий Юрьевич
д.б.н., заведующий лабораторией геносистематики,
ФГБУН «Лимнологический институт СО РАН»,
г. Иркутск

Ведущее учреждение: Федеральный научный центр биоразнообразия наземной биоты Восточной Азии Дальневосточного отделения Российской академии наук (ФНЦ биоразнообразия ДВО РАН), г. Владивосток.

Защита диссертации состоится «___» _____ 2020 г. на утреннем заседании диссертационного совета Д 003.011.01 на базе ФГБНУ «ФИЦ Институт цитологии и генетики СО РАН» в конференц-зале Института по адресу:
пр. академика Лаврентьева 10, г. Новосибирск, 630090
тел: +7(383) 363-49-06 (1321); e-mail: dissov@bionet.nsc.ru.
факс: +7(383) 333-12-78

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ИЦиГ СО РАН и на сайте Института: www.bionet.nsc.ru.

Автореферат разослан «___» _____ 2020 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
доктор биологических наук

Т.М. Хлебодарова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Семейство Acrididae или Настоящие саранчовые является крупнейшим семейством отряда Orthoptera (Прямокрылые). Систематика, реконструкция филогенетических отношений и представления об эволюции настоящих саранчовых долгое время складывались преимущественно на основе сравнительного анализа ключевых морфологических структур рецентных и ископаемых видов. В результате были разработаны многие эволюционно-филогенетические модели развития этих насекомых на уровне таксонов высокого ранга. Однако на уровне семейств, подсемейств или триб у данных насекомых появляются проблемы, связанные с явлениями конвергенции и параллелизма. Acrididae включает в себя по 26 подсемейств (Cigliano et al., 2019), а также несколько родов, которые не были отнесены ни к одному из подсемейств, и филогенетические взаимоотношения между этими таксонами до сих пор вызывают споры.

Несмотря на наличие общепризнанной классификации (Cigliano et al., 2019), на данный момент не существует устойчивого мнения о филогенетических взаимоотношениях между подсемействами, некоторыми трибами и родами семейства Acrididae. Однако, использование молекулярно-биологических методов, основанных на анализе нуклеотидных последовательностей, позволяет объективно установить филогенетические взаимоотношения между таксонами любого ранга (Li et al., 2010; McMahon et al., 2011; Li et al., 2015). Накопленные к настоящему времени данные о последовательностях митохондриальной ДНК (мтДНК) различных видов саранчовых могут служить основой для широкого филогенетического анализа взаимоотношений видов данного семейства (Charco et al., 2011; Huang et al., 2013).

Таким образом, для более полного и детального исследования филогении семейства Настоящие саранчовые необходимо провести филогенетический анализ маркерных нуклеотидных последовательностей его видов. В данной работе использовались одни из наиболее распространенных маркеров, широко представленных в базе данных GenBank (Benson et al., 2018) для видов семейства Acrididae: первая субъединица митохондриальной цитохром оксидазы (COI), вторая субъединица митохондриальной цитохром оксидазы (COII), цитохром В (Cytb) и внутреннего транскрибируемого спейсера 2 (ITS2).

Целями данной работы являются изучение филогенетических взаимоотношений видов семейств Acrididae и Pamphagidae, а также их подсемейств и триб, на основе сравнения последовательностей митохондриальной и ядерной ДНК.

Задачи:

1. Биоинформатический поиск и анализ последовательностей митохондриальных (COI, COII, Cytb) и ядерного (ITS2) маркеров, а также полноразмерных кодирующих последовательностей митохондриальных геномов представителей семейств Acrididae и Pamphagidae, представленных в базе данных GenBank.
2. Экспериментальное установление последовательностей митохондриальных (COI, COII, Cytb) и ядерного (ITS2) маркеров для видов семейств Acrididae и Pamphagidae.

3. Сравнительный и филогенетический анализ полученных последовательностей.
4. Выявление основных групп для семейств Acrididae и Pamphagidae и несоответствий с существующей систематикой.

Научная новизна работы. В работе был проведен комплексный филогенетический анализ семейств Acrididae и Pamphagidae. На основе данного анализа были сделаны гипотезы по коррекции существующей систематики видов данных семейств саранчовых. В ходе изучения семейства Acrididae была установлена полифилия для трех подсемейств, считающихся монофилетичными: Acridinae, Gomphocerinae, Oedipodinae. Были предложены два новых подсемейства из видов полифелитичных групп. Для семейства Pamphagidae была установлена полифилетическая природа подсемейства Pamphaginae, а также предложены варианты распределения видов данного подсемейства по новым группам (трибы Nocarodeini, Tropidauchenini). Было показано, что триба Harlotropidini входит в состав подсемейства Thrinchinae, а не Pamphaginae.

Теоретическая и практическая значимость исследования.

1. В результате проведенного филогенетического анализа были показаны несоответствия существующей систематики и собранных молекулярных данных.
2. Полученная в ходе исследования информация вносит вклад в систематику семейств Acrididae и Pamphagidae.
3. В ходе работы были выявлены сочетания маркеров, подходящих для филогенетического анализа семейств Acrididae и Pamphagidae.

Положения, выносимые на защиту:

1. Виды подсемейств Acridinae, Gomphocerinae и Oedipodinae семейства Acrididae имеют полифилетичное происхождение и на уровне отдельных подсемейств образуют как минимум пять различных кластеров.
2. Трибы Nocarodeini и Tropidauchenini семейства Pamphagidae могут иметь статус отдельного подсемейства.
3. Виды подсемейства Pamphaginae имеют различное происхождение и, как минимум две трибы, Tropidauchenini и Harlotropidini, не входят в состав подсемейства.

Вклад автора. Установление нуклеотидных последовательностей саранчовых *de novo* и проведение филогенетического анализа были осуществлены автором самостоятельно. Сбор и видовое определение саранчовых проводились проф. А. Г. Бугровым (ИСЭЖ СОРАН, НГУ).

Апробация работы. Основные результаты, полученные в рамках настоящей работы, были представлены на десятой международной конференции BGRS\SB-2016 (Новосибирск, 2016 г.); девятой международной школе молодых ученых SBB-2017 (Ялта, 2017 г.); XV съезде Русского энтомологического сообщества (Новосибирск, 2016 г.).

Структура и объем работы. Диссертация состоит из оглавления, списка сокращений, введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов и

обсуждений, заключения, выводов и списка литературы. Работа изложена на 100 страницах, содержит 16 рисунков, 2 таблицы и 6 приложений.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Все образцы видов семейства Acrididae и Pamphagidae были собраны на территориях Дальнего Востока, Сибири, Центральной Азии, Кавказа, Турции, Японии и Южной Африки в период 2008-2015 годов (Приложение 1). Все образцы были определены и предоставлены проф. А.Г. Бугровым (ИСЭЖ СО РАН, НГУ).

Тотальная ДНК была выделена из мышечных тканей взрослого насекомого с помощью набора реактивов DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN) (Германия), согласно протоколу фирмы-производителя. Для проведения полимеразной цепной реакции (ПЦР) были подобраны праймеры, специфичные к последовательностям митохондриальных генов COI и COII саранчовых, а также ITS2 рибосомной РНК. Для электрофоретического разделения фрагментов ДНК использовали 1.2% агарозный гель, приготовленный на буфере TAE. Для выделения фрагментов ДНК из агарозного геля использовали набор реактивов QIAquick Gel Extraction Kit, согласно инструкции производителя (Quiagen, 2008).

Определение нуклеотидной последовательности проводили при помощи автоматического секвенирования. Включение метки проводилось при помощи реакции Сэнгера. Определение последовательностей проводилось в центре коллективного пользования «Геномика» СО РАН (<http://www.niboch.nsc.ru/doku.php/sequence>).

Для поиска полных нуклеотидных митохондриальных последовательностей, митохондриальных генов COI, COII и CytB, а также ядерного ITS2 видов саранчовых использовалась база данных NCBI GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/).

Помимо полных белок-кодирующих митохондриальных последовательностей видов семейств Acrididae и Pamphagidae, для видов семейства Acrididae были сконструированы наборы конкатенированных последовательностей COI+COII+Cytb, конкатенированных последовательностей COI+COII и последовательностей ITS2; для видов семейства Pamphagidae были сконструированы наборы конкатенированных последовательностей COI+COII и последовательностей ITS2.

Все выравнивания были построены используя алгоритм MAFFT в программе MAFFT v7.312 (Kato et al., 2013) с параметрами --localpair и --maxiterate 1000. Для автоматического подбора подходящих моделей нуклеотидных замен и разбиения наборов последовательностей на части была использована программа PartitionFinder v 2.1.1 (Lanfear et al., 2017) с параметрами --unlinked и --greedy.

Для каждого набора последовательностей были построены филогенетические деревья методом Максимального Правдоподобия в программе IQ-tree (Trifinopoulos et al., 2016) и методом Байеса в программе MrBayes 3.2.6 (Huelsenbeck et al., 2001)

Для статистической поддержки максимального правдоподобия в программе IQ-Tree были использованы два коэффициента: “SH-like aLRT” (1000 репликаций) и сверхбыстрый бутстреп (“UfBoot”, 1000 репликаций). Для более тщательной оценки бутстреп поддержки был добавлен коэффициент “transfer bootstrap” с помощью алгоритма Booster (Lemoine et al., 2018). Для статистической поддержки методом Байеса были использованы значения Байесовских постериорных вероятностей (Huelsenbeck et al., 2001).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Поиск последовательностей в нуклеотидных базах данных и установление последовательностей экспериментальным путем

В проведенном филогенетическом анализе были использованы полные митохондриальные последовательности, конкатенированные последовательности трех митохондриальных генов (COI, COII, Cytb), конкатенированные последовательности двух митохондриальных генов (COI, COII) а также последовательности межгенного рибосомального спейсера ITS2. Для COI, COII и ITS2 маркерных генов были подобраны подходящие условия амплификации фрагментов нуклеотидных последовательностей. Поскольку выбранные праймеры специфичны для всех насекомых, и виды семейства Acrididae имеют большое генетическое разнообразие, отжиг проводился при минимальной возможной температуре для данных праймеров (42°C). Данный температурный режим позволил амплифицировать последовательности как видов семейства Acrididae, так и Pamphagidae. Далее, *de novo* были установлены нуклеотидные последовательности для 68 видов семейства Acrididae и 49 видов семейства Pamphagidae. Построение филогенетических деревьев семейства Acrididae начиналось с видов, для которых были установлены полные нуклеотидные последовательности, а затем на конкатенированных COI, COII и Cytb последовательностях. Маркер ITS2, представляющий собой последовательность участка ядерных рибосомных генов, был использован с целью подтверждения результатов филогенетического анализа, основанного на митохондриальных маркерах.

Для построения филогенетических деревьев видов семейства Pamphagidae использовались последовательности двух митохондриальных генов COI и COII. Были сконструированы как индивидуальные деревья для каждого гена, так и дерево для конкатенированных последовательностей COI и COII. Деревья, построенные на основе отдельных COI и COII генов, показывают более низкие коэффициенты поддержки чем на конкатенированном дереве, однако их топологии соответствуют. Как и в случае с Acrididae, в анализе был использован ITS2 участок для подтверждения результатов филогенетического анализа, основанного на митохондриальных маркерах.

Филогенетический анализ видов семейства Acrididae

Ожидаемо, дерево, построенное на основе полных белок-кодирующих митохондриальных последовательностей видов семейства Acrididae, имеет наилучшую статистическую поддержку, и является остовом для оценки филогении последующих деревьев (Рисунок 1). Дерево, построенное на основе конкатенированных последовательностей генов COI, COII и Cytb по большей не противоречит предыдущему дереву, однако группа III не имеет хорошей поддержки, что говорит о меньшем разрешении данного набора маркеров. Деревья, построенные только на основе конкатенированных последовательностей генов COI и COII, имеют низкие коэффициенты поддержки для большинства ветвей уровня подсемейства, и не дают достоверных результатов, однако их топологии частично соответствуют деревьям с большим количеством митохондриальных генов.

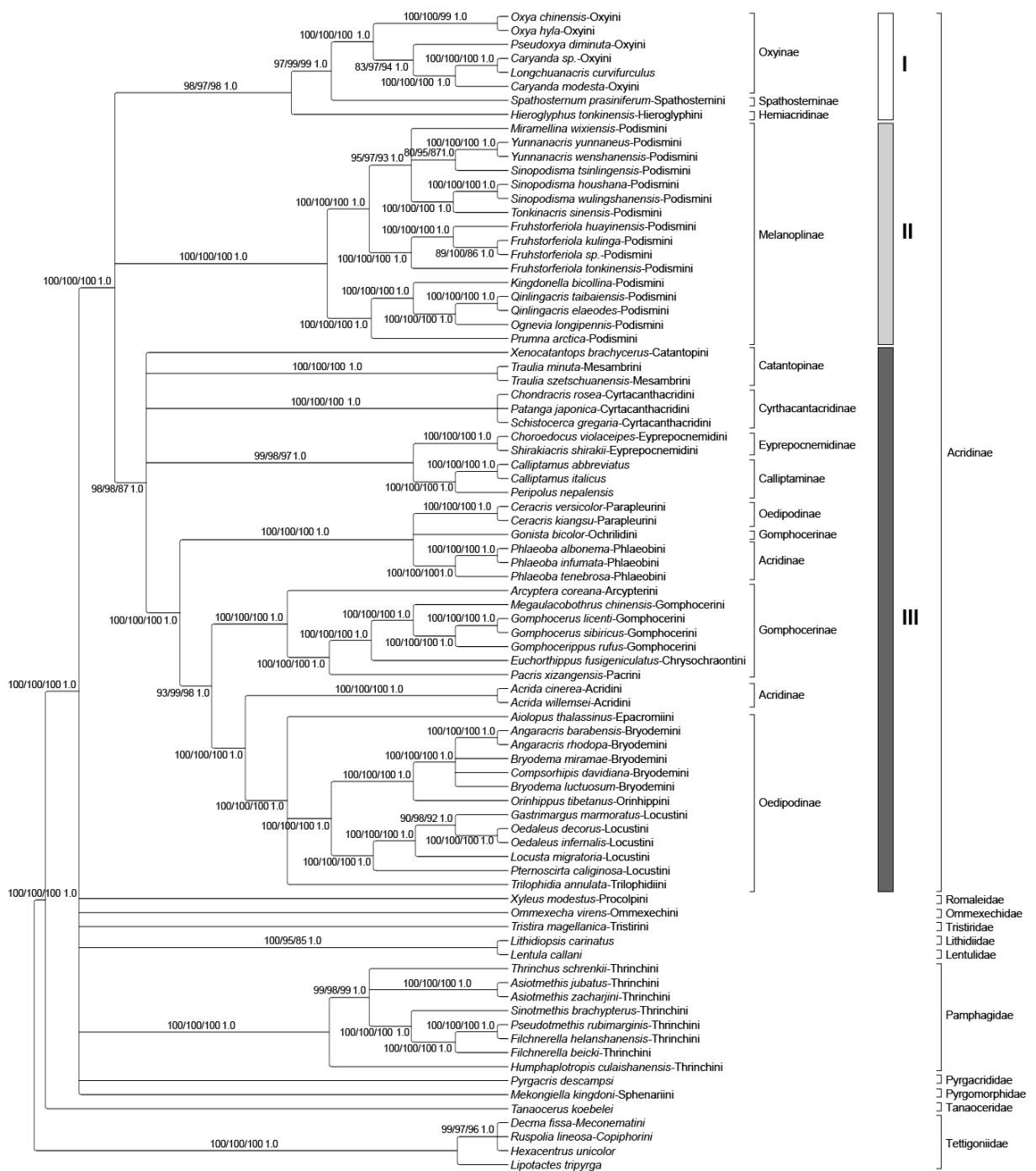


Рисунок 1. Филогенетическое древо, построенное на основе полных кодирующих митохондриальных последовательностей видов семейства Acrididae с помощью методов максимального правдоподобия и Байеса. Коэффициенты поддержки обозначены как SH-Like aLTR/UfBoot/Booster и Поддержка по Байесу. Римскими цифрами обозначены основные группы, скобками обозначены подсемейства и семейства.

Согласно информации, расположенной на сайте ортоптерологического общества (Sigliano et al., 2019), в настоящее время семейство Acrididae включает в свой состав 26 подсемейств. Представители 15 подсемейств были исследованы в настоящей работе. Суммируя полученные данные по всем использованным маркерам кроме COI+COII, можно сделать вывод, что все исследованные виды,

представляющие 12 подсемейств, образуют три филогенетические группы (Рисунок 1). Стоит отметить, что конкатенированные нуклеотидные последовательности COI+COII, по всей видимости, не обладают достаточным разрешением для качественного филогенетического анализа видов семейства Acrididae, и не добавляют достоверной информации касательно разделения видов на подсемейства и трибы.

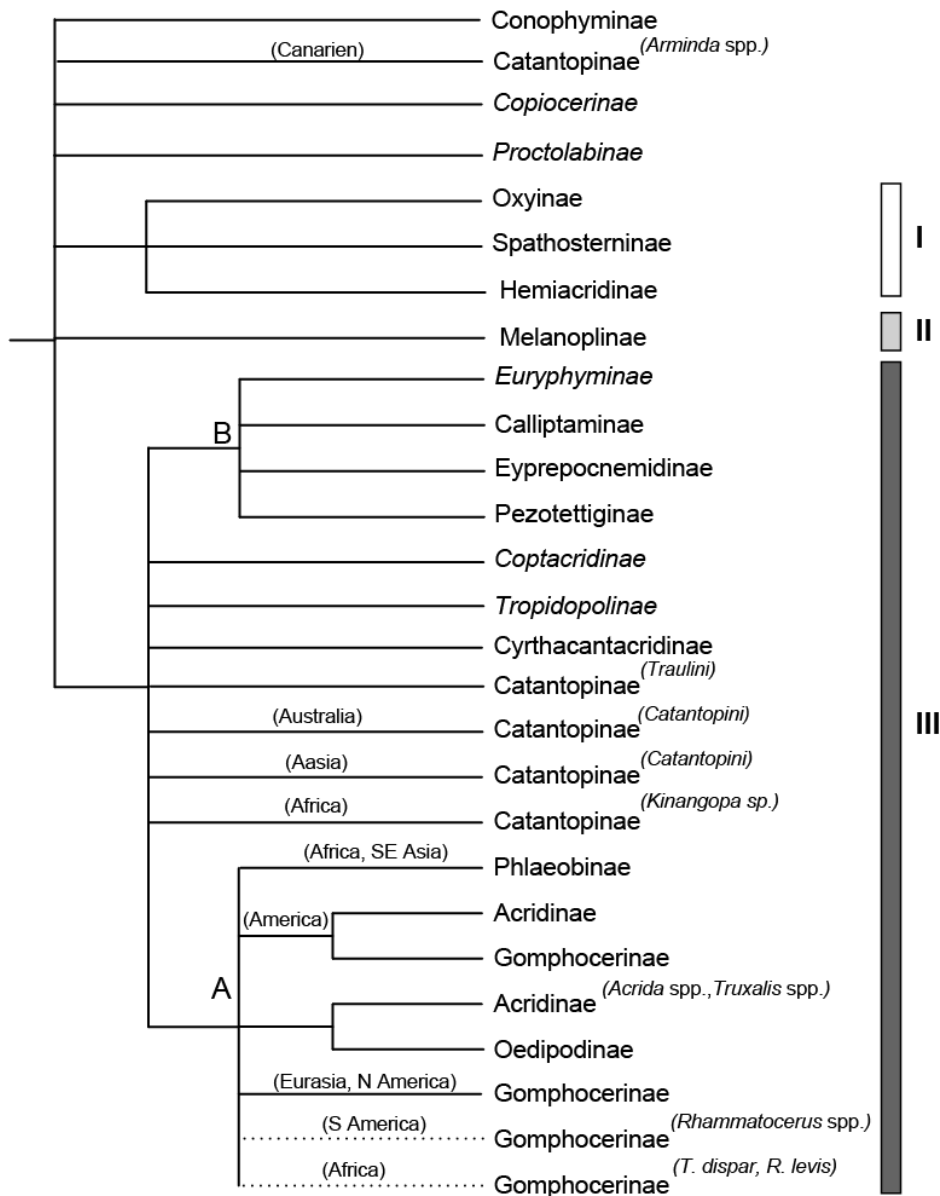


Рисунок 2. Взаимоотношения видов семейства Acrididae в виде схемы, основанной на трех филогенетических деревьях (Полные кодирующие митохондриальные нуклеотидные последовательности, конкатенированные COI+COII+Сytb нуклеотидные последовательности и ITS2 последовательности). Филогенетические группы обозначены серыми блоками с правой стороны дерева, и пронумерованы римскими цифрами. А и В – подгруппы в филогенетической группе III. Пунктирными линиями обозначены предположительные ветви. С левой стороны в скобках обозначены ареалы распространения видов полифилетических подсемейств. С правой стороны в скобках отмечены основные виды, входящие в состав данной ветви.

Филогенетическая группа I

Филогенетическая группа I объединяет виды трех подсемейств: Oxyinae, Hemiacridinae и Spathosterninae. Относительно видов подсемейств Hemiacridinae и Spathosterninae информация весьма скудная. В настоящей работе эти подсемейства были представлены только двумя видами: *Hieroglyphus tonkinensis* и *Spathosternum prasiniferum*. Однако, для обоих этих видов известны полные митохондриальные последовательности, что позволяет с уверенностью говорить о результатах проведенного филогенетического анализа. Все исследованные виды подсемейства Oxyinae представлены трибой Oxyini. На всех деревьях они формируют отдельную ветвь, тем самым показывая, что никаких разногласий с существующей классификацией не наблюдается. Однако, присутствие среди видов трибы Oxyini вида *Longchuanacris curvifurculus* требует пересмотра его принадлежности к подсемейству Catantopinae.

Митохондриальные COI и рибосомальные 18S и 28S последовательности *Spathosternum prasiniferum* были использованы ранее для филогенетического анализа, однако достоверно установить филогенетические взаимоотношения этого вида с другими видами акридид не удалось (Huang et al., 2013; Song et al., 2018). Позднее, при использовании полных митохондриальных последовательностей было установлено, что *Spathosternum prasiniferum* филогенетически близок к видам рода Охуа (Oxyinae) (Gao et al., 2018). Это подтверждает наши данные о вхождении видов подсемейств Spathosterninae и Oxyinae в отдельную филогенетическую группу. Подсемейство Spathosterninae весьма малочисленно (три рода и 12 видов), ареалы его видов очень узкие и представлены обособленными районами Африки и Юго-Восточной Азии. Исследованный вид распространен в Индии и в небольшой части Юго-Восточной Азии.

Подсемейство Hemiacridinae гораздо более многочисленно, однако для молекулярно-филогенетического анализа исследователями было использовано лишь несколько видов из этого подсемейства, используя 18S и 28S маркеры (Song et al., 2018). Три вида, представляющие роды *Pristocorypha*, *Leptacris* и *Kassongia* были расположены в различных частях древа и один из них, *Pristocorypha sp.*, был расположен в одной ветви с видом *Oxya hyla* (Oxyinae).

Филогенетическая группа II

В состав этой группы входит только одно подсемейство – Melanoplinae. Это подсемейство одно из самых крупных среди саранчовых, из шести известных триб в нашем анализе это подсемейство было представлено в основном видами трибы Podismini. Молекулярная филогения этого подсемейства изучена достаточно хорошо (Contreras et al., 2006; Chintauan-Marquier et al., 2011; Chintauan-Marquier et al., 2014; Woller et al., 2014). Полученные нами данные хорошо согласуются с существующей классификацией этого подсемейства и с данными по молекулярно-филогенетическому анализу, проведенному другими авторами относительно монофилетичности данного подсемейства.

Филогенетическая группа III

Эта группа самая многочисленная, но в явном виде она присутствует только на полном митохондриальном древе. В ее состав входят виды из девяти подсемейств: Acridinae, Calliptaminae, Catantopinae, Conophyminae, Cyrtacanthacridinae, Euprepocnemidinae, Gomphocerinae, Oedipodinae и Pezotettiginae.

Три из этих подсемейств (Acridinae, Gomphocerinae и Oedipodinae) формируют обособленную подгруппу (A) внутри филогенетической группы III, которая присутствует на всех деревьях, что говорит о филогенетической близости видов этих трех подсемейств. Внутри подгруппы присутствует четыре кластера, каждый из которых должен иметь статус отдельного подсемейства. Недавно проведенный молекулярно-филогенетический анализ представителей Caelifera на основе полных митохондриальных последовательностей показал, что три подсемейства, Acridinae, Gomphocerinae и Oedipodinae, как и в нашем случае, образуют единую филогенетическую группу, содержащую три кластера (Gao et al., 2018; Song et al., 2018). Эти три кластера полностью соответствуют трем из четырех кластеров, обнаруженным в нашей работе. Четвертый кластер в данных работах отсутствует по причине отсутствия тех видов подсемейств Acridinae и Gomphocerinae, которые его образуют.

Первый кластер включает в свой состав представителей трех подсемейств: Oedipodinae, Acridinae и Gomphocerinae. Подавляющее большинство видов в этом кластере принадлежит подсемейству Oedipodinae. Стоит отметить, что, за исключением видов рода *Ceracris*, в других кластерах виды подсемейства Oedipodinae отсутствуют. Подсемейство Oedipodinae насчитывает несколько сотен видов, распространенных на всех континентах, большая часть из которых входит в состав 16 триб. Из 13 исследованных нами триб, пять (Psinidiini, Arphiini, Hippiscini, Trimerotropini и Chortophagini) представляют Североамериканскую фауну, а остальные восемь (Trilophidini, Acrotlyini, Locustini, Oedipodini, Sphingonotini, Bryodemini, Epracromiini и Parapleurini) – фауну Старого Света. Кроме видов подсемейства Oedipodinae, в этом кластере присутствуют представители подсемейств Acridinae и Gomphocerinae. Подсемейство Acridinae представлено видами триб Acridini и Truxalini, а подсемейство Gomphocerinae только одним видом – *Orinhippus tibetanus*. Согласно данным проведенного филогенетического анализа, *Orinhippus tibetanus* не должен быть представителем подсемейства Gomphocerinae. А вот присутствие видов рода *Acrida* близко к видам подсемейства Oedipodinae подтверждается и другими исследованиями (Charco et al., 2011; Gao et al., 2018).

На данный момент наиболее полный молекулярно-филогенетический анализ трех подсемейств, Acridinae, Oedipodinae и Gomphocerinae, был выполнен с использованием последовательностей четырех митохондриальных генов и 16S РНК (Charco et al., 2011). Относительно видов подсемейства Oedipodinae результаты настоящей работы во многом совпадают. Прежде всего, данное подсемейство – монофилетично. У. Чапко и Д. Контрерас выделяют 7 клад внутри подсемейства Oedipodinae и 6 из них полностью соответствуют по видовому составу шести из восьми кладов, обнаруженных в настоящей работе.

Таким образом, ситуация с видами подсемейства Oedipodinae вполне определенная и она не противоречит существующей классификации, равно как и предыдущим результатам молекулярно-филогенетического анализа (Fries et al., 2007; Charco et al., 2011). Исключение составляют только виды рода *Ceracris*, которые были, по всей видимости, ошибочно включены в состав подсемейства Oedipodinae.

Второй кластер содержит в своем составе только виды подсемейства Gomphocerinae, входящие в состав 11 триб: Acrolophitini, Alaucobothrini, Arcypterini, Aulocarini, Chrysochraontini, Dociostaurini, Gomphocerini, Paropomalini, Pacrini,

Ramburielini и Stenobothrini. Большинство видов этого кластера представляет Евроазиатскую фауну и на древе они собраны в одну ветвь. Стоит отметить, что североамериканские и африканские виды формируют отдельные независимые ветви внутри кластера. Аналогичные результаты относительно видов данного кластера были получены другими исследователями на различных молекулярных маркерах (Bugrov et al., 2006; Contreras et al., 2006; Chapco et al., 2011; Nattier et al., 2011; Huang et al., 2013).

Третий кластер представлен большинством исследованных видов подсемейства Acridinae, тремя видами подсемейства Gomphocerinae (*Pnorisa angulata*, *Gonista africa*, *Gonista bicolor*) и тремя видами рода *Ceracris* (Oedipodinae). К сожалению, подсемейство Acridinae изучено молекулярно-генетическими методами относительно плохо. Фактически существует только одно исследование, в котором был проведен анализ видов трех вышеуказанных подсемейств (Chapco et al., 2011), с которым можно сравнивать результаты настоящей работы. У. Чапко с соавторами использовали похожий набор видов подсемейства Acridinae, что и в настоящей работе, однако данными авторами не было выявлено единого кластера подсемейства Acridinae, который появляется в данной работе. Следует отметить, что ареал обитания видов кластера III представлен либо Африкой, либо Юго-Восточной Азией. Основываясь на полученных данных, можно предположить, что данный кластер стоит объединить в новое подсемейство Phlaeobinae, тем более что такое название уже употреблялось ранее для аналогичного состава видов (Uvarov, 1966). Таким образом, представители трибы Ochridini и вид *Pnorisa angulata* (Gomphocerinae), а также виды рода *Ceracris* (Oedipodinae) должны быть отнесены к подсемейству Acridinae. Тем более, что все виды, входящие в этот кластер, имеют общий ареал обитания.

Последний, четвертый, кластер представлен пятью видами родов *Achurum* (Gomphocerinae), *Orphulella* (Gomphocerinae), *Dichromorpha* (Gomphocerinae), *Covasacris* (Acridinae) и *Eutryxalis* (Acridinae). Основываясь на результатах филогенетического анализа можно сделать предположение, что все виды данного кластера должны входить в состав отдельной филогенетической группы в ранге подсемейства. Ареал распространения видов этой группы ограничен американским континентом. Этот кластер полностью соответствует кластеру «Е», объединяющему виды родов *Metaleptea*, *Covasacris*, *Eutryxalis* (подсемейства Acridinae) и родов *Achurum*, *Orphulella*, *Dichromorpha*, *Orphulina*, *Amblytropidia* (подсемейство Gomphocerinae) (Chapco et al., 2011).

Таксономический статус пяти видов подсемейства Gomphocerinae (*Rhammatocerus schistocercoides*, *Rhammatocerus pictus*, *Rhaphotittha levis*, *Thyridota dispar* и *Boopedon nubilum*) в данном анализе установить не удалось. Однако, не один из этих видов не входит в состав ни одного из четырех вышеописанных кластеров. В работе У. Чапко и Д. Контрерас (Chapco et al., 2011) было исследовано большее количество представителей подсемейства Gomphocerinae, которые были разбиты на клады. *Thyridota dispar* и *Rhaphotittha levis* вместе с представителями родов *Amesotropis*, *Stenohippus* (статус трибы не определен) и *Ochridia* (Ochridini), представляющими африканскую фауну, формируют “clade D”, а виды рода *Rhammatocerus* вместе видами родов *Sinipta* (Amblypropiidiini), *Staurorhectus* (Compsacriini), *Parapellopedon*, *Jagomphocerus* (Scillini), формируют “clade F”. Обе эти группы видов могут претендовать на отдельный систематический статус, ранг которого пока установить невозможно.

Пять из шести оставшихся подсемейств филогенетической группы III (Calliptaminae, Conophyminae, Cyrtacanthacridinae, Eupreopcnemidinae и Pezotettiginae) формируют отдельные кластеры, каждый из которых соответствует отдельному подсемейству. Филогенетические взаимоотношения видов внутри подсемейств удалось установить только для подсемейства Cyrtacanthacridinae, поскольку остальные подсемейства представлены лишь небольшим количеством видов. На полном митохондриальном древе, подсемейства Eupreopcnemidinae и Calliptaminae образуют общую ветвь, а на COI\COII\Cytb древе общую ветвь образуют подсемейства Eupreopcnemidinae и Pezotettiginae. В работе У. Чапко (Charco, 2013) при использовании митохондриальных маркеров также было показано, что Eupreopcnemidinae и Pezotettiginae расположены в одной ветви. Поэтому, можно сделать предположение, что три подсемейства, Calliptaminae, Eupreopcnemidinae и Pezotettiginae филогенетически близки друг другу и могут быть объединены в подгруппу В. Тем более, что близость видов подсемейств Calliptaminae и Eupreopcnemidinae подтверждается также и морфологическими данными (Li et al., 2011).

Стоит отдельно отметить положение подсемейства Conophyminae, так как оно представлено видами, имеющими только COI, COII и ITS2 маркеры. Несмотря на то, что топология дерева COI\COII позволяет сделать предположение о принадлежности данного подсемейства к группе III, отсутствие видов Conophyminae на деревьях с тремя и более маркерами не позволяет делать окончательный вывод о положении данного подсемейства относительно других подсемейств.

Подсемейство Catantopinae одно из наиболее сложных в семействе Acrididae. В его состав входят около двух десятков триб и несколько десятков родов, для которых принадлежность к какой-либо трибе не определена. В данном анализе подсемейство Catantopinae представлено трибами Cantotopini (роды *Stenocatantops*, *Diabolocatantops*, *Xenocatantops*) и Traulini на митохондриальных деревьях, и видами трибы Cantotopini (роды *Xenocatantops*, *Phaulacridium* и *Sigauss*), а также родом *Arminda* на ITS2 древе.

На митохондриальных деревьях исследованные виды подсемейства Catantopinae образуют две независимые ветви (Cantotopini и Traulini), а на ITS2 древе – три. Филогенетический анализ видов подсемейства Catantopinae, проведенный другими авторами, совершенно однозначно показывает на то, что виды трибы Traulini и родов *Catantops*, *Stenocatantops*, *Diabolocatantops*, *Xenocatantops* (триба Cantotopini) представляют две независимые группы видов, каждая из которых может иметь систематический ранг на уровне подсемейства (Charco, 2013; Huang et al., 2013; Gao et al., 2018; Song et al., 2018). Австралийские представители трибы Cantotopini формируют независимые от двух вышеуказанных групп видов подсемейства Catantopinae ветви на ITS2 (*Phaulacridium*, *Sigauss*), 18S и 28S (*Rusurplia*, *Porraxia*) (Song et al., 2018) и митохондриальном (*Goniaea*, *Coryphistes*, *Theomolpus*) (Song et al., 2013) деревьях.

На этом филогенетическое разнообразие видов подсемейства Catantopinae не заканчивается. *Toacris yaoshanensis*, *Urnisiella rubropunctata* представляющие трибы Tauchirini и Urnisiellini, соответственно, а также виды родов *Menglacris*, *Meltripata*, *Kinangopa* формируют отдельные ветви на филогенетических деревьях (Huang et al., 2013; Song et al., 2018). Приведенные выше результаты филогенетических анализов говорят о том, что все вышеперечисленные группы видов подсемейства

Catantopinae могут претендовать на отдельный таксономический статус вплоть до ранга подсемейства. Очевидно, что для выяснения филогенетических взаимоотношений видов подсемейства Catantopinae и установления их систематического статуса необходимо провести более расширенное исследование.

Молекулярная филогения семейства Pamphagidae

В базе данных NCBI собрано значительно меньше нуклеотидных последовательности видов семейства Pamphagidae чем последовательностей Acrididae, и соответствие видов по последовательностям можно провести далеко не для всех. Преобладающими маркерами являются COII и COI последовательности, а также ITS2. Согласно Orthoptera Species File (Cigliano et al., 2019), семейство Pamphagidae разделено на пять подсемейств: Akicerinae, Echinotropinae, Pamphaginae, Porthetinae и Thrinchinae. В проведенном анализе на основе митохондриальных и рибосомных маркеров были использованы представители трех подсемейств (Pamphaginae, Porthetinae и Thrinchinae), которые разделились на шесть линий, две из которых выделяются только на ITS2 дереве (линия V и VI), и семь ветвей, соответствующих отдельным видам.

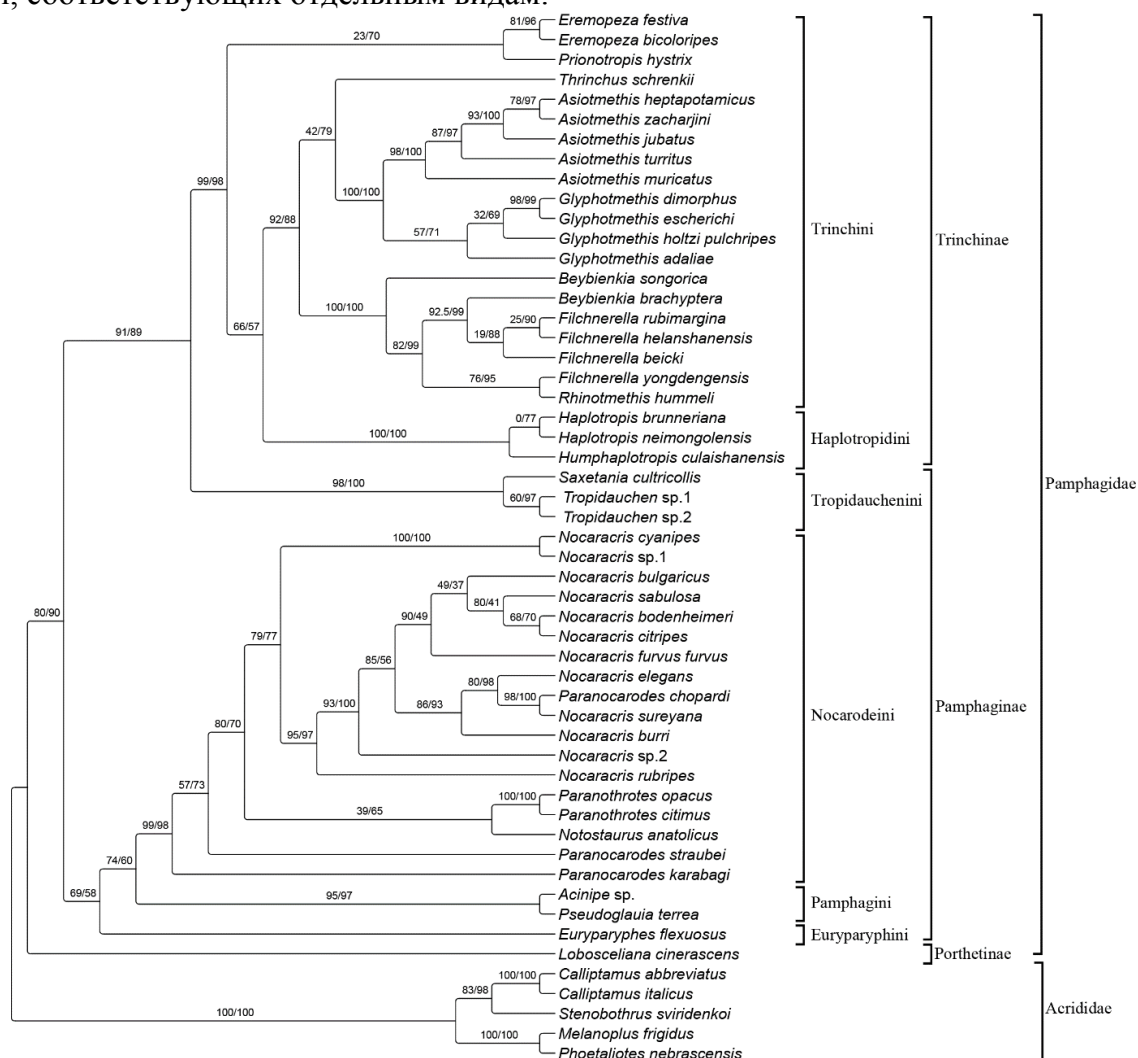


Рисунок 3. Филогенетическое дерево, построенное на основе конкатенированных митохондриальных последовательностей генов COI и COII видов семейства Pamphagidae с помощью методов максимального правдоподобия. Коэффициенты поддержки обозначены как SH-Like aLTR/UfBoot. Скобками обозначены подсемейства.

Линия I: Все виды данной группы входят в состав подсемейства Thrinchinae. Более того, согласно результатам анализа данной работы, подсемейство Thrinchinae монофилетично и разделяется на трибы Thrinchini и Haplotropidini. Однако, два рода трибы Thrinchini (*Eremopeza* и *Prionotropis*) выходят из общей ветви с остальными видами данной трибы. Данный факт говорит о том, что виды данных родов могут принадлежать другой, еще не описанной трибе. Также, результаты подтверждают гипотезу о том, что триба Haplotropidini находится в подсемействе Thrinchinae, а не в подсемействе Pamphaginae (Sukhikh et al., 2019).

Линия II: Данная линия представлена тремя видами трибы Tropidauchenini (Pamphaginae). Близкое положение к представителям другого подсемейства (Thrinchini), с достоверным коэффициентом поддержки, показывает разногласие результатов данной работы с общепринятой систематикой OSF. В работе Д. Чжана, на основании морфологических признаков (Zhang et al., 2003), данный таксон был выделен в ранг подсемейства (Tropidaucheninae). Таким образом, иерархическое положение данного таксона имеет доказательства как на основе молекулярных данных, так и морфологических признаков.

Линия III: Группа линии III представлена исключительно видами трибы Nocarodeini (Pamphaginae). По положению других видов подсемейства Pamphaginae относительно данной трибы можно предположить, что Nocarodeini не является трибой Pamphaginae, а отдельным подсемейством. Результаты исследования морфологических признаков Китайских видов памфагид подтверждают данную гипотезу (Zhang et al., 2003). Однако, так как количество видов других триб подсемейства Pamphaginae на митохондриальном дереве невелико, а разрешающая способность ITS2 дерева не позволяет с уверенностью говорить о разделении подсемейств, то достоверное выделение трибы Nocarodeini в отдельное подсемейство требует дополнительного анализа.

Линия IV: Четвертая линия представлена видами трибы Pamphagini, роды *Acinipe*, *Paracinipe* и *Pseudoglaucia*. Другие виды данной трибы представлены только на ITS2 дереве, и не входят в данную линию. Это можно объяснить низкой разрешающей способностью данного маркера для трибы Pamphagini.

Линия V: Представлена только на ITS2 дереве, и образована двумя видами, *Paraeumigus parvulus* и *Eunapiodes* sp.

Линия VI: Данная линия включает в свой состав виды родов *Acrostira* и *Purpuraria* и выделяется только на ITS2 дереве. Стоит отметить, что данные роды не входят в состав ни одной трибы по классификации OSF.

На основании только ITS2 последовательностей изучить филогенетические взаимоотношения между линиями V и VI, а также отдельных видов, не представляется возможным, особенно учитывая относительно небольшой размер маркера (~340 п.н.). Для установления их ранга и эволюционных взаимоотношений необходимо изучить более консервативные нуклеотидные последовательности данных видов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенный филогенетический анализ и привлеченные данные других исследований позволили сделать следующие выводы и предположения относительно филогении и систематики видов семейства Acrididae, которые также проиллюстрированы на Рисунке 2:

1. Виды из 13 исследованных подсемейств семейства Acrididae представляют собой монофилетичную группу.

2. 12 исследованных подсемейств входят в состав трех филогенетических групп:

- a) Оxyinae, Hemiacridinae и Spathosterninae;
- b) Melanoplinae;
- c) Acridinae, Calliptaminae, Catantopinae, Cyrtacanthacridinae, Eupreoscnemidinae, Gomphocerinae, Oedipodinae, Pezotettiginae;

3. Внутри филогенетической группы III очевидно выделяется подгруппа А, объединяющая три подсемейства: Acridinae, Gomphocerinae, Oedipodinae.

4. Внутри филогенетической группы III предположительно выделяется подгруппа В, объединяющая три подсемейства: Calliptaminae, Eupreoscnemidinae и Pezotettiginae.

5. Внутри подгруппы А расположены пять очевидных кластеров, каждый из которых может соответствовать отдельному подсемейству:

- a) Oedipodinae;
- b) Acridinae, трибы Acridini и Truxalini;
- c) Gomphocerinae (распространённые на территории Евразии и Северной Америки);
- d) Acridinae, включая род *Ceracris* (Oedipodinae) и роды *Gonista* и *Pnorisa* (Gomphocerinae). Ареал обитания всех видов этого кластера – Африка и Юго-Восточная Азия;

е) Acridinae и Gomphocerinae, распространённые в Америке. Роды *Metaleptea*, *Covasacris*, *Eutryxalis* (подсемейство Acridinae) и роды *Achurum*, *Orphulella*, *Dichromorpha*, *Orphulina*, *Amblytropidia* (подсемейство Gomphocerinae);

6. Внутри подгруппы А расположены два предположительных кластера:

- g) Виды подсемейства Gomphocerinae (Африка): роды *Thyridota*, *Rhaphotittha*, *Amesotropis*, *Stenhippus* и *Ochrilidia*;
- h) Виды подсемейства Gomphocerinae (Южная Америка): роды *Rhammatocerus*, *Sinipta*, *Staurorhectus*, *Parapellopedon*, *Jagomphocerus*;

7. Все исследованные виды подсемейства Catantopinae входят в состав филогенетической группы III и образуют в ней, как минимум, четыре независимых ветви (и возможная пятая ветвь, представленная в работе У. Чапко видом *Kinangora* sp), взаимоотношения между которыми и с представителями других подсемейств на данный момент достоверно установить невозможно.

В результате филогенетического анализа видов семейства Pamphagidae были сделаны следующие выводы и предположения:

- 1. Семейство Pamphagidae монофилетично.
- 2. Триба Thrinchini (Thrinchinae) не монофилетична. Роды *Eremopeza* и *Prionotropis* располагаются не в одной ветви с остальными представителями трибы.
- 3. Триба Naplotropidini входит в состав семейства Thrinchinae, а не Pamphaginae.

4. Подсемейство Pamphaginae не монофилетично. Как минимум одна триба (Tropidauchenini) не входит в состав подсемейства и может иметь статус отдельного подсемейства.

5. Триба Nocarodeini может иметь статус отдельного подсемейства.

В результате филогенетического анализа конкатенированных нуклеотидных последовательностей генов COI и COII видов семейства Acrididae было установлено, что данный набор молекулярных маркеров не подходит для изучения взаимоотношений между таксонами ранга выше рода видов семейства Acrididae, так как обладает низким разрешением. В то же время, филогенетический анализ конкатенированных нуклеотидных последовательностей генов COI и COII видов семейства Pamphagidae продемонстрировал достоверное разделение подсемейств. Данный факт говорит о том, что использованные в настоящей работе виды семейства Pamphagidae исторически образовали единую ветвь позже, чем виды семейства Acrididae. Это подтверждается работой Х. Сонга с соавторами (Song et al., 2015), по результатам которой виды семейства Pamphagidae образовали группу примерно 40 миллионов лет назад, а Acrididae 73. Таким образом, можно предположить, что набор молекулярных маркеров COI и COII позволяет разрешить филогенетические взаимоотношения между видами, общий предок которых образовался приблизительно от 40 миллионов лет назад и позднее.

ВЫВОДЫ

1. Установлено, что конкатенированные нуклеотидные последовательности митохондриальных генов COI, COII и CytB могут с успехом использоваться для разрешения филогенетических взаимоотношений между подсемействами семейства Acrididae.

2. В результате проведенного филогенетического анализа выявлены три основные группы видов 12 подсемейств семейства Acrididae: I (Oxyinae, Hemi-acridinae и Spathosterninae), II (Melanoplinae), III (Acridinae, Calliptaminae, Catantopinae, Cyrtacanthacridinae, Eupreopocnemidinae, Gomphocerinae, Oedipodinae, Pezotettiginae).

3. Показано, что виды подсемейств Acridinae, Gomphocerinae и Oedipodinae объединяются единую подгруппу в группе III, и образуют внутри данной подгруппы пять независимых таксономических групп на уровне отдельных подсемейств.

4. Достоверно установлено, что виды трех подсемейств (Pamphaginae, Thrinchinae и Porthetinae) семейства Pamphagidae, ранее имеющего спорное таксономическое положение, образуют единую монофилетичную группу.

5. Впервые был проведен комплексный филогенетический анализ видов семейства Pamphagidae и установлено, что трибы Nocarodeini и Tropidauchenini могут иметь статус отдельных подсемейств, а триба Haplotropidini, ранее считавшаяся частью подсемейства Pamphaginae, входит в состав подсемейства Thrinchinae.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. **Sukhikh I.**, Ustyantsev K., Bugrov A., Sergeev M., Fet V., Blinov A. The Evaluation of Genetic Relationships within Acridid Grasshoppers (Orthoptera, Caelifera, Acrididae) on the Subfamily Level Using Molecular Markers. // *Folia Biologica (Kraków)*. 2019. T. 67. No 3.
2. **Sukhikh I.**, Blinov A., Bugrov A. Molecular phylogenetic analysis of subfamilial placement of *Haplotropis Saussure*, 1888 (Orthoptera: Pamphagidae) based on mitochondrial and nuclear DNA markers // *Zootaxa*. 2019. T. 4551. № 5. С. 530–540.
3. Bugrov A., **Sukhikh I.**, Blinov A. Phylogenetic relationships of the Pamphagidae grasshoppers with the neo-XY/neo-XX of sex determination based on the analysis of DNA sequences in COI mitochondrial gene // *Euroasian Entomol. J.* 2015. № December.
4. **Sukhikh I.**, Ustyantsev K., Bugrov A., Sergeev M., Vavilova V., Blinov A. Revision of phylogenetic relationships between several Acrididae subfamilies // *Systems Biology and Bioinformatics, The Eleventh International young Scientists School (SBB-2019); Abstracts, Novosibirsk, Russia. 24–28 June 2019. P.46*
5. **Sukhikh I.**, Ustyantsev K., Bugrov A., Sergeev M., Vavilova V., Blinov A. Establishing the molecular phylogeny of Acrididae grasshoppers (Orthoptera, Caelifera) // *13th International Congress of Orthopterology; Agadir, Morocco 24-28 march 2019. Abstract book, 2019. P. 202.*
6. Vavilova V., **Sukhikh I.**, Blinov A, Bugrov A. Molecular phylogeny of the Pamphagidae family (Orthoptera, Caelifera) // *13th International Congress of Orthopterology; Agadir, Morocco 24-28 March 2019. Abstract book, 2019. P. 134.*
7. **Sukhikh I.**, Ustyantsev K., Vavilova V., Blinov A. Revised molecular phylogeny of Acrididae family // *Biodiversity: Genomics and Evolution (BioGenEvo-2018) : Symposium (21–24 Aug. 2018, Novosibirsk, Russia); Abstracts, 2018, 45-45.*
8. Vavilova V., **Sukhikh I.**, Ustyantsev K., Blinov A. Acrididae family: establishing of phylogenetic relationships based on mitochondrial and nuclear DNA markers // *Systems Biology and Bioinformatics: The Ninth International Young Scientists School SBB-2017 (Yalta, Republic of the Crimea, Russia 25–30 June, 2017); Abstracts – Novosibirsk : ICG SB RAS, 2017. p. 75*
9. **И.С. Сухих**, А.Г. Блинов, А.Г. Бугров. Молекулярная филогения саранчовых семейства Acrididae (Orthoptera: Acridoidea) // *XV Съезд Русского энтомологического сообщества; Россия, Новосибирск, 31 июля – 7 августа 2017 г., Материалы съезда. С. 471.*
10. **I.S. Sukhikh**, A.G. Blinov, A.G. Bugrov. Molecular phylogenetic analysis of the grasshoppers of family Acrididae based on several mitochondrial and nuclear markers // *The Tenth International Conference on Bioinformatics of Genome Regulation and Structure\Systems Biology. Abstracts – Novosibirsk : ICG SB RAS, 2016. p. 303.*