

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
Государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования
«Новосибирский государственный университет»

УДК 574/577

№ госрегистрации 01200905444

Инв. № 2611/13-07

УТВЕРЖДАЮ
Ректор
д.х.н., профессор В. А. Собянин

(подпись)

“ ____ ” августа 2011 г.

М.П.

ОТЧЕТ

О НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЙ РАБОТЕ

В рамках федеральной целевой программы «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009-2013 годы

Проведение научных исследований коллективами научно-образовательных центров в области общей биологии и генетики

по теме:

**ГЕНОМНЫЕ И ХРОМОСОМНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ВОЗНИКНОВЕНИЯ И ПОДДЕРЖАНИЯ
БИОЛОГИЧЕСКОГО РАЗНООБРАЗИЯ**

(Государственный контракт № 02.740.11.0277)

(заключительный, этап № 6)

Наименование этапа: «Оценка роли и возможной интеграции геномных и хромосомных механизмов возникновения и поддержания биоразнообразия в биотах и биоценозах»

Проректор по научной
работе, д.б.н., проф., член-корр. РАН

С. В. Нетёсов
подпись, дата

Руководитель проекта
д.б.н., проф., академик

В. К. Шумный
подпись, дата

Новосибирск 2011

СПИСОК ИСПОЛНИТЕЛЕЙ

| | | |
|--|---|--|
| <p>Научный руководитель, д.б.н., проф., академик</p> | <hr style="width: 100%;"/> <p>подпись, дата</p> | <p><i>Шумный В. К.</i> (разделы 1, 6, 7, введение, заключение)</p> |
| Исполнители | | |
| <p>зав. каф. общей биологии и экологии, д.б.н., проф.</p> | <hr style="width: 100%;"/> <p>подпись, дата</p> | <p><i>Сергеев М. Г.</i> (разделы 5–7, введение, заключение)</p> |
| <p>профессор каф. общей биологии и экологии, д.б.н., доц.</p> | <hr style="width: 100%;"/> <p>подпись, дата</p> | <p><i>Бугров А. Г.</i> (разделы 3, 5–7)</p> |
| <p>зам. зав. каф. цитологии и генетики, д.б.н., проф.</p> | <hr style="width: 100%;"/> <p>подпись, дата</p> | <p><i>Высоцкая Л. В.</i> (разделы 6, 7)</p> |
| <p>доцент кафедры общей биологии и экологии, к.б.н., доц.</p> | <hr style="width: 100%;"/> <p>подпись, дата</p> | <p><i>Пишеницына Л.Б.</i> (разделы 5, 7)</p> |
| <p>доцент кафедры цитологии и генетики, к.б.н.</p> | <hr style="width: 100%;"/> <p>подпись, дата</p> | <p><i>Гусаченко А.М.</i> (раздел 6)</p> |
| <p>старший преподаватель кафедры цитологии и генетики, к.б.н.</p> | <hr style="width: 100%;"/> <p>подпись, дата</p> | <p><i>Корниенко О.С.</i> (раздел 6)</p> |
| <p>старший преподаватель кафедры общей биологии и экологии</p> | <hr style="width: 100%;"/> <p>подпись, дата</p> | <p><i>Молодцов В. В.</i> (разделы 5–7)</p> |
| <p>ассистент кафедры общей биологии и экологии, к.б.н.</p> | <hr style="width: 100%;"/> <p>подпись, дата</p> | <p><i>Бывальцев А. М.</i> (разделы 5 6)</p> |
| <p>старший преподаватель кафедры общей биологии и экологии, к.б.н.</p> | <hr style="width: 100%;"/> <p>подпись, дата</p> | <p><i>Дзюбенко В. В.</i> (разделы 3, 7)</p> |
| <p>научный сотрудник отдела химии и биологии, к.б.н.</p> | <hr style="width: 100%;"/> <p>подпись, дата</p> | <p><i>Данилов Ю.Н.</i> (раздел 6)</p> |
| <p>инженер кафедры цитологии и генетики</p> | <hr style="width: 100%;"/> <p>подпись, дата</p> | <p><i>Брошков А.Д.</i> (раздел 6)</p> |
| <p>инженер кафедры общей биологии и экологии</p> | <hr style="width: 100%;"/> <p>подпись, дата</p> | <p><i>Молодцова Е.А.</i> (раздел 5)</p> |
| <p>инженер Отдела химии и биологии НИЧ, к.б.н.</p> | <hr style="width: 100%;"/> <p>подпись, дата</p> | <p><i>Головнина К.С.</i> (раздел 3)</p> |
| <p>аспирант</p> | <hr style="width: 100%;"/> <p>подпись, дата</p> | <p><i>Джетыбаев И.Е.</i> (раздел 3)</p> |
| <p>ст. лаборант отдела химии и биологии</p> | <hr style="width: 100%;"/> <p>подпись, дата</p> | <p><i>Батурина Н. С.</i> (разделы 5–7)</p> |
| <p>ст. лаборант отдела химии и биологии</p> | <hr style="width: 100%;"/> <p>подпись, дата</p> | <p><i>Сурадейкина М.А.</i> (раздел 5)</p> |
| <p>инженер отдела химии и биологии</p> | <hr style="width: 100%;"/> <p>подпись, дата</p> | <p><i>Пашин В.Н.</i> (раздел 5)</p> |
| <p>Нормоконтролер</p> | <hr style="width: 100%;"/> <p>подпись, дата</p> | <p><i>Кашиникова Л.И</i></p> |

Соисполнители:

зав. лаб., к.б.н.

подпись, дата

Кочетов А.В.
(разделы 1, 6, 7,
введение, заключение)

Институт цитологии и
генетики СО РАН
Ибрагимова С.С.

с.н.с., к.б.н.

подпись, дата

(раздел 1)
Институт цитологии и
генетики СО РАН

Волкова О.А.

м.н.с.

подпись, дата

(раздел 1)
Институт цитологии и
генетики СО РАН

Сангаев С.С.

м.н.с., к.б.н.

подпись, дата

(раздел 1)
Институт цитологии и
генетики СО РАН

Горелова В.В.

аспирант

подпись, дата

(раздел 1)
Институт цитологии и
генетики СО РАН

Першина Л.А.

д.б.н.

подпись, дата

(раздел 2, введение,
заключение)

Институт цитологии и
генетики СО РАН

Кравцова Л.А.

с.н.с., к.б.н.

подпись, дата

(раздел 2)
Институт цитологии и
генетики СО РАН

Трубачеева Н.В.

с.н.с., к.б.н.

подпись, дата

(раздел 2)
Институт цитологии и
генетики СО РАН

Осадчая Т.С.

м.н.с.

подпись, дата

(раздел 2)
Институт цитологии и
генетики СО РАН

Девяткина Э.П.

м.н.с.

подпись, дата

(раздел 2)
Институт цитологии и
генетики СО РАН

Бородин П.М.

д.б.н.

подпись, дата

(раздел 4, 6, 7
введение, заключение)

Институт цитологии и
генетики СО РАН

Башева Е.А.

аспирант

подпись, дата

(раздел 4)
Институт цитологии и
генетики СО РАН

| | | |
|---------------------|---------------|---|
| <i>аспирант</i> | _____ | <i>Торгашева А.А.</i> (раздел 4) Институт цитологии и генетики СО РАН |
| | подпись, дата | |
| <i>студент</i> | _____ | <i>Сакаева Г.Р.</i> (раздел 4) Институт цитологии и генетики СО РАН |
| | подпись, дата | |
| <i>студент</i> | _____ | <i>Дашкевич О.А.</i> (раздел 4) Институт цитологии и генетики СО РАН |
| | подпись, дата | |
| <i>д.б.н.</i> | _____ | <i>Аксенович Т.И.</i> (раздел 7) Институт цитологии и генетики СО РАН |
| | подпись, дата | |
| <i>н.с., к.б.н.</i> | _____ | <i>Аульченко Ю.С.</i> (раздел 7) Институт цитологии и генетики СО РАН |
| | подпись, дата | |
| <i>н.с., к.б.н.</i> | _____ | <i>Белоногова Н.М.</i> (раздел 7) Институт цитологии и генетики СО РАН |
| | подпись, дата | |

РЕФЕРАТ

Отчет 69 с., 7 рис., 4 табл., 73 источника.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: ГЕНОМ, ХРОМОСОМА, БИОРАЗНООБРАЗИЕ, ПОЛИМОРФИЗМ, СИГНАЛЫ ЭКСПРЕССИИ, ПОПУЛЯЦИЯ, КРОССИНГОВЕР, МЕЙОЗ, ФИЛОГЕНИЯ, ПШЕНИЦА, ЯЧМЕНЬ, ФЕРТИЛЬНОСТЬ, ПОЛЕВКА, САРАНЧОВОЕ, ГЕНЕТИЧЕСКАЯ КАРТА

Цель проекта — установление ключевых геномных и хромосомных механизмов возникновения биологического разнообразия популяций и видов животных и растений и факторов поддержания этого разнообразия в широком спектре экологических условий их обитания на основе интеграции общебиологических, эколого-географических и генетических данных. В качестве основных модельных объектов использованы триба пшеничные, надсемейство саранчовые и подсемейство полевковые. Для решения задач 6-го этапа использовалась совокупность современных и классических подходов, ориентированных на установление закономерностей организации биологического разнообразия. Установлено, что в мРНК генов животных альтернативные сайты инициации трансляции встречаются значительно чаще, чем у растений. Показано, что при полиплоидизации ядерного генома ячменно-пшеничных гибридов *H. marinum* subsp. *gussoneanum* x *T. aestivum* и последующей редукции числа хромосом у беккроссных потомков состояние гетероплазмии последовательности 18S/5S митохондриального повтора сохраняется. Разработана оригинальная филогенетическая система короткоусых прямокрылых насекомых. Показано, что у полевок наиболее надежным детерминантом уровня рекомбинации является число аутосом. Подтверждена четко выраженная пространственная гетерогенность разных регионов (особенно горных) по характеру биоразнообразия. Сформулирована гипотеза о том, что в одних условиях геномно-хромосомные механизмы существенны, а их вклад в поддержание разнообразия весом, тогда как в иных — они проявляют себя незначительно, а ведущими являются эколого-географические различия и(или) фенотипическая изменчивость. Подведены общие итоги реализации проекта. Разработана программа внедрения результатов НИР в образовательный процесс на кафедрах цитологии и генетики и общей биологии и экологии НГУ. Полученные результаты используются в учебном процессе (лекции по экологии, зоологии беспозвоночных, энтомологии, эволюционной теории, цитологии, практических занятиях и летних полевых практиках).

СОДЕРЖАНИЕ

| | |
|--|----|
| ВВЕДЕНИЕ..... | 7 |
| ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ | 13 |
| 1 Сравнительный анализ вклада альтернативной трансляции в кодирующий потенциал геномов растений и животных. Оценка вклада этого механизма в кодирование биологической сложности эукариотических организмов | 16 |
| 2 Анализ изменчивости ядерных и митохондриальных геномов у беккроссных потомков ячменно-пшеничных амфиплоидов | 21 |
| 3 Оценка перспектив использования молекулярных маркёров в решении общих и частных проблем систематики и филогении прямокрылых насекомых..... | 23 |
| 4 Сравнительный анализ частоты и распределения сайтов рекомбинации по хромосомам 8 видов млекопитающих, оценка относительной роли числа хромосом и хромосомных плеч, размера синаптонемного комплекса и силы кроссоверной интерференции в определении межвидовых и межпопуляционных различий в общем уровне рекомбинации | 34 |
| 5 Натурная верификация результатов, полученных на предыдущих этапах на модельных полигонах в равнинных и горных регионах..... | 37 |
| 6 Оценка роли и возможной интеграции геномных и хромосомных механизмов возникновения и поддержания биоразнообразия в биотах и биоценозах | 39 |
| ЗАКЛЮЧЕНИЕ..... | 50 |
| СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ..... | 64 |

ВВЕДЕНИЕ

Общая картина видовой разнообразия живых организмов, заселяющих Землю в современную эпоху, до сих пор плохо известна. Описано их около 2 млн, но, по разным оценкам, их реальное число может быть во много раз больше — от 10 до 100 млн. Такое несоответствие описанных и реально существующих таксонов в значительной степени определяется несовершенством подходов, используемых для дифференциации видов, а также слабой изученностью части экосистемных блоков. Кроме того, среди исследователей нет полного согласия в том, что представляют собой виды, особенно в группах без полового размножения. Подавляющее число неописанных форм принадлежит к мелким и очень мелким существам — одноклеточным (в том числе бактериям), круглым червям, членистоногим. Дополнительные сложности связаны с невозможностью во многих случаях выявления морфологических различий между близкими видами. Еще более загадочной выглядит картина распределения живых существ во времени и пространстве, особенно если учитывать специфику темпоральных характеристик таксонов и трехмерность пространства.

Фактически, несмотря на определенную традиционность исследований, процесс познания закономерностей распределения, организации и эволюции биоразнообразия только разворачивается, что подтверждается выполненным в последние несколько лет исследованиями бактериальных сообществ [1, 2]. Если же принять во внимание, что биоразнообразие исследуется и на других уровнях организации живой материи [3], таких как молекулярно-генетический, популяционный, экосистемный, и что его характер непрерывно меняется в пространстве и времени, то становится очевидной невозможность даже простого его описания с помощью традиционных подходов. В последние несколько лет развернуты программы, связанные с различением известных таксонов по сопоставимым фрагментам последовательностей нуклеотидов — так называемый *barcoding* [4], но реально речь, во-первых, идет лишь о сравнительно немногих таксонах, во-вторых, необходимы дополнительные оценки вариабельности данных участков, а в-третьих, сопоставление разных участков ДНК (особенно ядерной, митохондриальной и пластидной) часто демонстрирует слишком разные картины.

Очевидна актуальность поддержания и сохранения уровня биоразнообразия (в том числе и для России), особенно с учетом прогнозируемого в середине XXI в. резкого сокращения его уровня [5–7]. Решение этих проблем необходимо не только для достижения целей устойчивого развития (как в региональном, так и в глобальном масштабах), но и для оценки перспектив использования разных групп живых существ [7]. К сожалению,

значительная часть задач 2000–2010 г., поставленных Международной конвенцией по биоразнообразию, оказалась нерешенной [7]. Вместе с тем 10-я Международная конференция участников Конвенции определила новые задачи на период с 2010 до 2020 г. [7].

Особенно существенно, что поддержание биологического разнообразия на всех уровнях организации живой материи — от молекулярно-генетического до экосистемного — крайне важно и для сохранения эволюционного потенциала. Проблема биоразнообразия неотделима и от решения экологических проблем, в первую очередь таких, как поддержание свойств саморегуляции и самовоспроизведения в природных и трансформированных системах, экологический мониторинг и разработка природоохранных мероприятий [7]. Мировой опыт показывает и высокую возможную экономическую отдачу от исследований в области биоразнообразия.

На основе разнообразия по морфологическим, физиологическим, биохимическим и другим признакам под действием естественного отбора формируются поразительно сложные и многообразные адаптации к широкому спектру эколого-географических условий. Комплексное и интегрированное исследование ключевых механизмов возникновения генетической изменчивости на геномном (точковые мутации, делеции, дупликации и транспозиции коротких фрагментов ядерной, митохондриальной и пластидной ДНК) и хромосомном (хромосомные перестройки, гомологичная рекомбинация крупных хромосомных блоков, алло- и автополиплоидия), анализ фенотипического проявления этой изменчивости, экологических и генетических механизмов ее поддержания в пределах ареалов разных видов представляется принципиально важным для решения фундаментальных проблем эволюционной биологии и практических проблем рационального природопользования, селекции хозяйственно важных видов животных и растений, медицинской генетики. Принципиально важным и почти не разработанным является вопрос о факторах и особенно механизмах, в том числе геномных и хромосомных, определяющих интеграцию видов в разноранговые сообщества, формирующие облик экологических систем и обеспечивающие их устойчивость и самовоспроизведение.

Решение этих проблем необходимо для развития признанных правительством Российской Федерации приоритетных направлений «Живые системы» и «Рациональное природопользование», а также для ряда критических технологий в рамках этих направлений.

Вовлечение студентов и аспирантов Национального исследовательского Новосибирского государственного университета в исследования в рамках данного проекта, развитие Научно-образовательного центра «Экология и биоразнообразие», использование полученных результатов в преподавании общебиологических дисциплин, таких как зоология, ботаника, биология клетки, генетика, экология, эволюционное учение, сыграет важную роль в

формировании у студентов целостного представления о механизмах возникновения и поддержания биологического разнообразия в контексте разнообразия экологических условий во времени (в ходе эволюции) и в пространстве в широких пределах видовых ареалов и природных регионов.

Все сказанное выше определяет цель настоящего проекта — установление ключевых геномных и хромосомных механизмов возникновения биологического разнообразия популяций и видов животных и растений и факторов поддержания этого разнообразия в широком спектре экологических условий их обитания на основе интеграции общебиологических, эколого-географических и генетических данных — и набор решаемых для ее достижения задач.

Для достижения поставленной цели были определены следующие задачи, которые решались на протяжении 2009–2011 гг. и которые были сгруппированы в шесть последовательных этапов:

Этап 1. Выделение модельных таксонов и изучение характера полиморфизма молекулярно-генетических признаков:

1.1. Создание репрезентативных выборок нуклеотидных последовательностей генов растений и животных.

1.2. Анализ влияния хромосомы дикорастущего ячменя *H. maritimum* subsp. *gussoneanum* 7Hmar и ее длинного плеча 7LHmar на проявление ряда фенотипических и хозяйственно-ценных признаков у замещенных и дополненных линий мягкой пшеницы при наличии у этих линий цитоплазмы мягкой пшеницы или дикорастущего ячменя.

1.3. Молекулярно-цитогенетическое картирование функционально значимых кластеров рибосомальной ДНК (18S) и теломерного пентамера (TTAGG)_n в аутосомах и половых хромосомах саранчовых, различающихся числом и морфологией хромосом в кариотипе.

1.4. Исследование природы полиморфизма по хромосомным перестройкам у представителей природных популяции муйской полевки.

1.5. Исследование природы полиморфизма по хромосомным перестройкам у представителей природных популяции плавучей, сибирской и сапорской кобылок.

1.6. Выделение модельных таксонов и анализ их видового и подвидового состава.

1.7. Сбор необходимых для реализации проекта полевых данных.

Этап 2. Сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей и гомологичных районов хромосом:

2.1. Сравнительный анализ структурно-функциональной организации нуклеотидных последовательностей функциональных районов мРНК генов растений и животных.

2.2. Изучение взаимосвязи между проявлением фертильности и жизнеспособности растений, присутствием хромосом ячменя в ядерном геноме аллоплазматических и эуплазматических линий гексаплоидной пшеницы и наличием определенных последовательностей митохондриальной ДНК ячменного или пшеничного типов.

2.3. Выявление районов гомологии хромосом у разных видов саранчовых методом FISH кроссгибридизации ДНК проб, полученных микродиссекцией метафазных хромосом из одних видов с хромосомами других видов.

2.4. Оценка общей частоты мейотической рекомбинации у серебристо-черных лисиц, селекционируемых по поведению, а также у модельных видов саранчовых.

2.5. Анализ ареалов видов и подвидов модельных групп животных и растений.

Этап 3. Изучение особенностей рекомбинации хромосом в модельных таксонах.

Выявление очагов разнообразия:

3.1. Исследование роли вторичной структуры РНК в функционировании сигнала инициации трансляции генов растений и животных.

3.2. Изучение распространенности пшенично-ржаных транслокаций у сибирских сортов мягкой пшеницы и создаваемых новых адаптивных форм на основе стабильных по фертильности аллоплазматических линий пшеницы.

3.3. Установление нуклеотидных последовательностей ДНК, соответствующих лабильным участкам генов для решения проблемы островного видообразования в популяциях саппорской кобылки.

3.4. Анализ спаривания и рекомбинации хромосом у мышей гетерозиготных по парацентрической инверсии.

3.5. Анализ спаривания и рекомбинации хромосом у саранчовых гетерозиготных по парацентрической инверсии.

3.6. Анализ распределение длин LD блоков в различных генах человека.

3.7. Выявление областей повышенного разнообразия и центров эндемизма для модельных таксонов.

3.8. Сбор необходимых для реализации проекта полевых данных.

Этап 4. Исследование организации нуклеотидных последовательностей у модельных таксонов (стартовые кодоны трансляции и лабильные участки):

4.1. Предсказание альтернативных стартовых кодонов трансляции в нуклеотидных последовательностях генов растений и животных.

4.2. Исследование характера реорганизации ядерных и митохондриальных геномов у реципрокных пшенично-ржаных гибридов и их беккроссных потомков.

4.3. Установление нуклеотидных последовательностей ДНК, соответствующих лабильным участкам генов, для решения проблемы островного видообразования в популяциях модельных видов саранчовых, обитающих на Сахалине, Курильских островах, Хоккайдо, Хонсю и архипелага Рюкю.

4.4. Изучение рекомбинации в сверхчисленных хромосомах серебристо-черных лисиц; оценка влияния изменчивости по числу сверхчисленных хромосом на уровень рекомбинации в хромосомах основного набора.

4.5. Изучение рекомбинации в сверхчисленных хромосомах сибирской и плавучей кобылок; оценка влияния изменчивости по числу сверхчисленных хромосом на уровень рекомбинации в хромосомах основного набора.

4.6. Анализ эколого-географических факторов, определяющих распределение областей повышенного разнообразия.

Этап 5. Анализ характера изменчивости геномных и хромосомных признаков на внутри- и межпопуляционном уровнях:

5.1. Создание выборок аминокислотных последовательностей новых форм белков, которые кодируются альтернативными открытыми рамками считывания в мРНК генов растений и животных. Предсказание их функции.

5.2. Изучение особенностей ядерно-цитоплазматических взаимодействий при изменчивости геномов у самоопыленных потомков ячменно-пшеничных амфиплоидов.

5.3. Составление консенсусного эволюционно-филогенетического сценария (филогенетического древа), отражающего актуальную связь анцестральных и производных видов и надвидовых таксонов в отряде Orthoptera на основе синтеза частных семофилезов, полученных в результате применения различных молекулярных маркеров.

5.4. Оценка общей частоты мейотической рекомбинации у 4 близкородственных видов полевок.

5.5. Анализ разрешающей способности различных методов картирования генов, находящихся в регионах с различной интенсивностью рекомбинационного процесса.

5.6. Анализ характера изменчивости исследованных геномных и хромосомных признаков в районах высокого многообразия и за их пределами.

Этап 6. Оценка роли и возможной интеграции геномных и хромосомных механизмов возникновения и поддержания биоразнообразия в биотах и биоценозах:

6.1. Сравнительный анализ вклада альтернативной трансляции в кодирующий потенциал геномов растений и животных. Оценка вклада этого механизма в кодирование биологической сложности эукариотических организмов.

6.2. Анализ изменчивости ядерных и митохондриальных геномов у беккроссных потомков ячменно-пшеничных амфиплоидов.

6.3. Оценка перспектив использования молекулярных маркёров в решении общих и частных проблем систематики и филогении прямокрылых насекомых.

6.4. Сравнительный анализ частоты и распределения сайтов рекомбинации по хромосомам 8 видов млекопитающих, оценка относительной роли числа хромосом и хромосомных плеч, размера синаптонемного комплекса и силы кроссоверной интерференции в определении межвидовых и межпопуляционных различий в общем уровне рекомбинации.

6.5. Натурная верификация результатов, полученных на предыдущих этапах на модельных полигонах в равнинных и горных регионах.

6.6. Оценка роли и возможной интеграции геномных и хромосомных механизмов возникновения и поддержания биоразнообразия в биотах и биоценозах.

6.7. Разработка программы внедрения результатов НИР в образовательный процесс.

ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

Биологическое разнообразие — одно из фундаментальных понятий современной биологии, экологии и биогеографии, а также охраны природы. Оно не только описывает набор и богатство форм (а также их соотношения), но и принадлежит к синтетическим категориям, определяющим цели комплексных исследований в биогеографии, экологии и эволюционной теории [3]. Конвенция по биологическому разнообразию определяет биологическое разнообразие как «вариабельность живых существ из всех сред, включая, среди прочих, наземные, морские и другие водные экосистемы, и экологических комплексов, которые они составляют» [8].

Роль биологического разнообразия в поддержании устойчивости экосистем до сих пор не вполне понятна [9]. Очевидно, что обычными следствиями сокращения биоразнообразия являются (1) уменьшение продукции растительного покрова, (2) падение устойчивости экосистем к природным пертурбациям (таким как засухи) и (3) увеличение изменчивости экосистемных процессов (например продуктивности) [10]. В ряде работ показано, что продуктивность экосистем зависит не только от уровня разнообразия, но и от состава видов на разных трофических уровнях [11 и др.]. Очевидно, что исчезновение одного вида из экосистемы может привести к элиминации связанных с ним видов, особенно если связи жесткие [12]. Высказана идея, что биоразнообразие может выступать в роли своеобразной страховки устойчивости экосистемы [13], например, благодаря присутствию в ней близких видов, представляющих одну жизненную форму, но различающихся по толерантности к разным экологическим факторам, популяционной структуре и т. п.

Очевидно наличие нескольких принципиальных проблем, решение которых может быть найдено только на основе интеграции классических и современных подходов:

I. Взаимосвязь между числом генов в геноме и биологической сложностью эукариотических организмов. Сопоставление расшифрованных к настоящему времени нуклеотидных последовательностей геномов ряда видов эукариот показывает, что число генов не коррелирует с биологической сложностью: например, в геномах человека и арабидопсиса (растение семейства крестоцветных) содержится около 23 тысяч генов, а в геноме небольшого рачка — дафнии — свыше 30 тысяч. Этот феномен представляет собой одну из загадок современной молекулярной генетики. Считается, что одним из возможных механизмов, расширяющих кодирующий потенциал геномов высших организмов, является возможность кодирования одним геном нескольких мРНК. Это направление (альтернативная транскрипция)

в настоящее время находится в центре внимания многих исследователей. Недавно стало известно, что в эукариотических клетках существует возможность синтеза нескольких белков с одной мРНК. В настоящее время вклад альтернативной трансляции в кодирующий потенциал геномов растений практически не изучен.

II. Роль гибридизации в формировании биоразнообразия. Известно, что отдаленная гибридизация лежит в основе одного из типов симпатрического видообразования, широко распространенного у покрытосеменных растений, а также известного для ряда групп животных. Кроме того, скрещивания между растениями, принадлежащими к разным таксонам, способствуют поддержанию генетического разнообразия природных популяций за счет интрогрессии генов между видами. Принципы экспериментального создания интрогрессивных форм используются для реализации задач хромосомной инженерии – направления биотехнологии, ориентированного на создание новых адаптивных и продуктивных генотипов для селекции за счет переноса отдельных хромосом или их сегментов в геном культурных растений. В связи с этим большое значение имеет выявление механизмов, контролируемых различные этапы развития гибридных организмов, способных к восстановлению фертильности и несущих новые признаки. Изучение гибридных зон свидетельствует об интенсивно протекающих процессах гибридизации и образования интрогрессивных форм среди разных таксономических групп. При этом, как правило, отмечают однонаправленный перенос генов между видами. Это объясняют преимуществом определенных направлений скрещивания, которые могут быть связаны как с ploидностью скрещиваемых видов, так и характером ядерно-цитоплазматических взаимодействий. Вместе с тем, если влиянию ploидности родительских видов на эффективность образования гибридов и направление интрогрессии чужеродных генов уделяется достаточное внимание, то представления о механизмах ядерно-цитоплазматических взаимодействий при отдаленных скрещиваниях, сформировавшиеся к 1960-м гг., практически не меняются. Процессы формообразования у отдаленных гибридов, обусловленные изменчивостью их геномов, достаточно продолжительны. Это ограничивает возможность изучения событий отдаленной гибридизации в естественных гибридных зонах и вызывает необходимость их моделирования в экспериментальных условиях. В этом отношении большой интерес представляют искусственно создаваемые гибриды гексаploидной пшеницы, поскольку полиploидный геном этого вида, в отличие от диплоидов, способен в результате отдаленных скрещиваний подвергаться значительным структурно-функциональным преобразованиям без негативных последствий для растений.

III. Противоречивость существующих реконструкций филогенетических отношений разных групп эукариот. Для большинства крупных таксонов существуют многочисленные

эволюционно-филогенетические сценарии исторического развития, разработанные на уровне таксонов ранга надсемейств и семейств, а в меньшей степени — на более низком таксономическом уровне. В последние десятилетия широкое распространение получили попытки оценить родство видов по последовательностям нуклеотидов, выявленным в первую очередь с использованием технологических решений, основанных на полимеразной цепной реакции.

IV. Генетическое единство вида как одно из необходимых условий его существования. Несмотря на то, что данный критерий интегрирован в биологическую концепцию вида, он, по сути дела, не принимается во внимание в эколого-эволюционной и таксономической практике из-за сложности определения наличия или отсутствия генетических изолирующих механизмов и факторов, способных модифицировать их проявление. Еще более сложным является вопрос о генетической интегрированности как отдельных популяций, так и всей популяционной системы вида. Описаны единичные, зачастую лабораторные модели, иллюстрирующие роль генетических факторов в создании барьеров стерильности. Ряд моделей, внесших вклад в понимание генетической дивергенции популяций, был разработан в рамках концепции хромосомного видообразования, из которой следовало, что хромосомные перестройки играют важную роль в видообразовании, поскольку гетерозиготы по ним обладают пониженной фертильностью, предотвращая поток генов между популяциями. Сейчас становится преобладающей точка зрения, что влияние гетерозиготности по перестройкам на поток генов между популяциями обеспечивается перераспределением у них паттерна рекомбинации. По-видимому, эти гипотезы не являются взаимоисключающими.

В настоящее время в мире активно проводятся по сравнительному анализу кариотипов млекопитающих, выявляются горячие точки хромосомных перестроек, зафиксированных в ходе эволюции различных таксонов, определяются эволюционно консервативные участки хромосом. Особое внимание уделяется сравнительному изучению частоты и распределения сайтов гомологичной рекомбинации. Сравнительно-эволюционный анализ рекомбинации в основном базируется на данных полученных при генетическом картировании. Такой подход часто дает смещенные оценки частоты рекомбинации. Длины генетических карт, оцененных по частоте кроссинговера между отдельными маркерами, могут быть как завышенными за счет суммирования коротких интервалов, так и заниженными за счет недостатка информативных маркеров.

V. Взаимосвязь генетического многообразия и областей высокого таксономического разнообразия. Данная проблема, поставленная в общем виде еще Ч. Дарвином и А. Уоллесом, фактически была сформулирована заново Н. И. Вавиловым в его концепции центров происхождения культурных растений. Но и сейчас, несмотря на многочисленные публикации,

в которых характеризуется картина размещения районов высокого разнообразия различных таксонов, мы достаточно плохо представляем не только генетические, но и эколого-географические механизмы, обеспечивающие подобное распределение.

VI. Оценка роли и возможной интеграции геномных и хромосомных механизмов возникновения и поддержания биоразнообразия в биотах и биоценозах. Картина эволюционного возникновения и поддержания биоразнообразия в биотах (как совокупностях видов) и ценозах (как совокупностях особей) интерпретируется абсолютно по-разному: от наложения полностью независимых и случайных событий (широко распространенные нейтралистские концепции) до детерминированных взаимодействий. Считается, что цено-географическая дискретность играет важную роль в снижении эффективности элиминации и торможении эволюции. Ценозы в целом могут быть представлены как сложные системы с многократно дублированными информационными каналами, причем метаинформация представлена в первую очередь в виде взаимодействия между видами. Подобные же взаимодействия могут осуществляться не только на экологическом, но и на генетическом уровне. В итоге каждая биота или каждый биоценоз может быть представлена не просто как мешанина из видов, а, скорее, как сборная солянка, в которой каждый (или почти каждый) элемент важен и в которой все элементы дополняют друг друга. Пространственная дифференциация биосферы в целом может быть своего рода эволюционным организатором. Таким образом, назревшая в последние десятилетия необходимость синтеза классических и современных концепций формирования и поддержания биоразнообразия, основанных на биосферном мышлении, определяет целесообразность организации междисциплинарных коллективов и интеграции результатов не только генетических, таксономических и палеобиологических, но и эколого-географических исследований.

1 Сравнительный анализ вклада альтернативной трансляции в кодирующий потенциал геномов растений и животных. Оценка вклада этого механизма в кодирование биологической сложности эукариотических организмов

Исследование структуры матричных РНК необходимо для понимания фундаментальных механизмов реализации генетической информации. Согласно существующим в молекулярной генетике представлениям, эукариотические гены способны кодировать несколько белков за счет использования альтернативных промоторов или с помощью альтернативного сплайсинга, в результате чего с одного гена может считываться

несколько (в отдельных случаях - сотни) различных мРНК. Этот феномен (альтернативная транскрипция) увеличивает кодирующий потенциал эукариотических генов, то есть число кодируемых ими функционально различных белков. Известно, что альтернативная транскрипция существенно более выражена у животных, что может служить одним из возможных объяснений несоответствия между числом генов и уровнем биологической сложности организмов: действительно, число генов у человека и арабидопсиса примерно одинаково, тогда как уровень биологической сложности (морфологической, физиологической, поведенческой и т. д.) весьма различен. По-видимому, большее число различных белков, кодируемых генами животных за счет альтернативной трансляции, может быть одним из факторов, лежащих в основе таких различий.

Механизмы альтернативной транскрипции активно исследуются и учитываются при анализе структуры генов и геномов эукариот. Однако, существуют другие возможности, позволяющие увеличивать кодирующий потенциал эукариотических генов. Один из возможных путей – альтернативная трансляция. В настоящее время считается, что с одной эукариотической матричной РНК (мРНК) может транслироваться только один белок (у прокариот ситуация другая, там допустима трансляция полицистронных матриц). Однако, ранее было показано (в том числе и участниками настоящего проекта), что в мРНК эукариот рибосомы могут распознавать несколько сайтов инициации трансляции, что может приводить к дополнительному синтезу различающихся с N-конца белков.

В настоящее время считается, что инициация трансляции большей части эукариотических мРНК происходит по механизму линейного сканирования, согласно которому 40S субъединица рибосомы связывается с кепом на 5'-конце мРНК и движется вдоль матрицы в поиске инициаторного AUG кодона в подходящем контексте [14]. Показано, что нуклеотиды в районе стартового кодона растений и млекопитающих важны для его взаимодействия с рибосомой: оптимальному контексту соответствуют пурины в -3 и гуанин в +4 положениях вокруг AUG. В экспериментах *in vitro* показано, что в случае субоптимального контекста AUG кодона, часть рибосом не распознает его как старт трансляции и может иницировать трансляцию на следующем AUG (leaky scanning или «сканирование с подтеканием» [14, 15]). Помимо механизма «сканирование с подтеканием», инициация трансляции на нескольких стартовых кодонах может осуществляться за счет механизмов реинициации и внутренней инициации трансляции (Internal Ribosome Entry Sites, IRES). Эффективность механизма реинициации ограничена размером 5'-проксимальной рамки считывания (ORF), а также зависит от размера спейсера (участка мРНК, лежащего между проксимальной ORF и нижерасположенным стартовым кодоном трансляции). Считается, что эффективность реинициации может зависеть от статуса базовых факторов инициации

трансляции (eIF2, eIF4E) и этот механизм способен обеспечивать трансляцию альтернативных изоформ нескольких важных регуляторных факторов млекопитающих. В целом, ситуацию с альтернативной трансляцией в настоящее время можно охарактеризовать следующим образом: известно, что этот феномен существует, и ряд эукариотических мРНК кодируют несколько функционально-значимых изоформ белков за счет инициации трансляции на двух или более стартовых кодонах. Например, в клетках шпината синтезируются митохондриальная и хлоропластная формы протопорфириногена II, трансляция которых инициируется на двух близкорасположенных альтернативных AUG-кодонах; ДНК-лигаза 1 кодируется в геноме арабидопсиса одним геном, с мРНК которого за счет альтернативной трансляции синтезируются ядерная и митохондриальная формы и т. п. Также известны отдельные случаи, в которых аннотированный белок и его N-укороченный вариант выполняют совершенно различные функции (например, мРНК гистона H4 млекопитающих дополнительно кодирует фактор роста остеобластов), характеризуются различной стабильностью или различаются по уровню функциональной активности (детальное рассмотрение таких случаев приведен в [16]). Однако, в целом, число описанных в литературе случаев использования альтернативных стартовых кодонов трансляции невелико и при предсказании структуры генов эукариот их существование не принимается в расчет. В банках данных нуклеотидных последовательностей (GenBank, EMBL) подавляющее большинство мРНК содержат только один аннотированный стартовый кодон и одну ORF. С нашей точки зрения такая ситуация не соответствует действительности и существенная часть транскриптов эукариот может кодировать несколько белков. Одна из целей настоящего проекта заключается в исследовании кодирующего потенциала эукариотических мРНК, направленном на выявление альтернативных открытых рамок считывания, кодирующих новые белки (то есть белки, отличные от тех, которые занесены в базы данных GenBank, SwissProt и т. п.). Эта информация позволит уточнить существующие представления как о структуре сигнала инициации трансляции, так и о составе протеома эукариотических клеток и трансляционном полиморфизме белков. На данном этапе реализации проекта был проведен сравнительный анализ вклада альтернативной трансляции в кодирующий потенциал геномов растений и животных.

Ранее в рамках проекта нами был проведен сравнительный анализ встречаемости и характеристик лидерных ORF, с которых потенциально могут кодироваться небольшие белки или пептиды (детальная информация представлена в отчете за пятый этап). Здесь мы суммируем всю полученную при выполнении проекта информацию, а также представляем дополнительные данные об эволюционной консервативности потенциальных сайтов инициации трансляции. Согласно полученным данным, в качестве альтернативных стартовых

кодонов могут использоваться кодоны AUG, расположенные в 5'-НТП или в начале белок-кодирующей части мРНК (при условии субоптимального контекста стартового кодона). Анализ кДНК, аннотированных в банке данных нуклеотидных последовательностей GenBank позволил сделать следующие оценки:

1. Лидерные кодоны AUG (uAUG) встречаются с высокой частотой у *Homo sapiens* (44% выборки), *Mus musculus* (40%), *Gallus gallus* (48%), *Arabidopsis thaliana* (27%). Анализ мРНК мыши, содержащих один uAUG, показал, что средний размер uORF соответствует пептиду размером 21 аминокислоту и размер 411 кодируемых такими uORF пептидов превышал 50 аминокислот. Следует отметить, что небольшой размер пептида не означает отсутствия у него биологической функции – в настоящее время известно более тысячи биологически-активных пептидов. Некоторые гены эукариот кодируют белки, размер которых соответствует олигопептиду (например, размер важных регуляторных белков POLARIS и ROTUNDIFOLIA4 у *Arabidopsis thaliana* составляет около 50 аминокислот и эти белки не являются продуктом созревания более протяженного предшественника). Можно отметить, что у растений uORF в среднем встречаются более редко, чем у млекопитающих, что может означать меньшую значимость uORF-кодируемых белков и пептидов в протеоме растений.

2. Анализ встречаемости стартовых кодонов трансляции белок-кодирующих последовательностей, расположенных в субоптимальном контексте (YnnAUG, Y = U/C), показал их наличие у 17% мРНК *Homo sapiens*, 12% *Gallus gallus*, 20% *Arabidopsis thaliana*. Мы вычислили средние частоты альтернативных стартовых кодонов трансляции в начале белок-кодирующих последовательностей у мРНК с оптимальным (RnnAUG) и субоптимальным (YnnAUG) контекстами инициаторного кодона. Оказалось, что мРНК с субоптимальным контекстом инициаторного кодона характеризуются значительно более высокой частотой альтернативных стартовых кодонов трансляции (табл. 1). Опять же, у млекопитающих этот феномен оказался более выраженным, чем у растений.

Мы провели дополнительный анализ консервативности альтернативных стартовых кодонов трансляции в мРНК позвоночных, причем была использована выборка мРНК, позиции стартового кодона у которых были верифицированы в протеомных экспериментах. Можно видеть (табл. 2), что увеличенная консервативность альтернативных сайтов инициации трансляции сохраняется в участке между 2 и 20 кодонами БКП и этот феномен не виден в более протяженном участке (между 2 и 100 кодонами). Это наблюдение хорошо соответствует нашей гипотезе и существующим моделям инициации трансляции.

Таблица 1. Средняя частота кодонов AUG в позициях 3-9 эукариотических мРНК у которых стартовый кодон трансляции расположен в оптимальном (Opt) или субоптимальном (Sub) контексте

| Организм | Sub | Opt | позиции ^b | Exp ^a |
|--------------------|-------|-------|----------------------|------------------|
| <i>H. sapiens</i> | 0.031 | 0.012 | 2–9, 11, 13 | 0.017 |
| <i>M. musculus</i> | 0.038 | 0.015 | 2–8, 10, 11 | 0.017 |
| <i>A. thaliana</i> | 0.031 | 0.022 | 2,3 | 0.015 |

^aОжидаемое значение средней частоты AUG кодона (вычислено как средняя частота AUG в удаленном участке БКП (между 30 и 40 кодонами).

^bПозиции кодонов в участке БКП от 2 до 15 триплета, в которых различия в частоте кодона AUG между выборками мРНК с оптимальным и субоптимальным контекстами стартового кодона были достоверно различны (согласно *t*-тесту, $p < 0.05$).

Таблица 2. Консервативность присутствия альтернативных стартовых кодонов трансляции в позициях БКП мРНК генов позвоночных животных, характеризующихся оптимальным (Opt) и субоптимальным (Sub) контекстами стартового кодона трансляции

| Район БКП (участок между кодонами) | Доля консервативных AUG кодонов | |
|---|---------------------------------|-------|
| | Opt | Sub |
| 2–5 | 79.1% | 92.3% |
| 2–10 | 79.0% | 91.7% |
| 2–20 | 83.6% | 93.6% |
| 2–100 | 95.1% | 95.3% |

Роль механизма «альтернативной трансляции», основанного на использовании нескольких стартовых кодонов в эукариотических мРНК, исследована недостаточно. В рамках проекта показано, что открытые рамки считывания, расположенные в составе 5'-НТП или белок-кодирующей последовательности, могут кодировать изоформы белков, отличающиеся по структуре N-концевого участка (укороченные или удлиненные с N-конца). Проведенный компьютерный анализ продемонстрировал, в мРНК генов животных альтернативные сайты инициации трансляции встречаются значительно чаще, чем у растений и они характеризуются высокой эволюционной консервативностью. По-видимому, этот феномен связан с большей

биологической сложностью животных, для обеспечения которой их гены должны кодировать большее число структурно и функционально различных белков.

2 Анализ изменчивости ядерных и митохондриальных геномов у беккроссных потомков ячменно-пшеничных амфиплоидов

*Особенности аллоплазматических линий, выделенных среди беккроссных потомков ячменно-пшеничных амфиплоидов *H. marinum subsp. gussoneanum* Huds ($2n=28$) x *T. aestivum* L. ($2n=42$). Ячменно-пшеничный амфиплоид *H. marinum subsp. gussoneanum* ($2n=28$) x *T. aestivum* ($2n=42$) (сорт Пиротрикс 28) был опылен сортом яровой мягкой пшеницы Пиротрикс 28. Полученные растения BC_1 были включены в последовательные этапы самоопыления. В данной работе проанализированы растения шести линий и исходного амфиплоида по сравнению с родительскими генотипами – дикорастущим ячменем *H. marinum* и мягкой пшеницей сорта Пиротрикс 28. Аллоплазматические линии выделены на основе отдельных растений BC_1F_3 -поколения. В табл. 3 приведены основные характеристики изученных линий по числу хромосом и проявлению фертильности. Среди этих линий – одна дисомная замещенная Л-1/13 – $2n=42 = 40+2(7H)$, остальные шесть линий – дополненные. Линия Л-1/17 – исходный амфиплоид ($2n=56$), который был включен в возвратные скрещивания для получения беккроссных потомков и аллоплазматических линий. Линии характеризовались разным уровнем проявления фертильности и цитогенетической стабильности. Так, полностью фертильными были все растения дополненных линий Л-1/11 и Л-1/12, для которых характерна цитогенетическая стабильность. Цитогенетически нестабильными были дополненные линии Л-1/15 и Л-1/16, у которых процесс стабилизации кариотипов не закончен. Среди растений этих линий были как частично фертильные, так и стерильные растения. Частота фертильных растений у амфиплоида (Л-1/17) была относительно высокой, но завязываемость зерновок в колосе не полная (часть колосков не содержали зерен). На рис. 1 представлены образцы колосьев всех изученных линий, амфиплоида и родительских форм – дикорастущего ячменя *H. marinum* и мягкой пшеницы сорта Пиротрикс 28.*

Таблица 3. Проявление фертильности и число хромосом у аллоплазматических линий, выделенных на основе растений BC₁F₃-поколения ячменно-пшеничных амфиплоидов *H.marinum subsp.gussoneanum* (2n=28) x *T.aestivum* (2n=42)

| № п/п в соответствии с рис. 17 и рис. 18 | № линии | Число хромосом | Частота фертильных растений, % |
|--|---------|-------------------|--------------------------------------|
| 3 | Л-1/11 | 2n=42+2(7H) | 100 |
| 4 | Л-1/12 | 2n=42+2t (7H) | 100 |
| 5 | Л-1/13 | 2n=42 (40+2H) | 96 |
| 6 | Л-1/14 | 2n=43 | 92 |
| 7 | Л-1/15 | 2n=45, 2n=46 | 53 |
| 8 | Л-1/16 | 2n=48 | 64 |
| 9 | Л-1/17 | 2n=56 | 92 |



Рис. 1. Колосья: 1 – дикорастущего ячменя *H.marinum*; 2 – мягкой пшеницы сорта Пиротрикс 28; 3, 4, 6–9 аллоплазматических дополненных линий (*H.marinum*)-*T.aestivum*; 5 – аллоплазматической замещенной линии (*H.marinum*)- *T.aestivum*

Результаты изучения последовательности 18S/5S митохондриального повтора. Показано, что у всех изученных растений аллоплазматических линий, несущих цитоплазму дикорастущего ячменя и отдельные хромосомы дикорастущего ячменя, независимо от проявления фертильности растений, проявляется гетероплазмия по митохондриальному повтору 18S/5S. Это же состояние, соответствующее одновременному присутствию ячменных и пшеничных последовательностей, характерно и для амфиплоида (№ 9) (рис. 2).

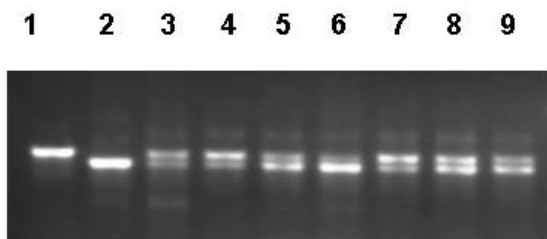


Рис. 2. ПЦР-анализ 18S/5S повтора мтДНК: 1 – дикорастущий ячмень *H. marinum*; 2 – сорт мягкой пшеницы Пиротрикс 28; 3, 4, 6–8 аллоплазматические дополненные линии (*H.marinum*)-*T.aestivum*; 5 – аллоплазматическая замещенная линия (*H.marinum*)- *T.aestivum*; амфиплоид

Установлено, что в процессе беккроссирования ячменно-пшеничных амфиплоидов, а затем их самоопыления, происходит изменчивость ядерного генома со стабилизацией кариотипа, близкого к типичному пшеничному ($2n = 42$) [ср. 17, 18]. Этот процесс сопровождается встраиванием отдельных пар хромосом ячменя в геном мягкой пшеницы с образованием дополненных или замещенных генотипов. При этом состояние гетероплазии по 18S/5S повтору мтДНК, характерное для амфиплоида, сохраняется у всех аллоплазматических линий неизменным, независимо от их цитогенетической стабильности или уровня проявления фертильности. Подтверждены ранее полученные данные о совместимости ядерного генома мягкой пшеницы с цитоплазмой дикорастущего ячменя *H.marinum*. Таким образом, при полиплоидизации ядерного генома ячменно-пшеничных гибридов *H.marinum subsp.gussoneanum* ($2n=28$) x *T.aestivum* ($2n=42$) и последующей редукции числа хромосом у беккроссных потомков амфиплоида состояние гетероплазии последовательности 18S/5S митохондриального повтора сохраняется.

3 Оценка перспектив использования молекулярных маркёров в решении общих и частных проблем систематики и филогении прямокрылых насекомых

Систематика, реконструкция филогенетических отношений и представления об эволюции биоразнообразия прямокрылых насекомых долгое время складывались на основе сравнительного анализа признаков ключевых морфологических структур рецентных и ископаемых таксонов. В основу существующих схем филогенетических отношений прямокрылых были положены признаки одной или нескольких морфологических структур: копулятивного аппарата самцов [19, 20], гениталий самок и яйцеклада [21, 22], жилкования и

строения крыльев [23], а также деталей анатомического строения [24, 25]. Противоречивые эволюционно-филогенетические схемы, разработанные на этих данных и принципах эволюционной таксономии, касались преимущественно таксонов высокого ранга - надсемейств и семейств. Попытки выяснения более детальных путей естественной истории биоты сталкиваются с конвергенциями и параллелизмами в морфо-адаптивной эволюции многих групп живых существ, что является причинами постоянного пересмотра систематики и филогении того или иного таксона.

Использование методов, основанных на сравнительном анализе нуклеотидных и аминокислотных последовательностей, недавно, но стремительно вошло в практику филогенетических исследований, поскольку позволяет оценить уровень дивергенции видов в таксоне любого иерархического ранга.

С развитием техники клонирования отдельных генов с помощью полимеразной цепной реакции началось быстрое накопление данных о нуклеотидных последовательностях разных генов и молекулярная филогенетика вступила в период (1990-е гг.), который можно назвать «эрой генов рибосомальной РНК», поскольку именно с этими генами были связаны надежды на решение многих филогенетических проблем Metazoa и, в частности — Arthropoda. Использование рРНК молекулярных маркёров позволили установить плезиоморфные и апоморфные группы в отряде прямокрылых насекомых и предложить новые решения ряда вопросов, связанных с эволюционными взаимоотношениями высших таксонов (семейств и надсемейств) на материале преимущественно из Африки, Южной и Северной Америк [26-28]. Эти исследования подтвердили монофилию отряда Orthoptera и его композицию из двух монофилетических кластеров, соответствующих длинноусым (Ensifera) и короткоусым (Caelifera) прямокрылым насекомым. Анализ скорости нуклеотидных замен и реконструкция на этой основе филогенетических деревьев нашли отражение и в систематике короткоусых прямокрылых. В частности была предложена новая комбинация надсемейств, составляющих объём короткоусых прямокрылых насекомых (Caelifera): Tridactyloidea, Tetrigoidea, Eumastacoidea, Trigonopterigoidea, Tanaoceroidea, Pyrgomorphoidea, Pneumoroidea и Acridoidea. Изменение статуса некоторых семейств (и даже некоторых подсемейств) до уровня надсемейств расходятся с результатами классической таксономической практики и требуют проверки на других видах из других регионов по тем же генам, что и предусмотрено при реализации целей настоящего проекта. В связи с высокой консервативностью выбранных участков рРНК и относительно небольшим числом видов исследованных короткоусых прямокрылых насекомых, филогенетические реконструкции на уровне ниже семейства в цитированных выше работах наиболее противоречивы и требуют дополнительных исследований.

В конце XX века для изучения филогенетических взаимоотношений стал использоваться анализ митохондриальной ДНК [29, 30]. К достоинствам мтДНК при использовании в подобных задачах следует отнести простоту выделения, высокую копияность, отсутствие рекомбинации и наличие разных мутационных уровней в различных частях молекулы. Наиболее часто используемыми митохондриальными маркерами являются последовательности генов *цитохрома b*, первой и второй субъединиц цитохром оксидазы (*COI* и *COII*).

Не удивительно, что использование генов митохондриальной ДНК и генов митохондриальной рибосомной РНК для реконструкции филогении и систематики той или иной группы живых организмов активно развивается, в том числе и для короткоусых прямокрылых насекомых, преимущественно саранчовых.

Анализ нуклеотидных замен в быстро эволюционирующем митохондриальном геноме позволил подойти к проблеме установления родственных связей на уровне подсемейств, групп родов и видов в том или ином роде саранчовых. Ряд работ был посвящён использованию молекулярных маркёров для анализа кладогенеза и выяснению филогенетических отношений саранчовых подсемейств *Acridinae* и *Oedipodinae* [31-35]. Однако следует признать, что установление филогенетических связей внутри каждого из этих подсемейств и филогенетических отношений этих подсемейств с другими группами семейства *Acrididae* и, прежде всего подсемейством *Catantopinae* остаются практически не исследованными. Это связано прежде всего с относительно небольшим числом видов, у которых на сегодняшний день секвенированы участки геномов по выбранным маркёрам, причём в некоторых случаях всего по единственному гену.

В настоящем отчёте мы приводим результаты молекулярно-филогенетического и молекулярно-цитогенетического исследования прямокрылых насекомых. Использование нескольких молекулярных маркёров было призвано обеспечить устойчивость филогенетических построений и избежать ошибок, связанных с разными скоростями мутирования в разных частях генома. В ходе выполнения работ по проекту был пополнен международный генетический банк (GenBank) данными о нуклеотидных последовательностях секвенированных участков генома у ранее не исследованных в этом отношении прямокрылых насекомых.

Материал для реализации проекта включает большое число видов прямокрылых насекомых, принадлежащих к различным фауно-генетическим комплексам и широкому спектру таксонов разного уровня и степени эволюционной дивергенции. Его основу составляет уникальная спиртовая коллекция образцов из более чем 200 видов *Caelifera*, собранных нашей исследовательской группой в Африке, Малой и Центральной Азии,

Юго-Восточной Азии, Кавказе и Закавказье, Карпатах, Сибири, Дальнем Востоке России и Японских островах, а также полученных от коллег — сотрудников ЗИН РАН, БПИ ДВО РАН, ИСиЭЖ СО РАН; Московского, Новосибирского, Томского и Алтайского университетов и коллег из европейских (Польша, Ягеллонский университет; Испания: Университет Гранады), азиатских (Япония: Университет Хоккайдо и Университет Рюкю; Малайзия: Университет Малайзии и Институт тропической биологии) и африканских (ЮАР: Университет Претории, Трансваальский музей естественной истории и Национальный институт защиты растений) научных центров.

Определение нуклеотидной последовательности маркерных генов мДНК.

Выделение геномной ДНК проводили согласно протоколу [36]. Для амплификации фрагмента митохондриального гена *COI* использовали пару праймеров:

911: (5'-ТТТСТАСААТСАТАААГАТАТТGG-3') и

912: (5'-ТАААСТТCAGGGTGACCAAAAAATCA-3'). Для амплификации фрагмента митохондриального гена *COII* использовали праймеры

C2J (5'-AGAGСТТСТССТТТААТАГААСА-3') и

C2N (5'-ССАСААТТТСТГААСАТТGACCA-3').

Для амплификации фрагмента митохондриального гена *cytochrome b* использовали праймеры CB-L: 5'-ТАТGТТТТАССАТGAGGАСАААТАТС—3' и

TS-I-N (5'-ТАТТТСТТТСТТАТGТТТТСААААС-3') длиной 818 п.н. [37].

Полимеразно-цепную реакцию выполняли в 20 мкл реакционной смеси при следующем температурном режиме: предварительная денатурация (94 °С, 3 мин) и последующие 30 циклов – денатурация (94 °С, 30 с), отжиг (42 °С, 42 с) и элонгация (72 °С, 1 мин). Определение нуклеотидной последовательности фрагментов проводили с использованием реагента BigDye Terminator Ready Reaction Mix (Applied Biosystems) согласно протоколу производителя. Предварительный анализ последовательностей проводился при помощи различных вариантов BLAST (blastp, tblastn и rpsblast), доступных на <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>. Множественные выравнивания аминокислотных последовательностей были выполнены при помощи программы CLUSTAL W [38]. Филогенетический анализ был проведен при помощи программы MEGA3.0 [39]. Построение эволюционных деревьев проводили по методу соединения ближайших соседей [40]. Достоверность полученных таким образом филогенетических деревьев оценивали методом бутстреп-анализа при количестве репликаций, равном 1000 [41]. Вычисление попарных дистанций Тамуры–Нея было проведено при помощи программы MEGA3.0 [39].

Флуоресцентная гибридизация in situ. Флуоресцентную гибридизацию *in situ* проводили в соответствии с протоколом Пинкеля [42]. Для этого 0,4 мкг меченой ДНК пробы

смешивали с 10 мкг ДНК лосося и осаждали тремя объемами охлажденного 96% спирта при 14000 об/мин в течение 20 мин. Супернатант сливали, а 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 °С 3 мин, а отжиг повторяющихся последовательностей в течение 1 ч при 42 °С.

Цитологические препараты метафазных хромосом обрабатывали РНКазой А (100 мкг/мл) в 2×SSC в течение одного часа при 37 °С. 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 мМ HCl в течение 10 мин при 37 °С. Затем препараты отмывали дважды по 5 мин в фосфатном буфере (0,13 М NaCl; 0,27 мМ KCl; 7 мМ Na₂HPO₄; 3 мМ NaH₂PO₄, pH 7,2) и один раз в фосфатном буфере, содержащем 50 мМ MgCl₂. Денатурацию препаратов проводили в 70% формамиде (ФА) в 2×SSC в течение 2 мин при 70 °С. Препараты немедленно переносили в серию охлажденных спиртов возрастающей концентрации (70 %, 80 %, 96 %) по 3 мин. После чего высушивали их на воздухе, и под покровное стекло (24мм×24мм) наносили 20 мкл ДНК пробы в гибридизационном буфере, и оставляли во влажной камере в термостате при 42 °С на 16 ч.

Микроскопический анализ был проведен 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).

Молекулярная филогения кузнечиков семейства Tettigoniidae. Анализ нуклеотидных последовательностей у кузнечиков была ориентирована на оценку уровня дивергенции и реконструкцию естественной истории исследуемой группы насекомых.

Кузнечики, принадлежащие 16 видам семейства Tettigoniidae, были отловлены в Украине, Северном Кавказе, Алтае, Монголии, Дальнем Востоке России, в Сибири, Японии, Малайзии, Болгарии и Южной Африке. Образцы для экстракции ДНК хранились в 96% этаноле при -20 °С на кафедре общей биологии и экологии ФЕН НГУ.

После проведения полимеразно-цепной реакции (ПЦР) со специфичными праймерами для генов *COI* (911 и 912) и *COII* (C2J и C2N) были получены одиночные фрагменты длиной около 700 п.н. для *COI* и 600 п.н. для *COII*. Продукты ПЦР были выделены и установлена их нуклеотидная последовательность. Полученные последовательности были выровнены друг относительно друга при помощи программы CLUSTAL W. Во всех случаях при амплификации был получен единственный продукт нужного размера. Последовательности не содержали стоп-кодона и не имели вставок или делеций, приводящих к сдвигу рамки

считывания. Короткая инсерция длиной 3 п.н. была обнаружена в 5' области последовательности *COI*, полученной для *Hetrodes pupus* (подсемейство Hetrodinae).

Из 1121 сайта последовательностей *COI* и *COII*, определенных для 16 видов кузнечиков, 557 были вариабельными и 432 были информативны для анализа. Для оценки вариации уровня нуклеотидных замен между таксонами использовался тест константности уровня замен, основанный на анализе различия максимальных правдоподобий филогенетических деревьев, построенных с учетом константности уровня нуклеотидных замен и без него. Различие log-правдоподобий, вычисленных с учетом постоянного уровня замен и без него, не превысило 0,004. Таким образом, нет оснований отвергать гипотезу константности уровня нуклеотидных замен для рассматриваемого набора данных.

Анализ последовательностей гена *COI* кузнечиков показал, что вся совокупность видов формирует несколько обособленных кластеров, один из которых объединяет представителей подсемейств Bradyporinae и Tettigoniinae, два других – представителей рода *Conocephalus* (подсемейство Conocephalinae); *Phaneroptera* и *Isophya* (подсемейство Phaneropterinae) (рис. 3). Следующий кластер представлен *Mecopoda nipponensis* и *Mecopoda elongata* (подсемейство Mecopodinae) из разных популяций. От перечисленной совокупности исследованных видов достоверно отличается *Hetrodes pupus*, представитель подсемейства Hetrodinae. По сравнению с кузнечиками из других подсемейств *H. pupus* демонстрирует более высокую скорость дивергенции нуклеотидных замен в соответствующем участке исследованного гена, что нашло отражение на его положении на филогенетическом древе.

Топология филогенетического древа, построенного на основе множественного выравнивания фрагмента гена *COII*, в целом совпадает с топологией древа на основе последовательностей гена *COI*. Могут быть выделены обособленные кластеры, соответствующие подсемействам в традиционной классификации: Bradyporinae, Tettigoniinae, Conocephalinae, Mecopodinae (см. рис. 3).

Таким образом, близкие скорости эволюции, равномерность уровня нуклеотидных замен и сходство нуклеотидного состава позволяют проводить совместный филогенетический анализ *COI* и *COII* генов для исследованных видов. Филогенетическое древо, построенное на основе множественного выравнивания участков генов *COI* и *COII*, по топологии незначительно отличается от деревьев, реконструированных на основе каждого из генов в отдельности.

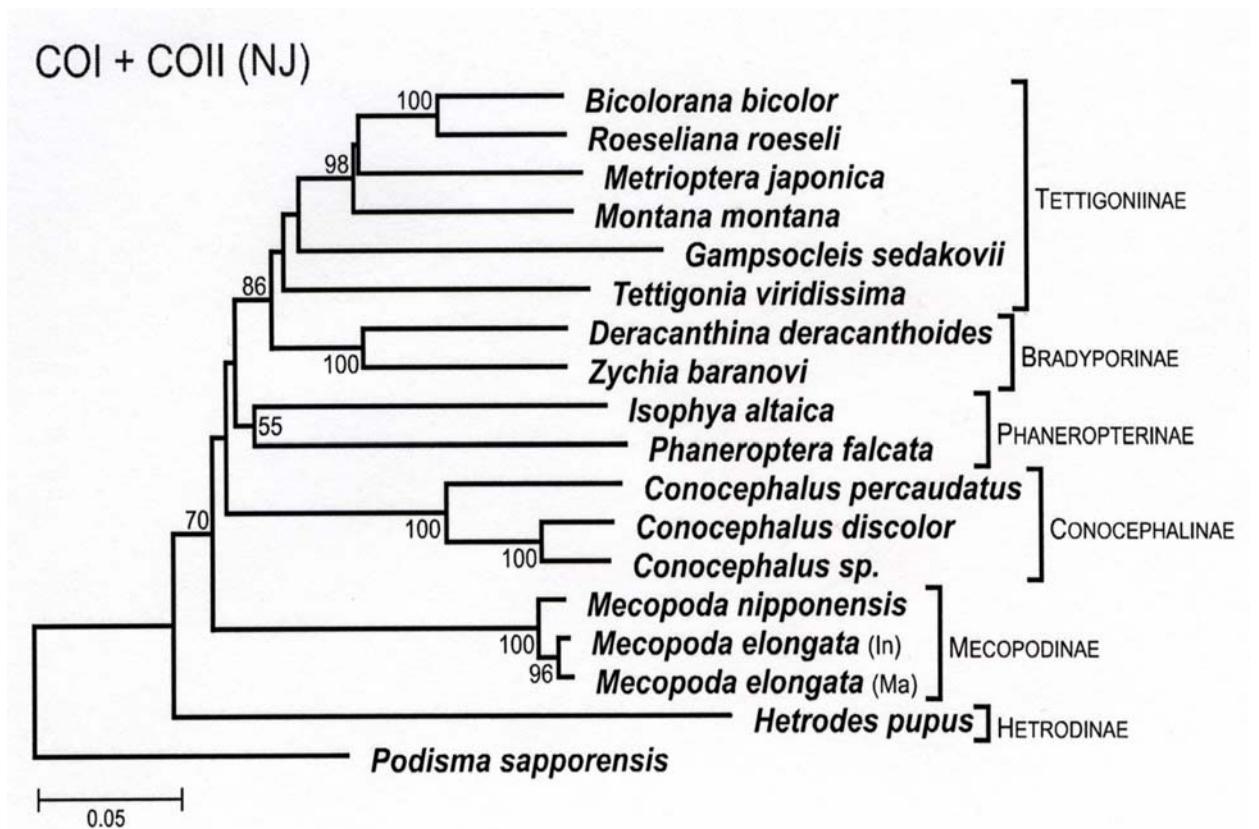


Рис. 3. Филогенетическое древо кузнечиков семейства Tettigoniidae, реконструированное на основе множественного выравнивания участков генов *COI* и *COII* мтДНК методом соединения ближайших соседей (Neighbor-Joining; NJ). Значения бутструп-коэффициентов менее 50% не указаны. В качестве внешней группы использованы соответствующие последовательности *Podisma sapporensis*. Условные обозначения мест сбора *Mecopoda elongata*: Ma – Малайзия; In – Индонезия

Анализ последовательностей генов *COI* и *COII* у кузнечиков показал монофилию семейства Tettigoniidae и каждого из исследованных подсемейств, подтвердив необоснованность выделения шароголовых кузнечиков в самостоятельное семейство Bradyporidae. На полученных нами дендрограммах, исследованные виды подсемейства Bradyporinae принадлежат одному кластеру с высокими бутструп-коэффициентами (96% на *COI* древе и 99% на *COII* древе). Кластер видов подсемейства Bradyporinae наиболее близок к видам подсемейства Tettigoniinae. Южно-африканский вид *Hetrodes pupus*, представитель подсемейства Hetrodinae, демонстрирует высокую степень дивергенции нуклеотидных последовательностей как по участку гена *COI*, так и по *COII*, формируя отдельный кластер в исследованной совокупности видов кузнечиков.

Существующие взгляды на классификацию и естественную историю своеобразной группы кузнечиков подсемейства Bradyporinae, отличаются, пожалуй, наибольшей

противоречивостью в оценке ранга и филогенетических отношений этого таксона. Цойнер [43] был первым, кто в своей филогенетической схеме кузнечиковых выделил группы *Brachycephalia* и *Dolichosephalia* на основании наличия или отсутствия выступающего вперёд роострума головы и положения усиков относительно глаз. Он считал *Brachycephalia* примитивной группой, которая, как и возможные мезозойские предки кузнечиков, была лишена крупного роострума на голове и имела нижнее положение усиковых впадин. В группы *Brachycephalia* он поместил представителей рецентных подсемейств *Bradypoginae*, *Ephippigerinae*, *Rusnogastrinae*, *Deracanthinae*, *Hetrodinae*, *Acridoxeninae*, а также одну вымершую группу. В группу *Dolichosephalia* им были включены остальные группы кузнечиков. Всех современных *Brachycephalia* Цойнер считал монофилетической группой. Его схема получила большое распространение и с теми или иными изменениями была принята современными исследователями [44, 45]. При этом следует подчеркнуть, что долгое время шароголовые кузнечики выделялись как самостоятельное семейство *Bradypogidae* в подотряде *Ensifera* наряду с *Rhaphidophoridae* и *Tettigoniidae* [46]. В филогенетической схеме Горохова [47] группа *Brachycephalia* была расформирована. Первые 4 «подсемейства» Цойнера [43] были объединены в одно подсемейство *Bradypoginae*, которое рассматривалось как ближайшее к *Tettigoniinae* (в последнее подсемейство были включены триба *Decticini* и ряд близких к ней триб). Более того, на основании признаков гениталий было высказано предположение, что *Bradypoginae*, возможно, происходят от одной из ветвей *Tettigoniinae*. *Hetrodinae* рассматривались Гороховым как подсемейство, не имеющее близкого родства ни с *Bradypoginae*, ни с *Tettigoniinae*. Эта гипотеза встретила возражения со стороны ряда авторов [48, 49].

Наш анализ последовательностей генов *COI* и *COII* у исследованных кузнечиков показал монофилию семейства *Tettigoniidae* и каждого из исследованных подсемейств, подтвердив необоснованность выделения шароголовых кузнечиков в самостоятельное семейство *Bradypogidae*.

Южно-африканский вид *Hetrodes pupus*, представитель подсемейства *Hetrodinae*, демонстрирует высокую степень дивергенции нуклеотидных последовательностей как по участку гена *COI*, так и по *COII*, формируя отдельный кластер в исследованной совокупности видов кузнечиков. Положение *Hetrodes pupus* на кладограммах, по-видимому, является отражением феномена «притяжения длинных цепей». Тем не менее, следует отметить, что и на основе анализа последовательностей 18S, 28S и 16S рибосомной РНК у *Ensifera* представитель подсемейства *Hetrodinae* — *Acanthoplus* sp. также не кластеризуется ни с *Bradypoginae*, ни с *Tettigoniinae*, а исследованный с помощью этих маркёров *Ephippiger ephippiger* (Fiebig, 1784) (*Bradypoginae*, *Ephippigerini*) на основе данных о скорости

нуклеотидных замен оказывается наиболее близким к видам подсемейства *Tettigoniinae* [28]. Таким образом, молекулярные данные поддерживают гипотезу А.В. Горохова [47] о филогенетической близости *Bradyporinae* и *Tettigoniinae* и противоречат точке зрения Цойнера [43] и его последователей [44], считающих, что внешнее сходство кузнечиков *Bradyporinae* и *Hetrodinae* обусловлено их происхождением от общего предка.

Молекулярная филогения и систематика саранчовых семейства Acrididae. Семейство настоящих саранчовых *Acrididae* наиболее многочисленное и наиболее разнообразное в морфоадаптационном плане среди прямокрылых насекомых. В мировой фауне насчитывается около 10 000 видов [50]. Разногласия в статусе и объеме той или иной группы в пределах этого семейства — типичная ситуация для современной акридологии. «Объединение видов и родов в таксоны более высокого ранга у разных исследователей могут различаться очень существенно». Эта цитата из коллективной монографии, опубликованной под эгидой Международной ассоциации прикладной акридологии и Университета Вайоминга (США) [51], весьма точно отражает современное состояние систематики саранчовых.

Примером исключительной нестабильности взглядов на систематику и филогению может быть подсемейство *Gomphocerinae*. Взгляды на таксономическую структуру этого подсемейства включают широкое разнообразие мнений в диапазоне от невозможности подразделения подсемейства на трибы до выделения 19 триб [52]. Для решения классических проблем систематики и филогении этой группы насекомых мы исследовали нуклеотидные последовательности нескольких маркерных митохондриальных генов с последующим консенсусным анализом.

Нами была выделена суммарная ДНК из 32 видов подсемейства *Gomphocerinae*. После проведения полимеразной цепной реакции (ПЦР) со специфичными праймерами для генов *cytochrome b* и *COI* были получены одиночные фрагменты необходимой для анализа длины. Продукты ПЦР были выделены и установлена их нуклеотидная последовательность.

Полученные нами результаты доказывают монофилию исследованной совокупности родов и поддерживают мнение большинства систематиков о возможности выделения в пределах подсемейства *Gomphocerinae* дискретных совокупностей родов (триб). Это подтверждается статистически и отражено в виде нескольких достоверно обособленных кластеров (рис. 4). При этом следует подчеркнуть, что совокупность родов в том или ином отдельном кластере в значительной мере соответствует трибам, выделенных на основе морфологических признаков. При этом совокупность родов *Chorthippus*, *Stauroderus* и *Aeropus* с одной стороны и *Stenobothrus* и *Omocestus* с другой, образуют дискретные кластеры (вероятности 99% и 96% соответственно). Этот результат поддерживает выделение

самостоятельной трибы Stenobothrini из Gomphocerini на основе сравнительно-морфологических данных [45].

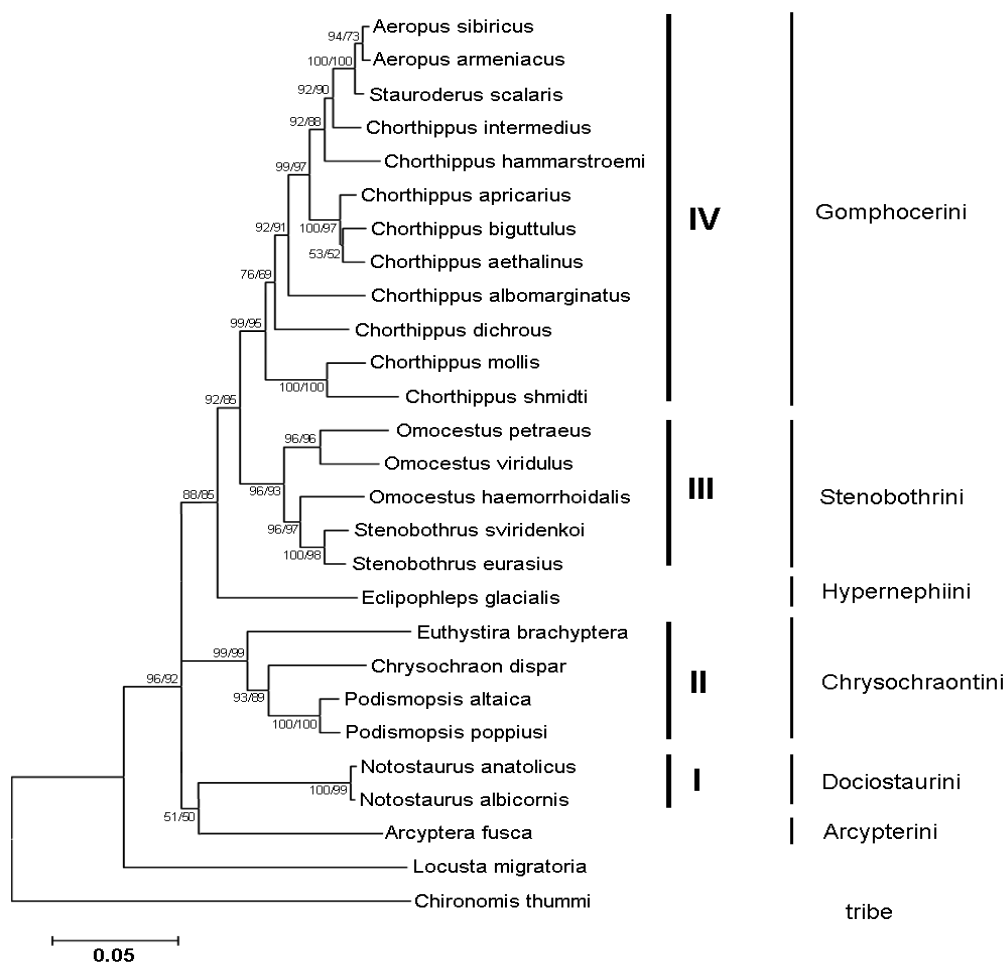


Рис. 4. Консенсусное филогенетическое древо, отражающее симплезиоморфии и синапоморфии палеарктических видов саранчовых подсемейства Gomphocerinae по COI и *cytb* генам мДНК. Данные о внешних группах, представленных *Locusta migratoria* (GenBank NC_001712) и *Chironomus thummi* (GenBank AF109699 and AF110154) взяты и Международного генетического банка

Обособленное положение на полученной нами кладограмме занимает вид *Eclipophleps glacialis*. Обычно, вслед за Л.Л. Мищенко [53], представителей этого рода выделяют в самостоятельную трибу Нурепнепиини. Таксономическая проблема заключается в том, что остается неясным к какому подсемейству относится эта триба, так как ряд авторов, не признавая таксономическую самостоятельность подсемейства Gomphocerinae, помещают эту группу в Acridinae (sensu lato) [51]. Другие же, несмотря на признание подсемейства Gomphocerinae, помещают эту группу в подсемейство Acridinae (sensu stricto) [54]. Наши

данные однозначно подтверждают принадлежность *E. glacialis* (Hypernephini) к подсемейству Gomphocerinae. Остальные три кластера точно соответствуют по составу трем выделяемым систематиками трибам: Chrysochraontini (*Chrysochraon* – *Euthystira* – *Podismopsis*), Dociostaurini (*Notostaurus*) и Arcypterini (*Arcyptera*) (см. рис. 4).

Следующий этап реконструкции филогенетического сценария саранчовых на основе молекулярных маркёров был связан с выяснением филогенетических отношений подсемейств и отдельных триб внутри семейства Acrididae.

Для решения этой задачи нами дополнительно к ранее представленным (см. рис. 4) были установлены нуклеотидные последовательности маркёрных участков мДНК (*COI*, *COII* и *cytb*) у 72 видов семейства Acrididae и выполнили множественные выравнивания аминокислотных последовательностей при помощи программы CLUSTAL W для построения консенсусного дерева по всем выбранным маркёрам. На основе этих данных была построена кладограмма по методу соединения ближайшего соседа (Neighbor-Joining; NJ) (рис. 5). Топология филогенетического дерева, построенного на основе множественного выравнивания фрагмента гена *COI*, в целом совпадает с топологией дерева на основе последовательностей гена *COII* и *cytb*. Таким образом, близкие скорости эволюции, равномерность уровня нуклеотидных замен и сходство нуклеотидного состава позволяют проводить совместный филогенетический анализ маркёрных генов для исследованной группы насекомых.

Результаты кластерного анализа, представленные на рис. 5, поддерживают мнение большинства систематиков о возможности выделения в семействе Acrididae дискретных совокупностей родов — подсемейств. Однако объём подсемейств в современной систематике саранчовых трактуется крайне не однозначно. Наши данные подтверждают монофилию группы триб, объединяемых в подсемейство Catantopinae (в некоторых системах — семейство Catantopidae). При этом, трибы, представленные в нашем исследовании несколькими видами из одного или нескольких родов (Conophymatini, Eupreopcnemidini, Calliptamini и Podismini), кластеризуются в соответствии с традиционной таксономической практикой и могут считаться монофилетичными таксонами не зависимо от того, какой ранг им придаётся в иерархической системе прямокрылых насекомых.

4 Сравнительный анализ частоты и распределения сайтов рекомбинации по хромосомам 8 видов млекопитающих, оценка относительной роли числа хромосом и хромосомных плеч, размера синаптонемного комплекса и силы кроссоверной интерференции в определении межвидовых и межпопуляционных различий в общем уровне рекомбинации

Для сравнительного анализа частоты рекомбинации в хромосомах млекопитающих мы выбрали 12 видов полевок подсемейства *Arvicolinae*. Оно включает более 100 видов населяющих различные биотопы палеарктической и неарктической зоны [55]. Процесс видообразования в пределах данного подсемейства происходил, по-видимому, очень быстро и сопровождался значительной экологической, морфологической, кариотипической и молекулярно-генетической дивергенцией [56]. Благодаря этим особенностям, данное подсемейство представляет собой крайне интересную модель для исследования эволюции рекомбинации.

Материал и методы. Использованы в работе животные перечислены в табл. 4. Распластанные препараты сперматоцитов были приготовлены из семенников по методике Петерса с соавторами [57]. Препараты для электронно-микроскопического анализа окрашивали азотнокислым серебром [58] и анализировали на микроскопе JEM100 (Jeol, Япония) при 80 кВ.

Окрашивание для иммунофлуоресцентного анализа проводили по методике Андерсон с соавторами [59]. Препараты инкубировали 2 ч при 37 °С с поликлональными антителами кролика против белка боковых элементов СК SCP3 (Abcam, Великобритания) при разведении 1:500, моноклональными антителами мыши против белка MLH1 (Abcam, Великобритания) при разведении 1:50 и антителами человека против центромерных белков ACA (Antibodies Incorporated, США) при разведении 1:100 в фосфатно-солевом буфере (PBS) содержащем 3% бычьего сывороточного альбумина (Sigma-Aldrich, США). Препараты отмывали три раза по 5 мин в PBS и инкубировали 40 мин при 37 °С с антителами осла против иммуноглобулинов кролика, конъюгированными с флуоресцентной меткой Cy3 (Jackson Laboratories, США) в разведении 1:200, антителами козы против иммуноглобулинов мыши, конъюгированными с флуоресцентной меткой FITC (Jackson Laboratories, США) в разведении 1:400 и антителами козы против иммуноглобулинов человека, конъюгированными с флуоресцентной меткой FITC (Vector Laboratories, США) в разведении 1:100 согласно стандартному протоколу. Препараты отмывали в PBS, затем в дистиллированной воде, высушивали и наносили 15 мкл

раствора антифэйда с красителем (Vectashield with DAPI; Vector Laboratories) для окрашивания ДНК и предотвращения гашения флуоресценции.

Микроскопический анализ проводили в Центре коллективного пользования микроскопического анализа биологических объектов СО РАН. Препараты анализировали на микроскопе Аxioplan 2 (ZEISS, Германия) снабженным CCD видеокамерой (CV M300, JAI Corporation, Япония), набором комплектов фильтров CHROMA и программным обеспечением для обработки изображений ISIS4 (MetaSystems GmbH, Германия). Яркость и контраст изображений редактировали с использованием пакета PaintShopPro 7.0.

Для анализа отбирали ядра сперматоцитов на стадии пахитены, содержащих полные наборы полностью синаптированных аутомных бивалентов и XY-бивалент. Учитывали количество сигналов MLH1 на каждом биваленте. Статистические расчеты производили с использованием пакета программ STATISTICA. Все данные в тексте и таблице представлены в виде средних значений и стандартных ошибок ($M \pm SB$). В табл. 4 приведены рекомбинационные и цитогенетические характеристики полевок 12 исследованных видов.

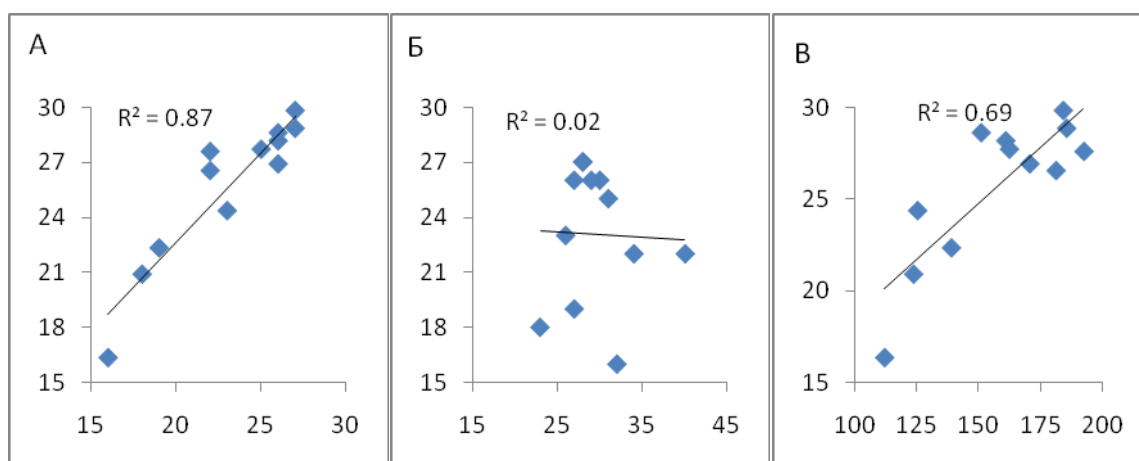


Рис. 6. Зависимость общего число кроссинговеров на геном (ось Y) от числа аутомом (А) числа плеч аутомом (Б) и длины синаптонемного комплекса (В)

Таблица 4. Рекомбинационные характеристики 12 видов полевок подсемейства Arvicolinae

| Вид | N | n | Среднее (M±SD) число сайтов связывания MLH1 на ядро | Гаплоидное число аутосом | Гаплоидное число плеч аутосом | Средняя (M±SD) длина СК аутосом (в мкм) |
|---|---|-----|---|--------------------------------|-------------------------------------|---|
| <i>Myodes glareolus</i> | 2 | 100 | 29.8±1.6 | 27 | 28 | 184.1±26.6 |
| <i>Lagurus lagurus</i> | 1 | 51 | 28.2±1.5 | 26 | 30 | 160.9±18.2 |
| <i>Eulagurus luteus</i> | 1 | 24 | 28.8±1.4 | 27 | 28 | 185.4±15.5 |
| <i>Lasiopodomys brandti</i> | 2 | 100 | 16.4±0.6 | 16 | 32 | 112.0±14.6 |
| <i>Lasiopodomys mandarinus</i> | 2 | 100 | 24.4±1.1 | 23 | 26 | 125.3±15.4 |
| <i>Microtus fortis</i> | 3 | 132 | 27.7±2.0 | 25 | 31 | 162.3±23.2 |
| <i>Microtus maximowiczii</i> | 3 | 310 | 22.3±1.3 | 19 | 27 | 139.0±16.3 |
| <i>Microtus mujanensis</i> | 3 | 238 | 20.9±1.3 | 18 | 23 | 123.7±10.2 |
| <i>Microtus juldaschi</i> | 2 | 100 | 26.9±0.9 | 26 | 29 | 170.6±15.1 |
| <i>Microtus rossiaemeridionalis</i> | 4 | 57 | 28.6±2.2 | 26 | 27 | 150.9±17.8 |
| <i>Microtus arvalis arvalis</i> | 3 | 149 | 27.6±1.2 | 22 | 40 | 192.4±18.5 |
| <i>Microtus arvalis obscurus</i> | 3 | 150 | 26.5±1.0 | 22 | 34 | 181.2±24.3 |

На рис. 6 представлены результаты анализа относительной роли числа хромосом и хромосомных плеч и размера синаптонемного комплекса в определении межвидовых различий в общем уровне рекомбинации. У большинства видов млекопитающих наиболее надежным предиктором уровня рекомбинации является гаплоидное число плеч аутосом [60]. У полевок исследованных нами мы не обнаружили корреляции между этими двумя показателями ($R^2 = 0.02$, $p > 0.05$). Мы обнаружили достоверную корреляцию между уровнем рекомбинации и длиной синаптонемного комплекса ($R^2 = 0.69$, $p < 0.05$). Это хорошо согласуется с данными полученными на других видах животных [60]. Наиболее надежным

детерминантом уровня рекомбинации у полевок оказалось гаплоидное число аутосом ($R^2 = 0.87$ $p < 0.05$).

5 Натурная верификация результатов, полученных на предыдущих этапах на модельных полигонах в равнинных и горных регионах

Для проверки ряда заключений, сделанных на предыдущих этапах проекта, в июне-июле 2011 г. проведено исследование разнообразия ряда групп живых организмов на модельных полигонах в равнинных и горных регионах. Выбор таких полигонов определялся возможностью верификации результатов, соответственно, это были территории, практически не изучавшиеся ранее.

Разнообразие прямокрылых насекомых в восточной части Усть-Канской котловины. Усть-Канская котловина расположена в Центральном Алтае, но фактически открыта в сторону северной части Горного Алтая и предалтайских степей. Это означает, что, с одной стороны, она находится в пределах местного центра высокого разнообразия прямокрылых, с другой, можно ожидать проникновения в нее ряда равнинных видов. Проведенные наблюдения показали, что характер разнообразия данных насекомых, уровень их численности и соотношение доминантов полностью соответствуют региону, т.е. выявленные ранее эколого-географические закономерности позволяют осуществлять пространственный прогноз.

В местной степи многочисленны *Omocestus haemorrhoidalis*, *Chorthippus albomarginatus*, *Aeropus sibiricus*, присутствуют *Aeropedellus variegatus*, *Omocestus petraeus*, *Poecilimon intermedius*, *Montana montana*, *Angaracris barabensis*, а также эндемик Алтае-Саянской горной области *Podismopsis altaica*. По предварительным оценкам, уровень рисуночно-окрасочной изменчивости полиморфных видов (в первую очередь *Aeropus sibiricus*) высок, что также соответствует ранее установленным особенностям Алтайского центра разнообразия.

Разнообразие прямокрылых насекомых в восточной части Предалтайской равнины. Предалтайская равнина тянется довольно широкой полосой — до десятков километров — вдоль северного края Горного Алтая. В западной части она занята типичными и даже сухими степями, а восточнее их сменяют луговые степи, переходящие в лесостепи.

Исследования, проведенные нами в 1992, 1999 и 2000 гг. в западной части равнины показали нетривиальность ее населения прямокрылых, что позволило нам в свое время выделить особый переходный биогеографический регион.

Работы же, выполненные в июле 2011 г. в рамках проекта, демонстрируют типичность видового богатства, численности и соотношения доминантных видов прямокрылых в восточной части равнины. Предварительное определение сборов свидетельствует о господстве *Stenobothrus lineatus*, *Chorthippus apricarius*, *Stauroderus scalaris*, *Glyptobothrus biguttulus*. Остальные выявленные виды также являются типичными для данного региона юга Западной Сибири. Таким образом, проведенные полевые исследования также верифицируют результаты, полученные на предыдущих этапах проекта.

Разнообразие шмелей Кулундинской степи. Известно всего 22 вида. Все, кроме *Ps. rufestris*, представлены в проведенных в 15 точка Кулунды учетах. Виды *V. armeniacus* и *V. luscogum* распространены повсеместно и, как правило, заметно преобладают над остальными, а в качестве содоминантов обычно выступают *V. muscogum* и *V. s. serrisquama*. Эти виды, за исключением эвритопного *V. luscogum*, относятся к типичным обитателям степей (*V. armeniacus*, *V. s. serrisquama*.) и открытых луговых пространств (*V. muscogum*). Также приуроченные к степям шмели *V. terrestris* и *V. laesus* встречаются в Кулунде часто, но в целом довольно немногочисленны, особенно последний. Напротив, виды *V. ruscogum*, *V. subterraneus*, *V. maculidorsis*, *V. humilis* и *V. s. paradoxus* придерживаются мезофитных стадий, но при этом заметно обильны и иногда преобладают в общем населении шмелей подобных местообитаний. Эти шмели характерны прежде всего для северных, приграничных с лесостепью районов, где приурочены к участкам приколочного разнотравья (Александровский, Троицкое). Дальше в степную зону эти виды проникают по “озисам” пойменных асоциаций (Клепечиха, Усть-Волчиха) и луговой растительности прилежащих к борам участков (Боровское, Солонька). В качестве содоминантов в сообществах шмелей данных местообитаний иногда могут выступать *V. hortorum* и *V. veteranus*. Остальные обнаруженные в Кулунде виды шмелей — преимущественно бореальные формы *V. schrencki*, *V. distinguendus*, *V. deuteronomus* и *V. sichelii*, поэтому их редкость и малочисленность вполне закономерна. Типичный степняк *V. fragrans* встречен только в трех из 15 обследованных локалитетов. Вероятно, находки этого вида при более продолжительных сезонных сборах возможны практически по всей территории. Тем не менее, его обилие очень низкое.

Кластерный анализ и ординация выборок на основе всей совокупности данных по каждому из обследованных локалитетов дали сходные результаты. Бутстреп проверка показывает слабую устойчивость формируемых кластеров. В ординационном пространстве анализируемые выборки по большей части также обособлены друг от друга. Таким образом, четко обозначенной закономерностью является только снижение разнообразия и численности шмелей по градиенту увлажнения. Выборки из подзоны очень сухой степи характеризуются весьма низким обилием и бедным видовым составом, при этом мало похожи в отношении

последнего. В подзоне умеренно сухой степи шмели в целом более обильны. Видовой состав на привлекательных для фуражировки участках сходный, но соотношение видов по обилию довольно разнообразно. В подзоне типичных степей численность и разнообразие шмелей значительно выше, чем в сухостепной части. В районах развития колючей степи (Александровский, Троицкое) отмечены самые высокие показатели разнообразия в отношении видового богатства и полидоминантности. При этом на сходных участках группировки фуражиров по видовому составу и структуре доминирования довольно однородны. Близкий облик имеют сообщества шмелей луговых припойменных ассоциаций малых рек (Клепечиха) в южной части подзоны. Сообщества этих насекомых вблизи сосновых боров наоборот заметно различаются между собой.

Следовательно, анализ эколого-географического распределения шмелей также подтверждает описанные ранее закономерности. Кулундинские степи, за исключением хорошо дренированных речных долин и районов развития колючей степи, малоблагоприятны для обитания шмелей. По комплексу условий наиболее благоприятными для обитания шмелей являются типичные степи Кулунды, наименее — ее сухостепная часть.

Кроме того, собраны данные по распределению модельных групп насекомых в лесостепном Прииртышье и в бассейне р. Песчаная (Северный Алтай), но обработка данных материалов еще не начата.

Итак, обработанные к настоящему времени данные, собранные в ходе полевой верификации результатов, полученных на предыдущих этапах проекта, подтверждают их реальность. В первую очередь характер разнообразия модельных групп, уровень их численности и соотношение доминантов соответствуют специфике региона, т. е. выявленные ранее эколого-географические закономерности позволяют осуществлять пространственный прогноз. Четко прослеживается значение провинциальности, по крайней мере, в каждой из двух сравниваемых природных зон — степной и лесостепной, причем как на равнинах, так и в горах, причем ее проявления удастся проследить на достаточно коротких дистанциях, порядка нескольких десятков километров. Подтверждается четко выраженная пространственная (в основном внутриландшафтная) гетерогенность разных регионов, особенно горных.

6 Оценка роли и возможной интеграции геномных и хромосомных механизмов возникновения и поддержания биоразнообразия в биотах и биоценозах

Паттерн пространственно-временного становления и поддержания биоразнообразия в биотах (как совокупностях видов) и сообществах (как совокупностях особей) объясняется с

диаметрально противоположных позиций: от наложения полностью независимых и случайных событий (широко распространенные нейтралистские концепции) до детерминированных взаимодействий. Эколого-географическая дискретность при этом может играть важную роль в снижении эффективности элиминации и торможении эволюции. Сообщества могут быть представлены как сложные системы с многократно дублированными информационными каналами, обеспечивающими всевозможные связи между особями как одного, так и разных видов. В итоге каждая биота или каждый биоценоз может быть представлена не просто как мешанина из видов, а, скорее, как сборная солянка, в которой каждый (или почти каждый) элемент (фактически набор особей одного вида) важен и в которой все подобные элементы дополняют друг друга. Картину общего распределения видов и надвидовых таксонов можно представить себе как некую суперпозицию современных природных условий и эволюционной истории расселения данного таксона. При этом, как это показано рядом авторов, именно первое в значительной степени определяет границы расселения многих групп, особенно видового и родового ранга (конечно, если не учитывать палеотектонические события, приводящие к становлению крупных преград), второе же проявляется в основном в картине распределения очагов разнообразия.

Каждый биогеографический выдел, в том числе любая область повышенного разнообразия, всегда является результатом исторического и пространственного взаимодействия между биотой и географической средой. Каждый регион может быть охарактеризован как географическое, так и биологическое явление. Первое позволяет нам описать закономерности, общие для различных групп живых существ и их группировок [62–64]. Второе дает возможность подчеркнуть экологические и исторические различия между биотами [63, 65]. Выделение регионов и их групп, отражающее дифференциацию биосферы, создает основу как для пространственного прогноза [66], так и для установления картины их вероятного развития, определяемого пространственной организацией эволюции.

Характер биологической формы движения материи — необратимость временного процесса в пространстве — определяет заметную роль пространственной организации биосферы в эволюционном становлении разнообразия. Это признается большинством исследователей, но обычно или биота "отрывается" от географической оболочки и ее эволюции [62 и др.], или же значение географического пространства преувеличивается [63]. Однако выделяемые в биогеографии регионы и области повышенного разнообразия — это основа не только для статичного пространственного прогноза [64], но в известной мере и для выявления перспектив, определяемых на основе установленных закономерностей пространственной организации эволюционного процесса [65, 66]. Общий характер размещения областей повышенного разнообразия и эндемизма того или иного таксона

демонстрирует распределение географических районов, особенно подходящих для существования значительного числа его представителей и обеспечивающих возможность их определенного пространственно-временного (а в некоторых случаях даже функционального) взаимодействия как внутри локальных биот, так и сообществ.

Выбранные **основные модельные таксоны** характеризуются:

- 1) широким распространением в Палеарктике,
- 2) расселением по разнообразным ландшафтам,
- 3) сочетанием видов с обширными ареалами и эндемиков с очень ограниченным распространением,
- 4) хорошей выраженностью областей разнообразия,
- 5) сочетанием массовых видов и редких, малочисленных форм,
- 6) хорошей изученностью с точки зрения биогеографии, экологии, генетики, в том числе в цитогенетическом и молекулярно-генетическом аспектах.

В первую очередь это триба пшеницевые (*Triticeae*), включающая более 20 родов, распространенных преимущественно во внетропических районах Северного полушария. Данный таксон хорошо изучен в первую очередь потому, что включает значительное число видов, введенных в культуру, в первую очередь это представители родов пшеница и ячмень. Хорошо выражены области разнообразия, многочисленны узкоареальные эндемики. С эволюционной точки зрения крайне интересно наличие большого числа гибридогенных видов. В целом распределение диких видов трибы достаточно своеобразно: четко выраженная приуроченность к внетропическим регионам, особенно к полосе Средиземноморье – Центральная Азия, но есть ярко выраженные связи с умеренными широтами Южного полушария. Значительное разнообразие в районах формирования земледельческих культур и четкие проявления гомологической изменчивости, в том числе по признакам, важным для использования в земледелии, привело к тому, что в разных районах Земли в культуру введены многие представители данной трибы.

Затем это саранчовые — надсемейство *Acridoidea* из отряда прямокрылых насекомых (*Orthoptera*), имеющие иной характер распределения: большая часть распространена в экваториальном и тропических поясах. Хорошая представленность во внетропических районах, особенно в травянистых ландшафтах, сочетание видов с эруптивным типом динамики популяций (возможных вредителей) и крайне редких форм, хорошая изученность делает эту группу весьма подходящей для исследований в данном направлении. В надсемейство входят трибы, распространение которых в значительной степени или полностью ограничено Голарктикой. Зарегистрированные подсемейства и трибы саранчовых по характеру распространения более разнообразны. Хотя их большинство также связано с

субтропическими, тропическими и экваториальными регионами, особенно Старого Света, отчетливо выделяются таксоны, органиченные преимущественно аридными и субаридными областями Центральной Азии, Западной Азии, в том числе ее горными массивами, областью так называемого Древнего Средиземья, простирающейся от западной части собственно Средиземноморья до Джунгарии и Кашгарии. В целом очевидно нарастание разнообразия саранчовых с севера Западной Сибири на юг и юго-восток, где в Средней Азии, особенно в горах, и на юге Дальнего Востока России зарегистрировано наибольшее число как родов, так и видов. В общем виде характер распределения областей повышенного разнообразия и очагов эндемизма надвидовых таксонов соответствует картине, отражающей на земной поверхности (в пределах внетропической Евразии) распространение всех прямокрылых: (1) нарастание видового богатства и дифференцирующей роли природных рубежей с севера на юг; (2) приуроченность большинства форм к открытым ландшафтам; (3) детерминированность границ ареалов преимущественно современными природными условиями.

Наконец, это подсемейство полевковые (*Arvicolinae* = *Microtynae*), напоминающее трибу пшеницевых по характеру расселения и разнообразию родов. Группа также изучена весьма хорошо, в том числе с цитогенетической и молекулярно-генетической точек зрения. Однако среди них не известны виды, расселенные в Южном полушарии, а во-вторых, есть таксоны, встречающиеся в бореальных районах. Интересно присутствие многочисленных форм, в том числе родов, ограниченных в распространении Сино-Тибетскими горами и Гималаями. Есть и своеобразные горные эндемики, например, Динарских Альп.

Следовательно, все модельные группы характеризуются ярко выраженными очагами разнообразия во внетропических районах. Часть из них находится в пределах России и сопредельных стран. Это делает их особенно удобными для эволюционно-географических и эколого-эволюционных обобщений.

Оценим роль геномных и хромосомных механизмов возникновения и поддержания биоразнообразия в биотах и биоценозах на примере, очевидно, самой изученной группы, а именно прямокрылых насекомых.

Как было показано на предыдущих этапах проекта, во внетропической Евразии выделяется 13 основных и не менее 11 дополнительных областей повышенного разнообразия и эндемизма прямокрылых насекомых. Для основных областей свойственны эндемичные и субэндемичные роды, а также более или менее значительное число эндемичных видов, для дополнительных — не менее двух эндемичных/субэндемичных видов. Бросается в глаза приуроченность основных очагов эндемизма к высоким окраинным хребтам, которые часто отделены друг от друга глубокими долинами. В целом же подтверждается преобладающая роль в дифференциации разнообразия орогенетических и эрозионных процессов.

Велика корреляция числа эндемичных таксонов и площади области повышенного разнообразия и эндемизма. Это показывает более или менее равномерность плотности распределения эндемичных таксонов (т. е. их числа на единицу площади). Значимые корреляции также выявлены для таких взаимосвязанных факторов, как средняя широта и средняя годовая температура. Однако здесь прослеживаются явные отличия от общей картины распределения видов, поскольку почти все основные области повышенного разнообразия во внетропической Евразии находятся в пределах полосы, идущей по самому югу умеренного пояса и субтропикам. Отсутствие корреляций с годовыми суммами осадков и средней долготой демонстрирует возможности прямокрылых в освоении как гумидных, так и аридных (в том числе внутриконтинентальных) регионов. Отсутствие корреляции со средними температурами самого холодного месяца — об известной возможности переживания зимы в состоянии диапаузы (главным образом на стадии яйца). Интригует почти полное отсутствие связей со сложностью рельефа, характером растительного покрова и разорванностью суши.

Диплоидные числа хромосом возрастают с севера на юг. Значения для областей высокого разнообразия в целом соответствуют средним величинам для тех природных зон, в пределах которых они преимущественно располагаются. Явно более сложный характер распределения демонстрирует средняя частота хиазм. При среднем по региону значении 16,02 этот показатель значительно снижается в зоне полупустынь и резко увеличивается при переходе к пустыням. Области повышенного разнообразия могут быть разделены на три группы. Большинство опять-таки сходно с соответствующими природными зонами в целом. Вторая группа включает три области (Восточное Средиземноморье, горы Средней Азии и Наньшань), средние частоты хиазм здесь существенно выше. Здесь также достаточно обычны эндемичные таксоны, хорошо дифференцирующиеся по нуклеотидным последовательностям митохондриальной ДНК. Третья группа объединяет Туранскую равнину, Восточное Забайкалье, Горный Алтай, а также Туркмено-Хорасанские горы. В этих районах средние частоты хиазм ниже зональных. Можно предполагать, что это результат «реликтовости» части местных эндемиков, их унаследованность от когда-то существовавших фаун. В степных и полупустынных регионах большая часть видов, несомненно, принадлежит к типу со значительной и континуальной изменчивостью, что, вероятно, отражает высокую микромозаичность местных местообитаний. Аналогичная картина выявлена для аридных районов Монголии и Северного Китая, для которых типично господство каменистых пустынь, характеризующихся варьированием микростадий. Характерные для этих территорий саранчовые из трибы *Bryodemini* хорошо обособлены по митохондриальной ДНК от других представителей подсемейства *Oedipodinae*. В пустынных областях Средней Азии (в том числе

в местных горных системах) и в смешанных и широколиственных лесах среда обитания саранчовых, по-видимому, более однородна. Кроме того, можно предполагать, и узость экологических ниш основной части видов, особенно эндемиков.

Следовательно, анализ характера изменчивости изученных признаков саранчовых в районах высокого многообразия и за их пределами (в пределах территории внетропической Азии) показывает выраженность только достаточно слабых тенденций. Первая из них — незначительное увеличение средних значений показателей, характеризующих степень рекомбинационного обмена (числа хромосом и частоты хиазм) с севера на юг, т. е. от менее теплообеспеченных районов к более теплым и даже жарким. Вторая — проявления некоторых различий между областями повышенного разнообразия: часть из них характеризуется высокими частотами хиазм и незначительной фенотипической изменчивостью (в первую очередь Восточное Средиземноморье и горы Средней Азии), другие — низкими частотами хиазм и высокой фенотипической изменчивостью (степные и полупустынный очаги). Остальные же области повышенного разнообразия по изученным показателям фактически не отличаются от фоновых значений для соответствующих природных зон.

Попытка сопоставить распределение тех же параметров и распределение обилия изученных в этой точки зрения видов в зональных сообществах прямокрылых Палеарктики показало отсутствие каких-то четко выраженных корреляций.

Возможные эколого-географические механизмы поддержания биоразнообразия. Анализ размещения популяционных группировок на зональном и региональном уровнях дает возможность выделить наиболее общие пространственные закономерности и показать роль эколого-географических рубежей в дифференциации как популяций, так и фаун [67-70]. Ранее было показано, что в пределах внетропической Азии зонально-ландшафтное распределение популяционных группировок прямокрылых может быть описано в виде большой схемы зональной смены местообитаний [71]. Оптимальна для этих насекомых степная зона, южнее и севернее усиливается дифференциация водораздельных и плакорных популяций. Для тайги и тундр наиболее типична приуроченность поселений прямокрылых к суходольным лугам, в том числе антропогенным, а аридных регионах наблюдается тенденция смещения популяций в долины. Продемонстрировано, что основные фаунистические регионы характеризуются определенными особенностями в распределении популяций в их пределах, а внутрирегиональным границам часто соответствуют четко выраженные перестройки в пространственном размещении поселений видов [67-68]. Тогда возникает вопрос о характере расселения внутри биогеографического выдела минимального ранга, не пересеченном явными фаунистическими границами, т. е. практически в пределах территории, соответствующей минимальному биогеографическому выделу [72] и занятой так называемой элементарной

фауной [71]. Как в таком регионе совмещаются популяции разных видов, в том числе экологически близких? Нельзя ли использовать распределение популяций для проведения границ внутри такого участка?

Для решения поставленной задачи рассмотрим распределение популяционных группировок по стоковым сериям, или катенам, в бассейне небольшой реки (до 100 км). Обычно такие бассейны лежат внутри территории конкретной фауны и, соответственно, не пересекаются внешними границами ареалов. Хотя некоторые особенности такого распределения ясны из статей Стебаева и др. [73] и Сергеева [68], проанализируем данные, полученные на специально изученных ключевых участках. Последние были заложены во всех основных фаунистических подобластях внетропической Евразии: Маньчжурской (1 участок), Скифской (4) и Сахаро-Гобийской (6). На каждом из них проводились учеты на нескольких профилях, пересекающих долину реки в разных ее частях [67, 71].

Рассмотрим в качестве примера участок у г. Камень-Рыболов, расположенный в Приханкайском фаунистическом районе. Здесь хорошо представлены как неморальные, так и лесостепные прямкрылые. Анализируемый бассейн включает низкогорья, покрытые дубовыми лесами с полянами, широкую луговую подгорную равнину с редкостойными дубняками и приозерную сырую низменность.

Для классификации прямкрылых по особенностям размещения их поселений использована, во-первых, приуроченность максимальных значений плотности к той или иной части долины и определенным местообитаниями, а во-вторых, наличие ограничения в размещении поселений внутри изученного речного бассейна.

Местных прямкрылых можно разделить на 5 групп (рис. 1):

1. Виды, тяготеющие к полянам и опушкам, а также залесенным участкам низкогорий (всего 15), распространены локально. Их численность невелика (2–10 экз./ч). Подобные формы могут довольно активно осваивать речную долину в ее горной части. Многие из них заходят в самую верхнюю часть подгорной равнины, а некоторые здесь также проникают в долину (*Oecanthus longicaudus* Matsumura, *Gampsocleis ussuriensis* Adelung, *Phaneroptera falcata* (Poda)). Большинство видов принадлежит к гербиколам (саранчовые *Prumna* spp., *Podismopsis* spp.). Хорошо представлены и арборикола (*Phaneroptera falcata* (Poda), *Oecanthus longicaudus* Matsumura, *Megaulacobothrus aethalinus* (Zubovsky)). В местных агроценозах такие прямкрылые не найдены. В группу входят: *Phaneroptera falcata* (Poda), *Atlanticus brunneri* (Pylnov), *Gampsocleis ussuriensis* Adelung, *Teleogryllus infernalis* (Saussure), *Oecanthus longicaudus* Matsumura, *Tetrix subulata* (Linnaeus), *Prumna primnoa* (Fischer de Waldheim), *P. tristis* (Mistshenko), *P. primnoides* Ikonnikov, *Euthystira japonica* (I. Bolivar), *Podismopsis*

ussuriensis Ikonnikov, *P. genicularibus* (Shiraki), *Arcyptera albogeniculata* Ikonnikov, *Megaulacobothrus aethalinus* (Zubovsky), *Celes skalozubovi* Adelung.

| | низкогорья | верхняя часть подгорной равнины | средняя часть подгорной равнины | нижняя часть подгорной равнины | приозерная низменность | группа |
|-----------------|------------|---------------------------------------|---------------------------------------|--------------------------------------|---------------------------|--------|
| северный склон | | | | | | 1 |
| южный склон | ? | | | | | |
| равнина | | | | | | |
| верхняя терраса | | | | | | |
| нижняя терраса | | | | | | |
| пойма | | | | | | |
| северный склон | | | | | | 2 |
| южный склон | | | | | | |
| равнина | | | | | | |
| верхняя терраса | | | | | | |
| нижняя терраса | | | | | | |
| пойма | | | | | | |
| северный склон | | | | | | 3 |
| южный склон | | | | | | |
| равнина | | | | | | |
| верхняя терраса | | | ? | | | |
| нижняя терраса | | | | | | |
| пойма | | | | | | |
| северный склон | | | | | | 4 |
| южный склон | | | | | | |
| равнина | | | | | | |
| верхняя терраса | | | ? | ? | | |
| нижняя терраса | | | | ? | | |
| пойма | | | | | | |
| северный склон | | | | | | 5 |
| южный склон | | | | | | |
| равнина | | | | | | |
| верхняя терраса | | | ? | ? | | |
| нижняя терраса | | | | ? | | |
| пойма | | | | | | |

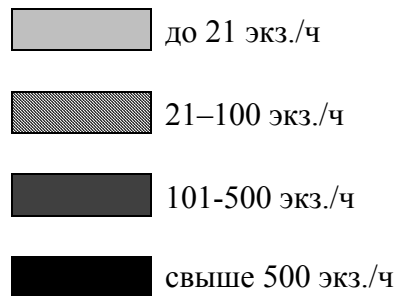


Рис. 7. Распределение поселений типичных представителей выделенных групп прямокрылых насекомых в бассейне небольшой реки на юге Дальнего Востока

2. Виды, связанные с верхними террасами горной долины (4). Их малочисленные поселения (1–2 экз./ч) обнаружены в разреженной древесно-кустарниковой растительности с обширными полянами. Половина из них — это гербиколы (саранчовые трибы *Melanoplina*), а другая — арбориколы (кузнечики *Tettigonia ussuriensis* Uvarov, *Kuwayamaea rossica* Gorochov). В других ландшафтах никто из них, кроме последнего, нами не обнаружен. В составе группы *Kuwayamaea rossica* Gorochov, *Tettigonia ussuriensis* Uvarov, *Prumna assimilis* (Mistshenko), *Anapodisma miramae* Dovnar-Zapolsky.

3. Виды, приуроченные к верхней части подгорной равнины (9), более обильны (до 32 экз./ч) и обладают в основном относительно плотными и интегрированными популяциями. Для этого ландшафта специфичен лишь *Haplotropis brunneriana* Saussure. Остальные прямокрылые обычно широко заселяют низкогорья, в том числе склоны и террасы, а также распространены в средней части подгорной равнины, хотя некоторые (*Conocephalus percaudatus* Bey-Bienko, *Glyptobothrus maritimus* Mistshenko) встречаются здесь только в поймах и на нижних террасах. Экоморфологический спектр этой группы иной — здесь преобладают терриколы (*Haplotropis brunneriana* Saussure, *Calliptamus abbreviatus* Ikonnikov, *Oedaleus infernalis* Saussure) и граминиколы, переходные к терриколам (*Omocestus haemorrhoidalis* (Charpentier), *Glyptobothrus maritimus* Mistshenko). В местные агроценозы подобные прямокрылые, судя по нашим данным, проникают слабо. Группа объединяет *Conocephalus percaudatus* Bey-Bienko, *Ruspolia jezoensis* (Matsumura et Shiraki), *Haplotropis brunneriana* Saussure, *Zubovskya koeppeni* (Zubovsky), *Calliptamus abbreviatus* Ikonnikov, *Omocestus haemorrhoidalis* (Charpentier), *Glyptobothrus maritimus* Mistshenko, *Chorthippus hammarstroemi* (Miram), *Oedaleus infernalis* Saussure.

4. Виды, тяготеющие к средней части подгорной равнины (2) — граминикол *Euchorthippus unicolor* (Ikonnikov) и террикол *Euracromius pulverulentus* (Fischer de Waldheim) — обычно широко расселены по всей равнине, заходя в низкогорья и встречаясь в поймах и на нижних террасах. Очевидно, их поселения тесно связаны друг с другом. Кроме того, обычно

высока их численность (свыше 150 экз./ч). Они заходят в агроценозы, в том числе и на поля и залежи.

5. Долинные виды (10) расселены преимущественно вдоль всей реки. Лишь некоторые (*Bryodema tuberculatum* (Fabricius)) найдены только в какой-то одной ее части. Численность их обычно невелика и не превышает 50 экз./ч. Лишь *Oxya maritima* Mistshenko в сырой приханкайской низменности достигает обилия в 663 экз./ч. В пределах долины они заселяют не только поймы, но и террасы, особенно в низкогорьях, а большинство очень разреженными поселениями встречается и на равнинах. В эту группу наряду с типичными граминиколами (*Oxya maritima* Mistshenko, *Mecostethus alliaceus* (Germar), *Conocephalus* spp.) входят и терриколы (*Bryodema tuberculatum* (Fabricius), *Tetrix japonica* (I. Bolivar)). Такие прямокрылые, как *Oxya maritima* Mistshenko понижают в агроценозы, а *Sphingonotus mongolicus* Saussure найден нами только в заброшенном карьере. Последний вид включен в группу условно, поскольку в других районах юга Дальнего Востока он является характерным обитателем галечниковых пойм. В состав группы входят *Eobiana engelhardti* (Uvarov), *Conocephalus discolor* Thunberg, *C. chinensis* (Redtenbacher), *Tetrix japonica* (I. Bolivar), *Oxya maritima* Mistshenko, *Chorthippus montanus* (Charpentier), *Stethophyma magister* (Rehn), *Mecostethus alliaceus* (Germar), *Bryodema tuberculatum* (Fabricius), *Sphingonotus mongolicus* Saussure.

Таким образом, в Приханкайском районе прямокрылые распределены по тяготению к ландшафтным выделам довольно равномерно. Большое количество видов заселяет низкогорья, их число коррелирует с невысоким обилием. Наоборот, наличие лишь двух видов, приуроченных к средним частям подгорных равнин, примечательно в связи с их сравнительно высокой численностью. Долинные же прямокрылые со средними значениями обилия широко расселены по ландшафтам.

Следовательно, общий характер распределения разнообразия таксонов носит не просто сложный характер. Полученные результаты показывают, что возможная роль геномных и хромосомных механизмов его возникновения и поддержания во многом зависит от природных особенностей каждого конкретного физико-географического региона: его зонального и секторального положения, тектонической дифференциации, ландшафтной структуры. Даже более или менее сходные территории, например, пустынные (умеренно-субтропические) или горные, оказываются разнородными с этой точки зрения. Соответственно, можно предполагать, что в одних условиях геномно-хромосомные механизмы существенны, а их вклад в поддержание разнообразия весом, тогда как в иных — они проявляют себя незначительно (либо на уровне, выходящем за пределы современного разрешения), а ведущими являются эколого-географические различия и(или) фенотипическая изменчивость.

Последние обеспечивают расхождение видов во времени и пространстве и таким образом обеспечивают их сосуществование. Очевидно, можно представить себе области, где будет прослеживаться тесное взаимодействие всех этих механизмов, однако в пределах Палеарктики они (в пределах изученного материала) пока не выявляются.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Итак, реализация проекта «Геномные и хромосомные механизмы возникновения и поддержания биологического разнообразия» в 2009–2011 гг. позволила получить следующие результаты:

На 1-м проекта:

1.1. Получены файлы в формате СУБД Paradox for Windows, содержащие структурированную информацию об мРНК 24154 генов *Homo sapiens*, 16788 генов *Mus musculus*, 17323 генов *Arabidopsis thaliana*.

1.2. Установлено, что цитоплазма дикорастущего ячменя может оказывать супрессирующее влияние на такой важный хозяйственный показатель, как «масса 1000 зерен».

1.3. Показано, что микродиссекционная ДНК проба, приготовленная из прицентромерного района аутосомы *Chorthippus apricarius*, гомологична только прицентромерному гетерохроматину этого вида. Перекрёстный FISH анализ этой ДНК-пробы с хромосомами других видов саранчовых рода *Chorthippus* и *Stauroderus* не выявил гомологии молекулярной композиции прицентромерного гетерохроматина исследованных видов. Полученные данные указывают, что прицентромерный гетерохроматин представляет собой один из наиболее лабильных компонентов генома в эволюции саранчовых подсемейства Gomphocerinae.

1.4. Выяснено, что подавление рекомбинации в инвертированном участке привело к перераспределению рекомбинационных событий также и в неинвертированных плечах гетероморфных бивалентов. Полное подавление кроссинговера в инвертированных плечах хромосом за счет негомологичного синапсиса у гетерозигот предотвращает образование дефектных хромосом. Благодаря этому у гетерозигот не снижается плодовитость, и следовательно инвертированные хромосомы не подвергаются элиминации естественным отбором.

1.5. Сформулирована гипотеза о том, что хромосомный полиморфизм в восточно-средиземноморских популяциях плавучей кобылки отличается от неравновесной модели долгосрочной эволюции, описанной для западных популяций. Динамика системы полиморфизма по добавочным хромосомам в большей степени соответствует эгоистической модели с взаимным проникновением доминантных типов добавочных хромосом между популяциями.

1.6. Анализ фрагментов последовательностей нуклеотидов у кузнечиков свидетельствует в пользу гипотезы А.В. Горохова о филогенетической близости *Bradyporinae* и *Tettigoniinae* и против точки зрения Ф. Цойнера и его последователей, считающих, что внешнее сходство кузнечиков *Bradyporinae* и *Hetrodinae* обусловлено их происхождением от общего предка.

1.7. Сравнительно-морфологический анализ осевого элемента X-хромосомы самцов 41 вида саранчовых показал, что у представителей подсемейств *Acridinae* и *Catantopinae* ось всегда линейная и короткая, в то время как в подсемействе *Locustinae* у одних видов ось прерывистая и длинная, у других — не обнаруживается совсем. Эти данные свидетельствуют об особенной молекулярной организации X-хромосомы у видов подсемейства *Locustinae* и подтверждают ранние представления систематиков о независимом статусе подсемейства *Locustinae*.

1.8. Сопоставление изученных сообществ прямокрылых лесостепных ландшафтов правобережного Приобья показывает их относительную однородность. Несмотря на то, что применение эвклидова расстояния позволяет выделить два их основных типа, а внутри одного из них — еще и несколько подтипов, различия между ними во многом определяются не соотношением видов, а уровнями их численности. Такая картина, вероятно, определяется, во-первых, сравнительной бедностью местной фауны этих насекомых, во-вторых, общей схожестью условий их обитания, а в-третьих, постоянным воздействием человека.

1.9. Обоснован выбор трех основных таксонов в качестве модельных: их принадлежность к совершенно разным, но высокоорганизованным группам живых существ (покрытосеменные растения, беспозвоночные и позвоночные животных), богатая представленность во внетропических районах Северного полушария, разнообразные, но тесные связи с антропогенными экосистемами определяют перспективность их сравнительного анализа.

1.10. В ходе полевых исследований 2009 г., проведенных в разных частях юга Палеарктики, собраны дополнительные материалы по распределению, экологии и разнообразию ряда модельных групп, а также таксонов, материалы по которым привлекаются дополнительно.

На 2-м этапе:

2.1. Показано, что в мРНК высших растений с кодонами-терминаторами UGA и UAG статистически достоверно увеличена частота встречаемости тандемных нонсенс-кодонов (UGAUAA и т. п.), тогда как мРНК растений с терминатором UAA не характеризуются такой особенностью. Выдвинуто предположение о том, что в ходе эволюции у небольшой группы

генов растений сформировался сигнал терминации трансляции, в котором содержится «запасной» стоп-кодон.

2.2. Установлено неодинаковое проявление фертильности у аллоплазматических линий мягкой пшеницы, несущих цитоплазму дикорастущего ячменя *H. marinum* subsp. *gussoneanum* и пару телоцентрических хромосом $7H^1L^{mar}$ ячменя. У аллоплазматической пшенично-ячменной замещенной линии Л-32(1) в отличие от линий Л-32(2) и Л-32(3) обнаружен крайний вариант ядерно-цитоплазматического конфликта в виде практически ее полной стерильности, что ассоциировано с наличием митохондриального 18S/5S повтора ячменного типа. Две другие аллоплазматические пшенично-ячменные дополненные линии характеризуются гетероплазмией, а у эуплазматических замещенных линий, имеющих цитоплазму пшеницы, обнаружены только пшеничные последовательности мтДНК. Сформулирована гипотеза о том, что выявление последовательностей мтДНК ячменного типа не связано с присутствием хромосом ячменя в ядерном геноме аллоплазматических замещенных линий, а 18S/5S повтор может использоваться в качестве надежного маркера для дифференциации мтДНК ячменя и пшеницы при изучении потомков ячменно-пшеничных гибридов.

2.3. С помощью FISH анализ микродиссекционных ДНК-проб В-хромосом *P. kanoi* с В-хромосомами *P. sapporensis* показаны видоспецифичные различия в организации В-хромосом.

2.4. При проведении FISH В4-пробы с различными типами В-хромосом установлено, что в гетерохроматиновых добавочных элементах не выявляется гомологии с «эухроматиновой» пробой. При гибридизации с $Ва_5$ хромосомой сигнал выявляется в трех участках хромосомы, соответствующих двум интеркалярным и одному околотеломерному С-негативным блокам. При гибридизации с Vt_{mini} хромосомой сигнал выявляется в дистальном С-негативном районе. Таким образом, преимущественно С-негативная добавочная хромосома насыщена последовательностями, характерными для эухроматиновых районов хромосом.

2.5. Оценена интенсивность рекомбинации у лисиц — 0.54 сМ/ Мб. Это значение ниже, чем таковая для собаки. Не обнаружены достоверные различия по частоте рекомбинации между лисицами из доместизируемой популяции (29.1 ± 2.6 кроссоверов на клетку) и из неселекционируемой популяции (30.0 ± 2.2); $F_{1,489} = 0.14$, $P = 0.7$).

2.6. Показано, что отсутствие синапсиса в прицентромерном гетерохроматине у темнокрылой кобылки приводит к исчезновению хиазменной интерференции через центромерный район и к независимому формированию хиазм в каждом плече. Таким образом, наличие крупных блоков прицентромерного гетерохроматина в двухплечих хромосомах,

приводит к тому, что в рекомбинационном отношении плечи ведут себя как акроцентрические хромосомы, образуя большее число хиазм, более равномерно расположенных по длине бивалента.

2.7. Продемонстрировано, что все модельные группы характеризуются ярко выраженными очагами разнообразия во внетропических районах. Часть из них находится в пределах России и сопредельных стран. Это делает их особенно удобными для эволюционно-географических и эколого-эволюционных обобщений.

2.8. Сравнительный анализ результатов классификаций сообществ наземных беспозвоночных Западно-Сибирской равнины, основанных на оценках воздушно-сухой биомассы и полученных в рамках разных подходов, показывает их неравнозначность. Классификации, базирующиеся на разных способах кластерного анализа и использующие в качестве меры сходства эвклидово расстояние, лучше отражают распределение запасов биомассы, в том числе на уровне отдельных функционально-таксономических групп. Иерархическая кластеризация позволяет создавать многогранговую систему таксонов. Фактически получающиеся схемы в какой-то степени дополняют друг друга.

2.9. Сопоставление плакорных сообществ прямокрылых насекомых Кулундинской степи показывает их ярко выраженную дифференциацию. Общая черта большинства из них – довольно высокое видовое богатство и значительные уровни обилия. В их состав обычно входят не только массовые, но и редкие виды. Расчет эвклидова расстояния и кластеризация с помощью метода Уорда позволяют расчленить все рассматриваемую совокупность на четыре типа, а внутри них – на несколько подтипов. Различия между группировками во многом определяются характером почвенно-растительного покрова. Сравнение сообществ, выявленных на одном и том же участке на протяжении ряда лет, показывает, что они могут попадать в разные классы. В первую очередь это детерминируется массовыми размножениями, особенно итальянской саранчи.

На 3-м этапе:

3.1. Определены мРНК млекопитающих, содержащие в начале белок-кодирующей части элементы стабильной вторичной структуры, которые могут выполнять функцию стресс-специфического энхансера трансляции.

3.2. Выявлена пшенично-ржаная транслокация у многочисленных линий, выделенных из сорта мягкой пшеницы Омская 37 и формы Ф-311. Отбор среди этих линий по комплексу хозяйственно-ценных и адаптивных признаков дает возможность выделить наиболее перспективные из них в качестве источников пшенично-ржаной транслокации с целью их использования в селекционной работе при получении новых сортов яровой мягкой пшеницы.

3.3. Показано, что молекулярная дивергенция исследованных хромосомных рас и субрас *Podisma sapporensis* не превышает уровня видовых отличий по исследованному гену COI. Сравнение результатов цитогенетического и молекулярного анализа популяций (хромосомных форм) *P. sapporensis* показывает, что уровень хромосомной дивергенции популяций выше уровня нуклеотидных замен в гене COI, что позволяет предполагать существование в прошлом или в настоящее время потока генов между популяциями, вопреки их кажущейся изоляции.

3.4. С использованием методов иммунофлуоресцентной локализации антител к белкам синаптонемного комплекса (SCP3) и миссматч-репарации (MLH1) проведен анализ синапсиса и рекомбинации в ооцитах мышей, гетерозиготных по парацентрической инверсии в хромосоме 1. Показано изменение соотношения синаптических конфигураций в течение пахитены: возрастание доли клеток с прямым бивалентом 1 и уменьшение доли клеток с инверсионными петлями. Выявлено повышение частоты и изменение паттерна рекомбинации по сравнению с нормальными гомозиготами. Локализованы сайты рекомбинации в прямых бивалентах в пределах инвертированного участка, полученные результаты интерпретированы в рамках модели синаптической подгонки.

3.5. Показано, что среди саранчовых, у которых обнаружены различные варианты мейотического синапсиса гомологичных хромосом и распределения в них рекомбинационных обменов, особое место принадлежит видам трибы *Brachyodemiini*. У самцов этих видов обнаружен принципиально новый тип синапсиса, начинающийся с центромерных районов. Он характерен для девяти пар хромосом. Однако проведение FISH с пробой теломерной ДНК не обнаружило сигнала в прицентромерной области этих хромосом. Две пары хромосом, в которых образование синаптонемного комплекса начинается с терминального района длинного плеча, давали сигналы гибридизации на концах обоих плеч, причем сигнал в коротком плече часто был более интенсивным.

3.6. Построена генетическая карта, отражающая популяционные особенности выборки из изолированной популяции г. Рукфен. Использование этой карты для анализа сцепления в нашей выборке будет более корректным, чем использование других карт. Выявленные блоки повышенной и пониженной рекомбинации позволят более корректно планировать исследования и интерпретировать полученные результаты.

3.7. Установлено, что многообразие и таксономическая насыщенность областей повышенного разнообразия и центров эндемизма возрастают к юго-западу и к юго-востоку внетропической Евразии. При этом отчетливо прослеживается нарастание с севера на юг дискретирующего значения меридиональных физико-географических рубежей, связанных в первую очередь с орографическими преградами и с нарастанием континентальности климата.

Очевидна определенная специфика юго-западных и юго-восточных областей. На юго-западе, т. е. в той или иной степени аридизированных районах, примыкающих к Средиземноморью, к числу самых богатых эндемичными родами и видами групп принадлежат такие таксоны, как *Bradypoginae*, *Odonturinae*, *Drymadusini*, *Pholidopterini*, *Pamphaginae*, *Melanoplinae*. В основном это короткокрылые или бескрылые формы, связанные с различными высотными поясами в горах. На юго-востоке, т. е. на муссонных территориях Восточной Азии, в основном представлены *Melanoplinae* и *Drymadusini*, а также *Mesoneurinae*. Своеобразны и области разнообразия, располагающиеся в горных системах внутреннего пространства Азии — от Тянь-Шаня до Гималаев. Здесь заметно присутствие *Bergiolini*, *Gomphomastacinae*, *Conophymatini*, а также *Hypernephini*.

Совпадение в основных чертах распределения всех прямокрылых и размещение центров разнообразия и очагов эндемизма не позволяет прямо подойти к заключению о причинах формирования наблюдаемой картины. Возможны, по крайней мере, три объяснения. Во-первых, общее нарастание благоприятности условий для *Orthoptera* к юго-западу и юго-востоку Палеарктики. Во-вторых, это различная пространственная (в основном внутриландшафтная) гетерогенность разных регионов, особенно горных. В-третьих, время существования того или иного таксона. Вероятно, они взаимосвязаны, но, очевидно, требуется конкретный анализ каждого фаунистического выдела на фоне палеогеографических данных и с учетом не просто его видового состава, но и распределением видов и популяций внутри него.

3.8. Продемонстрировано, что понимание закономерностей устройства популяционной системы того или иного вида необходимо не только для понимания его роли в экосистемах разного ранга, но и для оценки его эволюционной судьбы, а значит, для установления механизмов поддержания уровня биоразнообразия в целом и для разработки подходов к управлению популяциями массовых и редких форм. Синтез представлений о трёхмерной организации ареала, базирующихся как на эмпирических данных, так и на моделях — метапопуляционной и потенциального климатического ареала, принципах — постоянства заселяемых местообитаний и зональной смены стадий, позволяет по-другому взглянуть на освоение каждым видом эколого-географического пространства, а накопленные на протяжении последних десятилетий данные показывают, что пространственная структурированность популяционной системы любого вида во многом определяет его устойчивость и характер "поведения" в меняющейся биосфере.

Выявление характера связей, отношений сходства и различия разноранговых поселений одного вида необходимо для установления основных закономерностей пространственной организации эволюционного процесса, тогда как выяснение характера взаимоотношений популяций близких таксонов, населяющих один и тот же регион либо

ландшафт, должно привести к пониманию того, в каких конкретных условиях (регионы разного ранга, ландшафты и их выделы) и каким образом формируются, а также почему в таксоцено нередко представлены близкородственные видов, часто близкие по отношению к экологическим факторам.

Вместе с тем до сих пор мы далеки от понимания закономерностей временных изменений пространственных популяционных систем, как внутрисезонных, так и многолетних. Очевидно, что в первую очередь это определяется сложностью синхронного или почти синхронного сбора исходных данных. В результате чаще всего распределение популяций внутри ареала вида обычно характеризуется как статичное, хотя в большинстве случаев оно описывается по неоднородным материалам, накопленным в разных районах на протяжении многих лет. Такие решения в целом приемлемы для *K*-стратегов и близких к ним форм, но для *r*-стратегов, особенно с ярко выраженным эруптивным типом динамики, исследование закономерностей временного изменения насущно необходимо не только для отдельных модельных популяций, но и для их пространственных совокупностей, идеально — в пределах всего ареала. Лишь решение этой проблемы позволит создать основу для долгосрочного прогнозирования их деятельности в экосистемах. При этом недостаточно преобладающего в современных идеях о метапопуляционной динамике представления о вымирании–возникновении локальных популяций и роли миграций в упрощённом "ландшафте" из матрикса, пятен и коридоров. Во-первых, необходимо выявление динамической картины на разных уровнях организации популяционной системы вида — от демов до всего ареала. Во-вторых, нужно учитывать реальную сложность естественных и антропогенных ландшафтов, в том числе и роль человека, проявляющуюся в разных масштабах. Наконец, важно выяснение возможностей перемещения локальных популяций или их существенных частей, их слияния и разделения и оценка влияния всех изменений на развитие пространственной структуры.

3.9. Организованы полевые исследования в различных районах юга Западной Сибири (июнь 2010 г.) для сбора дополнительных данных по теме проекта.

На 4-м этапе:

4.1. Компьютерный анализ структурно-функциональной организации эукариотических мРНК показал положительную взаимосвязь между эффективностью сигнала инициации трансляции (оптимальностью или субоптимальностью нуклеотидного контекста) и присутствием эволюционно-консервативных альтернативных стартовых кодонов в начале БКП. Эти данные доказывают функциональную значимость альтернативных сайтов инициации трансляции, что дает возможность сформировать выборки альтернативных

открытых рамок считывания *Homo sapiens* и *Arabidopsis thaliana* для последующего компьютерного анализа.

4.2. Впервые показано, что в зависимости от направления скрещивания между мягкой пшеницей и рожью посевной проявляется разное состояние 18S/5S повтора мтДНК. Это позволяет использовать его в качестве маркера для детекции цитоплазмы ржи и пшеницы у растений гибридного происхождения. Полученные в результате выполненного исследования данные указывают на двуродительское наследование мтДНК при образовании ржано-пшеничных гибридов и формирующихся на их основе аллоплазматических форм мягкой пшеницы, несущих цитоплазму ржи. Достаточно высокая частота стерильности среди аллоплазматических пшенично-ржаных замещенных линий мягкой пшеницы может быть результатом ядерно-цитоплазматического конфликта. Таким образом, изученный пример показывает, что с одной стороны, перенос генов от мягкой пшеницы в геном ржи при интрогрессивной гибридизации может быть ограничен из-за меньшей пloidности ржи ($2n=2x=14$) по сравнению с мягкой пшеницей ($2n=6x=42$), а с другой – определяться особенностями митохондриального генома у ржано-пшеничных гибридов и их потомков.

4.3. Установлено, что уровень молекулярной дивергенции популяций саранчовых трибы Podismini, распространенных на юге Дальнего Востока России, островах Сахалин, Кунашир, Хоккайдо и Хонсю, а также популяций видов этой трибы, принадлежащих к родам *Sinopodisma*, *Fruhstorferiola* и *Tonkinacris*, обитающих на островах Амами, Ишигаки и Ириомото архипелага Рюкю, зависит от радиуса репродуктивной активности и давности географической изоляции популяций. Во всех выявленных случаях, полиморфизм гаплотипов не превышает уровня видовых отличий по исследованному гену COI.

4.4. Выявление сигналов MLH1 на синаптических конфигурациях В-хромосом и соответствие в характере их распределения паттерну распределений кроссоверов на А-хромосомах свидетельствует об их вовлеченности в гомологичную рекомбинацию. Не обнаружена корреляция между числом синаптических конфигураций В-хромосом и числом сайтов MLH1 на А-хромосомах ($y = 0.1x + 29.2$; $R^2 = 0.004$, $p > 0.05$). Можно предполагать, что это обусловлено длительным (более 12 млн лет) периодом коэволюции А- и В-хромосом лисицы, в результате которой В-хромосомы утратили большинство своих паразитических свойств.

4.5. Выявлен различный характер влияния добавочных хромосом на уровень рекомбинации в хромосомах основного набора разных видов саранчовых. Присутствие единственной В-хромосомы в хромосомном наборе сибирской кобылки *Aeropus sibiricus* не сказывается на частоте рекомбинации хромосом основного набора. У плавучей кобылки *Eupreocnemis plorans* присутствие В-хромосом в четном количестве не сказывается на

частоте рекомбинации, в то время как нечетное количество добавочных хромосом приводит к увеличению частоты рекомбинации хромосом основного набора.

4.6. Исследование характера распределения прямокрылых насекомых в пределах районов с экстремальными условиями (бореальная зона) позволяет выделить наиболее существенные факторы, его определяющие. Если для Orthoptera в целом ведущим из них, несомненно, является зональность, связанная в первую очередь с явно коррелирующими градиентами солнечной радиации, теплообеспеченности и продуктивности растительного покрова, то в размещении областей повышенного разнообразия и эндемизма данной группы ярко прослеживается влияние последних оледенений.

4.7. Выявлена высокая и значимая корреляция между числом эндемичных родов и видов прямокрылых насекомых во внетропической Евразии. Велика корреляция числа эндемичных таксонов и площади области повышенного разнообразия и эндемизма. Фактически это соответствует уже описанной рядом авторов картине для других групп живых существ и для других массивов суши. Такая тесная корреляция свидетельствует о более или менее равномерной плотности распределения эндемичных таксонов. Значимые корреляции также выявлены для таких взаимосвязанных факторов, как средняя широта и средняя годовая температура. Отсутствие корреляций с годовыми суммами осадков и средней долготой демонстрирует возможности прямокрылых в освоении как гумидных, так и аридных (в том числе внутриконтинентальных) регионов. Отсутствие корреляции со средними температурами самого холодного месяца — об известной возможности переживания зимы в состоянии диапаузы (главным образом на стадии яйца). Интригует почти полное отсутствие связей со сложностью рельефа, характером растительного покрова и разорванностью суши. Возможно, однако, это следствие значительного огрубления оценок этих факторов.

4.8. Показано, что пустынные эндемики и субэндемики с их сильно локализованными поселениями и невысокими численностями в агро- и урбоценозы почти не проникают. В результате сообщества прямокрылых в антропогенных ландшафтах аридных и семи-аридных районах внутренних частей Евразии гораздо более близки в различных частях региона, чем естественные. В отличие от других районов внетропической Евразии здесь редко наблюдается подъем численности прямокрылых в умеренно нарушенных местообитаниях (пастбища, залежи).

4.9. Разработана классификация сообществ прямокрылых насекомых степного юга Западной Сибири (за исключением Центрального и Юго-Восточного Алтая). В качестве меры сходства использовано эвклидово расстояние. Выделено 5 типов сообществ, два из которых могут быть разделены на таксоны низших рангов. В целом общий характер распределения сообществ прямокрылых в степях юга Западной Сибири определяется зональностью. Однако

в пределах каждой из двух представленных природных зон — степной и лесостепной, даже на равнинных территориях, достаточно очевидно влияние провинциальности. На организацию сообществ существенный отпечаток накладывают подъемы численности, особенно стадных саранчовых, в первую очередь итальянского пруса, доля которого во время вспышки массового размножения может превышать 30 %. Очевидно, что такие динамические особенности необходимо учитывать при классификации сообществ и разработке тематических карт. Кроме того, на протяжении последних 30 лет на исследуемой территории прослеживается расселение одних видов прямокрылых и исчезновение популяций других. Это приводит как к появлению новых вариантов сообществ, так и внедрению чуждых видов в ранее существовавшие сообщества.

4.9. Организованы полевые исследования в различных районах юга Западной Сибири (июль–август 2010 г.) для сбора дополнительных данных по теме проекта.

На 5-м этапе:

5.1. Показано, что открытые рамки считывания, расположенные в составе 5'-НТП или белок-кодирующей последовательности, могут кодировать изоформы белков, отличающиеся по структуре N-концевого участка (укороченные или удлиненные с N-конца). Проведенный компьютерный анализ продемонстрировал, что альтернативные изоформы белков в ряде случаев отличаются новой субклеточной локализацией. Это открывает возможности для расширения кодирующего потенциала эукариотических генов, поскольку позволяет адресовать продукт одного гена в разные компартменты клетки (например, митохондрии и цитоплазму) — таким образом сокращается число генов, необходимых для выполнения определенных функций.

5.2. На примере изучения самоопыленных потомков цитогенетически нестабильного ячменно-пшеничного амфиплоида показано, что ядерный геном мягкой пшеницы *T. aestivum* совместим с цитоплазмой дикорастущего ячменя *H. marinum subsp. gussoneanum* ($2n=28$). Это подтверждает возможность создания самофертильных аллоплазматических линий мягкой пшеницы, несущих цитоплазму этого вида ячменя. Выявлена совместимость хромосом мягкой пшеницы с хромосомами этого вида ячменя. Это предполагает образование среди полученных анеуплоидных и эуплоидных форм мягкой пшеницы чужеродно-дополненных и чужеродно-замещенных линий мягкой пшеницы, несущих индивидуальные хромосомы дикорастущего ячменя.

5.3. Анализ нуклеотидных последовательностей трёх митохондриальных генов *COI*, *COII* и *cytb* у саранчовых семейства Acrididae дал возможность построения кладограмм, отражающих дивергенцию исследованных групп на уровне триб и родов. Полученные результаты отражают позитивную перспективу использования методов анализа

нуклеотидных последовательностей и молекулярно-цитогенетических подходов к решению проблем классической систематики и филогении Orthoptera. Полученные результаты, с одной стороны, поддерживают гипотезу происхождения 21-хромосомного кариотипа в подсемействе Podisminae путем тандемной транслокации средней и мелкой пары аутосом, а с другой — дают основание предполагать наличие двух эволюционно-филогенетических ветвей в группе 21-хромосомных видов подсемейства, одна из которых представлена палеарктическими видами родов *Zubovskya*, *Anapodisma* и *Miramella*, а вторая видами родов *Sinopodisma* и *Indopodisma*, распространенных в Индо-Малайской фаунистической области.

5.4. Близкое совпадение числа рекомбинационных событий на геном и гаплоидного числа хромосом у исследованных видов полевок показывает, что функция рекомбинации у этой группы грызунов сводится к образованию в среднем одной хиазмы на бивалент, необходимой и достаточной для нормальной сегрегации гомологов. Можно полагать, что рекомбинационный процесс у данной группы видов не вносит существенного вклада в генерацию генетического разнообразия.

5.5. Показано, что в популяциях человека сигналы сцепления воспроизводятся анализом ассоциаций в местах с низкой частотой рекомбинации. Исключение составляют ситуации, когда ассоциация выявляет функциональный полиморфизм. В этом случае успех картирования не зависит от скорости рекомбинации в районе картируемого гена. Положительный сигнал сцепления может быть подтвержден анализом ассоциации только при низкой частоте рекомбинации. Молодые изолированные популяции, в которых повышено неравновесие по сцеплению, позволяют обойти это ограничение.

5.6. Анализ характера изменчивости изученных признаков саранчовых в районах высокого многообразия и за их пределами (в пределах территории внутротропической Азии) показывает выраженность только достаточно слабых тенденций:

— незначительное увеличение средних значений показателей, характеризующих степень рекомбинационного обмена (числа хромосом и частоты хиазм) с севера на юг, т. е. от менее теплообеспеченных районов к более теплым и даже жарким;

— проявления некоторых различий между областями повышенного разнообразия: часть из них характеризуется высокими частотами хиазм и незначительной фенотипической изменчивостью (в первую очередь Восточное Средиземноморье и горы Средней Азии), другие, напротив, низкими частотами хиазм и высокой фенотипической изменчивостью (степные и полупустынный очаги). Остальные же области повышенного разнообразия по изученным показателям фактически не отличаются от фоновых значений для соответствующих природных зон.

В ходе работ, проведенных на 6-м этапе реализации проекта:

6.1. Показано, что роль механизма «альтернативной трансляции», основанного на использовании нескольких стартовых кодонов в эукариотических мРНК, исследована недостаточно. В рамках проекта показано, что открытые рамки считывания, расположенные в составе 5'-НТП или белок-кодирующей последовательности, могут кодировать изоформы белков, отличающиеся по структуре N-концевого участка (укороченные или удлиненные с N-конца). Проведенный компьютерный анализ продемонстрировал, в мРНК генов животных альтернативные сайты инициации трансляции встречаются значительно чаще, чем у растений и они характеризуются высокой эволюционной консервативностью. По-видимому, этот феномен связан с большей биологической сложностью животных, для обеспечения которой их гены должны кодировать большее число структурно и функционально различных белков.

6.2. Установлено, что в процессе беккроссирования ячменно-пшеничных амфиплоидов, а затем их самоопыления, происходит изменчивость ядерного генома со стабилизацией кариотипа, близкого к типичному пшеничному ($2n = 42$). Этот процесс сопровождается встраиванием отдельных пар хромосом ячменя в геном мягкой пшеницы с образованием дополненных или замещенных генотипов. При этом состояние гетероплазмии по 18S/5S повтору мтДНК, характерное для амфиплоида, сохраняется у всех аллоплазматических линий неизменным, независимо от их цитогенетической стабильности или уровня проявления фертильности. Подтверждены ранее полученные данные о совместимости ядерного генома мягкой пшеницы с цитоплазмой дикорастущего ячменя *H. marinum*. Таким образом, при полиплоидизации ядерного генома ячменно-пшеничных гибридов *H. marinum* subsp. *gussoneanum* ($2n=28$) x *T. aestivum* ($2n=42$) и последующей редукции числа хромосом у беккроссных потомков амфиплоида состояние гетероплазмии последовательности 18S/5S митохондриального повтора сохраняется.

6.3. На основе установленных нуклеотидных последовательностей разработана оригинальная филогенетическая система короткоусых прямокрылых насекомых. Использование метода флуоресцентной *in situ* гибридизации нуклеиновых кислот (FISH) со стандартными и генерированными районспецифичными ДНК-пробами позволило более эффективно решить задачу линейной дифференциации хромосом. Выявленные сходства и различия в локализации функционально значимых повторённых последовательностях ДНК в хромосомах модельных групп прямокрылых насекомых использованы для детализации путей кариотипической эволюции. Полученные результаты отражают позитивную перспективу использования методов анализа молекулярных маркёров к решению проблем классической систематики и филогенетики Orthoptera.

6.4. Проведен сравнительный анализ частоты и распределения сайтов рекомбинации по хромосомам 12 видов полевок. Исследование было проведено на цитологических препаратах с использованием электронной и флуоресцентной микроскопии. После иммуноокрашивания белков синаптонемных комплексов (SCP3), и мисматч репарации (MLH1), который надежно маркирует точки кроссинговера. Проведена оценка относительной роли числа хромосом и хромосомных плеч, и размера синаптонемного комплекса в определении межвидовых и межпопуляционных различий в общем уровне рекомбинации. Показано, что наиболее надежным детерминантом уровня рекомбинации является число аутосом.

6.5. Обработанные к настоящему времени данные, собранные в ходе полевой верификации результатов, полученных на предыдущих этапах проекта, подтверждают их реальность. В первую очередь характер разнообразия модельных групп, уровень их численности и соотношение доминантов соответствуют специфике региона, т. е. выявленные ранее эколого-географические закономерности позволяют осуществлять пространственный прогноз. Четко прослеживается значение провинциальности, по крайней мере, в каждой из двух сравниваемых природных зон — степной и лесостепной, причем как на равнинах, так и в горах, причем ее проявления удается проследить на достаточно коротких дистанциях, порядка нескольких десятков километров. Подтверждается четко выраженная пространственная (в основном внутриландшафтная) гетерогенность разных регионов, особенно горных.

6.6. Общий характер распределения разнообразия таксонов носит не просто сложный характер. Полученные результаты показывают, что возможная роль геномных и хромосомных механизмов его возникновения и поддержания во многом зависит от природных особенностей каждого конкретного физико-географического региона: его зонального и секторального положения, тектонической дифференциации, ландшафтной структуры. Даже более или менее сходные территории, например, пустынные (умеренно-субтропические) или горные, оказываются разнородными с этой точки зрения. Соответственно, можно предполагать, что в одних условиях геномно-хромосомные механизмы существенны, а их вклад в поддержание разнообразия весом, тогда как в иных — они проявляют себя незначительно (либо на уровне, выходящем за пределы современного разрешения), а ведущими являются эколого-географические различия и(или) фенотипическая изменчивость. Последние обеспечивают расхождение видов во времени и пространстве и таким образом обеспечивают их сосуществование. Очевидно, можно представить себе области, где будет прослеживаться тесное взаимодействие всех этих механизмов, однако в пределах Палеарктики они (в пределах изученного материала) пока не выявляются.

6.7. Разработана программы внедрения результатов НИР в образовательный процесс на кафедрах цитологии и генетики и общей биологии и экологии НГУ.

В целом реализация проекта позволила установить ряд ключевых геномных и хромосомных механизмов возникновения биологического разнообразия популяций и видов животных и растений и факторов поддержания этого разнообразия в широком спектре экологических условий их обитания на основе интеграции общебиологических, эколого-географических и генетических данных — и набор решаемых для ее достижения задач. По сути, полученные данные подтверждают идею о том, что востранственная дифференциация биосферы в целом может быть своего рода эволюционным организатором.

Итак, все задачи, поставленные на последнем этапе и в рамках проекта в целом решены полностью. В исследованиях активное участие принимали молодые ученые, в том числе аспиранты, соискатели и студенты младших и старших курсов. Защищены или представлены к защите 1 докторская и серия кандидатских диссертаций. Опубликовано статьи в ведущих зарубежных и российских журналах.

Полученные результаты уже активно используются в учебном процессе (лекции по экологии, зоологии беспозвоночных, энтомологии, эволюционной теории, цитологии, практических занятиях и летних полевых практиках, разработка и совершенствование соответствующих мультимедийных курсов, подготовка курсовых работ). Разработана специальная программа внедрения полученных результатов в учебный процесс.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

- 1 Gold T. The deep, hot biosphere // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1992. Vol. 89. P. 6045-6049.
- 2 Venter J.C., Remington K., Heidelberg J.F. et al. Environmental genome shotgun sequencing of the Sargasso Sea // *Science*. 2004. Vol. 304. P. 66-74.
- 3 Чернов Ю.И. Биологическое разнообразие: сущность и проблемы // *Успехи современной биологии*. 1991. Т. 111, №4. С. 499-507.
- 4 Chase M. W., Fay M. F. Barcoding of plants and fungi // *Science*. 2009. Vol. 325. P. 682–683.
- 5 Brook B.W., Sodhi N.S., Ng P.K.L. Catastrophic extinctions follow deforestation in Singapore // *Nature*. 2003. Vol. 424. P. 420-426.
- 6 Jenkins M. Prospects for biodiversity // *Science*. 2003. Vol. 302. P. 1175-1177.
- 7 Perrings C., Naeem S., Ahrestani F., Bunker D. E., Burkill P., Canziani G., Elmquist T., Ferrati R., Fuhrman J., Jaksic F., Kawabata Z., Kinzig A., Mace G. M., Milano F., Mooney H., Prieur-Richard A.-H., Tschirhart J., Weisser W. Ecosystem services for 2020 // *Science*. Vol. 330. P. 323–324.
- 8 A guide to the Convention on Biological Diversity / IUCN. Gland and Cambridge, 1994. 161 p.
- 9 Lackey R.T. Values, policy, and ecosystem health // *BioScience*. 2001. Vol. 51, No 6. P. 437-443.
- 10 Naeem S., Chapin F.S. III, Costanza R., Ehrlich P.R., Golley F.B., Hooper D.U., Lawton J.H., O'Neill R.V., Mooney H.A., Sala O.E., Symstad A.J., Tilman D. Biodiversity and ecosystem functioning: maintaining natural life support processes // *Issues in Ecology*. 1999. No 4. P. 2-13.
- 11 Downing A., Leibold M.A. Ecosystem consequences of species richness and composition in pond food webs // *Nature*. 2002. Vol. 416. p. 837-840.
- 12 Koh, Lian Pin, Dunn R.R., Sodhi N.S., Colwell R.K., Proctor H.C., Smith V.S. Species coextinctions and the biodiversity crisis // *Science*. 2004. Vol. 305. P. 1632–1634.
- 13 Loreau M., Mouquet N., Gonzalez A. Biodiversity as spatial insurance in heterogeneous landscapes // *PNAS*. 2003a. Vol. 100. P. 12765-12770.
- 14 Kozak M. Regulation of translation via mRNA structure in prokaryotes and eukaryotes // *Gene*. 2005. Vol. 361. P. 13-37.
- 15 Кочетов А.В. Альтернативные сайты инициации трансляции и их вклад в протеом эукариотических клеток // *Молекулярная биология*. 2006. Т. 40. С. 788-795.

- 16 Kochetov A.V. Alternative translation and hidden coding potential of eukaryotic mRNAs // *BioEssays*/ 2008. Vol. 30. P. 683-691.
- 17 Lukaszewski A.J., Gustafson J.P., Apolinarska B. Transmission of chromosomes through the eggs and pollen of triticale \times wheat F1 hybrids // *Theor. Appl. Genet.* 1982. Vol. 63. P. 49-55.
- 18 Taketa S., Nakazaki T., Schwarzacher T., Heslop-Harrison J.S. Detection of a 4DL chromosome segment translocated to rye chromosome 5R in an advanced hexaploid triticale line Bronco 90 // *Euphytica*. 1997. Vol. 97. P. 91-96.
- 19 Roberts H.R. A comparative study of the Acrididae (Orthoptera) primarily on the basis of their phallic structures // *Proc. Acad. Nat. Sci. Phila.* 1941. Vol. 93, №1. P. 201-246.
- 20 Dirsh V.M. The phallic complex in Acridoidea (Orthoptera) in relation to taxonomy // *Trans. Roy. Entomol. Soc.* 1956. Vol.108, №7. P. 223-356.
- 21 Slifer E.H. The internal genitalia of female Acridinae, Oedipodinae and Pauliniinae (Orthoptera, Acrididae) // *J. Morphol.*, 1939. Vol. 65, №3. P. 437-469.
- 22 Махотин А.А. Филогенетические взаимоотношения основных групп прыгающих прямокрылых и морфология яйцеграда // *Тр. Ин-та морфол. животных.* 1953. Вып. 8. С. 5-62.
- 23 Шаров А.Г. Филогения ортоптероидных насекомых. М.: Наука, 1968. 217 с.
- 24 Брянцева И.Б. Особенности строения переднего отдела кишечника у саранчовых (Acridoidea) // *Сб. работ Ин-та прикл. зоол. и фитопатол.* 1951. Т.1. С. 23-31.
- 25 Подгорная Л.И. Анатомические особенности короткоусых прямокрылых (Orthoptera, Brachicera=Caelifera) и их систематическое взаимоотношение // *Тр. Всесоюз. энтомол. об-ва,* 1974. Т. 57. С.66-85.
- 26 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. Vol. 8. P. 89–103.
- 27 Flook P.K., Klee S., Rowell C.H. Combined molecular phylogenetic analysis of the Orthoptera (Arthropoda, Insecta) and implications for their higher systematics // *Syst. Biol.*, 1999. Vol. 48, N 2. P.233–253.
- 28 Jost M.C., Shaw K.L. Phylogeny of Ensifera (Hexapoda: Orthoptera) using three ribosomal loci, with implications for the evolution of acoustic communication // *Mol. Phylogenet. Evol.* 2006. Vol. 38, N 2. P.510–530.
- 29 Jermin L.S, Crozier R.H. The cytochrome b region in the mitochondrial DNA of the ant *Tetraponera rufoniger*: sequence divergence in Hymenoptera may be associated with nucleotide content // *Journal of Molecular Evol.* 1994. Vol. 38, No 3. P.282–294.

- 30 Zhang D.X., Hewitt G.M. Highly conserved nuclear copies of the mitochondrial control region in the desert locust *Schistocerca gregaria*: some implications for population studies // *Mol. Ecol.* 1996. Vol. 5, N 2. P.295–300.
- 31 Chapco W., Litzenberger G., Kuperus W. R. A molecular biogeographic analysis of the relationship between North American melanoploid grasshoppers and their Eurasian and South American relatives // *Molecular Phylogenetics and Evolution.* 2001. Vo. 18. P. 460-466.
- 32 Conteras D., Chapco W. Molecular phylogenetic evidence for multiple dispersal events in gomphocerine grasshoppers // *Journal of Orthoptera Research.* 2006. Vol. 15, N 1. P. 91-98.
- 33 Fries M., Chapco W., Conteras D. A molecular phylogenetic analysis of the Oedipodinae and their intercontinental relationships // *Journal of Orthoptera Research.* 2007. Vol. 16, N 2. P. 115-122.
- 34 Гуляева О.Н., Высоцкая Л.В., Сергеев М.Г. Таксономические и филогенетические отношения саранчовых (Orthoptera, Acrididae) Голарктики: новый взгляд на старые проблемы // *Евразиатский энтомол. ж.* 2005. Т.4, № 2. С. 87-94.
- 35 Bugrov A., Novikova O., Mayorov V., Adkison L., Blinov A. Molecular phylogeny of palaeartic genera of Gomphocerinae grasshoppers (Orthoptera, Acrididae) // *Syst. Ent.* 2006. Vol. 31. P.362–368.
- 36 Guryev, V., Makarevitch, I., Blinov, A. & Martin, J. Phylogeny of the genus *Chironomus* (Diptera) inferred from DNA sequences of mitochondrial cytochrome b and cytochrome oxidase I // *Molecular Phylogenetics and Evolution.* 2001. Vol. 19. P. 9–21.
- 37 Jermini L.S, Crozier R.H. The cytochrome b region in the mitochondrial DNA of the ant *Tetraponera rufoniger*: sequence divergence in Hymenoptera may be associated with nucleotide content // *Journal of Molecular Evol.* 1994. Vol.38, No 3. P. 282–294.
- 38 Thompson J.D., Higgins D.G., Gibson T.J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice // *Nucleic. Acids Res.* 1994. Vol. 11, No 22. P. 4673–4680.
- 39 Kumar S., Tamura K., Nei M.. MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment // *Brief Bioinform.* 2004. Vol.5, No 2. P. 150–63.
- 40 Saitou N., Nei M.. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees // *Mol. Biol. Evol.* 1987. Vol.4, No 4. P. 406–425.
- 41 Felsenstein J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap // *Evolution.* 1985. Vol. 39. P.783–791.
- 42 Pinkel D., Straume T., Gray J.W. Cytogenetical analysis using quantitative, high sensitivity, fluorescence hybridization // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1986. Vol. 83. P.2934-2938.
- 43 Zeuner F.E. Fossil Orthoptera Ensifera. London, 1939. 321 p.

- 44 Rentz D.C.F. 1979. Comments on the classification of the orthopteran family Tettigoniidae, with a key to subfamilies and description of two new subfamilies // Australian. Journ. Zool. Vol. 27. P. 991-1013.
- 45 Стороженко С.Ю. Отряд Orthoptera (Saltatoria) – прямокрылые (прыгающие прямокрылые) // Определитель насекомых Дальнего Востока СССР в шести томах. Ленинград, 1986. Т. 1. С. 241-317.
- 46 Бей-Биенко Г. Я. Отряд Orthoptera (Saltatoria) - Прямокрылые (Прыгающие прямокрылые) // Определитель насекомых европейской части СССР. М. - Л.: Наука, 1964. Т. I. С. 205-284.
- 47 Горохов А.В. Система и эволюция прямокрылых подотряда Ensifera (Orthoptera). Части 1 и 2 // Труды Зоол. инст. РАН, 1995. Т. 260. С. 1-224 и С. 1-213.
- 48 Nickle D.A., Naskrecki P. Recent Developments in the Systematics of Tettigoniidae and Gryllidae // The Bionomics of Grasshoppers, katydids and Their Kinds. London, 1997. P. 41-58.
- 49 Naskrecki P. The surprisingly vocal females: the phylogeny and evolution of female stridulation in katydids (Orthoptera: Tettigoniioidea) // Metaleptea (special Meeting Issue), 2001. Eighth Internation. Meet. Orthopterists' Soc. Montpellier, 2001. P. 33-34.
- 50 Uvarov B.P. Grasshoppers and locusts. A handbook of general acridology. Vol. I. Cambridge: The Cambridge Univ. Press, 1966. 481 p.
- 51 Лачининский А.В., Сергеев М.Г., Чильдебаев М. К., Черняховский М.Е., Локвуд Дж. А., Камбулин В.Е., Гаппаров Ф.А. Саранчовые Казахстана, Средней Азии и сопредельных территорий. Ларамии: Международная Ассоциация прикладной Акридологии и Университет Вайоминга, 2002. 387 с.
- 52 <http://orthoptera.speciesfile.org/Common/basic/Taxa.aspx>
- 53 Мищенко Л.Л. Саранчовые рода *Ecliphleps* Serg. (Orthoptera, Acrididae) // Энтомологическое обозрение. 1973. Т. 52. С. 94–107.
- 54 Vickery V.R. Classification of the Orthoptera (sensu stricto) or Caelifera // The Bionomics of Grasshoppers, Katydid and Their Kin (ed. by S. K. Gangwere, M. C. Muralirangan & M. Muralirangan). Faringdon, Oxfordshire: CAB International , 1997. P. 5–40.
- 55 Wilson D.E., Reeder D.M. Mammal species of the world : a taxonomic and geographic reference. Baltimore: Johns Hopkins University Press. 2005. Vol. 1-2. Xxxv + 2142 p.
- 56 Jaarola M., Martinkova N., Gunduz I. et al. Molecular phylogeny of the speciose vole genus *Microtus* (Arvicolinae, Rodentia) inferred from mitochondrial DNA sequences // Mol Phylogenet Evol. 2004. Vol. 33. P. 647-663.

- 57 Peters A.H., Plug A.W., van Vugt M.J. et al. A drying-down technique for the spreading of mammalian meiocytes from the male and female germline // *Chromosome Res.* 1997. Vol. 5. P. 66-68.
- 58 Howell W.M., Black D.A. Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method // *Experientia.* 1980. Vol. 36. P. 1014-1015.
- 59 Anderson L.K., Reeves A., Webb L.M. et al. Distribution of crossing over on mouse synaptonemal complexes using immunofluorescent localization of MLH1 protein // *Genetics.* 1999. Vol. 151. P. 1569-1579.
- 60 Pardo-Manuel de Villena F., Sapienza C. Recombination is proportional to the number of chromosome arms in mammals // *Mamm. Genome.* 2001. Vol. 12. P. 318-322.
- 61 Kleckner N., Storlazzi A., Zickler D. Coordinate variation in meiotic pachytene SC length and total crossover/chiasma frequency under conditions of constant DNA length // *Trends Genet.* 2003. Vol. 19. P. 623-628.
- 62 Емельянов А.Ф. Предложения по классификации и номенклатуре ареалов // *Энтомологическое обозрение.* 1974. Т. 53, №3. С. 497-552.
- 63 Крыжановский О.Л. К вопросу о предмете зоогеографии и методах зоогеографических исследований // *Журн. общ. биол.* 1976. Т. 37, №5. С. 762-768.
- 64 Юрцев Б.А. Флористический и фитоценологический подходы к растительному покрову: соотношение, проблемы синтеза // *Журн. общ. биол.* 1988. Т. 49, №4. С. 437-450.
- 65 Чернов Ю.И. Природная зональность и животный мир суши. М.: Мысль, 1975. 222 с.
- 66 Киселев А.Н. Прогнозное биогеографическое картографирование (региональный аспект). М.: Наука, 1985. 104 с.
- 67 Сергеев М. Г. Закономерности распространения прямокрылых насекомых азиатской части СССР: Автореф. докт. дис. / Зоологический институт РАН. СПб., 1991. 37 с.
- 68 Сергеев М. Г. Биологическое разнообразие прямокрылых насекомых Северо-Восточной Палеарктики: распределение популяционных группировок // *Сибирский экологический журнал.* 1994. Т. 1, № 6. С. 547–554.
- 69 Сергеев М.Г. Исследовательские подходы классической и современной биогеографии: вклад российских энтомологов // *Энтомологическое обозрение.* 2010. Т. 89, № 1. С. 150–177.
- 70 Sergeev M. G. Ecogeographical distribution of Orthoptera // *The Bionomics of Grasshoppers, Katydid and their Kin.* Oxon et al.: CAB Internat., 1997. P. 129–146.
- 71 Сергеев М.Г. Закономерности распространения прямокрылых насекомых Северной Азии. Новосибирск: Наука, 1986. 237 с.

72 Старобогатов Я.И. Проблема минимального выдела в биогеографии и ее приложение к фаунистической (фауногенетической) зоогеографии моря // Морская биогеография. М.: Наука, 1982. С. 12–18.

73 Стебаев И. В., Муравьева В. М., Сергеев М. Г. Специфика экологических стандартов прямокрылых (Orthoptera) в ландшафтах с травянистой растительностью на Дальнем Востоке // Энтомологическое обозрение. 1988. Т. 67, № 2. С. 241–250.