

**Филогенетические отношения саранчовых семейства
Pamphagidae с нео-XY/нео-XX определением пола,
реконструированные на основе анализа нуклеотидных
последовательностей митохондриального гена COI**

**Phylogenetic relationships of the Pamphagidae grasshoppers
with the neo-XY/neo-XX of sex determination based
on the analysis of DNA sequences in COI mitochondrial gene**

А.Г. Бугров^{*,}, И.С. Сухих^{**}, М. Унал^{***}, А.Г. Блинов^{****}
A.G. Bugrov^{*,**}, I.S. Sukhih^{**}, M. Unal^{***}, A.G. Blinov^{****}**

* Институт систематики и экологии животных СО РАН, ул. Фрунзе 11, Новосибирск 630091 Россия. E-mail: bugrov@fen.nsu.ru; bugrov04@yahoo.co.uk.

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

** Новосибирский госуниверситет, ул. Пирогова 2, Новосибирск 630090 Россия.

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

*** Университет Абант Иззет Байсал, Болу 14280 Турция. E-mail: mustafauna@gmail.com.

*** Abant İzzet Baysal Üniversitesi, Bolu TR-14280 Türkiye (Turkey).

**** Институт цитологии и генетики СО РАН, просп. Ак. Лаврентьева 10, Новосибирск 630090 Россия. E-mail: blinov@bionet.nsc.ru.

**** Institute of Cytology and Genetics, Russian Academy of Sciences, Siberian Branch, Pr. Lavrentjeva 10, Novosibirsk 630090 Russia.

Ключевые слова: саранчовые Pamphagidae, эволюция половых хромосом, митохондриальный ген COI, систематика, филогения.

Key words: Pamphagidae grasshoppers, sex chromosomes evolution, mitochondrial gene COI, systematics, phylogeny.

Резюме. Установлены нуклеотидные последовательности митохондриального гена COI для 12 видов саранчовых семейства Pamphagidae с X0/XX и нео-XY/нео-XX определением пола. Для 11 видов эти данные были получены из международного генетического банка (GenBank). Все эти нуклеотидные последовательности были использованы для построения филогенетического древа, отражающего дивергенцию исследованных видов саранчовых по выбранному молекулярному маркеру. Анализ нуклеотидных последовательностей митохондриального гена COI доказывает независимое возникновение нео-XY/нео-XX механизма определения пола в подсемействах Trinchinae и Pamphaginae семейства Pamphagidae.

Abstract. Nucleotide sequences (NS) of mitochondrial COI gene were established for 12 species of Pamphagidae grasshoppers with X0/XX and neo-XY/neo-XX sex determination. Additional COI NS from eleven Pamphagidae species were extracted from GenBank (NCBI). All NS were used for reconstruction of the phylogeny tree, which reflects the divergency of the studied grasshoppers. This analysis proves the independent origin of the neo-XY/neo-XX sex determination mechanism in the Trinchinae and the Pamphaginae subfamilies of the Pamphagidae family.

К семейству Pamphagidae относится около 600 видов, обитающих преимущественно в пустынных и полупустынных ландшафтах Африки, Европы и Азии [Uvarov, 1966; Descamps, 1972; Massa, 2013]. Это семейство далеко не самое многочисленное и разнообразное среди саранчовых, но разногласия в статусе и объёме той или иной группы весьма существенные [Storozhenko, Paik, 2011]. В данной работе мы приняли за основу таксономическую систему Pamphagidae, принятую международным Ортоптерологическим обществом [<http://orthoptera.speciesfile.org>].

В цитогенетическом плане семейство Pamphagidae одно из наименее изученных в надсемействе Acridoidea. Ранее подчёркивалась исключительная кариотипическая консервативность этой группы прямокрылых насекомых, хромосомный набор которых состоит из 19 акроцентрических хромосом у самца и 20 у самки (определение пола X0♂/XX♀) [Camacho et al., 1981; Santos et al., 1983; Cabrero et al., 1985; Mansueto, Vitturi, 1989; Vitturi et al., 1993; Warchalowska-Sliwa et al., 1994; Li et al., 2005]. Наше сравнительно-кариологическое исследование представителей этого семейства из Сибири, Сред-

ней Азии, Казахстана, Кавказа, Закавказья и Болгарии позволило опровергнуть мнение об этой группе как исключительно единообразной по структуре кариотипа. Наряду с типичными для Pamphagidae кариотипами были описаны хромосомные наборы, возникшие в результате взаимной транслокации исходно акроцентрической X-хромосомы и крупной акроцентрической аутосомы. Это приводит к тому, что формируется метацентрическая нео-X-хромосома, а одна аутосома из пары у самца становится непарной гетерохромосомой (Y-хромосомой) с образованием нео-XY♂/нео-XX♀ механизма определения пола. При этом число хромосом в диплоидном наборе становится равным 18 как у самцов, так и у самок [Бугров, 1986; Bugrov, 1996; Bugrov, Warchalowska-Sliwa, 1997; Bugrov, Grozeva, 1998].

Транслокация X-хромосомы и аутосомы спорадически встречается у тех или иных видов в каждом семействе прямокрылых насекомых [White, 1973; Hewitt, 1979; Castilio et al., 2010]. Однако исключительно редко бывает, чтобы группа видов, принадлежащих к одному роду или группе близких родов (трибе) саранчовых, обладала бы изменённым на основе описанной выше транслокации типом определения пола. Это наблюдение привело к заключению, что *de novo* возникшие системы определения пола обрезают виды прямокрылых насекомых на короткую эволюционную судьбу, не приводя к дивергенции на основе возникшей хромосомной мутации, затрагивающей половые хромосомы [Mesa et al., 2001].

Исключением из этого правила долгое время были только южноамериканские представители саранчовых подсемейства Melanoplinae [Castillo et al., 2010; Vidau et al., 2011]. Pamphagidae — новая модель эволюции гетерогаметного пола у саранчовых, отражающая разные стадии генетической дегенерации нео-Y-хромосомы [Bugrov et al., 2013; Jetybayev et al., 2013]. На пути исследования этой модели возникает вопрос о филогенетических взаимоотношениях подсемейств Trinchinae и Pamphaginae внутри семейства Pamphagidae, поскольку часть видов в каждом из этих подсемейств имеет нео-XY/нео-XX механизм определения пола [Бугров, 1986; Bugrov, 1996; Bugrov, Warchalowska-Sliwa, 1997; Bugrov, Grozeva, 1998]. Этот вопрос продиктован тем, что вероятность независимого возникновения редкой хромосомной перестройки и дивергенции на основе этой мутации групп видов в разных эволюционно-филогенетических ветвях одного семейства саранчовых оценивается как чрезвычайно малая [Vidau et al., 2011]. Целью настоящей работы является проверка данного предположения на основе анализа нуклеотидных последовательностей митохондриального гена *COI* у саранчовых семейства Pamphagidae с разными механизмами определения пола.

Выбор молекулярного маркера обусловлен тем, что ген *COI* наиболее часто используется в реше-

нии филогенетических задач и есть возможность найти нуклеотидные последовательности представителей той или иной группы насекомых в базе данных (GenBank) для сравнительного анализа.

Материалы и методы

Саранчовые семейства Pamphagidae, относящиеся к 12 видам, были отловлены в Сибири, Казахстане, Болгарии, Турции, на Кавказе и в Закавказье. Данные о принадлежности видов к надвидовым таксонам, местах сбора и механизме определения пола представлены в таблице 1.

Суммарную ДНК выделяли из фиксированных в этаноле насекомых, согласно протоколу, описанному ранее [Guryev et al., 2001]. Для амплификации фрагмента митохондриального гена *COI* использовали пару праймеров: 911 (5'-TTTCTACAAATCATAAAGATATTGG-3') и 912 (5'-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA-3') [Folmer et al., 1994]. 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/> [Altschul et al., 1990]. Множественные выравнивания нуклеотидных последовательностей были выполнены при помощи программы CLUSTAL W [Thompson et al., 1994]. Филогенетический анализ был проведён при помощи программы MEGA3.0 [Kumar et al., 2004]. Построение эволюционных деревьев проводили по методу соединения ближайших соседей [Saitou, Nei, 1987]. Достоверность полученных таким образом филогенетических деревьев оценивали методом бутстреп-анализа [Felsenstein, 1985] при количестве репликаций, равном 1000. Вычисление попарных дистанций Тамуры-Нея [Tamura, Nei, 1993] было проведено при помощи программы MEGA3.0 [Kumar et al., 2004].

Поиск нуклеотидных последовательностей гена *COI* представителей семейства Pamphagidae в базе данных GenBank производился при помощи программы BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) [Altschul et al., 1990]. Сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей, доступных в базе данных GeneBank и полученных в настоящей работе, проводился при помощи программы CLUSTAL W [Thompson et al., 1994].

Определение нуклеотидной последовательности было проведено с использованием реагента BigDye Terminator Ready Reaction Mix (Applied Biosystems) согласно протоколу производителя в

Центре коллективного пользования «Геномика» СО РАН.

Результаты

В ходе работы были установлены нуклеотидные последовательности митохондриального гена *COI* для 12 видов саранчовых семейства Pamphagidae. Эти данные помещены в международный банк данных (GenBank) (табл. 1).

Для 11 видов, у которых ранее была установлена нуклеотидная последовательность гена *COI*, дан-

ные были получены из международного генетического банка (GenBank) (табл. 1). Существенно отметить, что виды, нуклеотидные последовательности гена *COI* которых взяты из Международного генетического банка, с высоким уровнем поддержки кластеризуются с другими представителями того же вида (рис. 1: *Haplotropis brunneriana*) или рода (рис. 1: виды рода *Asiotmethis*), исследованных нами.

Все эти нуклеотидные последовательности были использованы для построения филогенетического древа, отражающего дивергенцию исследованных видов саранчовых по выбранному молекулярному

Таблица 1. Список исследованных видов саранчовых семейства Pamphagidae с указанием регионов сбора, механизма хромосомного определения пола и источника получения *COI* последовательностей

Table 1. List of the species and collecting localities of Pamphagidae grasshoppers with the mechanism of the sex chromosome determination and nucleotide sequences of mitochondrial *COI* gene

Подсемейство, триба	Вид	Регион сбора образцов	Определение пола	GenBank	Источник данных
Trinchinae	<i>Asiotmethis turritus</i> (Fischer von Waldheim, 1833)	Армения	♂neo-XY / ♀neo-XX	KF951247	Наши данные
	<i>Asiotmethis muricatus</i> (Pallas, 1771)	Западный Казахстан	♂X0 / ♀XX	KF951246	Наши данные
	<i>Asiotmethis heptapotamicus</i> (Zubovskii, 1898)	Юго-Восточный Казахстан	♂neo-XY / ♀neo-XX	KF951245	Наши данные
	<i>Asiotmethis zacharjini</i> (Bey-Bienko, 1926)	Китай, Синьцзян	♂neo-XY / ♀neo-XX	JX468876	Lang et al, 2013
	<i>Pseudotmethis rubimarginis</i> Li, 1986	Китай, Внутренняя Монголия	-	JX468878	Lang et al, 2013
	<i>Filchnerella kukunoris</i> Bey-Bienko, 1948	Китай, Ганьсу	-	JF412674	Lang et al, 2013
	<i>Filchnerella helanshanensis</i> Zheng, 1992	Китай, Внутренняя Монголия	-	JX468877	Lang et al, 2013
	<i>Filchnerella yongdengensis</i> Xi et Zheng, 1984	Китай, Ганьсу	-	JF412676	Lang et al, 2013
	<i>Rhinotmethis hummeli</i> Sjöstedt, 1933	Китай, Внутренняя Монголия	-	JF412675	Lang et al, 2013
	<i>Sinotmethis amicus</i> Bey-Bienko, 1959	Китай	-	KC140098	Huang et al, 2012, direct submission
	<i>Beybienkia songorica</i> Tsyplenkov, 1956	Китай, Ганьсу	-	JF412671	Lang et al, 2013
	<i>Eremopeza festiva</i> (Saussure, 1884)	Армения	♂X0 / ♀XX	KF951254	Наши данные
	<i>Prionotropis hystrix</i> (Germar, 1817)	Европа	-	GU122525	Moulton et al., 2010
	<i>Thrinchus schrenkii</i> (Fischer von Waldheim, 1836)	Китай, Внутренняя Монголия	-	GU181288	Zhang et al, 2011
	Pamphaginae, Haplotropiini	<i>Haplotropis brunneriana</i> Saussure, 1888	Сибирь, Забайкалье	♂X0 / ♀XX	KF951256
<i>Haplotropis brunneriana</i> Saussure, 1888		Китай, Хейлосзян	-	JF412672	Lang et al, 2013
<i>Haplotropis neimongolensis</i> Jin, 1994		Китай, Внутренняя Монголия	-	KC140096	Huang et al., 2012, direct submission
Pamphaginae, Nocarodeini	<i>Nocaracris cyanipes</i> (Fischer von Waldheim, 1846)	Кавказ, Закавказье, Армения	♂neo-XY / ♀neo-XX	KF951248	Наши данные
	<i>Paranocaracris elegans</i> Mishchenko, 1951	Турция	-	KF951249	Наши данные
	<i>Paranocaracris bulgaricus</i> (Ebner et Drenowski, 1936)	Болгария	♂neo-XY / ♀neo-XX	KF951252	Наши данные
	<i>Paranocaracris rubripes</i> (Fischer von Waldheim, 1846)	Армения	♂neo-XY / ♀neo-XX	KF951253	Наши данные
	<i>Paranothrotes opacus</i> (Brunner von Wattenwyl, 1882)	Армения	♂neo-X1X2Y / ♀neo-X1 X1X2X2	KF951255	Наши данные
	<i>Paranocarodes chopardi</i> Peshev, 1965	Болгария	♂neo-XY / ♀neo-XX	KF951250	Наши данные
<i>Paranocarodes straubei</i> (Fieber, 1853)	Болгария	♂neo-XY / ♀neo-XX	KF951251	Наши данные	
Acridinae	<i>Acrida oxycephala</i> (Pallas, 1771)	Казахстан	♂X0 / ♀XX	KC261404	Бугров и др., 2012
Oedipodinae	<i>Bryodema tuberculatum</i> (Fieber, 1853)	Сибирь, Алтай	♂X0 / ♀XX	KC261397	Бугров и др., 2012
Gomphocerinae	<i>Chorthippus angulatus</i> Serg. Tarbinsky, 1927	Казахстан	♂X0 / ♀XX	KC261381	Бугров и др., 2012

маркёру. В качестве внешней группы были избраны три вида семейства настоящих саранчовых Acrididae из разных подсемейств (табл. 1, рис. 1).

Анализ последовательностей гена *COI* у Pamphagidae показывает, что на полученном древе эта группа представляет генеральную монофилетическую совокупность таксонов по отношению к внеш-

ней группе (рис. 1). В пределах этой генеральной группы выделяется два кластера, обозначенных на рисунке римскими цифрами. Кластер I состоит, как минимум, из пяти клад, четыре из которых принадлежит подсемейству Trinchinae. Только одна ветвь из этой совокупности включает виды с нео-XY♂/нео-XX♀ механизмом определения пола. Все эти

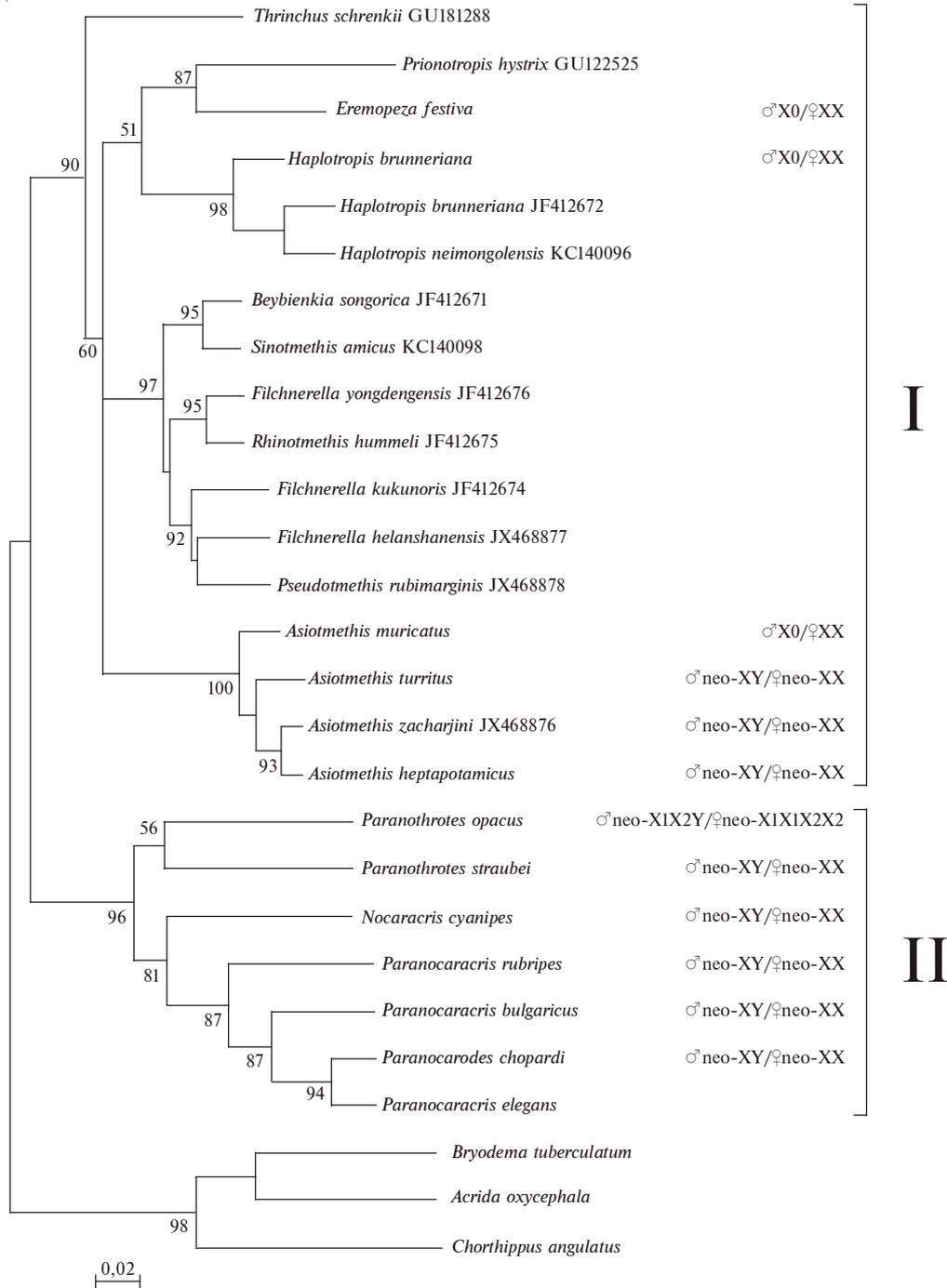


Рис. 1. Филогенетическое древо саранчовых семейства Pamphagidae, реконструированное на основе данных о нуклеотидных последовательностях митохондриального гена *COI* методом соединения ближайших соседей (Neighbor-Joining; NJ).

Fig. 1. Phylogenetic tree of the grasshoppers belonging to the family Pamphagidae, reconstructed by Neighbor-Joining method (NJ) on the basis of the nucleotide sequences of the mitochondrial *COI* gene.

виды относятся в роду *Asiotmethis* Uvarov, 1943 (рис. 1). Особое положение в кластере I занимают виды монотипического рода *Haplotropis* Saussure, 1888, принадлежность которого к Trinchinae или Pamphaginae в настоящее время дискутируется [Sergeev, 1995; Storozhenko, Paik, 2011].

Кластер II включает только представителей трибы Nocarodeini подсемейства Pamphaginae.

Обсуждение

Результаты анализа нуклеотидных последовательностей митохондриального гена *COI*, представленные на рисунке 1, поддерживают таксономическую практику большинства ортоптерологов подразделения семейства Pamphagidae на дискретные совокупности родов — подсемейства и трибы [http://orthoptera.speciesfile.org/]. Однако ранг и объём этих таксонов в современной систематике саранчовых трактуется не однозначно. Не имея репрезентативного массива молекулярных данных, мы пока не можем на этой основе включиться в дискуссию относительно филогенетической систематики семейства Pamphagidae. Отметим лишь, что анализ полученных последовательностей поддерживает представления тех таксономистов, которые выделяют в семействе Pamphagidae подсемейства Trinchinae и Pamphaginae [Шумаков, 1963; Yin, 1984; Vickery, 1997]. Вместе с тем, результаты анализа нуклеотидных последовательностей гена *COI* (рис. 1) противоречат включению трибы Haplotropiini в подсемейство Pamphaginae [Storozhenko, Paik, 2011], поддерживая мнение о принадлежности этой трибы к подсемейству Trinchinae [Sergeev, 1995].

На представленном древе (рис. 1) виды, обладающие neo-XY механизмом определения пола в результате взаимной транслокации X-хромосомы и аутосомы, оказываются в разных кластерах. Наряду с другими видами подсемейства Trinchinae, исследованные виды рода *Asiotmethis* принадлежат к одной монофилетической кладе с высоким уровнем статистической поддержки (табл. 1, рис. 1). Присутствие в роде *Asiotmethis* видов как с исходным типом определения пола X0/XX (*A. muricatus*), так и с neo-XY/neo-XX (табл. 1) позволяет высказать предположение об относительно недавнем эволюционном событии, приведшем к изменению хромосомного определения пола. В этом случае уровень дивергенции достиг лишь видового уровня. Это предположение подтверждается и малыми структурными изменениями neo-Y хромосомы по сравнению со своим гомологом — XR-плечом neo-X хромосомы [Bugrov et al., 2013; Jetybaev et al., 2013].

Представители трибы Nocarodeini подсемейства Pamphaginae составляют монофилетическую ветвь семейства Pamphagidae, все виды которой имеют neo-XY/neo-XX или neo-X₁X₂Y/neo-X₁X₁X₂X₂

(*P. opacus*) механизм определения пола (табл. 1; рис. 1). К сожалению, пока нет данных о *COI* последовательностях у Pamphaginae с исходным (X0/XX) типом определения пола, что не позволяет проследить филогенетические связи Nocarodeini. Принимая во внимание то, что представители нескольких родов Nocarodeini имеют продвинутый (neo-XY/neo-XX) тип определения пола, можно предполагать давнюю дивергенцию этой группы на основе структурной хромосомной перестройки. На этом эволюционном пути neo-Y хромосома в значительной мере утратила гомологию с XR-плечом neo-X хромосомы и для неё становятся характерны специфические черты, резко отличающие её от других хромосом набора [Bugrov et al., 2013; Jetybaev et al., 2013].

Таким образом, анализ нуклеотидных последовательностей митохондриального гена *COI* доказывает независимое возникновение neo-XY/neo-XX механизма определения пола в разных ветвях семейства Pamphagidae. При этом некоторые виды рода *Asiotmethis* в подсемействе Trinchinae демонстрируют ранние этапы эволюции neo-XY/neo-XX механизм определения пола, в то время как Nocarodeini отражают наиболее продвинутый этап. Предпринятый анализ нуклеотидных последовательностей и реконструкция на этой основе филогенетических отношений саранчовых семейства Pamphagidae с neo-XY/neo-XX механизмом определения пола не даёт оснований считать разные этапы гетероморфизации Y-хромосомы выявленные в настоящее время, начальным и более продвинутым вариантами единого эволюционного процесса, как это считалось ранее [Bugrov, Grozeva, 1998]. Полученные результаты показывают, что исходные варианты эволюции Y-хромосомы в подсемействе Pamphaginae и, в частности, в трибе Nocarodeini ещё не найдены.

Поиск новых вариантов систем определения пола и анализ последовательностей ДНК у других видов семейства Pamphagidae позволит детально проследить эволюцию Y-хромосомы и реконструировать кладогенез этой группы насекомых.

Благодарности

Авторы благодарны доктору Снежане Грозевой (Институт зоологии Болгарской академии наук, София, Болгария) за всестороннюю помощь во время совместных полевых исследований в Болгарии и за фиксацию части материала для настоящего исследования; проф. E. Warchalowska-Sliwa (Institute of Systematics and Evolution of Animals Polish Academy of Sciences) за фиксацию части материала для настоящего исследования; доктору Гаяне Карагян и доктору Марку Калашяну (Научный центр зоологии и гидроэкологии Национальной Академии наук Армении) за помощь в организации экспедиции в Армению в рамках соглашения о научном сотрудничестве между ИСиЭЖ СО РАН и ИЦ ЗИГ НАА. Работа поддержана грантом РФФИ №12-04-01233-а.

Литература

- Бугров А.Г. 1986. Нео-XY-хромосомное определение пола у саранчовых семейства Pamphagidae // Цитология. Т.28. No.1. С.117–119.
- Бугров А.Г., Смышляев Г.А., Блинов А.Г. 2012. Реконструкция филогенетических отношений настоящих саранчовых (Orthoptera, Acrididae) на основе анализа нуклеотидных последовательностей митохондриального гена *COI* // Евразийский энтомологический журнал. Т.11. No.6. С.493–502.
- Шумаков Е.М. 1963. Саранчовые Афганистана и Ирана // Труды ВЭО. Т.49. С.3–248.
- Altschul S.F., Gish W., Miller W., Myers E.W., Lipman D.J. 1990. Basic local alignment search tool // Journal of Molecular Biology. Vol.215. P.403–410.
- Bidau C.J., Dardo A.M., Castillo E.R. 2011. Inexorable spread: inexorable death? The fate of neo-XY chromosomes of grasshoppers // Journal of Genetics. Vol.90. No.3. P.1–4.
- Bugrov A.G. 1996. Karyotypes of the short-horned Orthopteran insects (Orthoptera, Caelifera) from Russia, Kazakhstan, Central Asia, and the Caucasus // Folia Biologica. Krakow. Vol.44. Nos 1–2. P.15–25.
- Bugrov A.G., Jetybayev I.E., Rubtsov N.B. 2013. Using molecular markers in comparative cytogenetics of Pamphagidae grasshoppers with different types of the sex chromosome determination // Orthoptera in scientific progress and human culture. Abstracts of 11th International Congress of Orthopterology, 11th–15th August, 2013. Kunming, China. P.186–186.
- Bugrov A., Grozeva S. 1998. Neo-XY chromosome sex determination in four species of the pamphagid grasshoppers (Orthoptera, Acridoidea, Pamphagidae) from Bulgaria // Caryologia. Vol.51. No.2. P.115–121.
- Bugrov A.G., Warchalowska-Sliwa E. 1997. Chromosome numbers and C-banding patterns in some Pamphagidae grasshoppers (Orthoptera, Acridoidea) from the Caucasus, Central Asia, and Transbaikalia // Folia Biologica. Krakow. Vol.45. Nos 3–4 P.133–138.
- Cabrero J., Camacho J.P.M., Pascual F. 1985. Cytotaxonomic studies on pamphagids genus *Eumigus*. Detection of two chromosomal races in *E. monticola* (Rambur) (Insecta, Orthoptera) // Caryologia. Vol.38. No.1. P.1–12.
- Camacho J.P.M., Cabrero J., Viseras E. 1981. C-heterochromatin variation in the genus *Eumigus* (Orthoptera, Pamphagoidea) // Genetica. Vol.56. No.3. P.185–188.
- Castillo E.R.D., Bidau C.J., Marti D.A. 2010. Neo-sex chromosome diversity in neotropical melanopline grasshoppers (Melanoplineae, Acrididae) // Genetica. Vol.138. P.775–786.
- Descamps M. 1972. Geographical regions and taxonomic groups of Acridomorpha in need of study // Proceeds International Study Conference Current and Future Problems of Acridology. London. 6–16 July 1970. P.9–20.
- Felsenstein J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap // Evolution. Vol.39. P.783–791.
- Folmer O., Black M., Hoeh W., Lutz R., Vrijenhoek R. 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates // Molecular Marine Biology and Biotechnology. Vol.3. No.5. P.294–299.
- Guryev V., Makarevitch I., Blinov A., Martin J. 2001. Phylogeny of the genus *Chironomus* (Diptera) inferred from DNA sequences of mitochondrial cytochrome b and cytochrome oxidase I // Molecular Phylogenetics and Evolution. Vol.19. No.1. P.9–21.
- Hewitt G.M. 1979. Grasshoppers and cricket // Animal cytogenetics. Vol.3: Insecta I, Orthoptera. Berlin-Stuttgart: Gebruder Borntraeger. 170 p.
- Jetybayev I.E., Bugrov A.G., Bogomolov A., Rubtsov N.B. 2013. Toad grasshoppers (Pamphagidae, Orthoptera) as a new model of sex chromosome evolution // 19th International Chromosome Conference. Bologna. 2nd–6th September 2013. P.68.
- Kumar S., Tamura K., Nei M. 2004. MEGA3: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment // Briefings in Bioinformatics. Vol.5. No.2. P.150–163.
- Lang L., Song W.W., Zhao X.Y., Wen C.J., Zhang D.C. 2013. Molecular phylogeny of Pamphagidae (Orthoptera, Acridoidea) from China based on mitochondrial cytochrome oxidase I sequences // Orthoptera in scientific progress and human culture. Abstracts 11th International Congress of Orthopterology. 11th–15th August 2013. Kunming, China. P.74–78.
- Li X.J., Zhang D.C., Wang W.Q. 2005. Chromosomal C-banding karyotype of 2 species of genus *Asiotmethis* (Acridoidea: Pamphagidae) from China // Yi Chuan. Vol.27. No.5. P.735–740. [In Chinese].
- Mansueto C., Vitturi I.R. 1989. NORs location and C-banding pattern in spermatogenesis of *Pamphagus ortholanii* (Orthoptera, Acrididae) // Caryologia. Vol.42. Nos 3–4. P.303–311.
- Massa B. 2013. Pamphagidae (Orthoptera: Caelifera) of North Africa: key to genera and the annotated check-list of species // Zootaxa. Vol.3700. No.3. P.435–475.
- Mesa A., Fontanetti C.S., Garsia Novo P. 2001. Does an X-autosome centric fusion in Acridoidea condemn the species to extinction? // Journal of Orthoptera Research. Vol.10. P.141–146.
- Moulton M.J., Song H., Whiting M.F. 2010. Assessing the effects of primer specificity on eliminating numt coamplification in DNA barcoding: a case study from Orthoptera (Arthropoda: Insecta) // Molecular Ecology Resources. Vol.10. P.615–627.
- Saitou N., Nei M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees // Molecular Biology and Evolution. Vol.4. No.4. P.406–425.
- Santos J.L., Arana P., Giraldez R. 1983. Chromosome C-banding patterns in Spanish Acridoidea // Genetica. Vol.61. No.1. P.65–74.
- Sergeev M.G. 1995. The general distribution of Orthoptera in the eastern parts of the Saharan-Gobian and Scythian subregion // Acta Zoologica Cracoviensia. Vol.38. No.2. P.213–256.
- Storozhenko S.Yu., Paik J.-Ch. 2011. Review of the genus *Haplotropis* Saussure, 1888 (Orthoptera: Pamphagidae), with notes on classification of the subfamilies Pamphaginae and Trinchinae // Zootaxa. Vol.2897. P.27–34.
- Tamura K., Nei M. 1993. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees // Molecular Biology and Evolution. Vol.10. No.3. P.512–526.
- Thompson J.D., Higgins D.G., Gibson T.J. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice // Nucleic Acids Research. Vol.11. No.22. P.4673–4680.
- Uvarov B.P. 1966. Grasshoppers and locusts. A handbook of general acridology. V.I. Cambridge: The Cambridge University Press. 481 p.
- Vickery V.R. 1997. Classification of the Orthoptera (sensu stricto) or Caelifera // Gangwere S.K., Muralirangan M.C., Muralirangan M. (Eds): The Bionomics of Grasshoppers, Katydid and their Kin. Cambridge University Press. P.5–40.
- Vitturi R., Mansueto C., Ficarella P. 1993. Heterochromatin variation in four species of the genus *Pamphagus* (Orthoptera: Pamphagidae) analyzed by C-banding // Biologisches Zentralblatt. Bd.112. P.335–341.
- Warchalowska-Sliwa E., Maryanska-Nadachowska A., Massa B. 1994. Some new data on C-bands and NORs in three species of Pamphagidae (Orthoptera) // Folia Biologica. Krakow. Vol.42. No.1. P.13–18.
- White M.J.D. 1973. Animal Cytology and Evolution. 3rd edition. London: Cambridge University Press. 961 p.
- Yin X.C. 1984. Grasshoppers and locusts from Qinghai-Xizang Plateau of China. Beijing: Science Press. 287 p.
- Zhang D., Zhi Y., Yin H., Li X., Yin X. 2011. The complete mitochondrial genome of *Thrinchus schrenkii* (Orthoptera: Caelifera, Acridoidea, Pamphagidae) // Molecular Biology Reports. Vol.38. P.611–619.