

ПОПУЛЯЦИОННАЯ ГЕНЕТИКА КОЛОРАДСКОГО ЖУКА: ОТ ГЕНОТИПА ДО ФЕНОТИПА

М.Б. Удалов, Г.В. Беньковская

Учреждение РАН Институт биохимии и генетики УНЦ РАН, Уфа, Россия,
e-mail: udalov-m@yandex.ru

Работа посвящена исследованиям, проведенным на популяционном материале колорадского жука. Представлены данные по изучению ДНК, хромосомных, белковых и фенетических маркеров полиморфизма. Приведены сведения о распределении частот встречаемости мутаций, обуславливающих формирование резистентности колорадского жука к инсектицидам. Показана возможность использования молекулярно-генетических методов в оценке уровня неспецифической устойчивости. На основании имеющихся на данный момент данных по полиморфизму колорадского жука обсуждается вопрос его политипичности.

Ключевые слова: колорадский жук, *Leptinotarsa decemlineata* Say, полиморфизм, популяция, кариотип, ДНК, резистентность к инсектицидам, мутации, фенетика.

История формирования современного ареала

Центром происхождения колорадского жука (*Leptinotarsa decemlineata* Say) считают территорию, ограниченную восточными склонами Скалистых гор и северными районами современной Мексики. Здесь произрастают ксерофитные паслёновые (*Solanum rostratum*, *S. cornutum*, *S. carolinense*, *S. angustifolium* и др.), на которых развивается несколько десятков видов жуков рода *Leptinotarsa*, в том числе и *L. decemlineata* (Колорадский картофельный жук ..., 1981; Alyokhin, 2009). Вегетативный период в этой аридной климатической зоне непродолжителен, развитие насекомых-фитофагов длится недолго, вследствие чего их популяции редко достигают значительной численности (Колорадский картофельный жук ..., 1981).

На данный момент нет определенного мнения относительно возраста вида. Имеются предположения о молодости рода *Leptinotarsa* и о том, что ряд видов, в том числе и *L. decemlineata*, дифференцировались недавно. Согласно одной из версий, это произошло в конце XVII–начале XVIII вв. (Tower, 1906). Более правдоподобной кажется точка зрения Р.С. Ушатинской, считавшей, что становление колорадского жука

как вида шло в антропогене, возможно, даже в голоцене (Колорадский картофельный жук ..., 1981). К сожалению, скудные молекулярно-генетические данные пока не позволяют нам судить о возрасте вида (хотя бы приблизительно).

Культурный картофель *S. tuberosum* зародился на Южноамериканском континенте, в Андах, на территории современных Перу и Чили. В Северную Америку картофель завезли только в 1719 г. (Колорадский картофельный жук ..., 1981). Таким образом, формирование *L. decemlineata* как вида шло без взаимодействия с *S. tuberosum*.

Усилившиеся в начале XIX в. миграции населения способствовали переносу дикорастущих пасленовых и расширению ареала многих питающихся ими насекомых. Однако наибольшее преимущество получил вид *L. decemlineata*. В связи с развитием земледелия и освоением западных районов Северной Америки в 40-х годах XIX столетия началось продвижение культурного картофеля *S. tuberosum* на запад. К середине XIX в. плантации картофеля достигли штата Колорадо и распространились вдоль склонов Скалистых гор, где в то время обитал *L. decemlineata*. Первые значительные повреждения картофеля этим жуком были отмечены в штате Небраска в 1855 г. Но особенно большой

ущерб картофелеводству был нанесен в 1859 г. в штате Колорадо, откуда и началось интенсивное расселение жука, получившего название *колорадский картофельный жук* (Яковлев, 1950; Колорадский картофельный жук ..., 1981; Alyokhin, 2009).

Переход колорадского жука на культурный картофель способствовал его интенсивному размножению и расселению, и вскоре жук приобрел значение опасного вредителя культуры картофеля.

После того как в 1874 г. жук, преодолев все преграды на Американском материке, достиг побережья Атлантического океана, возникла реальная опасность завоза его и на другие континенты. Особую опасность этот вредитель представлял для Европы с ее обширными плантациями картофеля и развитыми сетями дорог и мореплаванием. Поэтому карантинной службой торгующих стран был установлен строгий досмотр кораблей, грузов и портов.

Первый незамеченный очаг на Европейском континенте появился у берегов Франции. Предполагается, что в 1916–1918 гг. жук был случайно завезен на американских судах во французский порт Бордо; несмотря на немедленно принятые меры по ликвидации очагов его распространения, уничтожить вредителя полностью не удалось (Feuetaud, 1950). В последующие годы началось расселение колорадского жука на новом для него континенте. Расширение ареала колорадского жука на Европейском континенте шло не только в восточном, в сторону преобладающих ветров, но и в северо-восточном и юго-восточном направлениях; совсем незначительным было продвижение вредителя в северном, южном и юго-западном направлениях (Колорадский картофельный жук ..., 1981).

На территории бывшего СССР первые очаги колорадского жука были отмечены в 1949 г. в Львовской области, но были ликвидированы (Яковлев, 1960; Санин, 1976). Вторичные массовые залеты жука стали происходить с 1953 г. До 1958 г. очаги на территории СССР носили изолированный характер, были малочисленны и ликвидировались. Интенсивное распространение колорадского жука с захватом больших новых территорий наблюдалось в 1975 г., когда заселенная вредителем площадь картофеля составляла 5,35 млн га. Средняя ско-

рость распространения жука на восток в нашей стране в 1975–1977 гг. составляла 50–100 км в год и выше (Колорадский картофельный жук ..., 1981).

Ареал вида за 150 лет расширился более чем в 3 тыс. раз (Фасулати, 2007). На 2009 г. ареал *L. decemlineata* в Северной Америке, Европе и Азии составлял более 16 млн км² (Alyokhin, 2009) против первоначальных 5 тыс. км² (Hare, 1990).

Колорадский жук характеризуется значительным внутривидовым полиморфизмом и экологической пластичностью (Колорадский картофельный жук ..., 1981; Фасулати, 2002). Согласно современному взгляду на популяцию как на единицу эволюции и одновременно единицу управления видами (Яблоков, 1987), очевидна необходимость изучения этого инвазивного вида на популяционном уровне.

Основу для популяционных исследований дает анализ полиморфизма. Развитие понятия «полиморфизм» шло от определения Э. Форда, характеризующего его как «наличие в одном и том же местообитании двух или более дискретно отличающихся внутривидовых форм в таких количественных соотношениях, что самая редкая из них не может поддерживаться лишь давлением повторяющихся мутаций» (Ford, 1940). На молекулярном же уровне организации живой материи полиморфизм трактуется как «наличие в популяции двух или более аллелей одного локуса, встречающегося с ощутимой частотой» (Cavalli-Sforza, Bodmer, 1971). Чаще всего за «ощутимую частоту» принимается частота какого-либо аллеля (либо в более широком понимании какого-либо признака) $\geq 1-5\%$ (Алтухов, 2003; Динамика ..., 2004).

В данном обзоре мы рассмотрим примеры изучения полиморфизма в популяциях колорадского жука на уровне ДНК, хромосомном, белковом и фенетическом. Интересующимся данным вопросом по отношению к другим видам насекомых мы можем рекомендовать ряд как обзорных (Feyereisen, 1995; Roderick, 1996; French-Constant *et al.*, 1998, 2004; Loxdale, Lushai, 1998; Удалов и др., 2003, 2009; Li, 2007), так и практически неподдающееся учету число экспериментальных работ (Sheppard, Berlocher, 1984; Корсун, 1994; Koulianos, Crozier, 1997; Блехман, 2007; Ваулин, Захаров, 2008; Киль, Исмаилов, 2009; Ваулин, Новиков,

2010; Гундерина, Кикнадзе, 2010; Obruski *et al.*, 2001 и др.).

В последние десятилетия в связи с развитием методов молекулярной биологии появилась возможность использовать молекулярные маркеры (фрагменты ДНК) для различного рода исследований от филогении и систематики до анализа количественных признаков, внутри- и межвидового полиморфизма и т. п. В зависимости от способа получения и метода анализа выделяют несколько типов молекулярных маркеров.

Маркеры, полученные в ходе рестрикционного анализа

Метод ПДРФ (полиморфизм длин рестрикционных фрагментов, RFLP – restriction fragment length polymorphism) заключается в разрезании выделенной ДНК специальными ферментами – рестриктазами – по характерному для каждого фермента сайту рестрикции, состоящему из 4–10 пар нуклеотидов. Полученные в ходе рестрикции фрагменты ДНК разделяют в ходе электрофореза и анализируют по положению зон. Размер рестриктных фрагментов, а также их наличие или отсутствие могут различаться вследствие, например, замены одного или нескольких нуклеотидов, приведшей к появлению или потере сайта рестрикции. Также изменение размера фрагментов может происходить в результате инсерций (вставок) или делеций (выпадения) участков ДНК.

Методом ПДРФ было положено начало изучению полиморфизма митохондриальной ДНК (мтДНК) *L. decemlineata* (Azeredo-Espin *et al.*, 1991; 1996). При этом рестрикции 15 ферментами подвергались препараты очищенной мтДНК из популяций США и Мексики. Размер мтДНК предварительно оценен в 20 т.п.н. Три рестриктазы (*EcoRI*, *HpaI* и *PstI*) позволили дискриминировать полиморфизм мтДНК: было выделено 16 митотипов, в том числе один митотип, характерный для гетероплазмии (Azeredo-Espin, 1996). Наибольшим полиморфизмом отличалась популяция из Техаса, в которой встречалось 14 митотипов, наименьшим – популяции из Вашингтона, Огайо и Майна – по 1 митотипу. В двух популяциях (Техаса и Мерилленда) встречались особи с наличием гетероплазмии.

Секвенирование

В ходе секвенирования определяют нуклеотидную последовательность интересующего исследователя участка нуклеиновой кислоты. Более подробно о данном методе можно узнать в работах Т. Маниатис с соавт. (1984), А.В. Чемерис с соавт. (1999). К сожалению, при всей мощности и функциональности данного метода популяционные исследования отражены только в двух работах, посвященных колорадскому жуку (Grapputo *et al.*, 2005; Udalov, Benkovskaya, 2010a).

Секвенирование 109 образцов фрагмента мтДНК колорадского жука, содержащего 3'-конец гена *coxI* – tRNA^{Ley} – 5'-конец гена *coxII* из 13 североамериканских и европейских популяций, позволило выделить 20 различных митотипов, 3 из которых представлены в нескольких популяциях, а остальные присутствовали только в отдельных популяциях (Grapputo *et al.*, 2005). Интересно, что во всех 8 обследованных европейских популяциях был представлен только 1 митотип, он же был фиксирован и в популяции Айдахо, США (Grapputo *et al.*, 2005). Авторами делается вывод о том, что территория европейской части ареала была заселена в ходе одной успешной инвазии.

Нами были просеквенированы образцы из 5 локальных популяций колорадского жука с территории Башкортостана (Udalov, Benkovskaya, 2010a). Было отмечено 11 нуклеотидных отличий от последовательности, уже имеющейся в базе данных GeneBank (Ass. No AY165708; Hebert *et al.*, 2003). Почти все они, приходясь на третий нуклеотид в кодоне, не повлияли на изменение аминокислотного состава вследствие вырожденности генетического кода. И лишь одна замена 59G > C в последовательности, полученной для образца из одной локальной популяции (Дедово), привела к аминокислотной замене Gly/Ala.

Последующее сравнение нуклеотидных последовательностей фрагмента гена *coxI* колорадского жука южноуральской популяции с имеющимися в базе данных DDBJ/EMBL/GenBank соответствующими фрагментами гена близких видов рода *Leptinotarsa* – *L. haldemani* (Acc.No DQ459377), *L. juncta* (Acc.No AY532655 и AY532656) и *Zygogramma piceicollis* (Acc.

№ AY171413) показало, что наиболее близки между собой оказались особи *L. decemlineata* с Южного Урала, к которым примыкает североамериканский образец данного вида. Наиболее обособленным оказался представитель вида *Z. piceicollis*. Деление на кластеры особей колорадского жука из южноуральских и североамериканских популяций может служить, на наш взгляд, еще одним подтверждением гипотезы об интенсивных микроэволюционных процессах во всем ареале вида (Фасулати, 1993; Вилкова, Фасулати, 2000; Удалов, 2010; Udalov, Benkovskaya, 2010b).

Полимеразная цепная реакция

Маркеры, полученные в ходе полимеразной цепной реакции (ПЦР, PCR – polymerase chain reaction), получили широкое распространение в различных областях исследований, от систематики и филогении до криминалистики и судебной медицины. Метод ПЦР разработал Кэри Бэнк Муллис в 1985 г. (Saiki *et al.*, 1988), за что он и был удостоен Нобелевской премии по химии в 1993 г.

В ходе ПЦР происходит синтез (амплификация) *in vitro* определенных участков ДНК, фланкируемых используемыми праймерами – небольшими затравочными фрагментами ДНК. Полученные в ходе первых циклов реакции ПЦР-продукты служат матрицами в последующих циклах синтеза, вследствие чего число копий амплифицируемой последовательности увеличивается в геометрической прогрессии. Таким образом, присутствие в образце интересующей нас последовательности даже в минимальном количестве (одна или несколько копий) легко выявляется с помощью данного метода.

В зависимости от типа выявляемых ДНК-маркеров различают несколько методов ПЦР.

Метод RAPD-PCR (случайно амплифицируемая полиморфная ДНК, RAPD-PCR – random amplified polymorphic DNA) заключается в синтезе в ходе ПЦР фрагментов ДНК, инициированных произвольно выбранным праймером длиной обычно 10 нуклеотидов (Williams *et al.*, 1993). Электрофоретические спектры полученных при RAPD фрагментов позволяют (после должной статистической обработки) получить информацию об уровне внутри- и

межпопуляционного полиморфизма. При проведении RAPD не нужно заранее знать, какие конкретно последовательности ДНК предстоит амплифицировать. Количество и размер амплифицированных фрагментов зависят от длины и последовательности выбранного праймера, а сайты связывания праймеров случайно распределены по всему геному.

С помощью метода RAPD была предпринята попытка анализа полиморфизма в популяциях колорадского жука (Сидоренко и др., 2000, 2002). Анализировались по 4–6 особей из 4 географически удаленных популяций – киевской (2 точки сбора), московской и курганской. К сожалению, полученные на единичных образцах результаты не позволяют сделать однозначный вывод об уровне как внутривидового, так и межпопуляционного полиморфизма.

Метод AFLP (amplified fragment length polymorphism) основан на избирательной амплификации фрагментов, получаемых при рестрикции геномной ДНК. В этом случае после рестрикции ДНК и связывания «липких» концов фрагментов с олигонуклеотидными адаптерами с помощью лигазы проводят селективную ПЦР-амплификацию полученных рестрикционных фрагментов. (Динамика ..., 2004). Полиморфизм полученных при AFLP спектров фрагментов определяется полиморфизмом рестрикционных сайтов и проявляется в наличии или отсутствии полос в геле после электрофореза. Данный метод обладает высокой разрешающей способностью и в отличие от RAPD хорошей воспроизводимостью результатов (Mueller, Wolfenbarger, 1999).

В работе по анализу ядерного генома колорадского жука методом AFLP было получено 297 фрагментов длиной от 50 до 220 п.о. (Grapputo *et al.*, 2005), из них 99 % были полиморфными. Кластеризация на основе генетических расстояний D (Nei, 1972) показала как наличие значительной удаленности европейских популяций от североамериканских, так и наличие двух хорошо дифференцированных групп среди европейских образцов – западных (Испания, Франция, Италия) и восточных (Польша, Эстония, Финляндия и Россия) групп популяций. Европейские популяции характеризовались некоторым снижением уровня полиморфизма – 48 % против 67 % полиморфных локусов в

североамериканских популяциях, а также меньшим значением ожидаемой гетерозиготности (Grapputo *et al.*, 2005).

Микросателлитные повторы

Маркеры на основе микросателлитных повторов используются для работы на целом ряде объектов, относящихся к типу Arthropoda. Микросателлитные повторы представляют собой повторяющиеся копии длиной от 1 до 6 нуклеотидов, микросателлитный локус может насчитывать от 10 до 100 повторов (Животовский, 2006). Индивидуальные аллели этих локусов отличаются друг от друга числом tandemно повторяющихся копий.

Микросателлиты широко применяются в качестве генетических маркеров для изучения ряда биологических видов, чему способствуют следующие особенности этих маркеров: а) они в большом количестве рассеяны по всему геному; б) локализованы они в основном в некодирующих областях генома и, следовательно, селективно нейтральны (правда, не всегда); в) микросателлиты характеризуются менделевским кодоминантным характером наследования; г) возможен автоматизированный анализ микросателлитов (Алтухов, 2003).

Существует пока только одна работа, положившая начало изучению микросателлитных повторов в геноме колорадского жука (Grapputo, 2006). Было выделено 11 микросателлитных повторов, являющихся полиморфными в популяциях колорадского жука (проанализированы выборки из популяций России, Эстонии и США). Приведем в качестве примера микросателлитный локус *LdAC5-22* (GenBank Ass. No DQ424877), коровая последовательность которого (TCGT)₅. Данный микросателлит в геноме колорадского жука может быть представлен числом от 2 (TCGT-TCGT) до 5 повторов (TCGT-TCGT-TCGT-TCGT-TCGT) и варьироваться при амплификации в ПЦР от 147 до 160 п.н. в длину. Статистическая обработка полученных данных (число аллелей на локус, соответствие равновесию Харди-Вайнберга, соотношение ожидаемых и наблюдаемых гетерозигот) позволяет в дальнейшем использовать выделенные 11 микросателлитных повторов как в качестве маркеров генетических процессов

в популяциях колорадского жука, так и для установления путей заселения территории его ареала (Grapputo, 2006).

Резистентность колорадского жука к инсектицидам

Выше уже упоминалось о сравнительной молодости *L. decemlineata* и его значительном внутривидовом полиморфизме. Как следствие колорадский жук отличается поразительной экологической пластичностью и приспособляемостью (Колорадский картофельный жук ..., 1981; Фасулати, 2002). Все это позволяет ему успешно адаптироваться к биотическим и абиотическим факторам и к антропогенным воздействиям. Так, у колорадского жука развилась резистентность к почти всем используемым на настоящий момент и применявшимся ранее инсектицидам на всем его ареале на территории России и стран СНГ, Евразийского и Американского континентов.

По данным, представленным в международной базе данных (The Database ..., 2011), колорадский жук приобрел устойчивость к 51 препарату из различных классов инсектицидов в 46 регионах мира, хотя, с нашей точки зрения, анализ литературы позволяет несколько увеличить последнюю цифру. Так, Россия в данный список до сих пор не включена, хотя экспериментальных публикаций (в том числе и англоязычных) о резистентности колорадского жука к инсектицидам в России в научной литературе более чем достаточно (Leontieva *et al.*, 2006; Benkovskaya *et al.*, 2006, 2009; Sukhoruchenko, Dolzhenko, 2008; Udalov, Benkovskaya, 2008a, b, 2010b).

Развитие резистентности к инсектицидам в популяциях колорадского жука приводит к увеличению норм расхода препаратов и количества обработок (Рославцева, 2009). Это увеличивает себестоимость конечной продукции, приводит к загрязнению окружающей среды, нарушению равновесия в биоценозах вообще и агроценозах в частности. Формируется кросс-резистентность – устойчивость вредителя к препаратам из разных классов. Так, интенсивные обработки фосфорорганическими инсектицидами в 1980-х гг. и пиретроидами в 1990-х гг. в Ростовской области привели к формированию попу-

ляций с перекрестной резистентностью между препаратами обоих классов (Вилкова, 2005).

Распространение устойчивости к различным инсектицидам в популяциях колорадского жука по скорости превосходит все прогнозы (Вилкова и др., 2005). Объяснить это можно отбором особей, обладающих как специфической, так и неспецифической устойчивостью, к тому же отличающихся высоким уровнем приспособленности в полном смысле этого слова – способных оставить наибольшее количество жизнеспособного потомства (Шмальгаузен, 1968; Солбриг О., Солбриг Д., 1982). Выявленные в локальных популяциях вида на территории Республики Башкортостан эффекты стимуляции жизнеспособности отдельных особей не только сублетальными, но и летальными дозами инсектицидов из различных классов могут вносить заметный вклад в формирование и распространение устойчивости (Беньковская и др., 2010).

Мы рассмотрим как исследования уровня специфической устойчивости, так и неспецифическую устойчивость, вклад которой в формирование резистентных популяций насекомых, по-видимому, до сих пор недооценивали.

Резистентность к фосфорорганическим инсектицидам (ФОИ)

Известно, что один из основных механизмов резистентности насекомых к ФОИ – снижение чувствительности к действию инсектицидов у мутантной формы ацетилхолинэстеразы (AChE) (Feyereisen, 1995; French-Constant *et al.*, 1998). На молекулярном уровне это обусловлено нуклеотидными и, как следствие, аминокислотными мутациями в гене *AChE*, выявленными в резистентных генотипах. Так, в гене *AChE* резистентных линий плодовой мушки дрозофилы отмечено 5 нуклеотидных мутаций в 4 положениях (Mutero *et al.*, 1994), в гомологичном гене комнатной мухи – 4 мутации (Williamson *et al.*, 1996).

Нечувствительность AChE колорадского жука к ФОИ связана с нуклеотидной заменой аденина на гуанин в положении 980 от начала гена, что приводит к замене аминокислоты серин на глицин в положении 291 (Zhu, Clark, 1997; Zhu *et al.*, 1996). Та же мутация в несколь-

ко некорректной форме (мутация аспарагина в глутамин в локусе 980 ацетилхолинэстеразы) упоминается в обзоре «Исследование популяций колорадского жука» (Рославцева, Диденко, 2010).

Для изучения данного полиморфизма в популяциях колорадского жука используют метод двунаправленной ПЦР-амплификации специфических аллелей (bi-PASA, bi-directional PCR amplification of specific allele) (Liu *et al.*, 1997). Данный метод позволяет идентифицировать как чувствительные/резистентные гомозиготные аллели SS и RR, так и гетерозиготные SR (Clark *et al.*, 2001). Данным методом изучается полиморфизм колорадского жука в популяциях США (Clark *et al.*, 2001), России (Беньковская и др., 2008б; Udalov, Benkovskaya, 2008) и Чехии (Zichova *et al.*, 2010).

В популяциях США были генотипированы три возможных аллельных состояния (SS, RR и SR) фрагмента гена *AChE* (Clark *et al.*, 2001). В популяциях Чехии была отмечена преобладающая частота резистентных аллелей RR от 52,9 до 66,7 % в зависимости от популяции, а в одной из популяций – Литомерице – частота SS аллеля оказалась равна нулю (Zichova *et al.*, 2010).

Нами было проведено ДНК-типирование образцов колорадского жука в одной из локальных популяций Уфимского района Башкортостана. Данная популяция была выбрана как модельная, поскольку для нее установлен высокий уровень множественной резистентности не только к децису и карбофосу, но и к неоникотиноидам (Беньковская и др., 2008а; Benkovskaya *et al.*, 2009). Из трех возможных аллельных состояний (SS, RR и SR) фрагмента гена *AChE* были идентифицированы резистентные гомозиготные аллели RR и гетерозиготы SR. Нами было сделано предположение, что долговременные обработки ФОИ на начальном этапе расселения колорадского жука по территории Башкортостана оказали селективное влияние, элиминируя особей с чувствительными генотипами – гомозиготные чувствительные аллели дикого типа SS пока обнаружены не были (Беньковская и др., 2008б). Однако для подтверждения этой гипотезы необходимы дальнейшие исследования, направленные на изучение распределения аллелей *AChE* в онтогенезе вида.

Резистентность к пиретроидам

Широкое применение с середины 1970-х годов пиретроидов (Мигранов, 1994; Thacker, 2002) привело к возникновению резистентных к ним популяций клещей и насекомых. В настоящее время известно более 55 видов членистоногих, устойчивых как к природным пиретринам, так и к синтетическим пиретроидам (Thacker, 2002; The Database ..., 2011). Колорадский жук был одним из первых насекомых, у которых была отмечена устойчивость к ДДТ, перметрину и другим пиретроидам (Alyokhin, 2009).

Основная причина резистентности к пиретроидам (и ДДТ) – снижение чувствительности нервной системы (Williamson *et al.*, 1996; Lee *et al.*, 1999). Впервые этот механизм был обнаружен у комнатной мухи *Musca domestica* L. Выявлен ответственный за это ген *kdr* (knockdown resistance). У комнатной мухи он расположен на аутосомной хромосоме 3 (Перегуда, 1985; Metcalf, 1989), у колорадского жука – на половой X-хромосоме (Hawthorne, 2001).

В основе молекулярных механизмов резистентности к пиретроидным инсектицидам у насекомых лежат нуклеотидные мутации в гене электрончувствительного натриевого канала (voltage-sensitive sodium channel, *Vssc1*) (Williamson *et al.*, 1996). У колорадского жука была выявлена замена цитозина на тимин в 6 сегменте II домена (IIS6) α -субъединицы электрончувствительного натриевого канала *LdVssc1*. Нуклеотидная мутация приводит к замене аминокислоты лейцин на фенилаланин (Lee *et al.*, 1999).

Для изучения полиморфизма фрагмента гена *LdVssc1* в популяциях колорадского жука также используется метод bi-PASA. По наличию данного полиморфизма изучаются популяции колорадского жука в США (Clark *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 2005) и Чехии (Zichova *et al.*, 2010).

Так, в 16 популяциях США были генотипированы три возможных аллельных состояния (SS, RR и SR) фрагмента гена *LdVssc1*, причем не всегда генотипический статус популяции совпадал с уровнем фенотипической резистентности. Так, в популяции Делавера, характеризующейся высоким уровнем резистентности к инсектицидам (63 % выживших после токсикологических обработок), частота резистентных аллелей со-

ставляла всего 33 % (Kim *et al.*, 2005). Возможно, у особей данной популяции резистентность к пиретроидам обусловлена другими механизмами, например, такими, как снижение активности цитохром P450 монооксигеназы (Argentine *et al.*, 1995). Обратная ситуация: в популяции Миннесоты (низкий уровень фенотипической устойчивости к пиретроидам, всего 11 % выживших после обработок) частота резистентного аллеля составила 67 % (Kim *et al.*, 2005). На наш взгляд, значительные расхождения между данными токсикологических и молекулярно-генетических исследований происходят еще и вследствие малого числа генотипированных особей: по 3–6 особей из популяции.

В Чехии частота резистентных аллелей колебалась в диапазоне от 20,0 до 22,9 % в зависимости от локальной популяции и года сбора образцов (Zichova *et al.*, 2010).

Молекулярные маркеры неспецифической устойчивости колорадского жука

Неспецифическая устойчивость у насекомых и, в частности, у колорадского жука, обусловлена большим количеством разнообразных механизмов. Несмотря на то что данных о молекулярных маркерах неспецифической устойчивости крайне мало, следует обратить внимание на тенденции в исследованиях такого рода. В этом обзоре мы приводим данные о двух наиболее важных компонентах неспецифической устойчивости и генетических системах, их обеспечивающих. Это способность к различным формам покоя – от кратковременного летнего сна до суперпаузы, длящейся до 3–5 лет (Колорадский картофельный жук ..., 1982), а также барьерные механизмы, в первую очередь, покровы и особенности их структуры и функции. Здесь следует отметить и барьерную функцию жирового тела, и детоксицирующую систему, но для этих случаев грань между неспецифической и специфической устойчивостью условна.

Долгая диапауза на имагинальной стадии дает основание считать колорадского жука хорошей моделью для исследований механизмов старения и долголетия (Peferoen *et al.*, 1981). В то же время диапауза является приспособлением, позволяющим легче осваивать новые для вида территории (Biever, Chauvin, 1990). Кроме

всего перечисленного, долгая диапауза позволяет виду восстанавливать свою численность в популяции после прохождения бутылочного горлышка, допустим, в результате обработок инсектицидами. Показанная в работе М. Peferoen с соавт. (1981) равная для диапаузирующих и недиапаузирующих особей возможность достаточно долго жить в лабораторных условиях доказывает существование генетических основ полиморфизма этого признака и подтверждает наличие регуляторных механизмов, переключающих программы поведения и динамики состояния в наибольшем соответствии с изменяющимися условиями.

Подходы к оценке полиморфизма имаго по способности к диапаузе основаны не столько на поиске полиморфных локусов генов, сколько на оценке уровня экспрессии генов, участвующих в регуляции наступления диапаузы, поддержания диапаузного покоя и выхода из диапаузы. Различия уровней экспрессии между имаго, находящимися в состоянии преддиапаузы (живущими в условиях короткого светового дня) и в состоянии нормальной репродуктивной активности, были установлены для генов эстеразы ювенильного гормона *JHE* (Vermunt *et al.*, 1997, 1999), диапаузного протеина 1 (*Dp-1*) и вителлогенина (*Vg*) (De Kort *et al.*, 1997), причем было выявлено влияние инсектицида (пирипроксифен) на экспрессию генов *Dp-1* и *Vg*.

Эти работы были продолжены исследованием экспрессии генов семейства *Hsp70*. Из популяций Северной Дакоты (США) была взята выборка, содержащаяся в дальнейшем в лабораторных условиях. Она была разделена на диапаузирующую и недиапаузирующую линии с помощью метода фотопериодической дифференциации (Yocum, 2001). Удалось выяснить, что экспрессия генов *Hsp70A* и *Hsp70B* изменяется в этих линиях под влиянием условий окружающей среды различным образом. Несколько позже были выделены и охарактеризованы гены, кодирующие продукты, участвующие в регуляции наступления диапаузы – *LdDAT-1*, *LdDAT-2* и *LdDAT-3* (Yocum, 2003). В этих экспериментах объектом служила та же лабораторная культура колорадского жука, и было высказано утверждение о том, что в полевых условиях уровни экспрессии генов, ассоциируемых с диапаузой, будут сильно отличаться

от тех, которые наблюдались в лабораторных условиях.

Использование дифференциального дисплея позволило выделить 55 транскриптов с различными уровнями регуляции экспрессии (Yocum *et al.*, 2009). Наконец, на основе всей предшествовавшей работы был создан и проверен на популяции колорадского жука из Северной Дакоты протокол мультиплексной ПЦР. Мониторинг состояния имаго (по готовности к диапаузе, инициации вхождения в нее, продолжающейся и завершающейся диапаузы) выявил значительный внутривидовой полиморфизм (Yocum *et al.*, 2010) по экспрессионным профилям 5 генов, участвующих в регуляции диапаузы (*DP-1*, сериновая протеаза, цистеиновая протеаза, *DAT-2*, *DAT-3*).

Анализ экспрессии генов дал возможность установить новые факты, характеризующие роль барьерной функции покровов имаго и существующий на этой основе популяционный полиморфизм колорадского жука. Различия в экспрессии генов, кодирующих кутикулярные протеины, между особями чувствительной и резистентной к действию азинфосметила линий выявлены на стадии имаго (Zhang *et al.*, 2008). Эти различия свидетельствуют о существующем механизме регуляции экспрессии генов, еще не изученном у нашего объекта. Способность к регуляции экспрессии генов кутикулярных белков на стадии взрослого насекомого сама по себе является примером адаптации как к резким изменениям температурных условий, так и к воздействию токсикантов.

Хромосомный полиморфизм

Кариотип колорадского жука состоит из 17 аутосомных хромосом, пол у данного вида определяется по типу Protenor, т. е. наличием двух (XX) половых хромосом у самок или одной (X0) – у самцов (Hsiao T., Hsiao C., 1983).

Хромосомный анализ особей *L. decemlineata* из популяций США (Аризона и Юта) и Мексики (Морейоз) показал существование двух хромосомных «рас» по наличию перичентрической инверсии во второй аутосомной хромосоме. Эта инверсия является стабильной и характеризуется менделевским расщеплением в потомстве F₂ (Hsiao T., Hsiao C., 1983).

По числу хиазм на клетку популяции колорадского жука достоверно не различались, однако процент бивалентов с более чем одной хиазмой в мексиканской популяции (7,6 %) был несколько меньше, чем в популяциях США (9,3 и 11,0 %) (Hsiao T., Hsiao C., 1983).

Аллозимный полиморфизм

До недавнего момента анализ полиморфизма в популяциях животных вообще и членистоногих в частности проводили на основе регистрации белкового полиморфизма (см. например Messier, Mitton, 1996; Krafur, 1999; Brown *et al.*, 2000), когда электрофоретические характеристики белков являются маркерами генотипического состава популяционных групп вида. При этом идет сравнение биохимических особенностей разных популяций и детальное изучение в одной и той же популяции. Выборки сравнивают как по частотам определенных электроморф, так и по их набору (Яблоков, 1987; Кайданов, 1996; Динамика ..., 2004).

Аллозимному полиморфизму в популяциях колорадского жука посвящены пока только две работы (Jacobson, Hsiao, 1983; Krafur, 1999). Первая работа нам более интересна, так как в ней рассматривается полиморфизм в 12 популяциях колорадского жука США, Мексики и Европы. Из 11 изоцимов 3 были мономорфны в различных популяциях. Наиболее интересные результаты были получены для супероксиддисмутазы. Уровень гетерозиготности в мексиканской популяции оказался значительно ниже, чем в остальных 11. Средняя гетерозиготность по всем популяциям составила 0,206, что значительно выше такового значения для других видов насекомых (0,151) (Hartl, 1980), но хорошо соотносится с данными по другим видам жесткокрылых.

Генетические расстояния D между мексиканской и остальными 11 изучаемыми европейскими и североамериканскими популяциями колорадского жука, рассчитанные по этому локусу, оказались равны 0,212 (Jacobson, Hsiao, 1983). Эта величина оказалась «соответствующей» генетическим дистанциям между подвидами *Drosophila* (Ayala, 1975). Генетическая дистанция между *L. decemlineata* и близким видом *L. haldemani* равна 0,439. Возможно, подобные генетические различия между мексиканской и

остальными популяциями колорадского жука сложились в результате их раздельной эволюции, начавшейся с перехода колорадского жука на питание культурным картофелем и продолжающейся по сей день в течение 150 лет.

В работе E.S. Krafur (1999) показаны еще 8 ферментов (формальдегид-дегидрогеназа, дегидратаза оксикислот, изоцитрат-дегидрогеназа, малат-дегидрогеназа, фосфоглюкоизомераза, 6-фосфоглюкодегидрогеназа, фосфоглюкомутаза и трегалаза), представленных в популяциях колорадского жука в виде полиморфных локусов и перспективных для использования в популяционных исследованиях в качестве генетических маркеров.

Маркеры белкового полиморфизма используются не только для исследования межпопуляционных различий. Так, внутривидовой полиморфизм по аллелям фосфоглюкомутазы был в качестве нейтрального маркера привлечен к выяснению вопроса о значении конкуренции спермы и количества спариваний в лабораторной линии колорадского жука, производной от популяции вида в штате Калифорния (США), в которой соотношение аллелей фосфоглюкомутазы А и В составляло 0,68 и 0,32 (Roderick *et al.*, 2003).

Электрофоретический спектр эстераз кишечника колорадского жука демонстрирует высокий уровень полиморфизма, обусловленного индуцибельностью отдельных изоформ. Голодание, питание непривычным кормом диагностировали по характерным профилям изоферментных спектров (Хролинский, Хомяк, 1978). В качестве популяционных характеристик опробованы также физико-химические параметры и уровни активности ряда ферментов – каталазы (Кубайчук, 1982), системы ферментов детоксикации (Неделькина и др., 1988), пищеварительных гидролаз (Умаров, 2009).

Фенетический полиморфизм

Изначально в классической популяционной генетике работы по изучению внутривидового полиморфизма насекомых строились на данных изучения фенотипов.

По А.В. Яблокову (1987), фенами называют «любые дискретные альтернативные вариации признаков и свойств особей, которые на всем

имеющемся материале (обязательно многочисленном) далее неподразделимы без потери качества. Фены всегда отражают генетическую конституцию данной особи, а своей частотой – генетическую структуру популяции и других... групп особей данного вида».

Работы по изучению фенетического полиморфизма колорадского жука были начаты еще в начале XX в. (Tower, 1903), что, кстати, позволило автору как создать один из первых видовых каталогов рода *Leptinotarsa*, так и разработать филогению данного рода (Tower, 1906), во многом неоднозначную и спорную, но оставшуюся непременной до работы «Колорадский картофельный жук» (1981).

В качестве дискретно изменяющихся признаков – фенов – у колорадского жука выделяют вариабельность рисунка частей тела имаго и личинок, жилкование крыльев, окраску яиц. Из всего этого разнообразия чаще всего используются фены рисунка частей тела имаго, в частности фены темени, затылка, передне-спинки и надкрыльев (Фасулати, 1985, 1993, 2002; Ерёмкина, Денисова, 1987; Климец, 1988; Зелеев, 2002; Беньковская и др., 2004, 2008а; Удалов и др., 2010). Для ряда признаков показана эколого-генетическая детерминация в наследовании (Овчинникова, Маркелов, 1982; Гриценко и др., 1998).

Фены передне-спинки (пронотума) были использованы для анализа полиморфизма колорадского жука в Саратовской области (Ерёмкина, Денисова, 1987). Авторами показаны различия в частотах определенных вариаций из разных выборок рассматриваемой территории, а также динамика фенов за ряд лет.

В Липецкой области на основе изучения рисунка было выделено две группы популяций: западная и восточная, граница между которыми совпадает с границей агроклиматических районов (Овчинникова, Маркелов, 1982).

На основе 9 вариаций фена рисунка передне-спинки имаго на территории Восточно-Европейской равнины было выделено не менее 5 популяционных комплексов колорадского жука, а также смежный с ними западноказахстанский и изолированный от основного ареала среднеазиатский комплекс (Методические рекомендации..., 1993). У 5 восточноевропейских комплексов прослеживается четкая географическая

изменчивость частот встречаемости почти всех типов и признаков морф. В популяциях Казахстана и Средней Азии эти закономерности не выявлены, что позволяет говорить о возникновении новой, восточной, ветви микроэволюции колорадского жука на основе адаптаций к специфическим условиям картофелеводства в этих районах (Фасулати, 1993). Таксономический статус этих 7 популяционных комплексов колорадского жука до сих пор не уточнен. По мнению С.Р. Фасулати (1993), они, «... видимо, близки к географическим расам по классификации К.М. Завадского...».

Следует отметить, что работы, давшие материал для выделения данных популяционных комплексов, проводились в 1980-е гг. (Фасулати, 1985). Очевидно, что в популяции такого полиморфного вида, как колорадский жук, за прошедшие 20 лет должны были произойти изменения, которые, скорее всего, привели к изменению генетической и, как следствие, фенетической структуры популяций. В качестве примеров можно привести работы, показывающие изменения соотношений частот фенов за продолжительный период времени. В частности, показано отличие этих соотношений «приказанской» популяции от значений частот, полученных в свое время С.Р. Фасулати (Зелеев, 2002). То же самое отмечено для «псковско-новгородской» группы популяций (Калинина, 2007). Отмечены различия в соотношениях частот фенов, определенных с разницей в 10 лет в ряде выборок с территории Башкортостана (Беньковская и др., 2004).

Все это может быть свидетельством активных микроэволюционных процессов в ареале колорадского жука (Кохманюк, 1981; Фасулати, 1993; Вилкова, Фасулати, 2000; Вилкова и др., 2005; Удалов и др., 2008). Были показаны различия между особями из североамериканских и европейских популяций по полиморфизму других фенов рисунка. Так, фен L (желтоватая или бурая продольная полоса на передне-спинке) присутствует в европейских популяциях и отсутствует в североамериканских. Фены H (точка в боковом поле пронотума) и G (поперечная полоса на задних краях пронотума) встречаются у жуков Северной Америки и отсутствуют в европейских популяциях. Авторы объясняют отсутствие фенов H и G в европейских по-

пуляциях дрейфом генов, а наличие фена L – появлением в геноме европейских популяций новой мутации или изменением экспрессии гена (Кохманюк, 1982).

Результаты наших исследований, проводившихся в течение последних двух десятилетий на Южном Урале (территория Башкортостана), показали подразделенность популяции колорадского жука как минимум на две группы локальных популяций. Такое деление характерно для структуры популяции по всем рассмотренным 4 типам фенов – как для темени и затылка, так и для пронотума и элитр. Это, на наш взгляд, говорит о неслучайности отмеченной нами структурированности групп популяций. В целом на территории Башкортостана можно выделить две крупные внутривидовые группы, включающие в себя: (а) локальные популяции в центре рассматриваемой территории и (б) локальные популяции, большая часть которых представлена на периферии (Удалов и др., 2010).

В Башкортостане колорадский жук впервые был обнаружен в 1976 г. в двух районах, Кумертауском и Архангельском (Прогноз появления ..., 1978), после завоза в республику в 1975 г. заготовленных на Украине и в республиках Прибалтики, карантинных по этому вредителю соломы и продовольственного картофеля (Мигранов, 1994).

Возможно, что на начальном этапе формирования популяции колорадского жука на территории Башкирии основой для подобной дифференциации ее структуры послужили первые очаги его появления, т. е. сказался своего рода принцип основателя (Удалов и др., 2010).

Нами также были выявлены изменения фенетической структуры локальных популяций колорадского жука во времени (данные периодов 1994 и 2002 гг.). Отмечено в нативных популяциях и экспериментально подтверждено в лабораторных опытах снижение уровня фенетического полиморфизма – среднего числа вариаций μ (Животовский, 1991) в результате многократных обработок инсектицидами. Это дает нам возможность считать селективное действие инсектицидов основным фактором снижения уровня внутривидового полиморфизма колорадского жука на Южном Урале (Удалов, Беньковская, 2010). Выявленные

эколого-физиологические особенности имаго колорадского жука, относящихся к разным морфотипам, свидетельствуют о полиморфизме жизненных стратегий, позволяющем поддерживать высокий адаптивный потенциал в локальных популяциях вида.

Заключение

Таким образом, анализ литературы, посвященной изучению популяций колорадского жука, показывает, что подобные исследования проводятся как ставшими классическими методами популяционной генетики (белковый полиморфизм, фенетический полиморфизм), так и современными методами изучения ДНК-маркеров. Последние, основанные на ПЦР, секвенировании, рестрикционном анализе, наиболее перспективны и интересны для изучения как внутри- и межпопуляционного полиморфизма, так и путей расселения и микроэволюционных процессов, идущих в ходе формирования современного ареала колорадского жука.

Нам представляются наиболее перспективными и интересными следующие молекулярные маркеры: а) микросателлитные повторы и гены мтДНК как нейтральные маркеры – для изучения общих генетических процессов, идущих в ареале колорадского жука; б) гены *AChE* и *LdVssc1*, нуклеотидные мутации в которых приводят к резистентности к инсектицидам – для изучения популяционных процессов, обусловленных бессознательным отбором (в терминах Яблокова, Юсуфова (2004)).

Однако не следует оставлять без внимания и методы «до-ДНКовой» эпохи исследований, такие, например, как методы фенетики. На начальном этапе исследования популяции такие методы позволяют получить первые данные по популяции и наметить дальнейшие пути ее изучения.

Нельзя считать, что объективная оценка структуры и состояния популяций возможна без учета фенотипических показателей и оценки приспособленности уровня адаптивного потенциала, что предполагает использование всего комплекса как современных, так и традиционных методов популяционной биологии (Фасулати, 1985, 2007; Климец, 1988; Вилкова, Фасулати, 2000; Беньковская и др., 2004, 2008б;

Вилкова и др., 2005; Киль, Головатенко, 2006; Беньковская, 2007; Калинина, Николаева, 2007; Марданшин и др., 2010).

В заключение считаем необходимым акцентировать внимание читателя на следующем моменте. Несмотря на то что *L. decemlineata* занимает столь обширный ареал, обитает в различных природно-климатических условиях и характеризуется полиморфизмом на различном уровне (от ДНК до фенетического) в различных популяциях, он считается видом монотипическим. Впервые о том, что этот вид может состоять из нескольких подвидов, было сказано в работе J.W. Jacobson, T.H. Hsiao (1983) по результатам изучения белкового полиморфизма в североамериканских и европейских популяциях. Авторы, правда, оговариваются, что для однозначного утверждения о политипичности вида на тот момент было недостаточно данных. Затем представление о нескольких подвидах колорадского жука (американском, европейско-сибирском и среднеазиатском) можно найти в работах С.Р. Фасулати (1985, 1993, 2002, 2007), основанных на анализе фенетического полиморфизма рисунка переднеспинки имаго. В исследованиях на молекулярном уровне, рассматривающих хромосомный полиморфизм (Hsiao T.N., Hsiao C., 1983) и полиморфизм ДНК (Grapputo *et al.*, 2005), этому аспекту, к сожалению, не было уделено абсолютно никакого внимания. Мы считаем, что данные, накопленные к настоящему моменту, позволяют с большей вероятностью утверждать о политипичности вида *L. decemlineata*.

Благодарности

Работа была выполнена в рамках проектов, поддержанных Российским фондом фундаментальных исследований (гранты № 09-04-00391-а и 11-04-01886-а). Мы выражаем признательность всем нашим коллегам, любезно предоставившим нам отписки статей, к которым у нас по тем или иным причинам нет доступа. Авторы будут благодарны всем коллегам за возможность получить образцы колорадского жука из различных частей его ареала. Авторы благодарят рецензентов за чтение рукописи нашей статьи и ценные замечания.

Литература

- Алтухов Ю.П. Генетические процессы в популяциях. М.: Академкнига, 2003. 531 с.
- Беньковская Г.В. Освоение новых пищевых ресурсов в расселяющихся популяциях колорадского жука // Современные проблемы биологической эволюции: к 100-летию Государственного дарвиновского музея: материалы конференции. 17–20 сентября 2007 г. Москва. М.: ГДМ, 2007. С. 101–103.
- Беньковская Г.В., Леонтьева Т.Л., Удалов М.Б. и др. Стимуляция жизнеспособности имаго колорадского жука летальными дозами инсектицидов как проявление эффектов гормезиса // Агрехимия. 2010. № 8. С. 43–48.
- Беньковская Г.В., Удалов М.Б., Поскрязков А.В. и др. Феногенетический полиморфизм колорадского жука *Leptinotarsa decemlineata* Say и его чувствительность к инсектицидам на территории Башкирии // Агрехимия. 2004. № 12. С. 23–28.
- Беньковская Г.В., Леонтьева Т.Л., Удалов М.Б. Резистентность колорадского жука к инсектицидам на Южном Урале // Агрехимия. 2008а. № 8. С. 55–59.
- Беньковская Г.В., Удалов М.Б., Хуснутдинова Э.К. Генетическая основа и фенотипические проявления резистентности колорадского жука к фосфорорганическим инсектицидам // Генетика. 2008б. Т. 44. № 5. С. 638–644.
- Блехман А.В. Изменчивость рисунка пронотума у божьей коровки *Harmonia axyridis* Pallas (Coleoptera, Coccinellidae) // Экол. генет. 2007. Т. 5. № 2. С. 25–36.
- Ваулин О.В., Захаров И.К. Временная динамика и изменчивость по мультилокусным ДНК-маркерам ISSR-PCR в популяции *Drosophila melanogaster* г. Умань на протяжении двух десятилетий (1984–2004 гг.) // Генетика. 2008. Т. 44. № 3. С. 359–365.
- Ваулин О.В., Новиков Ю.М. Географическая изменчивость ITS2 рДНК и COI мтДНК и криптические виды малярийного комара *Anopheles messeae* Fall. (Diptera: Culicidae) // Информ. вестник ВОГиС. 2010. Т. 14. № 3. С. 546–557.
- Вилкова Н.А., Сухорученко Г.И., Фасулати С.Р. Стратегия защиты сельскохозяйственных растений от адвентивных видов насекомых-фитофагов на примере колорадского жука *Leptinotarsa decemlineata* Say (Coleoptera, Chrysomelidae) // Вестн. защиты растений. 2005. № 3. С. 3–15.
- Вилкова Н.А., Фасулати С.Р. Адаптивные процессы в популяциях как явления микроэволюции видов на примере колорадского жука *Leptinotarsa decemlineata* Say // Современное состояние проблемы резистентности вредителей, возбудителей

- болезней и сорняков к пестицидам в России и сопредельных странах на рубеже XXI в. СПб, 2000. С. 16–18.
- Гриценко В.В., Глотов Н.В., Орлинский Д.Б. Эколого-генетический анализ изменчивости центральных элементов рисунка переднеспинки у колорадского жука (*Leptinotarsa decemlineata*) // Зоол. журнал. 1998. Т. 77. № 3. С. 278–284.
- Гундерина Л.И., Кикнадзе И.И. Эволюция кариофондов видов рода *Chironomus* (Diptera, Chironomidae) в Голарктике // Информ. вестник ВОГиС. 2010. Т. 14. № 1. С. 31–42.
- Динамика популяционных генофондов при антропогенных воздействиях / Ред. Ю.П. Алтухов. М.: Наука, 2004. 619 с.
- Ерёмина И.В., Денисова И.А. Изменчивость некоторых признаков колорадского жука в Саратовской области // Деп. ВИНТИ. М., 1987. С. 59–70.
- Животовский Л.А. Популяционная биометрия. М.: Наука, 1991. 269 с.
- Животовский Л.А. Микросателлитная изменчивость в популяциях человека и методы ее изучения // Информ. вестник ВОГиС. 2006. Т. 10. № 1. С. 74–96.
- Зелеев Р.М. Оценка полиморфизма рисунка переднеспинки и надкрылий колорадского жука, *Leptinotarsa decemlineata*, в окрестностях Казани // Зоол. журнал. 2002. Т. 81. № 3. С. 316–322.
- Кайданов Л.З. Генетика популяций. М.: Высш. шк., 1996. 320 с.
- Калинина К.В. Биоэкологическое обоснование защиты картофеля от колорадского жука *Leptinotarsa decemlineata* Say (Coleoptera, Chrysomelidae) в условиях южной части Северо-Западного региона России: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. Вел. Луки, 2007. 22 с.
- Калинина К.В., Николаева З.В. Результаты оценки сортов картофеля на устойчивость к колорадскому жуку в условиях Северо-Запада России // Картофель и овощи. 2007. № 8. С. 16–18.
- Киль В.И., Головатенко Н.А. Мониторинг резистентности колорадского жука к трансгенному картофелю по фенетическим маркерам // Агрохимия. 2006. № 2. С. 58–64.
- Киль В.И., Исмаилов В.Я. Идентификация резистентных к инсектицидам генотипов в популяции клопа вредная черепашка по фенам рисунка и RAPD-маркерам // Агрохимия. 2009. № 1. С. 38–49.
- Климец Е.П. Выявление чувствительности колорадского жука к действию инсектицидов с помощью фенов // Фенетика природных популяций. М., 1988. С. 111–117.
- Колорадский картофельный жук. Филогения, морфология, физиология, экология, адаптация, естественные враги / Ред. Р.С. Ушатинская. М.: Наука, 1981. 377 с.
- Корсун О.В. Изменчивость и популяционная структура *Hoplia aureola* Pall. (Coleoptera, Scarabaeidae) // Экология. 1994. Т. 25. № 5. С. 372–379.
- Кохманюк Ф.С. Колорадский жук как модель микроэволюции // Природа. 1981. № 12. С. 86–87.
- Кохманюк Ф.С. Изменчивость фенетической структуры популяций колорадского жука (*Leptinotarsa decemlineata* Say) в пределах ареала // Фенетика популяций: Матер. II Всесоюз. совещ. (Москва, 1982 г.). М.: Наука, 1982. С. 233–243.
- Кубайчук В. Изменчивость каталазы колорадского жука из различных локальных популяций в Украинской ССР // Защита растений (Киев). 1982. Т. 29. С. 50–55.
- Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. М.: Мир, 1984. 480 с.
- Марданшин И.С., Ибрагимов Р.И., Умаров И.А. и др. Традиционная селекция – экологичный метод решения проблемы защиты картофеля от колорадского жука // Достижения науки и техники АПК. 2010. № 1. С. 22–23.
- Методические рекомендации по изучению и оценке форм картофеля на устойчивость к колорадскому жуку / Под ред. Н.А. Вилковой. М., 1993. 47 с.
- Мигранов М.Г. Пиретроиды: отечественные аналоги и их токсикология. Уфа, 1994. 101 с.
- Неделькина С.В., Соломенникова И.В., Волкотруб Э.Н. и др. Изучение ферментных систем детоксикации инсектицидов у резистентной к перметрину популяции колорадского жука // Биохимия. 1988. Т. 53. № 1. С. 11–17.
- Овчинникова Н.А., Маркелов Г.В. Внутривидовая изменчивость колорадского жука в Липецкой области // Науч. докл. высш. шолы. Биол. науки. № 7. 1982. С. 63–67.
- Перегуда Т.А. Механизмы устойчивости членистоногих к пиретроидам // Агрохимия. 1985. № 8. С. 121–132.
- Прогноз появления и распространения вредителей и болезней сельскохозяйственных культур в Башкирской АССР в 1978 году и меры борьбы с ними. Уфа: Башкир. кн. изд-во, 1978. 94 с.
- Рославцева С.А. Резистентность к инсектицидам в популяциях колорадского жука // Агрохимия. 2009. № 1. С. 87–92.
- Рославцева С.А., Диденко Л.Н. Исследования популяций колорадского жука // Агрохимия. 2010. № 4. С. 80–85.
- Санин В.А. Колорадский жук. М.: Колос, 1976. 112 с.
- Сидоренко А.П., Березовская О.П. Генетическая структура популяций колорадского жука *Leptinotarsa*

- decemlineata* (Coleoptera: Chrysomelidae) // Генетика. 2002. Т. 38. № 11. С. 1485–1491.
- Сидоренко А.П., Березовская О.П., Созинов А.А. Оценка генетического полиморфизма в популяциях колорадского жука *Leptinotarsa decemlineata* (Say) по RAPD-маркерам // Генетика. 2000. Т. 30. № 5. С. 651–656.
- Солбриг О., Солбриг Д. Популяционная биология и эволюция. М.: Мир, 1982. 488 с.
- Удалов М.Б. Формируются два подвида колорадского жука? // XXIV Любимцевские чтения: сб. докл. Ульяновск: УлГПУ, 2010. С. 189–193.
- Удалов М.Б., Беньковская Г.В. Изменения уровня полиморфизма в популяциях колорадского жука на Южном Урале // Экол. генетика. 2010. Т. VIII. № 3. С. 61–66.
- Удалов М.Б., Беньковская Г.В., Поскряков А.В. и др. Полиморфизм ДНК в изучении популяций членистоногих // Усп. соврем. биологии. 2009. Т. 129. № 1. С. 51–57.
- Удалов М.Б., Беньковская Г.В., Хуснутдинова Э.К. Структура популяции колорадского жука на Южном Урале // Экология. 2010. № 2. С. 126–133.
- Удалов М.Б., Поскряков А.В., Беньковская Г.В. и др. Молекулярно-биологические методы мониторинга резистентности к инсектоакарицидам в популяциях членистоногих // Агрохимия. 2003. № 6. С. 81–88.
- Удалов М.Б., Lindström L., Серебров В.В. и др. Микроэволюционные процессы в формирующихся популяциях колорадского жука // XXII Любимцевские чтения: Сб. докл. Ульяновск: УлГПУ, 2008. Т. 1. С. 249–252.
- Умаров И.А. Экологические и физиолого-биохимические закономерности взаимоотношений в системе «картофель–колорадский жук»: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. Уфа, 2009. 24 с.
- Фасулати С.Р. Полиморфизм и популяционная структура колорадского жука *Leptinotarsa decemlineata* Say в Европейской части СССР // Экология. 1985. № 6. С. 50–56.
- Фасулати С.Р. Полиморфизм, экологические группировки и микроэволюция колорадского жука *Leptinotarsa decemlineata* Say (Coleoptera, Chrysomelidae) // Вид и его продуктивность в ареале. СПб, 1993. С. 260–262.
- Фасулати С.Р. Территориальное расселение колорадского жука в северных районах картофелеводства // Экологические аспекты интенсификации сельскохозяйственного производства: Матер. междунар. науч.-практ. конф. Пенза, 2002. С. 205–207.
- Фасулати С.Р. Изучение адаптивной изменчивости вредителей для экологизации систем защиты растений на примере колорадского жука // Информ. бюл. ВПРС МОББ. СПб, 2007. С. 246–250.
- Хролинский Л.Т., Хомяк В.В. Зависимость состава белкового комплекса и компонентов эстераз кишечника колорадского жука от питающего растения // С.-х. биология. 1978. Т. 13. № 2. С. 294–297.
- Чемерис А.В., Ахунов Э.Д., Вахитов В.А. Секвенирование ДНК. М.: Наука, 1999. 429 с.
- Шмальгаузен И.И. Факторы эволюции. Теория стабилизирующего отбора. М.: Наука, 1968. 450 с.
- Яблоков А.В. Популяционная биология. М.: Высш. шк., 1987. 303 с.
- Яблоков А.В., Юсуфов А.Г. Эволюционное учение. М.: Высш. шк., 2004. 310 с.
- Яковлев Б.В. Колорадский картофельный жук и меры борьбы с ним. М.: Сельхозгиз, 1950. 64 с.
- Яковлев Б.В. Колорадский жук // Гос. инсп. по карантину с.-х. вредит. МСХ СССР. Рига, 1960. 152 с.
- Alyokhin A. Colorado potato beetle management on potatoes: current challenges and future prospects // Fruit, Vegetable and Cereal Sci. and Biotech. 2009. V. 3. № 1. P. 10–19.
- Argentine J.A., Lee S.H., Sos M.A. *et al.* Permethrin resistance in a near isogenic strain of Colorado potato beetle // Pest. Biochem. Physiol. 1995. № 53. P. 97–115.
- Ayala F.J. Genetic differentiation during the speciation process // Evol. Biol. 1975. № 8. P. 1–75.
- Azeredo-Espin A.M.L., Schroder R.F.W., Huettel M.D. *et al.* Mitochondrial DNA variation in geographic populations of Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata* (Coleoptera, Chrysomelidae) // Experientia. 1991. № 47. P. 483–485.
- Azeredo-Espin A.M.L., Schroder R.F.W., Roderick G.K. *et al.* Intraspecific mitochondrial DNA variation in the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata* (Coleoptera: Chrysomelidae) // Biochem. Genet. 1996. V. 34. № 7/8. P. 253–268.
- Benkovskaya G.V., Leontieva T.L., Udalov M.B. Colorado beetle resistance to insecticides in South Urals // Resistant Pest Manag. Newslett. 2009. V. 19. № 1. P. 3–4.
- Benkovskaya G.V., Udalov M.B., Nikolenko A.G. *et al.* Temporal and toxicological dynamics in the cover spot patterns of the Colorado potato beetle in South Ural // Resistant Pest Manag. Newslett. 2006. V. 15. № 2. P. 13–15.
- Biever K.D., Chauvin R.L. Prolonged dormancy in a Pacific Northwest population of the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata* (Say) (Coleoptera: Chrysomelidae) // Can. Entomol. 1990. V. 122. № 1/2. P. 175–177.
- Brown J.K., Perring T.M., Cooper A.D. *et al.* Genetic analysis of Bemisia (Hemiptera: Aleyrodidae) populations by isoelectric focusing electrophoresis

- // Biochem. Genet. 2000. V. 38. № 1/2. P. 13–25.
- Cavalli-Sforza L.L., Bodmer W.F. The Genetics of Human Populations. San Francisco: Freeman, 1971. 962 p.
- Clark J.M., Lee S.H., Kim H.J. *et al.* DNA-based genotyping techniques for the detection of point mutation associated with insecticide resistance in Colorado potato beetle *Leptinotarsa decemlineata* // Pest Manag. Sci. 2001. № 57. P. 968–974.
- De Kort C.A.D., Koopmanschap A.B., Vermunt A.M.W. Influence of pyriproxifen on the expression of haemolymph protein genes in Colorado Potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata* // J. Insect Physiol. 1997. V. 43. P. 363–371.
- Feyereisen R. Molecular biology of insecticide resistance // Toxicol. Lett. 1995. № 82/83. P. 83–90.
- Feytaud J. Le Doryphore a la conquete de l'Europe // Proc. VIII Intern. Congr. Entomol. Stockholm, 1950. P. 643–646.
- French-Constant R., Pittendrigh B., Vaughan A. *et al.* Why are so few resistance associated mutations in insecticide target genes? // Phil. Trans. R. Soc. Lond. B. 1998. № 353. P. 1685–1693.
- French-Constant R.H., Daborn Ph.J., Le Goff G. The genetics and genomics of insecticide resistance // Trends Genet. 2004. V. 20. № 3. P. 163–170.
- Ford E. Polymorphism and taxonomy // The New Systematics. Oxford: Clarendon Press, 1940. P. 493–513.
- Grapputo A. Development and characterization of microsatellite markers in the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata* // Mol. Ecol. Notes. 2006. № 6. P. 1177–1179.
- Grapputo A., Boman S., Lindström L. *et al.* The voyage of an invasive species across continents: genetic diversity of North American and European Colorado potato beetle population // Mol. Ecol. 2005. № 14. P. 4207–4219.
- Hare J.D. Ecology and management of the Colorado potato beetle // Ann. Rev. Entomol. Palo Alto, 1990. V. 35. P. 81–100.
- Hartl D.L. Principles of Population Genetics. Singer Assoc. Inc. Sunderland Mass., 1980. 488 p.
- Hawthorne D.J. AFLP-based genetic linkage map of the Colorado potato beetle *Leptinotarsa decemlineata*: sex chromosomes and a pyrethroid-resistance candidate gene // Genetics. 2001. № 158. P. 695–700.
- Hebert P.D.N., Cywinska A., Ball S.L. *et al.* Biological identifications through DNA barcodes // Proc. Roy. Soc. Lond. B. 2003. № 270. P. 313–321.
- Hsiao T.N., Hsiao C. Chromosomal analysis of *Leptinotarsa* and *Labidomera* species (Coleoptera, Chrysomelidae) // Genetica. 1983. № 60. P. 139–150.
- Jacobson J.W., Hsiao T.H. Isozyme variation between geographic populations of the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata* (Coleoptera: Chrysomelidae) // Ann. Entomol. Soc. Am. 1983. № 76. P. 162–166.
- Kim H.J., Hawthorne D.J., Peters T. *et al.* Application of DNA-based genotyping techniques for the detection of kdr-like pyrethroid resistance in field populations of Colorado potato beetle // Pest. Biochem. Physiol. 2005. № 81. P. 85–96.
- Krafsur E.S. Allozyme gene diversities in some leaf beetles (Coleoptera: Chrysomelidae) // Biochem. Genet. 1999. V. 37. № 718. P. 215–226.
- Koulianos S., Crozier R.H. Mitochondrial sequence characterization of Australian commercial and feral honeybee strains, *Apis mellifera* L. (Hymenoptera, Apidae), in the context of the species worldwide // Aust. J. Entomol. 1997. V. 4. № 36. P. 359–364.
- Lee S.H., Dunn J.B., Clark J.M. *et al.* Molecular analysis of kdr-like resistance in a permethrin-resistant strain of Colorado potato beetle // Pest. Biochem. Physiol. 1999. № 63. P. 63–75.
- Leontieva T.L., Benkovskaya G.V., Udalov M.B., Poscryakov A.V. Insecticide resistance level in *Leptinotarsa decemlineata* Say population in the South Ural // Resistant Pest Manag. Newslett. 2006. V. 15. № 2. P. 25–26.
- Li X., Schuler M.A., Berenbaum M.R. Molecular mechanisms of metabolic resistance to synthetic and natural xenobiotics // Ann. Rev. Entomol. 2007. № 52. P. 231–253.
- Liu Q., Thorland E.C., Heit J.A. *et al.* Overlapping PCR, for bidirectional PCR amplification of specific alleles: a rapid one-tube method for simultaneously differentiating homozygotes and heterozygotes // Genome Res. 1997. № 7. P. 389–398.
- Loxdale H.D., Lushai G. Molecular markers in entomology // Bull. Entomol. Res. 1998. № 88. P. 577–600.
- Messier S., Mitton J.B. Heterozygosity at the malate dehydrogenase locus and developmental homeostasis in *Apis mellifera* // Heredity. 1996. V. 76. P. 616–622.
- Metcalf R.T. Insect resistance to insecticides // Pest. Sci. 1989. V. 26. P. 333–358.
- Mueller U.G., Wolfenbarger L.L. AFLP genotyping and fingerprinting // Trends Ecol. Evol. 1999. V. 14. P. 389–394.
- Mutero A., Pralovorio M., Bride J.M. *et al.* Resistance-associated point mutations in insecticide-insensitive acetylcholinesterase // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 1994. № 91. P. 5922–5926.
- Nei M. Genetic distance between populations // Am. Naturalist. 1972. V. 106. № 949. P. 283–292.
- Obrycki J.J., Krafsur E.S., Bogran C.E. *et al.* Comparative studies of three populations of the lady beetle predator *Hippodamia convergens* (Coleoptera: Coccinellidae) // Florida Entomologist. 2001. V. 84. № 1. P. 55–62.

- Peferoen M., Huybrechts R., De Loof A. Longevity and fecundity in the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata* // Entomol. Exp. Appl. 1981. V. 29. P. 321–329.
- Roderick G.K. Geographic structure of insect populations: gene flow, phylogeography, and their uses // Ann. Rev. Entomol. 1996. № 41. P. 325–352.
- Roderick G.K., de Mendoza L.G., Dively G.P. *et al.* Sperm precedence in Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata* (Coleoptera: Chrysomelidae): temporal variation assessed by neutral markers // Ann. Entomol. Soc. Amer. 2003. V. 96. № 5. P. 631–636.
- Saiki R.K., Gelfand D.H., Stoffel S. *et al.* Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase // Science. 1988. V. 239. P. 487–491.
- Sheppard W.S., Berlocher S.H. Enzyme polymorphism in *Apis mellifera* from Norway // J. Apicult. Res. 1984. V. 23. № 2. P. 64–69.
- Sukhoruchenko G.I., Dolzhenko V.I. Problems of resistance development in arthropod pests of agricultural crops in Russia // EPPO Bull. 2008. V. 38. № 1. P. 119–126.
- Thacker J.R.M. An Introduction to Arthropod Pest Control. Cambridge: Cambridge Univ. Press, 2002. 343 p.
- The Database of Arthropods Resistant to Pesticides. 2011. available at <http://www.pesticideresistance.org>
- Tower W.L. Colors and color patterns of Coleoptera. Un. Chicago, 1903. № 10. P. 36–39.
- Tower W.L. An investigation of evolution in Chrysomelid beetles of the genus *Leptinotarsa* // Publ. Carnegie Inst. Wash. 1906. № 48. 320 p.
- Udalov M.B., Benkovskaya G.V. Application of bi-PASA and development of PCR-REN for detection of point mutation 980A>G in AChE gene of Colorado potato beetle in South Ural's local population // Resistant Pest Manag. Newslett. 2008. V. 17. № 2. P. 15–16.
- Udalov M.B., Benkovskaya G.V. Polymorphism *coxI* gene of Colorado potato beetle in South Ural populations // Resistant Pest Manag. Newslett. 2010a. V. 19. № 2. P. 29–32.
- Udalov M.B., Benkovskaya G.V. Two subspecies of Colorado potato beetles are forming? // IX Europ. Congr. of Entomol., 22–27 August 2010b. Budapest, 2010b. P. 217.
- Vermunt A.M., Koopmanschap A.B., Vlak J.M. *et al.* Cloning and sequence analysis of cDNA encoding a putative juvenile hormone esterase from the Colorado potato beetle // Insect Biochem. Mol. Biol. 1997. V. 27. P. 919–928.
- Vermunt A.M., Koopmanschap A.B., Vlak J.M. *et al.* Expression of the juvenile hormone esterase gene in the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata*: photoperiodic and juvenile hormone analog response // J. Insect Physiol. 1999. № 45. P. 135–142.
- Williams J.G.K., Hanafey M.K., Rafalsky J.A. *et al.* Genetic analysis using random amplified polymorphic DNA markers: Methods in Enzymology // Recombinant DNA. San Diego: Acad. Press, 1993. V. 86. P. 68–77.
- Williamson M.S., Martin-Torrez D., Hick C.A. *et al.* Identification of mutations in the housefly para-type sodium channel gene associated with knockdown resistance (*kdr*) to pyrethroid insecticides // Mol. Gen. Genet. 1996. № 252. P. 51–60.
- Yocum G.D. Differential expression of two Hsp70 transcripts in response to cold shock, thermoperiod, and adult diapause in the Colorado potato beetle // J. Insect Physiol. 2001. V. 47. P. 1139–1145.
- Yocum G.D. Isolation and characterization of three diapause-associated transcripts from the Colorado potato beetle *Leptinotarsa decemlineata* // J. Insect Physiol. 2003. № 49. P. 161–169.
- Yocum G.D., Rinehart J.P., Chirumamilla-Chapara A. *et al.* Characterization of gene expression patterns during the initiation and maintenance phases of diapause in the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata* // J. Insect Physiol. 2009. V. 55. P. 32–39.
- Yocum G.D., Rinehart J.P., Larson M.L. Monitoring diapause development in the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata* // J. Insect Physiol. 2010. DOI:10.1016/j.jinsphys. 2010.11.008.
- Zhang J., Goyer C., Pelletier Y. Environmental stresses induce the expression of putative glycine-rich insect cuticular protein genes in adult *Leptinotarsa decemlineata* (Say) // Insect Mol. Biol. 2008. V. 17. № 3. P. 209–216.
- Zhu K.Y., Clark J.M. Validation of a point mutation of acetylcholinesterase in Colorado potato beetle by polymerase chain reaction coupled to enzyme inhibition assay // Pest. Biochem. Physiol. 1997. № 57. P. 28–35.
- Zhu Y.K., Lee S.H., Clark J.M. A point mutation of acetylcholinesterase associated with azinphosmethyl resistance and reduced fitness in Colorado potato beetle // Pest. Biochem. Physiol. 1996. № 55. P. 100–108.
- Zichova T., Kocourek F., Salava J. *et al.* Detection of organophosphate and pyrethroid resistance alleles in Czech *Leptinotarsa decemlineata* (Coleoptera: Chrysomelidae) populations by molecular methods // Pest. Manag. Sci. 2010. № 66. P. 853–860.

POPULATION GENETICS OF THE COLORADO POTATO BEETLE: FROM GENOTYPE TO PHENOTYPE

M.B. Udalov, G.V. Benkovskaya

Institute of Biochemistry and Genetics, RAS, Ufa, Russia,
e-mail: udalov-m@yandex.ru

Summary

Populational studies of the Colorado potato beetle are reviewed. Data on DNA, chromosome, protein and phenetic polymorphism are considered. Data on the prevalence of mutations determining insecticide resistance in the beetles are presented. It is shown that molecular methods can be applied to the assessment of nonspecific resistance. The question whether the Colorado potato beetle is a polytypic species is discussed on the base of the current knowledge of its polymorphism.

Key words: Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata* Say, polymorphism, population, karyotype, DNA, insecticide resistance, mutation, phenetics.