

На правах рукописи



УДАЛОВ МАКСИМ БОРИСОВИЧ

**СТРУКТУРА ПОПУЛЯЦИИ КОЛОРАДСКОГО ЖУКА
LEPTINOTARSA DECEMLINEATA SAY
НА ЮЖНОМ УРАЛЕ**

03.00.15 – генетика

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т
диссертации на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

УФА – 2006

Работа выполнена в лаборатории биохимии адаптивности насекомых Института биохимии и генетики Уфимского научного центра Российской академии наук

Научный руководитель: кандидат биологических наук,
старший научный сотрудник
Беньковская Галина Васильевна

Официальные оппоненты: доктор биологических наук, профессор
Амирханов Дамир Вильданович

доктор биологических наук, профессор
Мустафина Ольга Евгеньевна

Ведущая организация: Всероссийский институт защиты растений РАСХН

Защита диссертации состоится "21" ноября 2006 г. в 15³⁰ часов на заседании Регионального диссертационного совета КМ 002.133.01 при Институте биохимии и генетики Уфимского научного центра РАН по адресу: 450054, Уфа, проспект Октября, 71.

С диссертацией можно ознакомиться в Научной библиотеке Уфимского научного центра РАН.

Автореферат разослан "20" октября 2006 г.

Ученый секретарь

Регионального диссертационного совета

кандидат биологических наук

 С.М. Бикбулатова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Колорадский жук – вид с продолжающимися процессами видообразования, характеризуется значительным внутривидовым полиморфизмом и экологической пластичностью (Ушатинская, 1981; Фасулати, 2002). Это позволяет ему успешно адаптироваться, в том числе и к антропогенным воздействиям – у колорадского жука развилась резистентность к почти всем используемым на настоящий момент и применявшимся ранее инсектицидам, во всём его ареале. Согласно современному взгляду на популяцию как на единицу эволюции и одновременно – единицу управления видами (Яблоков, 1987), очевидна необходимость изучения этого вида на популяционном уровне.

С.Р. Фасулати (1985, 1986, 1987) на территории Восточно-Европейской равнины выделил пять популяционных комплексов колорадского жука, а также смежный с ними западно-казахстанский и изолированный от основного ареала среднеазиатский комплексы. Граница между двумя восточно-европейскими комплексами популяций, возможно, проходит по территории Башкортостана (Вилкова, Фасулати, 2001; Вилкова с соавт., 2005).

Изменения структуры популяций колорадского жука, происходящие с высокой скоростью, обуславливают необходимость систематического анализа с использованием большого количества типов фенотипов. Разработанные в последние десятилетия молекулярно-биологические методы генетического анализа позволяют оценить степень внутривидового полиморфизма на уровне первичной структуры ДНК (Roderick, 1996; Loxdale, Lushai, 1998). Сочетание классических и современных методов должно дать наиболее адекватную оценку уровня полиморфизма и популяционной структуры вида.

Цель работы: выявление особенностей формирования популяционной структуры колорадского жука на Южном Урале.

Для достижения данной цели были поставлены следующие задачи:

1. Собрать биологический материал и создать банк ДНК колорадского жука для проведения популяционно-генетических исследований.
2. Провести анализ полиморфизма в локальных популяциях колорадского жука по уровню чувствительности к инсектицидам.
3. Оценить уровень полиморфизма в модельной локальной популяции с установленным высоким уровнем резистентности к фосфорорганическим инсектицидам по наличию нуклеотидной мутации 980A>G гена ацетилхолинэстеразы (*AChE*).
4. Проанализировать фенетическую структуру популяции, оценить её динамику во времени и влияние инсектицидного пресса.
5. Провести анализ полиморфизма фрагмента гена цитохромоксидазы I (COI) мтДНК в локальных популяциях колорадского жука.
6. Оценить возможные эволюционные процессы в южноуральской популяции колорадского жука и факторы, влияющие на них.

Научная новизна. Впервые в России создан банк ДНК колорадского жука объемом 1035 образцов. Впервые использованы методы ДНК-анализа для уточнения филогенетических отношений родов *Leptinotarsa* и *Zygogramma*. На основе анализа четырёх типов фенов рисунка покровов (22 вариации) впервые показана подразделённость структуры популяции колорадского жука на Южном Урале и установлено наличие популяционной системы. Впервые проведено исследование частот аллелей 980A>G гена *AChE* в модельной локальной популяции (Уфимский р-н) с установленным высоким уровнем резистентности к фосфорорганическим инсектицидам.

Практическая значимость работы. Анализ структуры популяции колорадского жука является первым этапом на пути к научному обоснованию проведения мер по регулированию его численности. Выявление двух групп популяций, различающихся по уровню чувствительности к инсектицидам, должно послужить основой для дифференциации схем защиты растений.

Полученные в работе результаты помогут скорректировать точность прогноза расселения колорадского жука на территории России и скорость формирования устойчивых к инсектицидам популяций. Отработанные методы анализа полиморфизма колорадского жука могут послужить материалом в процессе учебно-полевых практик, на практических занятиях и при подготовке квалификационных работ в учебных заведениях.

Положения, выносимые на защиту:

1. Мозаичность распределения резистентных к инсектицидам локальных популяций колорадского жука по территории Башкортостана.
2. Наличие множественной резистентности, а также начало формирования резистентности к препаратам новых классов в локальных популяциях колорадского жука.
3. Наличие мутации 980A>G гена *AChE* в модельной локальной популяции колорадского жука с высоким уровнем резистентности к фосфорорганическим инсектицидам.
4. Снижение уровня фенетического разнообразия в локальных популяциях колорадского жука под действием инсектицидного пресса.
5. Подразделённость популяции колорадского жука на Южном Урале и её обусловленность действием инсектицидного пресса.
6. Существование нуклеотидных различий фрагмента гена COI мтДНК у особей колорадского жука североамериканских и южноуральских популяций.

Апробация работы. Основные положения диссертации были представлены на XII – м съезде Русского Энтомологического Общества (Санкт-Петербург, 2002), 6-ой Пущинской школе-конференции молодых ученых "Биология – наука XXI века" (Пушино, 2002), международной научно-практической конференции "Экологические аспекты интенсификации сельскохозяйственного производства" (Пенза, 2002), II-й международной конференции "Разнообразие беспозвоночных животных на Севере"

(Сыктывкар, 2003), III-м съезде ВОГиС (Москва, 2004) и на IX-м Всероссийском популяционном семинаре “Особь и популяция – стратегии жизни” (Уфа, 2006).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 12 работ.

Структура и объём диссертации. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания объекта и методов исследования, результатов собственных исследований и их обсуждения, заключения, выводов, списка цитированной литературы, содержащего 250 источников (в том числе на иностранном языке 120) и приложения. Работа изложена на 177 страницах машинописного текста, иллюстрирована 18 таблицами и 31 рисунком.

ОБЪЕКТ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

В качестве объекта исследований были использованы перезимовавшие имаго колорадского жука *Leptinotarsa decemlineata* Say. Сбор проводился в 40 локальных популяциях 32-х районов Башкортостана (рис. 1).

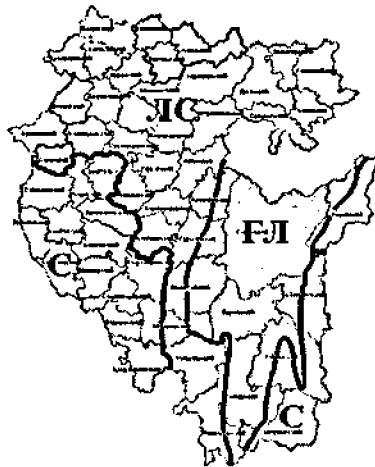


Рис. 1. Карта обследованных локальных популяций колорадского жука.

ЛС – лесостепная зона, С – степная, ГЛ – горно-лесная. Агропочвенное деление территории дано по (Атлас республики Башкортостан, 1992).

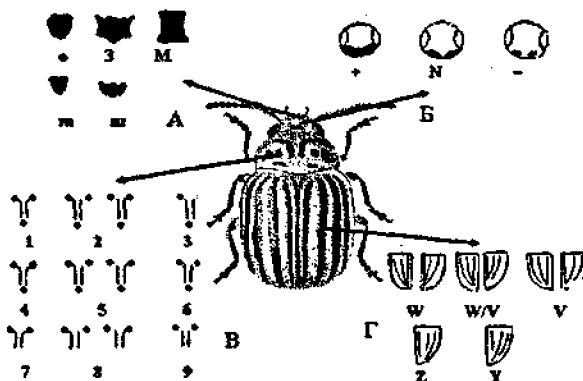
Оценку чувствительности имаго к пиретроидам (дельтаметрин, децис КЭ 2.5 г/л), фосфорорганическим инсектицидам (ФОИ: малатион, карбофос СП 100 г/кг), неоникотиноидам (тиаметоксам, актара ВДГ 250 г/кг; ацетамиприд, моспилан РП 200 г/кг) проводили топикально предварительно установленными диагностическими концентрациями (ДК) в дозе 1 мкл/особь. По результатам

учётов смертности на 3-и сутки определяли соотношение чувствительных и устойчивых к каждому препарату особей в локальных популяциях.

Для анализа фенетического полиморфизма использовали фены рисунка темени, 5 вариаций (Климец, 1988; Беньковская с соавт., 2004), затылка, 3 вариации (Беньковская с соавт., 2004), пронотума, 9 вариаций, (Фасулати, 1985, 1986) и элитр, 5 вариаций (Климец, 1988; Беньковская с соавт., 2004) (рис.2).

Рис. 2. Фены рисунков отделов тела имаго *Leptinotarsa decemlineata*.

А – вариации фена темени, Б – затылка, В – пронотума, Г – элитр.



Для выделения ДНК использовали живых и фиксированных в 96%-ном этаноле имаго. В случае живых имаго ДНК выделяли из простерилизованных лапок (Сидоренко, Березовская, 2000). Выделение проводили методом экстракции смесью гуанидинтиоцианат-фенол-хлороформ (Chomezynski, Sacchi, 1987). Амплификацию ДНК проводили методом ПЦР (Saiki et al., 1988) в амплификаторе “Терцик” (ДНК-Технология, Россия). Фрагмент гена COI мтДНК амплифицировали по Hebert (Hebert et al., 2003). Идентификацию нуклеотидной мутации 980A>G гена *AChE* проводили методом bi-PASA (Clark et al., 2001). Обработку ДНК ферментами рестрикции проводили при условиях, рекомендованных производителями (СибЭнзим, Россия). Для электрофоретического фракционирования препаратов ДНК в зависимости от целей эксперимента использовали 0.8–2% агарозные или же 5–8% полиакриламидные гели. Определение нуклеотидных последовательностей фрагмента гена COI проводили в автоматическом секвенаторе типа ABI

PRISM™ 310 Genetic Analyser, Applied Biosystems в условиях, рекомендованных производителями.

Токсикологические данные обрабатывали с применением формулы Эббота (Abbot, 1925). Величины CK_{50} , CK_{95} и ДК определяли методом пробит-анализа в модификации Миллера-Тейнтера (Беленький, 1963). Оценку внутривидового разнообразия проводили с использованием среднего числа вариаций μ и доли редких вариаций h с их выборочными ошибками (Животовский, 1982). Для оценки межвидовых различий использовали показатель сходства видов r (Животовский, 1982). Достоверность различий оценивали по критерию соответствия К. Пирсона χ^2 (Лакин, 1990).

Расчеты по всем приведенным показателям проводили с использованием компьютерной программы Microsoft Excel 2002, (1985-2001, Microsoft Corporation). Дендрограммы взаимоотношений между локальными популяциями колорадского жука строили по значениям показателя r при помощи пакета компьютерных программ STATISTICA 5.0 (1984-1985, Statsoft, Inc.). Кластеризацию проводили по стратегии Варда, в качестве метрики использовали Евклидово расстояние. Рельефные поверхности, отображающие эпигенетический ландшафт популяции, строили при помощи компьютерной программы 3D Field 2.7.7.0 (1998 – 2005, Vladimir Galouchko). Компьютерный анализ нуклеотидных последовательностей фрагмента гена COI, подбор праймеров и рестриктаз осуществляли с помощью пакета компьютерных программ Lasergene 5.05 (1989-2002, "DNASTAR Inc.", USA), а также программ PrimerPremier 5.00 (PREMIER Biosoft International) и Chromas 1.45 (1996-1998, Conor McCarthy, School of Health Science, Australia).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Полиморфизм колорадского жука на Южном Урале

Заселение территории Башкортостана колорадским жуком проходило в период с 1976 по 1979 гг. (Прогноз появления..., 1978). Контроль его численности осуществлялся вначале с помощью хлор- и фосфорорганических

инсектицидов, а с середины 80-х годов – синтетических пиретроидов. Токсикологическая оценка (1984–1985 гг.) позволила охарактеризовать сложившуюся к тому времени популяцию колорадского жука как однородную по уровню чувствительности к пиретроидам (Амирханов с соавт., 1986, 1991). Последовавшие затем многолетние обработки пиретроидами привели к появлению в отдельных районах высокорезистентных к ним локальных популяций (Амирханов, 1995; Леонтьева с соавт., 2000).

На начальном этапе работы мы оценили локальные популяции колорадского жука по уровню чувствительности к инсектицидам, и исследовали меж- и внутривидовой фенетический полиморфизм.

Полиморфизм колорадского жука по уровню чувствительности к инсектицидам. Выбранные препараты (децис, карбофос, моспилан и актара) использовали в установленных нами в предварительных опытах ДК для токсикологической оценки локальных популяций. Смертность жуков от ДК с поправкой на контроль показывает процент особей, чувствительных к данному инсектициду в исследуемой популяции. Результаты токсикологических экспериментов для препаратов децис и карбофос представлены на рис. 3.

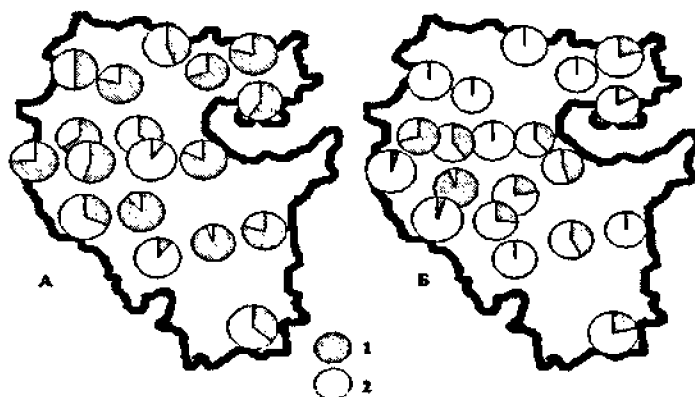


Рис. 3. Распределение чувствительных/резистентных генотипов в локальных популяциях Башкортостана (2004-2005 гг.).

А – для дециса, Б – для карбофоса.

1 – чувствительные генотипы, 2 – резистентные.

Полученные данные показали, что устойчивость к децису, который широко применялся в Башкортостане, проявляется почти повсеместно. В отдельных локальных популяциях колорадского жука обнаружено более 80% чувствительных особей, в то время как в других их менее 10%.

Устойчивость к карбофосу распространена гораздо шире – чувствительных особей осталось менее 25%, с изменением данного показателя от 0% смертности до 93-94% смертности.

Для установления возможных молекулярно-генетических основ существующей резистентности к ФОИ мы провели ДНК-анализ особей колорадского жука.

Известно, что один из основных механизмов резистентности насекомых к ФОИ – снижение чувствительности к действию инсектицидов мутантной формы ацетилхолинэстеразы (*AChE*) (Feyereisen, 1995; ffrench-Constant et al., 1998). У колорадского жука обнаружена транзикация 980A>G в гене *AChE*, приводящая к аминокислотной замене Ser291Gly (Zhu, Clark, 1995). Для выявления данной точковой мутации в гене *AChE* колорадского жука мы использовали метод двунаправленной ПЦР-амплификации специфичных аллелей (bi-PASA), который позволяет идентифицировать как чувствительные и резистентные гомозиготные аллели SS и RR, так и гетерозиготы SR (Clark et al., 2001).

Мы проанализировали генотипы общей выборки (N=98) колорадского жука дмитриевской локальной популяции Уфимского р-на Башкортостана.

Из трёх возможных аллельных состояний (SS, RR и SR) фрагмента гена *AChE* нами были идентифицированы резистентные гомозиготы RR (частота встречаемости 0.7) и гетерозиготы SR (частота встречаемости 0.3) (рис. 4).

Колорадский жук в локальных популяциях Уфимского р-на характеризуется максимальной резистентностью к карбофосу (смертность в одной из локальных популяций при применении ДК 0%).

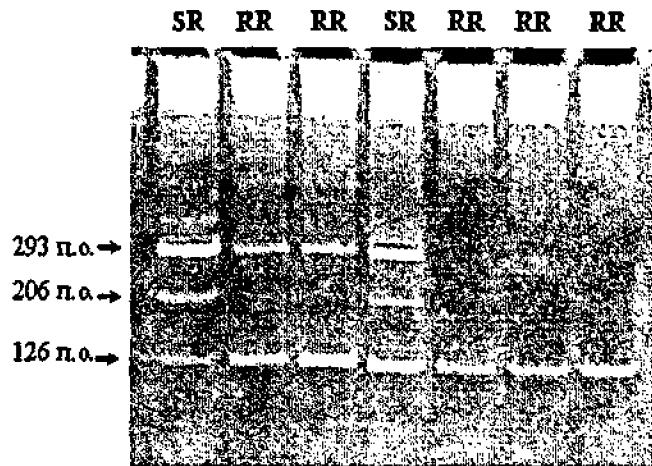


Рис. 4. Электрофореграмма результатов bi-PASA фрагмента гена *AChE* колорадского жука.

RR – резистентные гомозиготные аллели (фрагмент длиной в 126 п.о.), SR – гетерозиготные аллели (фрагменты длиной в 206 и 126 п.о.). Фрагмент длиной в 293 п.о. – продукт неспецифической ПЦР с участием двух внешних праймеров.

Мы считаем, что долговременные обработки ФОИ на начальном этапе расселения колорадского жука по территории республики элиминировали особей с чувствительными генотипами (гомозиготные аллели дикого типа SS не были обнаружены).

Вызывает беспокойство наличие локальных популяций колорадского жука, в которых обнаружены особи, устойчивые к препаратам новых классов. Для применяющихся с начала 2000-х гг. моспилана и актары в ряде локальных популяций отмечена смертность от ДК не более 90% и 20% соответственно.

Изменение фенетической структуры популяции колорадского жука во времени. Рассмотрим изменение фенетической структуры на примере старомусинской локальной популяции Кармаскалинского р-на Башкортостана (рис. 5). Различия между выборками, разделёнными во времени периодом в 8 лет, статистически достоверны при 1%-м уровне значимости для фенов темени ($\chi^2_{\phi}=31.97$, что $>\chi^2_{st}=13.28$, $k=4$) и пронотума ($\chi^2_{\phi}=51.95$, что $>\chi^2_{st}=20.09$, $k=8$), однако недостоверны для фена элитр ($\chi^2_{\phi}=3.66$, что $<\chi^2_{st}=9.21$, $k=2$).

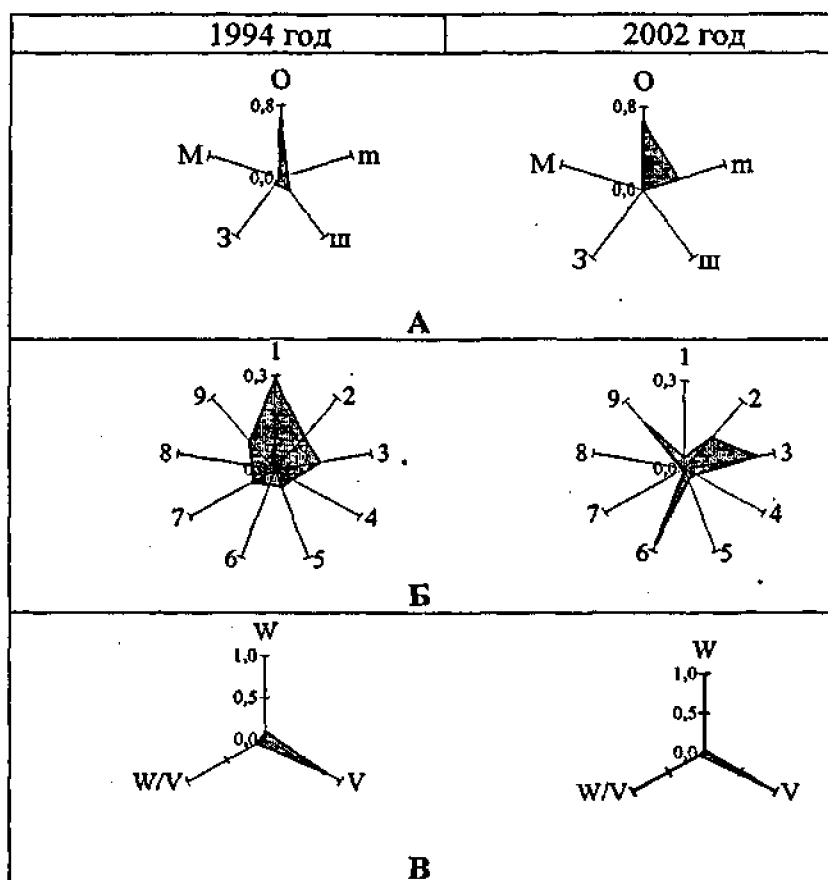


Рис. 5. Фенетическая структура старомусинской локальной популяции.

А – вариации фена темени, Б – пронотума, В – элитр. На осях отложены частоты вариаций соответствующего фена.

Произошедшие за период с 1994 по 2002 гг. изменения характерны в большей степени для фена темени (частота вариации “m” возросла с 0.08 до 0.34; вариации “ш”, “З” и “М” исчезли) и пронотума (в два раза возросла частота вариаций “З”, “б” и “9”, резко сократилась частота вариаций “1” и “7”), чем для фена элитр.

Подобная тенденция изменения фенетической составляющей структуры популяции (уменьшение и исчезновение частот одних вариаций на фоне увеличения других) неизбежно должна привести к снижению разнообразия в локальных популяциях, что нами и наблюдалось.

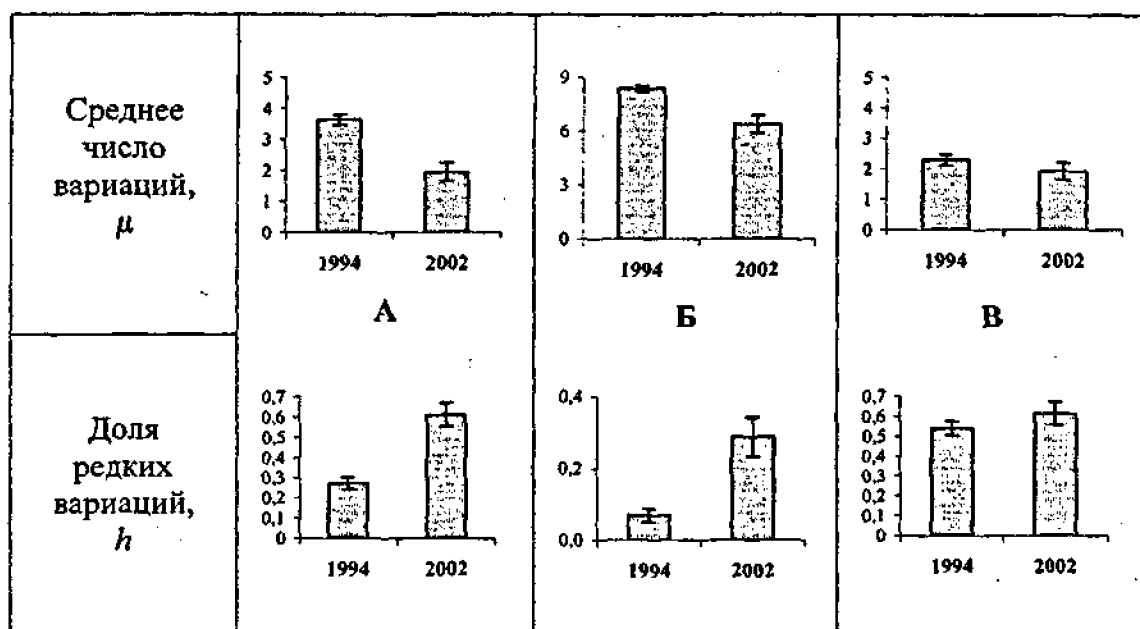


Рис. 6. Изменения уровня фенетического разнообразия в старомусинской локальной популяции за ряд лет.

А – вариации фена темени, Б – пронотума, В – элитр.

В рассматриваемой нами локальной популяции за период наблюдений с 1994 по 2002 гг. отмечено изменение уровня фенетического разнообразия. В большей степени такие изменения проявлялись для фенов рисунка темени и пронотума, в меньшей – для фена элитр (рис. 6). Среднее число вариаций μ для фена темени снизилось с 3.64 в 1994 г. до 1.95 в 2002 г. (в 1.9 раза), для фена пронотума – с 8.38 до 6.41 (в 1.3 раза), для фена элитр с 2.30 до 1.92 (в 1.2 раза).

Обратная тенденция отмечена для такого показателя, как доля редких вариаций h , характеризующего структуру внутрипопуляционного разнообразия (рис. 6). В частности, за период с 1994 по 2002 гг. значение данного показателя для фена темени возросло в 2.2 раза, для фена пронотума – в 4.2 раза, для фена элитр – сохранилось с тенденцией к росту. На наш взгляд, это можно объяснить тем, что в процессе становления данной локальной популяции (подобная тенденция характерна и для выборок из других локальных популяций) снижение разнообразия происходит за счёт перераспределения

частот вариаций, в ходе которого часть вариаций, сформировавших основу фенооблика популяции, переходит в разряд редких.

Показано, что в результате воздействия инсектицидов наблюдается изменение фенотипического состава популяций вредителя (Кохманюк, 1982; Фасулати, 1986; Король, 2000; Беньковская с соавт., 2000), что происходит в результате избирательного выживания особей, устойчивых к действию инсектицидов, чей генотип маркируется определёнными фенами рисунка.

Возможно, что именно многолетнее действие инсектицидного пресса оказывает влияние на динамику фенетической структуры популяции колорадского жука. Рассмотрим, какие изменения происходят непосредственно после воздействия инсектицидов.

Изменение уровня разнообразия в локальных популяциях колорадского жука под влиянием инсектицидного пресса. В серии лабораторных опытов по оценке влияния волатона (инсектицид из класса ФОИ) на изменения уровня фенетического разнообразия у имаго из аксёновской локальной популяции (Альшеевский р-н Башкортостана) была показана статистическая значимость различий только для изменений вариаций фена пронотума: при сравнении выживших в опыте с выжившими в контроле $\chi^2_{\phi}=18.09$, при сравнении с погибшими в опыте $\chi^2_{\phi}=19.03$. Оба значения $\chi^2_{\phi} > \chi^2_{st}=17.65$, при $k=8$ и 2.5%-м уровне значимости. По результатам сравнения выборок по частотам фенов темени и элитр различия статистически не значимы даже при 5%-ом уровне (для фена темени: сравнение выживших в опыте с выжившими в контроле $\chi^2_{\phi}=4.11$, что $< \chi^2_{st}=9.35$, $k=3$, с погибшими в опыте $\chi^2_{\phi}=2.82$, что $< \chi^2_{st}=11.14$, $k=4$; для фена элитр соответственно $\chi^2_{\phi}=1.9$, что $< \chi^2_{st}$ при $k=3$ и $\chi^2_{\phi}=1.77$ что $< \chi^2_{st}$ при $k=3$).

Отмечено снижение фенетического разнообразия (среднее число вариаций μ) в группе выживших особей в опыте как при сравнении с контролем (в 1.7 раза для фена темени, в 1.5 раза для фена пронотума и 2.3 раза

для фена элитр), так и при сравнении с погибшими в опыте (в 1.9 раза для фена темени, в 1.4 раза для фена пронотума и в 2.5 раза для фена элитр).

Таким образом, было отмечено в нативных популяциях и экспериментально подтверждено в лабораторных опытах снижение среднего числа вариаций под влиянием инсектицидного пресса. Данный факт можно использовать для раннего прогнозирования развития резистентности колорадского жука к инсектицидам.

Межпопуляционный полиморфизм колорадского жука на Южном Урале. Для анализа межпопуляционного полиморфизма нами было проведено сравнение 25-и выборок из локальных популяций по частотам вариаций с привлечением кластерного анализа. Для этого использовался показатель сходства популяций r (Животовский, 1982).

В среднем для четырёх типов фенов на территории Башкортостана можно выделить две крупные внутривидовые группы, включающие в себя: А – локальные популяции с центра рассматриваемой территории и Б – локальные популяции с периферии территории (рис. 7). Данные группы, помимо их географической приуроченности, различаются по уровню внутривидового разнообразия. Для группы А: $\mu=3.628$, $h=0.347$, для группы Б: $\mu=3.934$, $h=0.286$.

Возможно, что на начальном этапе формирования популяции колорадского жука основой для подобной дифференциации её структуры послужили первые очаги его появления (Кумертауский и Архангельский р-ны), то есть сказался своего рода принцип основателя (рис. 7).

Таким образом, на территории Башкортостана сформировалась специфическая популяционная система колорадского жука, устойчивая к воздействию различных факторов. Начало этому было положено принципом основателя, причём он не был нивелирован последующим расселением колорадского жука с запада и, видимо, был усилен селективным воздействием инсектицидного пресса.

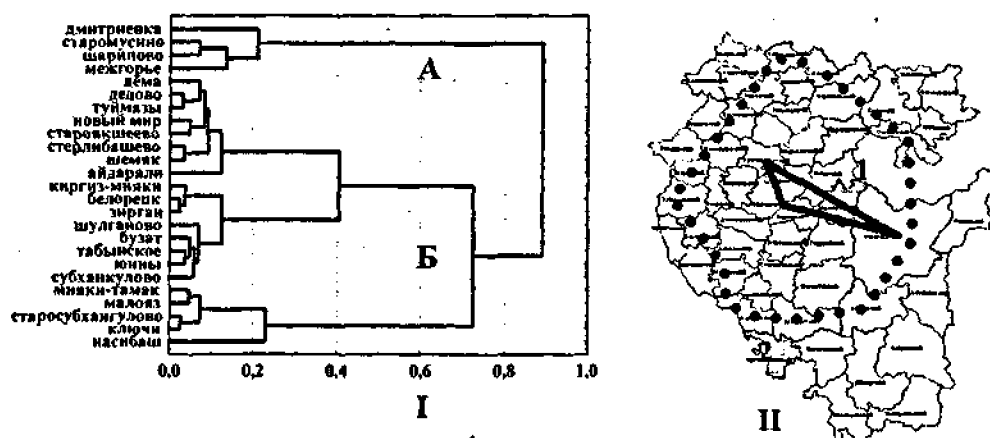


Рис. 7. Подразделённость популяции колорадского жука на Южном Урале.

I – дендрограмма взаимоотношений между локальными популяциями (построенная по значениям показателя сходства r) в среднем для четырёх типов фенотипов. А, Б – две группы локальных популяций.

II – территориальная приуроченность данных групп: сплошная линия – группа А, пунктирная – группа Б. 1– Архангельский р-н, 2– Кумертаусский.

Анализ полиморфизма фрагмента гена цитохромоксидазы I (COI) мтДНК. Следующим этапом нашей работы являлся анализ полиморфизма фрагмента гена COI мтДНК колорадского жука. В работе использовались образцы из 5-ти локальных популяций Башкортостана (киргиз-мирянская, дедовская, дёмская, шулгановская и межгорьевская). В ходе ПЦР-ПДРФ-анализа данного фрагмента полиморфизма по сайтам рестрикции для двух рестриктаз (*HinfI* и *Kzo9I*) обнаружено не было. Последовавшее затем определение первичных нуклеотидных последовательностей данного фрагмента у особей вышеуказанных локальных популяций показало наличие некоторых отличий от нуклеотидной последовательности, опубликованной ранее (Ass.No AY165708; Hebert et al., 2003) и принятой нами за условно "стандартный" митотип. Так, было отмечено 11 нуклеотидных замен. Почти все они, приходясь на третий нуклеотид в кодоне, не повлияли на изменение аминокислотного состава. И лишь одна замена 3G>C в последовательности,

полученной для образца из дедовской локальной популяции, привела к аминокислотной замене Gly/Ala. Определённые нами нуклеотидные, а также выведенные из них аминокислотные последовательности депонированы в международных банках данных DDBJ/EMBL/GenBank под регистрационными номерами DQ011111, DQ127906 – DQ127909, DQ649094 – DQ649101.

Далее, с целью оценки возможных эволюционных изменений, прошедших с момента раздельной эволюции североамериканских и европейских популяций колорадского жука, мы провели сравнение нуклеотидных последовательностей фрагмента гена COI, добавив для анализа полученные из базы данных DDBJ/EMBL/GenBank соответствующие фрагменты гена близких видов рода *Leptinotarsa* – 1 образец *L. haldemani* (США, Аризона, Acc.No DQ459377), 2 образца *L. juncta* (США, Мериленд, Acc.No AY532655; Западная Вирджиния, Acc.No AY532656), а также 1 образец вида *Zygogramma piceicollis* (Acc.No AY171413). В качестве реперной последовательности был взят соответствующий фрагмент гена *Drosophila melanogaster* (Acc.No U37541). Наиболее близки между собой особи *L. decemlineata* с Южного Урала, к которым примыкает североамериканский образец данного вида (рис. 8). Наиболее обособленным оказался представитель вида *Z. piceicollis*. Род *Zygogramma* считается предковым для рода *Leptinotarsa*, однако подобного вывода, сделанного на основе изучения рисунка элитры (Tower, 1906), было явно недостаточно. Использование в филогенетическом анализе дополнительных морфологических характеристик позволило рассматривать оба рода как очень близкие, но развивавшиеся независимо от общего предка (Ушатинская, 1981). Полученные нами на основе сравнения нуклеотидных последовательностей фрагмента гена COI результаты укладываются в гипотезу об общности происхождения родов *Zygogramma* и *Leptinotarsa*.

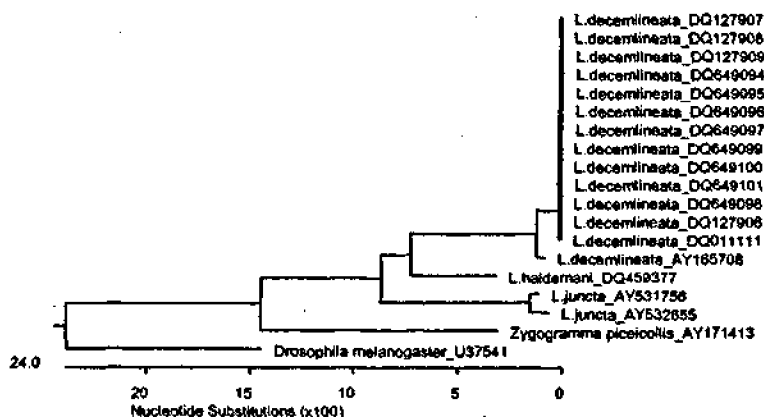


Рис. 8. Филогенетические отношения внутри родов *Leptinotarsa* и *Zygogramma* на основе сравнения нуклеотидных последовательностей фрагмента гена COI мтДНК.

Деление на кластеры на данной дендрограмме особей колорадского жука из южноуральских и североамериканских популяций служит ещё одним подтверждением гипотезы об интенсивном процессе подвидообразования во всём ареале колорадского жука. Скорее всего, подобные различия сложились в ходе раздельной эволюции североамериканских и европейских популяций колорадского жука.

Эпигенетическая структура популяции колорадского жука на Южном Урале. В работе были проанализированы локальные популяции колорадского жука на Южном Урале по уровню чувствительности к инсектицидам, уровню фенетического и ДНК-полиморфизма. И токсикологическая оценка, и фенетический анализ показали наличие как внутрипопуляционного, так и межпопуляционного полиморфизма. Кластерный анализ позволил установить подразделённость популяции колорадского жука на две группы популяций с неоднородным фенетическим составом и уровнем чувствительности к инсектицидам.

Для характеристики эпигенетического ландшафта популяции мы использовали показатель "среднее число вариаций" μ . По значениям μ , а также по данным токсикологического анализа, на карте Башкортостана строилась

рельефная поверхность, где элементы рельефа – впадины, равнины и горные пики – отображают различную интенсивность выраженности какого-либо показателя (Pauken, Metter, 1971), в нашем случае – уровня разнообразия и резистентности. Данная рельефная поверхность рассматривалась в дальнейшем как эпигенетический ландшафт популяции. В качестве примера эпигенетического ландшафта популяции приведены таковые, построенные для фенов темени и пронотума и для уровня смертности от дециса.

Оказалось, что для фена темени состав популяции по такому показателю, как среднее число вариаций μ , представлен следующим образом: минимальное число вариаций, т.е. минимальное разнообразие, характерно для центральной части рассматриваемой территории (рис. 9, А) (значение μ для старомусинской, дмитриевской и шариповской локальных популяций составило 1.947, 2.252 и 2.393 соответственно). Отмечено возрастание значений μ по направлению от "центра" территории к периферии.

Так, значение μ для шулгановской и староякшеевской локальных популяций (север республики) оказалось равно 3.269 и 2.986 соответственно, для малоязовской и насибашской (северо-восток) – 4.450 и 4.358, табынской – 4.128 (юго-восток), стерлибашевской, айдаралинской и бузатовской – 3.319, 4.045 и 4.394 (юго-запад), туймазинской и субханкуловской – 3.688 и 3.386 (запад). Следует отметить, что три локальные популяции Стерлибашевского р-на (стерлибашевская, айдаралинская и бузатовская) расположены друг относительно друга практически на прямой линии (тренд север – юго-запад), составляя характерный феноклин. Эпигенетический ландшафт для фена пронотума (рис. 9, Б) также характеризуется возрастанием уровня разнообразия от центра территории (μ для дёмской локальной популяции 6.823) к периферии, особенно в направлении к северо-западу (μ для шулгановской – 8.576).

В пользу неслучайного характера выявленной нами структуры популяции колорадского жука на территории Башкортостана может служить экстраполяция полученной картины за пределы данной территории. Так, на

основе частот вариаций фена пронотума особей из двух приказанских локальных популяций (Зелеев, 2003) нами было рассчитано среднее число вариаций μ . Оказалось, что значения μ продолжают возрастать по направлению к западу (рис.9, Г).

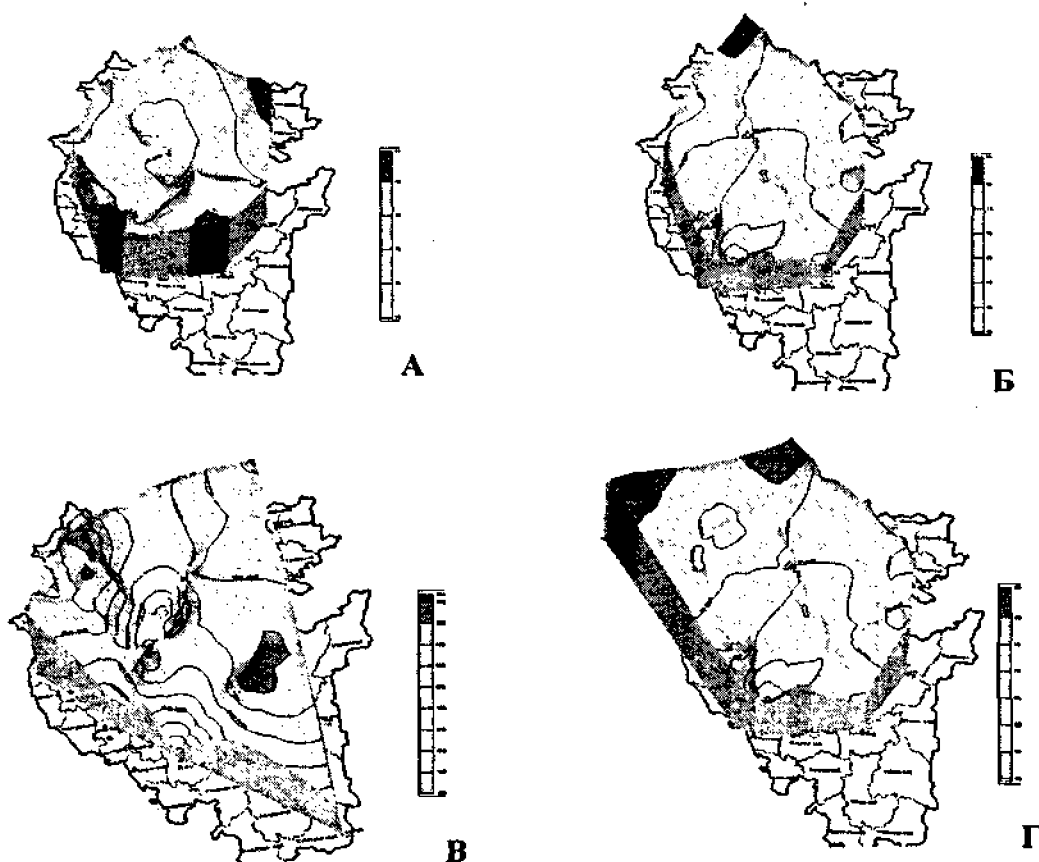


Рис. 9. Эпигенетические ландшафты популяции колорадского жука на Южном Урале.

А – уровень разнообразия μ для фена темени, Б – пронотума, В – уровень смертности от ДК дециса, Г – значение μ для фена пронотума с дополнением двух приказанских локальных популяций (рассчитано по (Зелеев, 2003)).

Рельефные поверхности, построенные по результатам токсикологического анализа, схожи для четырёх использованных в нашей

работе инсектицидов (на рис.9, В, приведён эпигенетический ландшафт для уровня смертности от ДК дециса). Минимальная смертность после воздействия ДК дециса, карбофоса, моспилана и актары отмечена для локальных популяций центральной части рассматриваемой территории. К окраинам уровень смертности (отражающий чувствительность особей в популяции) возрастает.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, нами был проведён анализ структуры южноуральской популяции колорадского жука и её изменений между 1994 и 2002 гг. Структуру популяции колорадского жука на Южном Урале образно можно представить в виде чаши с углублением в центре (минимальное фенетическое разнообразие и минимальная смертность под действием инсектицидов) и возвышением на окраинах рассматриваемой территории (где отмечен максимальный для данной территории уровень разнообразия и максимальная смертность). Определённое совпадение результатов по данным фенетических и токсикологических исследований, на наш взгляд, не случайно и имеет следующее объяснение. Мы считаем, что на формирование структуры популяции колорадского жука на Южном Урале основное влияние оказал инсектицидный пресс. Обработки инсектицидами приводят как к изменению фенотипического состава популяций вредителя, так и к снижению уровня разнообразия.

ВЫВОДЫ

1. Проведена оценка полиморфизма в популяциях колорадского жука по митохондриальному (COI) и ядерному (*AChE*) локусам на основе созданного банка ДНК (1035 образцов из 12 локальных популяций Башкортостана).

2. Показана мозаичность распределения резистентных локальных популяций колорадского жука на территории Южного Урала с использованием генетической характеристики резистентности к инсектицидам (ДК).

3. Установлена сформировавшаяся множественная резистентность в локальных популяциях колорадского жука из центральной и южной частей территории Башкортостана, сопровождающаяся проявлением высокого уровня резистентности к неоникотиноидам. Отмечено снижение эффективности тестируемых препаратов в большинстве из обследованных локальных популяций. Сохранение высокого уровня чувствительности к инсектицидам отмечено только в 3-х локальных популяциях из 25-ти обследованных.

4. Показано, что долговременные обработки ФОИ привели к элиминации особей с чувствительными генотипами (гомозиготные аллели дикого типа SS локуса 980A>G гена *AChE* не были обнаружены), что повлияло на уровень сформировавшейся резистентности.

5. Выявлены изменения фенетической структуры локальных популяций колорадского жука во времени. Экспериментально подтверждено снижение уровня фенетического разнообразия в локальных популяциях колорадского жука под действием инсектицидного пресса, лежащее в основе происходящих изменений.

6. Показано подразделение южноуральской популяции колорадского жука на две группы локальных популяций, приуроченных к центральной и периферийной части Башкортостана и различающихся по уровню фенетического разнообразия и чувствительности к инсектицидам.

7. Выявлены различия между нуклеотидными последовательностями фрагмента гена COI мтДНК южноуральской и североамериканской популяций колорадского жука. Впервые на основе сравнения нуклеотидных последовательностей фрагмента гена COI мтДНК колорадского жука подтверждена общность происхождения родов *Zygogramma* и *Leptinotarsa*.

8. Обнаружено, что действие инсектицидного пресса обусловило формирование подразделённой популяционной системы колорадского жука,

сохраняющей признаки различий между первичными очагами заселения территории РБ.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Удалов М.Б., Беньковская Г.В., Поскряков А. В., Николенко А.Г. Особенности биологии колорадского жука (*Leptinotarsa decemlineata* Say) в Предуралье Башкирии: репродуктивное состояние самок // Материалы международной научно-практической конференции “Экологические аспекты интенсификации сельскохозяйственного производства”. – Пенза, 2002. – С. 203–205.
2. Удалов М.Б., Поскряков А.В., Новицкая О.П., Николенко А.Г. Методы анализа резистентности к пестицидам в популяции колорадского жука *Leptinotarsa decemlineata* Say // 6-ая Пущинская школа-конференция молодых ученых “Биология - наука XXI века”.–Пушино, 2002. – С. 64–65.
3. Удалов М.Б., Новицкая О.П., Поскряков А.В., Николенко А.Г. Увеличение резистентности колорадского жука к инсектицидам в Башкирии // Тезисы докладов XII съезда РЭО. – Санкт-Петербург, 2002. – С. 351-352.
4. Удалов М.Б., Поскряков А.В., Беньковская Г.В., Николенко А.Г. Молекулярно-биологические методы мониторинга резистентности к инсектоакарицидам в популяциях членистоногих // Агрохимия. – 2003. – №6. – С. 81–88.
5. Удалов М.Б., Беньковская Г.В., Поскряков А.В., Николенко А.Г. Динамика популяционной структуры *Leptinotarsa decemlineata* Say (Coleoptera: Chrysomelidae) в Башкирии по данным фенорморфологического анализа // II Международная конференция “Разнообразие беспозвоночных животных на Севере”. – Сыктывкар, 2003. – С.72.
6. Удалов М.Б., Беньковская Г.В., Поскряков А.В., Николенко А.Г. Два экотипа как результат микроэволюции *Leptinotarsa decemlineata* Say на

- Южном Урале // "Генетика в XXI веке: современное состояние и перспективы развития". – III Съезд ВОГиС. – Москва, 2004. – Т.1. – С.463.
7. Беньковская Г.В., Удалов М.Б., Поскряков А.В., Николенко А.Г. Феногенетический полиморфизм колорадского жука *Leptinotarsa decemlineata* Say и его чувствительность к инсектицидам на территории Башкирии // Агрохимия. – 2004. – №12. – С. 23–28.
 8. Баринов М.К., Удалов М.Б., Тулаева И.А., Поскряков А.В. Возможность использования метода RAPD-PCR для выявления резистентных к демитану и талстару генотипов у обыкновенного паутинного клеща *Tetranychus urticae* Koch (Acarina, Tetranychidae) // Агрохимия. – 2005. – № 4. – С. 42-47.
 9. Николенко А.Г., Беньковская Г.В., Поскряков А.В., Удалов М.Б. Микроэволюция колорадского жука и инсектициды // Природа. – 2005. – №12. – С.67.
 10. 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 Management Newsletter. – 2006. – V. 15. – N .2.– P. 25–26.
 11. Benkovskaya G.V., Udalov M.B., Nikolenko A.G., Leontieva T.L. Temporal and toxicological dynamics in the cover spot patterns of the Colorado Potato Beetle in South Ural // Resistant Pest Management Newsletter. – 2006 – V. 15.–N. 2. –P. 13–15.
 12. Удалов М.Б. Леонтьева Т.Л. Николенко А.Г. Некоторые факторы формирования эпигенетического ландшафта популяции колорадского жука на Южном Урале // Сборник материалов IX Всероссийского популяционного семинара. – Уфа, 2006. – Ч.1. – С. 247–252.

УДАЛОВ МАКСИМ БОРИСОВИЧ

**СТРУКТУРА ПОПУЛЯЦИИ КОЛОРАДСКОГО ЖУКА
LEPTINOTARSA DECEMLINEATA SAY
НА ЮЖНОМ УРАЛЕ**

03.00.15 – генетика

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т

**диссертации на соискание учёной степени
кандидата биологических наук**

Лицензия № 0177 от 10.06.96 г.

Подписано в печать 12.10.2006 г.

Бумага офсетная. Отпечатано на ризографе.

Формат 60х84 ¹/₁₆. Усл.-печ. л. 1,56. Уч.-изд. л. 1,86.

Тираж 100 экз. Заказ № 387.

450000, г. Уфа, ул. Ленина, 3,
ГОУ ВПО «Башгосмедуниверситет РОСЗДРАВА»

