

© О. В. Сундуков, И. А. Тулаева,
Е. А. Зубанов

ФГБНУ «Всероссийский
НИИ защиты растений»,
Санкт-Петербург

На 20 инбредных генерациях проведен дизруптивный отбор самок обыкновенного паутинного клеща по наличию или отсутствию признаков резистентности к четырем инсектоакарицидам различных химических классов — диметоату, бифентрину, абамектину и бромпропилату. При дифференциации генотипов во всех резистентных к токсикантам линиях в каждом поколении присутствовало в среднем около 30 % самок без признака резистентности к акарициду из-за гапло-диплоидного способа размножения клещей. У единичных самок сравниваемых линий клещей выявлена активность карбоксилэстеразных фракций при электрофоретическом разделении ферментов. Клещи протестированы диагностическими концентрациями диметоата, бифентрина, пиридабена. Сопоставлено синергистическое действие на них ингибитора монооксигеназ — пиперонил бутоксида. Сделан вывод, что индукция карбоксилэстеразной и монооксигеназной активности является универсальной реакцией адаптивного ответа организма членистоногих при проявлении резистентности к любым инсектоакарицидам острого токсического действия.

✿ **Ключевые слова:** паутинный клещ; резистентность; инсектоакарициды; генотип; наследование; карбоксилэстераза.

ПРОЯВЛЕНИЕ ПРИЗНАКОВ РЕЗИСТЕНТНОСТИ К ИНСЕКТОАКАРИЦИДАМ В ИНБРЕДНЫХ ЛИНИЯХ ОБЫКНОВЕННОГО ПАУТИННОГО КЛЕЩА ПРИ ДИЗРУПТИВНОМ ОТБОРЕ

ВВЕДЕНИЕ

Паутинные клещи рода *Tetranychus* являются наиболее вредоносными фитофагами сельскохозяйственных культур. Около полутора десятков видов этого рода обитают более чем на 1100 видах растений 140 различных семейств. Вследствие очень короткого срока развития каждой генерации они обладают большим биотическим потенциалом и чрезвычайно быстро формируют резистентные популяции к применяемым против них акарицидам. Попытки создания научно обоснованной системы чередования используемых акарицидов, основываясь на различиях в механизмах их токсического действия для преодоления сформировавшейся резистентности, дают, как правило, разовый эффект и данная проблематика в течение многих десятилетий в научных публикациях не утрачивает своей актуальности. В отличие от проводившихся уже экспериментов на популяционных выборках паутинных клещей настоящее исследование выполнено на генотипах, полученных дизруптивным отбором инбредно культивируемых линий клеща. Основным выясняемым вопросом при этом являлось сходство и отличительные особенности биохимических механизмов, детерминирующих признаки резистентности к использованным в опытах инсектоакарицидам, относящихся к различным химическим классам.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Эксперименты проведены на обыкновенном паутинном клеще (*Tetranychus urticae* Koch). При дизруптивном отборе клещей с наличием или отсутствием признака резистентности к инсектоакарициду потомство селективируемых семей обрабатывали весовой (в %) диагностической концентрацией токсиканта — $СК_{95} \times 2$ для чувствительных к нему клещей. Тестирование проводилось методом окунания в раствор токсиканта на кусочке кормового растения появившихся на этот момент в каждой семье самок, если их было не менее 7. В семьях, селективируемых по признаку проявления резистентности к токсиканту, обрабатывали всех самок, а в семьях, отбираемых по факту чувствительности к применяемому инсектоакарициду — по 5–10 особей из каждой семьи. В случае их 100%-й смертности, от самок таких семей получали новое потомство. Семьи клещей в дифференцируемых линиях содержали на листовых плотиках фасоли, раскладывавшихся на залитую водой вату. Для воспроизводства каждого нового поколения брали по 10 самок из трех семей со 100%-й смертностью и из трех-четырех семей с 0%-й смертностью после обработки селективирующим токсикантом.

В опытах использованы препаративные формы инсектоакарицидов — диметоата (40 % к. э. * Би-58), бифентрина (10 % к. э. талстара), бромпропилата (50 % к. э. неорона) и абамектина (1,8 % к. э. вертимека). Для выявления механизмов, ответственных за выражение признаков резистентности к токсикантам были взяты также пиридабен (20 % с. п. ** санмайта) и ингибитор

Поступила в редакцию 11.03.2015
Принята к публикации 21.05.2015

* к. э. — концентрат эмульсии;

** с. п. — смачивающийся порошок.

системы цитохром Р450 монооксигеназ — пиперонил бутоксид (ППБ). Учет смертности клещей проводился через одни и трое суток после их окунания в раствор токсиканта.

Вычисление концентраций СК₉₅ выполнено методом пробит-анализа по Литчфильду и Уилкоксоу (Беленький, 1959). Ошибка выборочной доли средних арифметических процента смертности клещей в поколениях дизруптивного отбора клещей рассчитывали по формуле:

$$Sp (\%) = \sqrt{\frac{p(100-p)}{n}}$$

а коэффициент относительного рассеивания вариант — по формуле:

$$v = \frac{Sp (\%)}{\bar{x}} \times 100 \text{ (Урбах, 1964).}$$

Разделение эстераз подопытных клещей проводили методом диск-электрофореза в гель-системе с 7,5 % разделяющим полиакриламидным гелем рН 7,5 и трис-вероналовым электродным буфером рН 7,0 (Маурер, 1971).

Эстеразные фракции выявляли в инкубационной среде с 0,56 % 1-нафтилацетата и 0,2 % прочного синего RR в 0,2 М фосфатном буфере рН 6,9. Холинэс-

теразную фракцию и фракцию множественной молекулярной формы карбоксилэстеразы, активность которой увеличивалась у резистентных к акарицидам клещей, выявляли в инкубационной среде с бутирилтиохолин иодидом в 0,1 М фосфатном буфере рН 7,5 (Капновку, Roots, 1964).

Разделяемые образцы гомогената паутиных клещей для инкубационной среды с 1-нафтилацетатом готовили из 1-й и, в качестве дубля, 3 самок той же семьи в 40 мкл 40%-й сахарозы, а для тиохолиновой инкубационной среды — из 20 самок в 50 мкл 40%-й сахарозы, содержащей 1 % детергента — тритона X-100.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Селекция паутиных клещей на устойчивость и чувствительность к диметоату и бифентрину выявила сходный характер изменчивости проявления признака резистентности в поколениях дизруптивного отбора (табл. 1 и 2). Самки из семей полностью устойчивых к этим инсектоакарицидам производили новые семьи с различным количеством выживавших особей при тестировании их диагностическими концентрациями этих токсикантов. Суммарный среднестатистический показатель доли устойчивых к инсектоакарицидам клещей

Таблица 1

Проявление признака резистентности к диметоату в поколениях 1–10 и 11–20 дизруптивного отбора инбредных линий паутиного клеща

Линия R				Линия S			
Семей	Самок (n)	Смертность (%)	v (%)	Семей	Самок (n)	Смертность (%)	v (%)
30	304	29,3 ± 2,5		17	186	97,8 ± 1,3	
30	314	33,4 ± 2,7		16	160	100	
10	105	34,1 ± 5,1		13	141	99,1 ± 0,8	
7	75	19,3 ± 3,4		13	130	100	
19	207	47,7 ± 2,9		12	120	100	
14	156	24,5 ± 3,1		11	106	100	
8	92	39,2 ± 4,8		13	135	98,5 ± 1,5	
14	164	39,2 ± 3,5		7	96	100	
19	205	33,7 ± 2,8		16	163	99,0 ± 1,0	
17	191	29,4 ± 3,0		18	180	98,5 ± 1,1	
Σ 168	Σ 1813	χ̄ = 33,0 ± 3,4	10,3 ± 0,17	Σ 136	Σ 1417	χ̄ = 99,3 ± 0,6	0,6 ± 0,01
29	309	41,8 ± 2,1		15	164	93,7 ± 3,6	
18	200	30,7 ± 2,9		14	165	92,4 ± 4,1	
16	185	22,6 ± 2,7		14	150	97,7 ± 3,4	
17	195	32,3 ± 3,1		17	182	92,5 ± 3,9	
15	169	31,1 ± 3,2		18	189	99,2 ± 0,8	
17	185	30,9 ± 3,1		8	90	97,5 ± 2,5	
19	208	44,4 ± 3,2		16	175	96,5 ± 1,7	
16	193	38,3 ± 3,5		13	138	97,1 ± 2,0	
16	201	31,6 ± 3,1		20	210	99,1 ± 1,0	
23	259	42,1 ± 2,4		20	190	100	
Σ 186	Σ 2104	χ̄ = 34,6 ± 2,9	8,4 ± 0,13	Σ 155	Σ 1653	χ̄ = 96,6 ± 2,3	2,4 ± 0,04

Таблица 2

Проявление признака резистентности к бифентрину в поколениях 1–10 и 11–20 дизруптивного отбора инбредных линий паутиного клеща

Линия R				Линия S			
Семей	Самок (n)	Смертность (%)	v (%)	Семей	Самок (n)	Смертность (%)	v (%)
16	175	33,9 ± 4,4		8	87	100	
11	125	15,8 ± 3,7		8	85	85,7 ± 5,9	
30	292	15,8 ± 2,1		21	209	90,8 ± 2,8	
27	277	13,8 ± 2,3		20	202	84,4 ± 3,9	
30	309	11,8 ± 1,8		20	208	83,3 ± 3,6	
30	302	20,2 ± 2,1		20	194	88,3 ± 3,3	
26	280	19,4 ± 2,2		18	187	88,5 ± 4,0	
22	248	25,8 ± 2,6		17	186	94,2 ± 2,5	
14	145	29,7 ± 3,8		11	114	94,4 ± 3,1	
9	118	38,1 ± 4,5		19	198	92,9 ± 2,6	
Σ 215	Σ 2271	$\bar{x} = 22,4 \pm 2,9$	12,9 ± 0,19	Σ 162	Σ 1670	$\bar{x} = 90,2 \pm 3,2$	3,5 ± 0,06
7	76	17,4 ± 5,6		6	59	100	
5	68	22,1 ± 5,0		11	106	98,2 ± 1,8	
7	70	38,6 ± 5,8		16	160	100	
8	90	26,7 ± 4,7		17	165	96,5 ± 2,0	
7	78	20,0 ± 5,7		7	63	100	
8	98	32,4 ± 4,5		14	140	95,7 ± 2,4	
9	112	33,0 ± 4,4		16	163	96,4 ± 2,0	
6	73	32,9 ± 5,5		15	157	96,1 ± 2,2	
8	89	29,0 ± 5,5		18	190	95,6 ± 2,2	
15	155	37,3 ± 3,6		15	156	96,1 ± 2,2	
Σ 80	Σ 909	$\bar{x} = 28,9 \pm 5,0$	17,3 ± 0,4	Σ 135	Σ 1359	$\bar{x} = 97,4 \pm 1,5$	1,5 ± 0,03

в 10 первых поколениях отбора, включая и семьи, где все особи были резистентными, составлял при селекции диметоатом около 65 %, а при селекции бифентрином — 75 %. В следующих 10 поколениях отбора диметоатом и бифентрином данные показатели в резистентных линиях существенно не менялись.

При отборе потомства клещей, проявляющих чувствительность к действию этих токсикантов, в дочерних поколениях оказывались и устойчивые к этим инсектоакарицидам особи. Количество их в 10 поколениях отбора диметоатом было около 1 %, а при селекции бифентрином достигало в среднем 10 %. В следующих 10 дочерних поколениях количество клещей с признаком резистентности к диметоату увеличилось до 2,5 %, а при обработке бифентрином уменьшилось до такого же уровня.

Совсем иное соотношение устойчивых и чувствительных генотипов в дочерних поколениях самок, по сравнению с селекцией клещей на устойчивость к токсическому действию диметоата и бифентрина, выявлено при их дизруптивном отборе абаментиним. Самки из семей с полной выживаемостью клещей при обработке диагностической концентрацией абаментина в 10 первых поколениях отбора давали потомство, в котором только около половины общего количества особей были резис-

тентными к этому инсектоакарициду. В следующих 10 поколениях среднестатистическое количество устойчивого к абаментину потомства клещей увеличивалось до 70 % (табл. 3).

При селекции чувствительной к абаментину линии клеща в каждом поколении отбора с самого начала стабильно воспроизводились только особи, погибавшие при обработке диагностической концентрацией токсиканта. Появление единичных самок, выживавших в некоторых поколениях — в среднем менее 0,5 % во всех 20 поколениях (табл. 3), могло быть следствием возможных технических погрешностей эксперимента при окунании кусочков листа кормового растения с клещами в раствор токсиканта.

Третий вариант количественного соотношения генотипов с признаком резистентности и с его отсутствием в поколениях дизруптивного отбора получен при селекции клещей бромпропилатом (табл. 4). От самок из полностью резистентных к бромпропилату семей в 10 первых поколениях отбора получали потомство, в котором по суммарному количеству особей было только около 30 % резистентных клещей. В следующих 10 поколениях селекции устойчивые к бромпропилату самки производили уже в среднем около 75 % резистентных к этому токсиканту особей.

Таблица 3

Проявление признака резистентности к абамектину в поколениях 1–10 и 11–20 дизруптивного отбора инбредных линий паутинного клеща

Линия R				Линия S			
Семей	Самок (п)	Смертность (%)	v (%)	Семей	Самок (п)	Смертность (%)	v (%)
10	112	60,7 ± 4,6		20	200	100	
7	86	43,5 ± 7,3		12	124	100	
7	84	56,8 ± 7,5		9	95	100	
14	155	51,8 ± 3,6		20	208	100	
16	176	56,5 ± 3,1		18	180	100	
19	199	26,8 ± 2,2		17	170	100	
7	83	60,6 ± 8,5		7	84	100	
7	78	46,4 ± 9,4		8	89	100	
13	133	30,1 ± 4,1		9	94	100	
12	120	25,8 ± 4,0		20	200	99,1 ± 0,1	
Σ 112	Σ 1226	$\bar{x} = 45,9 \pm 5,4$	11,7 ± 0,23	Σ 140	Σ 1444	$\bar{x} = 99,9 \pm 0,1$	0,1 ± 0,002
8	83	21,7 ± 4,5		22	222	99,1 ± 1,0	
9	99	13,2 ± 3,4		20	209	98,3 ± 1,2	
19	197	42,0 ± 3,9		22	223	100	
11	109	18,3 ± 2,6		24	243	100	
18	197	14,5 ± 2,1		22	220	100	
10	106	28,6 ± 4,0		18	187	99,1 ± 0,9	
10	104	26,9 ± 4,3		18	184	100	
8	79	50,8 ± 5,5		21	221	100	
8	85	27,7 ± 5,5		10	102	100	
9	108	50,0 ± 4,6		20	204	100	
Σ 110	Σ 1167	$\bar{x} = 29,4 \pm 4,0$	13,6 ± 0,28	Σ 197	Σ 2015	$\bar{x} = 99,6 \pm 0,4$	0,4 ± 0,006

Селекция чувствительной к бромпропилату линии клеща давала в 10 первых генерациях в среднем около 80 % погибавших после обработки дискриминирующей концентрацией токсиканта особей, а после 20 поколения — около 90 % (табл. 4).

Одной из основных причин таких различий фенотипического проявления признака резистентности в инбредных поколениях клеща при дизруптивном отборе инсектоакарицидами мог быть партеногенетический способ его размножения по типу аррентокии. Диплоидная гетерозиготная самка, копируя диплоидных дочерних самок, производит гаплоидных самцов двух типов — с гаметами резистентных и чувствительных к токсиканту аллелей. Эти самцы при инбредном размножении имеют равные шансы участвовать в воспроизводстве следующего поколения при случайном соотношении количественной реализации такой возможности.

Как было выяснено гибридологическим анализом, из двух главных генов, детерминирующих признак резистентности к бромпропилату, один является доминантным, а дигенное наследование признака резистентности к абамектину было полностью доминантным (Сундуков и др., 2014). Доминантное состояние признака в инбредных поколениях дизруптивного отбора не позволяет освободиться от альтернативных чувствительных аллелей.

Вследствие этого и после 20 поколений дифференциации генотипов паутинного клеща по признаку устойчивости к четырем использованным инсектоакарицидам в общем количестве самок каждого нового поколения сохранялось в среднем около 30 % чувствительных к селектирующим инсектоакарицидам генотипов.

При дизруптивном отборе клещей на наличие альтернативного признака — чувствительности к токсикантам, выявлялись существенные различия его фенотипического выражения в дочерних генерациях при действии инсектоакарицидов различных химических классов.

Наблюдаемое в чувствительной к диметоату линии некоторое увеличение количества появляющихся в новых поколениях резистентных особей в 10 первых генерациях отбора (табл. 1) не связано со спонтанной амплификацией генного локуса, кодирующего синтез множественной молекулярной формы карбоксилэстеразы, которая определяет проявление признака резистентности к фосфорорганическим соединениям (Bass, Field, 2011). Спонтанное умножение участков ДНК у членистоногих может происходить в одном поколении с частотой не более чем в 10^{-4} – 10^{-3} случаев (Сингер, Берг, 1998). Значительно большее количество выявляемых резистентных самок в 20 поколениях дизруптивного отбора, вероятно, было обусловлено тем, что в отсутствие главного гена,

Таблица 4

Проявление признака резистентности к бромпропилату в поколениях 1–10 и 11–20 дизруптивного отбора инбредных линий паутиного клеща

Линия R				Линия S			
Семей	Самок (n)	Смертность (%)	v (%)	Семей	Самок (n)	Смертность (%)	v (%)
18	122	61,5 ± 3,6		24	240	72,6 ± 2,7	
27	275	68,7 ± 2,2		24	246	54,9 ± 2,8	
28	298	49,4 ± 2,2		17	169	77,5 ± 3,2	
30	304	70,0 ± 2,2		17	170	79,4 ± 3,1	
30	314	66,3 ± 2,1		20	198	79,5 ± 2,9	
30	294	65,0 ± 1,9		17	174	74,8 ± 3,0	
30	309	66,4 ± 2,0		17	171	72,2 ± 3,5	
29	297	83,4 ± 1,7		10	100	94,0 ± 2,4	
30	299	93,5 ± 1,1		7	69	97,4 ± 2,5	
23	229	62,2 ± 2,6		7	75	74,6 ± 5,4	
Σ 275	Σ 2801	$\bar{x} = 68,6 \pm 2,1$	3,1 ± 0,04	Σ 160	Σ 1612	$\bar{x} = 77,7 \pm 3,1$	4,0 ± 0,07
26	263	15,9 ± 1,9		15	149	97,3 ± 1,3	
20	206	31,9 ± 2,8		17	169	86,1 ± 2,6	
8	91	14,9 ± 3,1		17	175	96,5 ± 1,7	
18	189	28,6 ± 2,8		14	149	84,9 ± 3,3	
28	285	19,3 ± 1,8		18	186	85,3 ± 2,8	
28	291	24,2 ± 1,9		20	199	91,9 ± 1,9	
24	239	21,5 ± 2,2		19	197	88,7 ± 2,4	
22	220	39,7 ± 2,5		11	110	95,5 ± 2,0	
25	260	33,7 ± 2,3		15	149	71,5 ± 3,8	
23	240	36,5 ± 2,3		17	174	79,3 ± 3,2	
Σ 222	Σ 2284	$\bar{x} = 26,6 \pm 2,3$	8,6 ± 0,13	Σ 163	Σ 1657	$\bar{x} = 87,7 \pm 2,5$	2,8 ± 0,05

гены-модификаторы оказывали собственное действие на проявление признака резистентности.

Селекция линии клеща на проявление чувствительности к бифентрину, напротив, происходила с уменьшением фенотипической изменчивости признака в 11–20 поколениях дизруптивного отбора (табл. 2), что можно объяснить процессом концентрации аллелей, детерминирующих чувствительность к токсиканту.

Отсутствие резистентных особей в поколениях чувствительной к абаментину линии клеща (табл. 3) являлось следствием того, что оба главных гена, определяющие чувствительность клещей к этому инсектоакарициду, были рецессивными, а модифицирующих факторов, способных влиять на выражение признака резистентности к абаментину, в геноме самок чувствительной к абаментину линии не оказалось.

Присутствие значительного количества резистентных генотипов во всех 20 генерациях дизруптивного отбора в чувствительной к бромпропилату линии клеща (табл. 4) можно объяснить тем, что один из двух главных генов, детерминирующих восприимчивость к токсическому действию инсектоакарицида, является доминантным.

Предположение, что признак резистентности у клещей к абаментину и к бромпропилату может индуцироваться такими же мутациями, как и резистентность

к инсектоакарицидам других химических классов, биохимические механизмы токсического действия и, соответственно, резистентности к которым считаются выясненными, проверяли тестированием клещей сопоставляемых линий диагностическими концентрациями этих токсикантов.

Результат действия на резистентных и чувствительных к абаментину и бромпропилату клещей диагностической концентрацией бифентрина, свидетельствовал о том, что мутация, нивелирующая дефекты в потенциал-зависимых натриевых каналах, с которыми связывают проявление устойчивости членистоногих к пиретроидным соединениям, в геноме резистентных к абаментину и к бромпропилату клещей отсутствует. Высокий уровень смертности клещей чувствительных и резистентных к абаментину и к бромпропилату линий при действии бифентрина был одинаковым (табл. 5, 6).

Проведенное тестирование сопоставляемых линий клеща диагностической концентрацией пиридабена показало, что способ противодействия нарушению процессов митохондриального электронного транспорта, рассматриваемый как основной механизм, определяющий устойчивость членистоногих к токсическому действию этого соединения, не входит в состав факторов, детерминирующих выражение признаков

Таблица 5

Токсикологическая дифференциация биохимических факторов, определяющих выражение признака резистентности к абамектину

Идентифицирующие агенты	R-линия				S-линия			
	Семей	Самок (n)	Смертность (%)	ν (%)	Семей	Самок (n)	Смертность (%)	ν (%)
Диметоат 0,005 %	22	240	35,5 ± 4,6	12,9 ± 0,58	16	181	77,4 ± 7,5	9,6 ± 0,5
Бифентрин 0,002 %	19	194	83,8 ± 4,3	5,1 ± 0,12	12	134	87,3 ± 3,2	3,7 ± 0,22
Пиридабен 0,006 %	20	225	52,9 ± 4,6	8,7 ± 0,41	10	118	59,1 ± 5,9	10,0 ± 0,65
Бромпропилат 0,005 %	9	102	78,0 ± 4,6	5,9 ± 0,41	10	98	97,9 ± 2,2	2,2 ± 0,16
Абамектин 0,00009 %	9	153	37,9 ± 3,9	10,3 ± 0,58	12	66	100	0
Абамектин 0,00009 % + ППБ 0,005 %	8	75	74,7 ± 5,0	6,7 ± 0,54	11	145	93,1 ± 2,1	2,2 ± 0,13

Таблица 6

Токсикологическая дифференциация биохимических факторов, определяющих выражение признака резистентности к бромпропилату

Идентифицирующие агенты	R-линия				S-линия			
	Семей	Самок (n)	Смертность (%)	ν (%)	Семей	Самок (n)	Смертность (%)	ν (%)
Диметоат 0,005 %	21	224	25,3 ± 2,9	11,5 ± 0,54	17	190	92,5 ± 4,2	4,5 ± 0,23
Бифентрин 0,002 %	18	175	93,0 ± 1,6	1,7 ± 0,09	15	167	100	0
Пиридабен 0,006 %	23	276	67,6 ± 2,8	4,1 ± 0,17	17	172	41,3 ± 3,8	9,2 ± 0,49
Абамектин 0,00009 %	18	198	33,8 ± 3,4	10,0 ± 0,5	12	144	89,6 ± 2,5	2,8 ± 0,16
Бромпропилат 0,005 %	23	323	25,4 ± 2,4	9,4 ± 0,37	10	53	98,1 ± 2,0	2,0 ± 0,19
Бромпропилат 0,005 % + ППБ 0,005 %	21	263	69,6 ± 2,8	4,0 ± 0,17	9	75	98,7 ± 1,3	1,3 ± 0,1

резистентности к абамектину и к бромпропилату (табл. 5, 6). Пиридабен одинаково действовал на выживаемость резистентных и чувствительных к этим токсикантам клещей.

Перекрестное тестирование диагностической концентрацией бромпропилата клещей, отсеleccionированных по наличию признака резистентности к абамектину и наоборот, показало, что резистентные и чувствительные к бромпропилату клещи проявляли такие же уровни устойчивости и к абамектину. Клещи резистентной и чувствительной к абамектину линий, напротив, были почти одинаково неустойчивы к токсическому действию диагностической концентрации бромпропилата (табл. 5, 6). Следовательно, признак резистентности к бромпропилату детерминируется комплексом факторов, включающих и те, которые обеспечивают защиту от отравления абамектином.

Обработка клещей сопоставляемых линий диагностическими концентрациями селективирующих токсикантов с добавкой ППБ, который, как считается, ингибирует преимущественно цитохром P450 монооксигеназную активность, синергистически усиливая действие токсикантов, достоверно снимая защиту, создаваемую генами резистентности при интоксикации и абамектином, и бромпропилатом. Это позволяет заключить,

что индукция монооксигеназной активности включается в комбинацию факторов адаптивных модификаций, противодействующих отравлению этими инсектоакарицидами (табл. 5, 6).

Результат тестирования клещей сопоставляемых линий диметоатом показал, что выражение признака резистентности к абамектину, и к бромпропилату связано с индукцией карбоксилэстеразной активности. Уровень смертности клещей резистентных к абамектину и бромпропилату линий при действии диметоата был таким же, как и процент смертности самок клеща при действии диагностических концентраций селективирующих токсикантов (табл. 5, 6). Данный вывод подтверждается выявленными различиями в активности электрофоретически разделяемых эстеразных фракций у клещей сопоставляемых линий. У самок резистентных к абамектину и бромпропилату генотипов выявлялся более высокий уровень общей эстеразной активности с отличительно высокоактивной фракцией одной из множественных молекулярных форм карбоксилэстеразы (рис. 1). Наиболее предпочтительными субстратами для этого аллозима, как было выяснено ранее, являются карбоксиэфирные масляной кислоты (Leeuwen, Tiggi 2007; Сундуков, 2012), что позволяет выявлять только эту множественную молекулярную форму карбоксилэстеразы вместе с фракцией

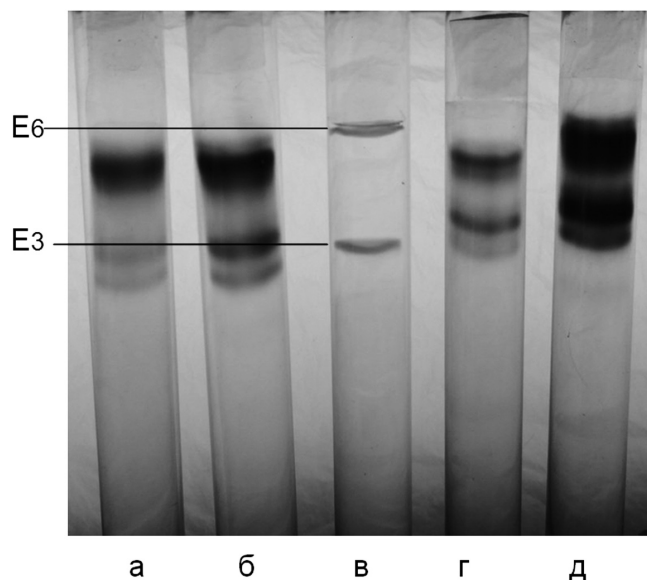


Рис. 1. Состав и активность эстеразных фракций в гомогенате самок отдельных семей обыкновенного паутинового клеща: гидролизуемые субстраты: 1-нафтилацетат (а, б, г, д) и бутирилтиохолиниодид (в). а — 3♀♀ S-абамектин; б — 3♀♀ R-абамектин; в — 20♀♀ R-абамектин; г — 3♀♀ S-бромпропилат; д — 3♀♀ R-бромпропилат. E₆ — ацетилхолинэстеразная фракция; E₃ — маркерная фракция множественной молекулярной формы карбоксилэстеразы

ацетилхолинэстеразы, которая также гидролизует бутирилтиохоллин иодид (рис. 1 в).

По результатам проводившихся спектрофотометрических экспериментов суммарная удельная активность карбоксилэстеразы (в мк моль/мин/мг белка) у самок клещей из резистентных к диметоату семей была в 1,5 раза выше, чем у чувствительных к этому токсиканту особей, при одинаковой удельной активности ацетилхолинэстеразы (Сундуков, 2012). Уровень индуцируемой карбоксилэстеразной активности у резистентных к инсектоакарицидам генотипов, как известно из литературных источников, зависит, прежде всего, от запрограммированной кратности умножения локусов ДНК, кодирующих синтез этой множественной молекулярной формы фермента.

Дополнительные копии какого-либо гена, образующиеся в результате его амплификации и обеспечивающие активацию регулируемой им ферментной системы, как известно, определяют доминантное состояние детерминируемого этим геном признака.

Биохимические механизмы, определяющие выражение признаков резистентности у клещей к абамектину и к бромпропилату, как свидетельствуют полученные данные, должны различаться, следовательно, только по одному из двух главных генов — регулируемому изменению чувствительности периферических рецепторов к воздействию каждого из токсикантов.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Проявление устойчивости членистоногих к токсическому действию инсектоакарицидов реализуется двумя основными физиологическими механизмами. Уменьшением чувствительности периферических рецепторов, на которые изначально действует токсикант, и увеличением активности адаптивных ферментов, усиливающих компенсаторные реакции противодействия нарушениям физиологических функций, вызываемых действием токсиканта на нервную систему членистоногих. Индуцируемые системы адаптации ферментных систем, при вызывающем стресс химическом воздействии, усиливают энергетическое обеспечение и интенсификацию обменных процессов, что способствует повышению жизнеспособности членистоногих, а также экстренному выведению из организма токсичных ксенобиотиков, в случаях их возможного попадания во внеклеточные жидкости.

Наиболее детально изучены к настоящему времени механизмы воздействия на периферические сенсорные окончания нервов пиретроидных инсектоакарицидов и авермектинов. Изменение чувствительности рецепторов к пиретроидам связывают с генетически детерминированными структурными перестройками аминокислотных последовательностей в натриевых каналах (Nyoni et al., 2011; Ya-ning et al., 2011).

У резистентных к авермектинам членистоногих выявляются изменения в аминокислотных структурах воротного механизма рецепторов гамма-аминомасляной кислоты (ГАМК), регулирующих частоту открываний ионных каналов для трансмембранного перемещения анионов хлора (Dermauw et al., 2012; Kwon et al., 2010; Zhao, Salgado, 2010).

На какие сенсорные окончания действуют галоидо-органические инсектоакарициды, к которым относится бромпропилат, литературные сведения не найдены.

Фосфорорганические инсектоакарициды изначально блокируют периферические ацетилхолиновые рецепторы. В течение всего предшествующего периода изучения механизма токсического действия и резистентности членистоногих к этим соединениям интенсивно исследовали их антихолинэстеразное действие, ориентируясь на выясненную этиологию отравления фосфорорганическими ядами теплокровных животных. При этом игнорировались основополагающие обстоятельства, исключающие возможность такой аналогии. У членистоногих нервно-мышечная медиация биоэлектрических импульсов, в отличие от теплокровных, не является холинергической и погибают членистоногие при отравлении инсектоакарицидами этого класса не от асфиксии (Сундуков, 2012). В организме членистоногих при интоксикации фосфорорганическими инсектоакарицидами можно зафиксировать различную динамику ацетилхолинэстеразной активности в процессе развития патогенеза отравления, наряду с модификацией активности других ферментных

систем. Однако прямая корреляция степени резистентности членистоногих к фосфорорганическим соединениям проявляется только с уровнем карбоксилэстеразной активности в их организме.

Как подтверждено полученными экспериментальными данными, индукция карбоксилэстеразной активности является биохимическим фактором, определяющим выражение признаков резистентности к диметоату и к бифентрину (Сундуков и др., 2014), а также к абамектину и к бромпропилату (табл. 5, 6 и рис. 1). Увеличение активности этой ферментной системы при отравлении паутиных клещей фосфорорганическими инсектоакарицидами продемонстрировано многочисленными исследованиями. Индукция карбоксилэстеразной и монооксигеназной активности выявлялась также у паутиных клещей, резистентных к токсикантам других химических классов (Leeuwen et al., 2005, 2006). Повышенная активность карбоксилэстеразной и монооксигеназной ферментных систем у резистентных к инсектоакарицидам членистоногих, как можно заключить, является проявлением универсальной адаптивной реакции организма на воздействие токсиканта. Выявляемая электрофоретически множественная молекулярная форма карбоксилэстеразы может служить молекулярным маркером наличия у анализируемых генотипов паутиных клещей признака резистентности к применяемым инсектоакарицидам.

Проведенный дизруптивный отбор паутиных клещей более чем на 100 поколениях инбредных линий не выявил никаких признаков инбредной депрессии или каких-либо отрицательных эффектов, связанных с гомозиготизацией рецессивных аллелей. Это свидетельствует о том, что инбредное скрещивание у клещей с гапло-диплоидным способом размножения является нормальным биологическим процессом. Поэтому, выявленные закономерности распределения аллелей, детерминирующих признаки резистентности к акарицидам различных химических классов в поколениях инбредных линий обыкновенного паутиного клеща, будут справедливы и для естественных популяций этого вида, а также для других видов тетраниховых клещей.

Как показал статистический анализ, даже при жестком дизруптивном отборе паутиных клещей с мутацией резистентности к инсектоакарицидам, в семьях всех дочерних поколений сохраняется более четверти, от общего количества особей, чувствительных генотипов. Это позволяет считать, что в естественной среде при прекращении воздействия химического пресса в новых генерациях клещей должно происходить быстрое восстановление (реверсия) среднего уровня чувствительности к любым инсектоакарицидам.

ЛИТЕРАТУРА

1. Беленький М.Л. (1959) Элементы количественной оценки фармакологического эффекта. Рига: АН Латв. ССР.

2. Маурер Г. (1971) Диск-электрофорез. М.: Мир.
3. Сингер М., Берг П. (1998) Гены и геномы. М.: Мир, Т. 2.
4. Сундуков О.В. (2012) Этиология острой токсичности инсектоакарицидов и физиологические факторы, определяющие избирательность их действия на членистоногих. СПб.: Наука.
5. Сундуков О.В., Тулаева И.А., Зубанов Е.А. (2014) Наследование признаков резистентности к акарицидам в инбредных линиях обыкновенного паутиного клеща. Экол. генетика. Т. 12 (3): С. 43–51.
6. Урбах В.Ю. (1964) Биометрические методы. М.: Наука.
7. Bass Ch., Field L.M. (2011) Gene amplification and insecticide resistance. Pest Manag. Sci. V. 67 (8): P. 886–890.
8. Dermauw W., Ilias A., Riga M. et al. (2012) The cytochrome P450 ligand-gated ion channel gene family of *Tetranychus urticae*: Implications for acaricide toxicology and novel mutation associated with abamectin resistance. Insect Biochem. Mol. Biol. V. 42: P. 455–465.
9. Karnovsky M.J., Roots L. (1964) A "direct-coloring" thiocholine method for cholinesterases. J. Histochem. Cytochem. V.12: P. 219–221.
10. Kwon D.H., Yoon K.S., Clark J.M., Lee S.H. (2010) A point mutation in a glutamate-gated chloride channel confers abamectin resistance in the two-spotted spider mite, *Tetranychus urticae* Koch. Insect Mol. Biol. V. 19: P. 583–591.
11. Leeuwen T. van, Pottelberge S. van, Tirri L. (2005) Comparative acaricide susceptibility and detoxifying enzyme activities in field-collected resistant and susceptible strains of *Tetranychus urticae*. Pest Manag. Sci. V. 61 (5): P. 499–507.
12. Leeuwen T. van, Pottelberge S. van, Tirry L. (2006) Biochemical analysis of chlorfenapyr-selected resistant strain of *Tetranychus urticae* Koch. Pest Manag. Sci. V. 62 (5): P. 425–433.
13. Leeuwen T. van, Tirri L. (2007) Esterase-mediated bifenthrin resistance in a multiresistant strain of the two-spotted spider mite, *Tetranychus urticae*. Pest Manag. Sci. V. 63 (2): P. 150–156.
14. Nyoni B.N., Gorman K., Mzilahowa T., et al. (2011) Pyrethroid resistance in the tomato spider mite, *Tetranychus evansi*, is associated with mutation of the *para*-type sodium channel. Pest Manag. Sci. V. 67 (8): P. 891–897.
15. Ya-ning F., Shu Zh., Wei S., et al. (2011) The sodium channel gene in *Tetranychus cinnabarinus* (Boisduval): identification and expression analysis of a mutation associated with pyrethroid resistance. Pest Manag. Sci. V. 67 (8): P. 904–912.
16. Zhao X., Salgado V.L. (2010) The role of GABA and glutamate receptors in susceptibility and resistance to chloride channel blocker insecticides. Pest. Biochem. Physiol. V. 97: P. 153–160.

MANIFESTATIONS OF RESISTANCE TO ACARICIDES IN INBRED LINES OF TWO-SPOTTED SPIDER MITE IN THE PROCESS OF DISRUPTIVE SELECTION

Sundukov O. V., Tulaeva I. A., Zubanov E. A.

✿ **SUMMARY:** *Background:* Information about genetic and biochemical mechanisms of arthropods resistance to pesticide obtained with resistant and susceptible genotypes is more correct than that of population-based samples. *Materials and methods:* The disruptively selection of two-spotted spider mites was carried out on the basis of the presence or absence of resistance to four acaricides — dimethoate, bifenthrin, abamectin and bromopropylate. A possible resistance mechanisms of mite to abamectin and bromopropylate was detected when testing the diagnostic concentrations of acaricides which toxic action is known. Synergetic effect of resistant genotypes treated with monoxygenase inhibitor piperonyl butoxide (PBO) was studied. Carboxylesterase isoenzymes were determined with use of polyacrylamide gel electrophoresis in individual genotypes of spider mite. *Results:* Statistical analysis of genotypes selection results demonstrated 30% of females with no traits of resistance to the toxicant in all resistant lines of each generation. The reason this is arrhenotokous reproduction spider mites and dominant status of alleles determining the traits of resistance. Abamectin and bromopropylate resistant mites were synergized by PBO. Resistance was positively correlated with increased carboxylesterase activity in resistant genotypes. *Conclusion:* Reduced sensitivity to pesticides in resistant arthropods was found in alteration recordings sensory receptivity and through elevated levels of carboxylesterase and monoxygenase activity. This is universal adaptive response of the arthropods organism to intoxication by any pesticides.

✿ **KEY WORDS:** *Tetranychus urticae*; acaricide; resistance; inheritance; genotype; carboxylesterase.

✿ REFERENCES (TRANSLITERATED)

1. Belenkiy M. L. (1959) Elementy kolichestvennoy ochenki farmakologicheskogo effekta [Elements of

quantitative estimate of pharmacological action] Riga: N-L.

2. Sundukov O. V. (2012) Aetiologiya ostroj toxichnosti insectoakaricidov i fiziologicheskie factory, opredelajuschie izbiratelnost ich dejstvija na chlenistonogich [Aetiology of sharp toxic action and physiological factors of selective insecticidal activity on arthropods]. St. Petersburg: N-L.
3. Urbah V. Yu. (1964) Biometricheskie metody [Biometrical methods]. Moskva: N-L.
4. Maurer H. R. (1971) Disk-Elektrophorese. Moskva: Mir.
5. Singer M., Berg P. (1998) Genes and Genomes. Moskva: Mir, V. 2.
6. Sundukov O. V., Tulaeva I. A., Zubanov Ye. A. (2014) Ecol. Genetics. T. 12 (3): C. 43–51.
7. Bass Ch., Field L. M. (2011) Pest Manag. Sci. V. 67(8): P. 886–890.
8. Dermauw W., Ilias A., Riga M. et al. (2012) Insect Biochem. Mol. Biol. V. 42: P. 455–465.
9. Kwon D. H., Yoon K. S., Clark J. M., Lee S. H. (2010) Insect Mol. Biol. V. 19: P. 583–591.
10. Karnovsky M. J., Roots L. (1964) A J. Histochem. Cytochem. V. 12: P. 219–221.
11. Leeuwen T. van, Pottelberge S. van, Tirri L. (2005) Pest Manag. Sci. V. 61 (5): P. 499–507.
12. Leeuwen T. van, Pottelberge S. van, Tirry L. (2006) Pest Manag. Sci. V. 62 (5): P. 425–433.
13. Leeuwen T. van, Tirri L. (2007) Pest Manag. Sci. V. 63(2): P. 150–156.
14. Nyoni B. N., Gorman K., Mzilahowa T., et al. (2011) Pest Manag. Sci. V. 67 (8): P. 891–897.
15. Ya-ning F., Shu Zh., Wei S., et al. (2011) Pest Manag. Sci. V. 67 (8): P. 904–912.
16. Zhao X., Salgado V. L. (2010) Pest. Biochem. Physiol. V. 97: P. 153–160.

✿ Информация об авторах

Сундуков Олег Вениаминович — к. б. н., старший научный сотрудник, лаборатория экотоксикологии. ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт защиты растений». 196608, Санкт-Петербург, Пушкин-8, ш. Подбельского, д. 3. E-mail: Sundukov.oleg @ yandex.ru.

Sundukov Oleg Veniaminovich — PhD, Senior scientist, Laboratory ecotoxicology. All-Russian Institute of Plant Protection. 196608, Saint Petersburg, Pushikin-8, shosse Podbelskogo, 3, Russia. E-mail: Sundukov.oleg @ yandex.ru.

Тулаева Ирина Анатольевна — к. б. н., научный сотрудник, лаборатория экотоксикологии. ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт защиты растений». 196608, Санкт-Петербург, Пушкин-8, ш. Подбельского, д. 3. E-mail: zubanov 63 @ yandex.ru.

Tulaeva Irina Anatolievna — PhD, scientist, Laboratory ecotoxicology. All-Russian Institute of Plant Protection. 196608, Saint Petersburg, Pushikin-8, shosse Podbelskogo, 3, Russia. E-mail: zubanov 63 @ yandex.ru.

Зубанов Евгений Александрович — научный сотрудник, лаборатория экотоксикологии. ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт защиты растений». 196608, Санкт-Петербург, Пушкин-8, ш. Подбельского, д. 3. E-mail: zubanov 63 @ rambler.ru.

Zubanov Evgeniy Aleksandrovich — PhD, scientist, Laboratory ecotoxicology. All-Russian Institute of Plant Protection. 196608, Saint Petersburg, Pushikin-8, shosse Podbelskogo, 3, Russia. E-mail: zubanov 63 @ rambler.ru.