

© Л. А. Сыртланова, К. А. Китаев

ФГБУН «Институт биохимии  
и генетики» Уфимского научного  
центра РАН

Проведен анализ распространения мутаций в генах *ache* (ацетилхолинэстераза) и *ldvssc1* (электрон-чувствительный натриевый канал), обеспечивающих соответственно устойчивость к фосфорорганическим инсектицидам (ФОС) и *kdr*-подобную устойчивость к пиретроидам. Проведено генотипирование 5 выборок имаго из локальных популяций периферии (Миякинский, Куяргазинский и Янаульский районы) и центральной части (Уфимский и Бирский районы) Республики Башкортостан.

✿ **Ключевые слова:** колорадский жук; резистентность; мутации в гене *ache*, *ldvssc1*; фосфорорганические инсектициды (ФОС); пиретроиды.

## МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ РАСПРОСТРАНЕНИЯ РЕЗИСТЕНТНОСТИ К ФОСФОРГАНИЧЕСКИМ ИНСЕКТИЦИДАМ И ПИРЕТРОИДАМ В ПОПУЛЯЦИИ КОЛОРАДСКОГО ЖУКА НА ТЕРРИТОРИИ РЕСПУБЛИКИ БАШКОРТОСТАН

### ВВЕДЕНИЕ

Колорадский жук характеризуется значительным внутривидовым полиморфизмом и экологической пластичностью, что позволяет ему успешно адаптироваться к биотическим и абиотическим факторам окружающей среды, включая антропогенные воздействия. На всем ареале (как первичном, так и вторичном) у этого насекомого развилась резистентность практически ко всем современным и применявшимся ранее инсектицидам. По сведениям, представленным в международной базе данных (The Database of Arthropods Resistance, 2011), колорадский жук приобрел устойчивость к 51 препарату из различных классов инсектицидов в 46 регионах мира.

Одним из основных механизмов обеспечения резистентности насекомых к ФОС является снижение чувствительности к действию инсектицидов у мутантной формы ацетилхолинэстеразы (*ache*), которая 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). В основе молекулярных механизмов резистентности к пиретроидным инсектицидам у насекомых лежат нуклеотидные мутации *kdr* в гене электрон-чувствительного натриевого канала (*voltage sensitive sodium channel, ldvssc1*) (Williamson et al., 1996). Нуклеотидная мутация *kdr* приводит к замене аминокислоты лейцин на фенилаланин в положении 1014.

Цель данной работы состояла в исследовании распространения мутаций в генах *ache* и *ldvssc1* в популяциях колорадского жука на территории Республики Башкортостан.

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Генотипирование проведено у 5 выборок имаго колорадского жука из локальных популяций периферии (Миякинский — юго-западный, Куяргазинский — южный, Янаульский — северный районы) и центральной части (Уфимский и Бирский районы) Республики Башкортостан. В каждой популяции проведен анализ 30–50 особей из выборки перезимовавших имаго. Обработку инсектицидами (актеллик — ФОС и децис — синтетический пиретроид) проводили топикальным методом рабочими растворами в дозе 1 мкл/особь. Растворы наносили микрошприцем марки МШ-1 на вентральную область переднегруди. Все рабочие растворы инсектицидов готовили на 96 % этаноле. В контроле насекомых обрабатывали этанолом. После обработки жуков помещали в чашки Петри в 10 повторностях по 10 особей на одну повторность. Учёт гибели вели через 3 суток. Экстракция ДНК была проведена фенол-хлороформным методом. Для изучения полиморфизма фрагментов генов *ache* и *ldvssc1* использовали метод двунаправленной ПЦР-амплификации специфических аллелей (bi-PASA, bi-directional PCR amplification of specific allele). Данный метод позволяет идентифицировать как чувствительные/резистентные гомозиготные генотипы *SS* и *RR*, так и гетерозиготные *SR* (Clark et al., 2001).

Поступила в редакцию 19.04.2015  
Принята к публикации 07.12.2015

Таблица 1

Распределение частот встречаемости фенотипов и генотипов имаго колорадского жука, различающихся по чувствительности к ФОС

Район	Фенотипы		Генотипы			Аллели	
	Чувствительные	Устойчивые	Гомозиготы «дикие», SS	Гетерозиготы, SR	Гомозиготы мутантные, RR	S	R
Уфимский	0,025	0,975	0,517	0,31	0,172	0,672	0,328
Миякинский	0,053	0,947	0,567	0,4	0,033	0,767	0,233
Благоварский	0,55	0,45	0,4	0,433	0,167	0,617	0,383
Куюргазинский	0	1	0,038	0,038	0,923	0,058	0,942
Бирский	0,15	0,85	0,581	0,29	0,129	0,726	0,274
Янаульский	0,086	0,914	0	0	1	0	1
Кигинский	0,025	0,975	0	0,107	0,893	0,054	0,946

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Результаты распределения частот встречаемости мутантных аллелей (*R*) и генотипов, гомозиготных по наличию «диких» и мутантных аллелей (*SS* и *RR*), были сопоставлены с частотами встречаемости устойчивых и чувствительных фенотипов в выборках, обработанных диагностическими концентрациями инсектицидов (табл. 1). В локалитетах, входящих в группу южных и восточных районов, отмечено совпадение распределения частот. Северо-западные и центральные группы демонстрируют превышение доли устойчивых к ФОС фенотипов по сравнению с долей генотипов, несущих мутантный аллель *ache*, и сниженную частоту встречаемости фенотипов, устойчивых к пиретроидам, по сравнению с частотой генотипов, несущих мутантный аллель гена *ldvssc1*.

## ОБСУЖДЕНИЕ

Полученные данные свидетельствуют о повышении уровня неспецифической устойчивости к ФОС (отличия долей фенотипов от долей соответствующих генотипов,  $p < 0,001$ ), что может быть связано с особенностями метаболической устойчивости, а также со структурой и плотностью покровов имаго. Нами проведено генотипирование мутации в гене *ache*, но появились данные, свидетельствующие о наличии точечных мутаций в гене *ache2* (Revuelta et al., 2011; Piironen et al., 2013). Для окончательного вывода о генетической основе формирующейся у колорадского жука из локальных популяций Республики Башкортостан резистентности необходимо определение частоты встречаемости мутаций в генах, контролирующих метаболические процессы, в частности, генах семейства цитохрома P 450.

Работа частично поддержана грантом РФФИ № 15-04-04801 «Эпигенетические механизмы реализа-

ции адаптивного потенциала особи и популяции в онтогенезе насекомых».

## ЛИТЕРАТУРА

1. Clark J. M., Lee S. H., Kim H. J. et al. (2001) DNA-based genotyping techniques for the detection of point mutation associated with insecticide resistance in Colorado potato beetle *Leptinotarsa decemlineata*. Pest Management Science. V. 57: P. 968–974.
2. Piironen S., Lidstrom L., Lyytinen A. et al. (2013) Pre-invasion history and demography shape the genetic variation in insecticide resistance-related acetylcholinesterase 2 gene in the Colorado potato beetle. Evolutionary Biology. V. 13: P. 1–13.
3. Revuelta L., Ortego F., Díaz-Ruiz J. R. et al. (2011) Contribution of *Ldace1* gene to acetylcholinesterase activity in Colorado potato beetle. Insect Biochem. Mol. Biol. V. 41 (10): P. 795–803.
4. The Database of Arthropods Resistance to Pesticides. Cited 29.04.2015. URL: <http://www.pesticideresistance.org>.
5. Williamson M. S., Martin-Torrez D., Hick C. A. (1996) Identification of mutations in the housefly para-type sodium channel gene associated with knockdown resistance (*kdr*) to pyrethroid insecticides. Molecular and General Genetics. V. 252: P. 51–60.
6. Zhu K. Y., Clark J. M. (1997) Validation of a point mutation of acetylcholinesterase in Colorado potato beetle by polymerase chain reaction coupled to enzyme inhibition assay. Pesticide Biochemistry and Physiology. V. 57: P. 28–35.

## MOLECULAR GENETIC ANALYSIS OF THE SPREAD OF RESISTANCE TO ORGANOPHOSPHATE INSECTICIDES AND PYRETHROIDS IN POPULATIONS OF THE COLORADO POTATO BEETLE IN THE REPUBLIC OF BASHKORTOSTAN

Syrtilanova L. A., Kitaev K. A.

✿ **SUMMARY:** *Background.* We analyzed the spread of mutations in the gene *ache* — acetylcholinesterase responsible for resistance to the organophosphate insecticides, and in the gene *ldvssc1* — electron-sensitive sodium channel, providing *kdr*-like resistance to pyrethroids in different regions of Republic of Bashkortostan. *Materials and methods.* Each group included 30–50 overwintered beetles. DNA from beetles was isolated by phenol-chloroform method. Amplification and analysis of genes *ache* and *ldvssc1* were held by bi-PASA (bi-directional PCR amplification of specific allele) according to (Clark et al., 2001). Evaluation of susceptibility to the set of insecticides from classes of POI (aktellik), pyrethroids (decis) was carried out by topical infliction of ethanol solutions of insecticides (1 ml per individual) on the thorax of adults. Diagnostic concentrations of insecticides corresponding with this manner of treatment were determined in the preliminary experiments. *Results.* In the localities included in the group of southern and eastern regions, frequency distributions coincided. North-western and central group showed excess of phenotypes resistant to organophosphate insecticides

compared with a share of genotypes carrying the mutant allele *ache*, and reducing the incidence of phenotypes resistant to pyrethroids, compared with the frequency of genotypes carrying the mutant allele *ldvssc1*. *Conclusion.* The interpretation of these results implies a significant contribution of some unknown component causing the increased level of non-specific resistance to organophosphate insecticides that can be associated with metabolic stability and also with structure and density of the beetle integuments. It should be noted that individuals carrying the mutant allele, providing resistance to pyrethroids, apparently did not have high adaptability, which may be the reason for this discrepancy in the frequencies of occurrence. Polymorphism and mutations in genes controlling metabolism (in particular, a family of genes of cytochrome P 450) should be studied to elucidate the genetic basis of Colorado potato beetle resistance in the territory of the Republic of Bashkortostan.

✿ **KEYWORDS:** colorado potato beetle; resistance; mutations in genes *ache*, *ldvssc1*; organophosphate insecticides (POI); pyrethroids.

✿ Информация об авторах

**Сырланова Лиана Ахнафовна** — аспирант, лаборатория физиологической генетики. Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра РАН (ИБГ УНЦ РАН). 450054, Уфа, пр. Октября, д. 71. E-mail: SLian4ik@mail.ru.

**Китаев Константин Альбертович** — к. б. н., научный сотрудник, лаборатория физиологической генетики. Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра РАН (ИБГ УНЦ РАН). 450054, Уфа, пр. Октября, д. 71. E-mail: cordek@ya.ru.

**Syrllanova Liana Akhnafovna** — postgraduate student, Laboratory of Physiological Genetics. Institute of Biochemistry and Genetics, Ufa Scientific Center RAS. 450054, Ufa, prospect Oktyabrya, 71, Russia. E-mail: SLian4ik@mail.ru.

**Kitaev Konstantin Albertovich** — Researcher, PhD in biology, Laboratory of Physiological Genetics. Institute of Biochemistry and Genetics, Ufa Scientific Center RAS. 450054, Ufa, prospect Oktyabrya, 71, Russia. E-mail: cordek@ya.ru.