

УДК 577.2: 632.93

М.М. ВОРОБЬЕВА, канд. биол. наук, доцент
заведующий кафедрой биотехнологии¹
E-mail: masch.89@mail.ru

А.С. ПОПОК
магистрант биотехнологического факультета¹
E-mail: alina_porok@mail.ru
¹Полесский государственный университет,
г. Пинск, Республика Беларусь

Статья поступила 10.10.2025 г.

ИЗУЧЕНИЕ ПОЛИМОРФИЗМА РИСУНКА ПЕРЕДНЕСПИНКИ ИМАГО *LEPTINOTARSA DECEMLINEATA* SAY, 1824 И ВАРИАБЕЛЬНОСТИ СЕМЕЙСТВ ГЕНОВ CYP450 КАК МЕХАНИЗМОВ УСТОЙЧИВОСТИ К ИНСЕКТИЦИДАМ

В популяциях *L. decemlineata*, коллектированных на территории Брестской области, отмечены все описанные Фасулати феноформы рисунка переднеспинки имаго с разной частотой встречаемости. Сравнительный анализ фенотипической структуры исследуемых популяций *L. decemlineata* показал, что пространственно-разобщенные популяции характеризуются сходством рисунка центральной части переднеспинки. В разные годы частота встречаемости разнится, что, возможно, обусловлено применением разных групп инсектицидов.

Разные феноформы демонстрируют разный уровень устойчивости к препарату «Битоксибациллин», что указывает на необходимость постоянного мониторинга и подбора эффективных инсектицидов для использования в сельском хозяйстве с учетом эволюционных изменений в популяциях *L. decemlineata*.

У имаго *L. decemlineata* представлены большим числом копий и обладают высоким уровнем вариабельности следующие гены: CYP4BN13, CYP4C1, CYP4C3, CYP6A23 и CYP6K1LIKE. Поскольку на увеличение числа копий генов оказывает влияние воздействие инсектицидов, можно предположить, что анализируемые имаго *L. decemlineata* подвергались обработке инсектицидов, что вызвало их экспрессию генов.

Ключевые слова: *Leptinotarsa decemlineata*, резистентность, инсектициды, препарат «Битоксибациллин», феноформы, система CYP450, вариабельность.

VARABYOVA M.M., PhD. in Biol. Sc., Associate Professor
Head of the Department of Biotechnology¹

ПОРОК А.С., Master's Student at the Faculty of Biotechnology¹
¹Polessky State University, Pinsk, Republic of Belarus

STUDY OF POLYMORPHISM PATTERN OF THE PRONOTUM OF IMAGO *LEPTINOTARSA DECEMLINEATA* SAY, 1824 AND VARIABILITY OF CYP450 GENE FAMILIES AS MECHANISMS OF RESISTANCE TO INSECTICIDES

In *L. decemlineata* populations collected in the Brest region, all the pronotum pattern phenoforms described by Fasulati were observed in adults with varying frequencies. A comparative analysis of the phenotypic structure of the studied *L. decemlineata* populations revealed that areal separated populations

are characterized by similarities in the central pronotal pattern. The frequency of occurrence varies between years, possibly due to the use of different groups of insecticides.

Different phenofoms exhibit varying levels of resistance to «Bitoxibacillin», indicating the need for ongoing monitoring and selection of effective insecticides for agricultural use, taking into account evolutionary changes in *L. decemlineata* populations. In *L. decemlineata* adults, the following genes are expressed in high copy numbers and exhibit high variability: CYP4BN13, CYP4C1, CYP4C3, CYP6A23, and CYP6K1LIKE. Since exposure to insecticides influences copy number variation increases, it can be assumed that the analyzed *L. decemlineata* adults were exposed to insecticides, what triggered their gene expression.

Keywords: resistance, insecticides, preparation «Bitoxibacillin», phenofoms, CYP450 system, variability.

Введение. Одной из важнейших народо-хозяйственных, социальных и природо-охранных проблем государства является усовершенствование систем защиты сельскохозяйственных культур от насекомых-фитофагов, в частности экологически пластичных видов, способных к массовым размножениям и активным территориальным экспансиям. Известным классическим примером является *Leptinotarsa decemlineata* Say, 1824, принадлежащий в условиях Беларуси к числу экономически значимых вредителей картофеля в соответствии с постановлением Министерства сельского хозяйства и продовольствия Республики Беларусь № 29 от 17.10.2016 г. Как известно, высокая численность фитофага способствует снижению урожая картофеля, уменьшению размера клубней и повышению содержания в них крахмала, а также распространению вирусных и бактериальных инфекций [1].

Согласно литературным данным, *L. decemlineata* характеризуются высокой экологической пластичностью, а также биохимической, морфологической и генетической вариабельностью, что позволяет им быстро и эффективно адаптироваться к изменениям условий окружающей среды. Индукторами микроэволюционных процессов, проводящих к изменению генетической структуры популяций колорадского жука, являются условия питания и экологические факторы, ведущую роль среди которых играет применение в системах защиты картофеля инсектицидов различной химической природы. В последние годы отмечается появление новых генетических форм *L. decemlineata* с повышенной агрессивностью или иными непредсказуемыми свойствами, к числу которых принадлежит устойчивость к инсектицидам из клас-

сов фосфорорганических соединений, карбаматов, пиретроидов, нерестиоксинов и неоникотиноидов, а также наличия тесной связи между устойчивостью имаго колорадского жука к инсектицидам и частотой встречаемости определенных фенотипов [2–3].

Существует предположение, что в основе устойчивости насекомых к инсектицидам лежат те же механизмы, что и отвечают за устойчивость к природным фитотоксинам. Установлено, что семейство генов P450 является ключевым в системе формирования резистентности у насекомых. Данный факт позволяет связать эволюционно выработанную устойчивость насекомых к естественным фитотоксинам с устойчивостью к инсектицидам, что имеет колоссальное значение для разработки современных приемов борьбы с насекомыми-вредителями [4–5].

Исходя из представленного выше, можно заключить, что *L. decemlineata* является универсальной моделью для изучения внутривидового фенотипического полиморфизма, а также устойчивости конкретных морф к инсектицидам и изменений системы CYP450, отвечающей за нейтрализацию метаболитов растений и инсектицидов. В связи с этим целью работы являлось изучить вариабельность рисунка переднеспинки и оценить резистентность разных фенотипов имаго *L. decemlineata*, коллектированных на территории Брестской области, к инсектицидам, а также получить новые научно обоснованные данные о микроэволюционных изменениях в системе CYP450, отвечающей за нейтрализацию к инсектицидам.

Материалы и методика исследований. Объектом исследования послужили имаго *L. decemlineata*, коллектированные с посадок картофеля на личных приусадебных участках

Бресткой области (г. Иваново, г. Пинск, г. Лунинец и г.п. Парахонск) в летний и осенний период 2024–2025 года.

Сбор материала проводился вручную с посадок картофеля по диагональной линии участка через каждые 10–15 метров, по 2 экземпляра имаго с куста [6]. *L. decemlineata* помещали в контейнеры, дно которых было выстлано фильтровальной бумагой, смоченной несколькими каплями воды, для сохранения влажности. В каждый контейнер помещали фрагмент листа картофеля для поддержания питания транспортируемых *L. decemlineata*. Объем выборки в каждой популяции составил 50 штук.

Для анализа фенотипического полиморфизма в популяциях *L. decemlineata* использовали доленое соотношение девяти различных фенов центральной части переднеспинки (рисунок 1) [3].

Статистический анализ полученных данных провели методом непараметрической статистики (U-критерий Манна-Уитни) в программе STATISTICA 8.0. Достоверными считали различия при $p < 0,05$.

Для оценки устойчивости *L. decemlineata* использовали препарат «Битоксибациллин» (РФ, действующее вещество – спорокристаллический комплекс *Bacillus thuringiensis* var. *Thuringiensis*).

Эксперимент проводили в чашках Петри, предварительно выстлав дно фильтровальной бумагой, смоченной несколькими каплями воды, для поддержания влажности. В каждую чашку Петри помещали листовую пластинку картофеля, смоченную с обеих сторон раствором препарата (для опытных образцов) или водой (для контрольных образцов) и по 5 особей имаго колорадского жука.

Подбор концентрации инсектицида проводили экспериментально, основываясь на концентрациях, предложенных производителями. Для проведения экспериментов использовали концентрации, при которых погибало 50% и 95% особей в каждом эксперименте. Учет выживших/погибших особей проводили на протяжении нескольких суток через 1 ч., 3 ч., 6 ч. и 20 ч.

Расчет смертности в опытных вариантах (С) проводили по формуле Аббота (Abbott 1925):

$$C = (A-B)/A \times 100,$$

где А – общее число особей в опытной группе, В – число выживших особей [7].

В работе использовали информацию о семействах генов P450, депонированных в GenBankNCBI [8]. Для оценки вариативности представленных семейств генов последовательности выравнивали в программе MEGA11 поочередным использованием алгоритмов Muscle и Clustal при установленном разрешении на включение пробелов в выровненные последовательности [9] и рассчитывали парные генетические дистанции.

Результаты исследований и их обсуждение. Анализ результатов свидетельствует о том, что в популяциях *L. decemlineata*, коллектированных на территории Брестской области, отмечены все описанные Фасулати феноформы рисунка переднеспинки имаго с разной частотой встречаемости.

В популяциях *L. decemlineata*, коллектированных в Брестской области, хорошо представлены феноформа 1 (30%), феноформа 3 (16,7%) и феноформа 5 (13,3%). Феноформа 8 является очень редкой для данной популяции колорадского жука (3,3%).

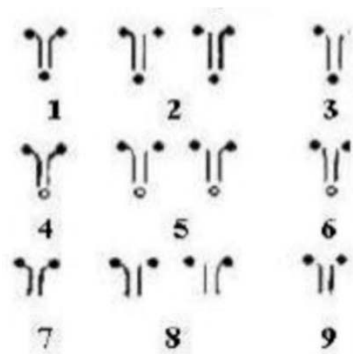


Рисунок 1. – Фены рисунка переднеспинки имаго *Leptinotarsa decemlineata* Say, 1824

Полученные нами результаты в 2024–2025 гг. по частоте встречаемости вариаций фена рисунка центральной части переднеспинки *L. decemlineata*, коллектированных на территориях Брестской области, несколько разнятся с результатами, полученными нами ранее. Так, например, в 2018–2019 гг. на данной территории наиболее хорошо были представлены феноформа 1 (25,9%), феноформа 4 (21,7%) и феноформа 6 (20,3%), а наиболее плохо – феноформа 8 (2,4%) и феноформа 9 (3,4%).

Сравнительный анализ фенотипической структуры исследуемых популяций *L. decemlineata* показал, что пространственно-разобщенные популяции из Брестской области характеризуются сходством рисунка центральной части переднеспинки. Статистически значимых различий при сравнении выборок из разных точек сбора по частотам анализируемых фенов отмечено не было ($p \geq 0,05$). Тем не менее, внутривидовое разнообразие рисунка центральной части переднеспинки *L. decemlineata* свидетельствует об изменении фенотипической структуры в разные годы, что, возможно, обусловлено инсектицидным прессом.

Согласно литературным данным, ключевую роль в индуцировании микроэволюционных процессов в популяциях *L. decemlineata* играют вторичные метаболиты, входящие в состав кормовых растений, и антропогенные факторы, связанные с агропроизводством. Как показывают многочисленные исследования, за последнее 50 лет популяции *L. decemlineata* сформировали резистентность к большинству применяемым инсектицидам. Интересным является то, что феноформы обладают разным уровнем резистентности к разным группам инсектицидов. Согласно литературным данным, феноформа 3, феноформа 6 и феноформа 9 обладают более высоким уровнем резистентности к пиретроидным инсектицидам, чем феноформа 1, феноформа 2, феноформа 5, феноформа 7 и феноформа 8. На сегодняшний день, в литературе отсутствуют информация об устойчивости *L. decemlineata* к биологическим препаратам.

Результаты нашего исследования позволили заключить, что наибольшую чувствительность к препарату «Битоксибациллин»

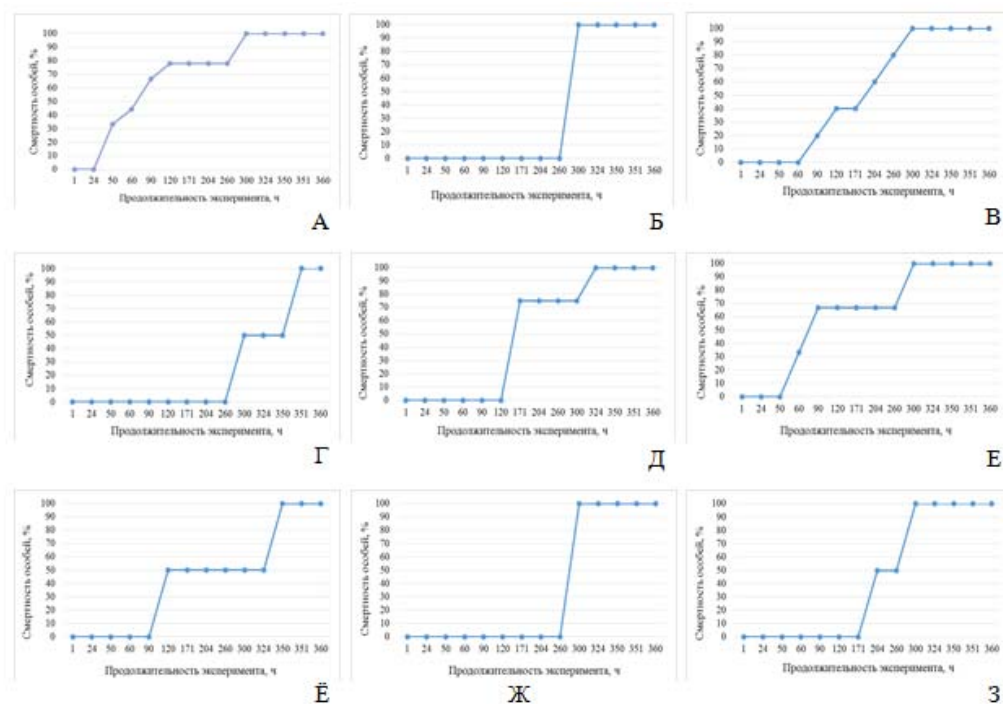
показали особи, относящиеся к феноформе 1. Смертность особей феноформы 1 уже на 50-ом часу эксперимента составила 33,3%, тогда как у особей остальных восьми феноформ наблюдалась 100% выживаемость. Высокая степень резистентности к испытываемому препарату была выявлена у особей феноформы 4, гибель первого имаго зафиксирована на 300-ом часу эксперимента (рисунок 2).

Таким образом, можно заключить, что разные феноформы действительно демонстрируют разный уровень устойчивости к инсектицидам в зависимости от времени контакта с ним. Результаты устойчивости особей *L. decemlineata*, принадлежащих разным феноформам, к испытываемому препарату указывают на необходимость постоянного мониторинга и подбора эффективных инсектицидов для использования в сельском хозяйстве с учетом эволюционных изменений в популяциях *L. decemlineata*.

Как было представлено выше, цитохромы р450 играют ключевую роль в метаболизме ксенобиотиков у *L. decemlineata* и, согласно литературным данным, существует корреляция между уровнем экспрессии этих генов и резистентностью к инсектицидам. В рамках настоящего исследования мы решили оценить представленность CYP450 в GenBank и уровень их варибельности для *L. decemlineata*.

Как оказалось, в GenBank хорошо представлены CYP4: CYP4AA1, CYP4Q10, CYP4BN13, CYP4BN14, CYP4BN12, CYP4G34, CYP4G29, CYP4AC1, CYP4Q11, CYP4C1, CYP4C3, CYP4S3, CYP4V2, CYP4D8, CYP4D2, CYP4G15, CYP4CW1, CYP4BN15, CYP4G58, CYP4G57. Эти гены разнятся по количеству копий и длине. Обращает на себя внимание то, что у *L. decemlineata* представлены большим числом копий гены CYP4BN13, CYP4C1 и CYP4C3.

Для оценки варибельности последовательностей CYP4 провели сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей паралогичных генов, представленных максимальным числом копий, в частности генов CYP4BN13, CYP4C1 и CYP4C3, и рассчитали парные дистанции между ними.



А – фенотип 1, Б – фенотип 2, В – фенотип 3, Г – фенотип 4, Д – фенотип 5,
Е – фенотип 6, Ё – фенотип 7, Ж – фенотип 8, З – фенотип 9

Рисунок 2. – Чувствительность фенотипов имаго *Leptinotarsa decemlineata* Say, 1824 к препарату «Битоксибациллин»

Оказалось, средневзвешенное значение нуклеотидной дистанции для копий гена CYP4BN13 составило $0,056 \pm 0,020$ (здесь и далее по тексту раздела первый показатель является средним значением, а второй – стандартной ошибкой среднего), гена CYP4C1 – $1,069 \pm 0,480$ и гена CYP4C3 – $1,315 \pm 0,583$. Гены CYP4C3 и CYP 4C1 имели высокие показатели значений генетических дистанций, что указывает на высокий уровень внутривидового генетического полиморфизма.

В GenBank также хорошо представлены CYP6: CYP6EG1, CYP6BJ1V, CYP6BJ2, CYP6BJ3, CYP6BU1, CYP6BN1V, CYP6LIKE, CYP6D4, CYP6A23, CYP6A2LIKE, CYP6K1LIKE, CYP6A14, CYP6A13, CYP6A8, CYP6EG1, CYP6EF1, CYP6EN1, CYP6ED1, CYP6BD18, CYP6BD17, CYP6BD16, CYP6BD15, CYP6BD19, CYP6BN2 и CYP6BD20, которые также различались по количеству копий и длине.

Оказалось, что гены CYP6A23 и CYP6K1LIKE обладали большим числом ко-

пий, поэтому именно для этих генов были рассчитаны парные дистанции. Средневзвешенное значение генетической дистанции для копий CYP6A23 составило $0,465 \pm 0,210$ (здесь и далее по тексту раздела первый показатель является средним значением, а второй – стандартной ошибкой среднего), а CYP6K1LIKE – $1,026 \pm 0,558$. Таким образом, можно заключить, что гены CYP6A23 и CYP6K1LIKE характеризуются высоким уровнем внутривидового генетического полиморфизма.

Учитывая имеющуюся в литературе информацию о том, что количество копий генов зависит от содержания вторичных метаболитов в кормовых растениях и воздействия инсектицидов, можно предположить, что анализируемые имаго *L. decemlineata* обрабатывались инсектицидами, что вызвало экспрессию этих генов.

Заключение. Внутрипопуляционное разнообразие рисунка центральной части переднеспинки *L. decemlineata* свидетельствует об изменении фенотипической структуры, что,

возможно, обусловлено воздействием инсектицидов.

Устойчивость имаго *L. decemlineata* к препарату «Битоксибациллин» указывает на необходимость постоянного мониторинга и подбора эффективных инсектицидов для использования в сельском хозяйстве с учетом эволюционных изменений в популяциях *L. decemlineata*.

У имаго *L. decemlineata* представлены большим числом копий и обладают высоким уровнем вариабельности следующие гены: CYP4BN13, CYP4C1, CYP4C3, CYP6A23 и CYP6K1LIKE. Поскольку на увеличение количества копий генов оказывает влияние воздействие инсектицидов, можно предположить, что анализируемые имаго *L. decemlineata* подвергались обработке инсектицидов, что вызвало экспрессию этих генов.

Список использованных источников

1. Об установлении перечня особо опасных вредителей, болезней растений и сорняков и признании утратившими силу некоторых постановлений Министерства сельского хозяйства и продовольствия Республики Беларусь : постановление М-ва сельского хозяйства и продовольствия Респ. Беларусь от 17 октября 2016 года №29 // ЭТАЛОН : информ.-поисковая система (дата обращения: 23.11.2025).
2. Сухорученко, Г. И. Положение с резистентностью колорадского жука *Leptinotarsa decemlineata* Say (Coleoptera, Chrysomelidae) к инсектицидам в разных зонах картофелеводства России / Г. И. Сухорученко [и др.] // Вестник защиты растений. – 2010. – №3. – С. 30–38.
3. Фасулати, С. Р. Формирование внутривидовой структуры у насекомых в условиях агроэкосистем на примерах колорадского жука *Leptinotarsa decemlineata* Say, 1824 (Coleoptera, Chrysomelidae) и вредной черепашки *Eurygaster integriceps* Puton, 1881 (Heteroptera, Scutelleridae) / С. Р. Фасулати // Науковий вісник Ужгородського університету. Сер. Біологія. – 2010. – Випуск 29. – С. 13–27.
4. Feyereisen, R. Molecular biology of insecticide resistance / R. Feyereisen // Toxicol. Lett. – 1995 – Vol. 82, № 3. – P. 83–90.
5. Полиморфизм рисунков переднеспинки, темени, элитры и фенотипическое проявление

резистентности в популяциях *Leptinotarsa decemlineata* Say южных регионов Беларуси / М. М. Воробьева, Н. В. Воронова, Е. А. Абакумова, К. В. Аргер // Веснік Мазырскага дзяржаўнага педагогічнага ўніверсітэта імя І.П. Шамякіна : навуковы часопіс. – 2020. – № 1 (55). – С. 9–15.

6. Бабкина, Л. А. Изучение фенотипического полиморфизма в популяциях колорадского жука (*Leptinotarsa decemlineata* Say) Льговского и Рыльского районов Курской области / Л. А. Бабкина, И. П. Балабина, Н. А. Балабина, К. В. Мерзлякова // Auditorium. Электронный научный журнал Курского государственного университета. – 2016. – №4 (12). – С. 10–16.
7. Abbott, W. S. A method of computing the effectiveness of an insecticide / W. S. Abbott // Econ. Entomol. – 1925. – № 18. – P. 265–267.
8. GenBank Overview [Electronic resource] / GenBank Overview. – [USA], 2017. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/> (date of access: 13.11.2025).
9. Kumar, S. A biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences / S. Kumar [et al.] // Briefings in Bioinformatics. – 2008. – Vol. 9. – P. 299–306.

References

1. On establishing a list of particularly dangerous pests, plant diseases and weeds and recognizing as invalid certain resolutions of the Ministry of Agriculture and Food of the Republic of Belarus [On the establishment of a list of particularly dangerous pests, plant diseases and weeds and the invalidation of certain resolutions of the Ministry of Agriculture and Food of the Republic of Belarus]. Resolution of the Ministry of Agriculture and Food of the Republic of Belarus dated October 17, 2016, no. 29. ETALON: information retrieval system (date accessed: November 23, 2025). (In Russian)
2. Sukhoruchenko G. I. et al. Polozhenie s rezistentnost'yu koloradskogo zhuka *Leptinotarsa decemlineata* Say (Coleoptera, Chrysomelidae) k insekticidam v raznykh zonakh kartofelevodstva Rossii [The status of resistance of the Colorado potato beetle *Leptinotarsa decemlineata* Say (Coleoptera,

- Chrysomelidae) to insecticides in different potato growing zones of Russia]. *Vestnik zashchity`rastenij* [Plant Protection Bulletin]. 2010, no. 3, pp. 30–38. (In Russian)
3. Fasulati S. R. Formirovanie vnutrividovoj struktury` u nasekomy`kh v usloviyakh agroekosistem na primerakh koloradskogo zhuka *Leptinotarsa decemlineata* Say, 1824 (Coleoptera, Chrysomelidae) i vrednoj cherepashki *Eurygaster integriceps* Puton, 1881 (Heteroptera, Scutelleridae) [Formation of intraspecific structure in insects under conditions of agroecosystems on the examples of the Colorado potato beetle *Leptinotarsa decemlineata* Say, 1824 (Coleoptera, Chrysomelidae) and the harmful turtle *Eurygaster integriceps* Puton, 1881 (Heteroptera, Scutelleridae)]. *Naukovij vi`snik Uzhgorodskogo uni`versitetu. Ser. Bi`logi`ya* [Scientific Bulletin of Uzhgorod University. Series: Biology], 2010. Issue 29. (In Russian)
 4. Feyereisen R. Molecular biology of insecticide resistance. *Toxicol. Lett.* 1995. Vol. 82, no.3, pp. 83–90.
 5. Vorobyova M.M., Voronova N.V., Abakumova E.A., Arger K.V. Polimorfizm risunkov perednespinky, temeni, e`litr i fenotipicheskoe proyavlenie rezistentnosti v populyaciyakh *Leptinotarsa decemlineata* Say yuzhny`kh regionov Belarusi [Polymorphism of patterns of pronotum, crown, elytra and phenotypic manifestation of resistance in populations of *Leptinotarsa decemlineata* Say from the southern regions of Belarus]. *Vesnik Mazyrskaga dzjarzhaj`naga pedagogichnaga y`niversiteta imya I.P. Shamyakina* [Bulletin of the Mozyr State Pedagogical University named after I.P. Shamyakin]. 2020, no. 1 (55), pp. 9–15. (In Russian)
 6. Babkina L.A., Balabina I.P., Balabina N.A., Merzlyakova K.V. Izuchenie fenotipicheskogo polimorfizma v populyaciyakh koloradskogo zhuka (*Leptinotarsa decemlineata* Say) L`govskogo i Ry`-l'skogo rajonov Kurskoj oblasti [Study of phenotypic polymorphism in populations of the Colorado potato beetle (*Leptinotarsa decemlineata* Say) of the Lgovsky and Rylsky districts of the Kursk region]. *Auditorium. E`lektronny`j nauchny`j zhurnal Kurskogo gosudarstvennogo universiteta* [Auditorium. Electronic scientific journal of Kursk State University]. 2016, no.4 (12), pp. 10–16. (In Russian)
 7. Abbott W. S. A method of computing the effectiveness of an insecticide. *Econ. Entomol.* 1925, no.18, pp. 265–267.
 8. GenBank Overview [USA], 2017. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/> (accessed: 13.11.2025).
 9. Kumar S. et al. A biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences. *Briefings in Bioinformatics.* 2008. Vol. 9, pp. 299–306.

Received 10.10.2025