

*На правах рукописи*



Китаев Константин Альбертович

ПОПУЛЯЦИОННО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ КОАДАПТАЦИИ  
КОЛОРАДСКОГО ЖУКА (*LEPTINOTARSA DECEMLINEATA* SAY)  
И ЕГО ЭНТОМОФАГОВ

03.02.07 – генетика

03.02.08– экология

Автореферат диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Уфа 2013

Работа выполнена в лаборатории физиологической генетики  
Федерального государственного бюджетного учреждения науки  
Института биохимии и генетики Уфимского научного центра  
Российской академии наук

**Научный руководитель:**

Беньковская Галина Васильевна

Доктор биологических наук, доцент

**Официальные оппоненты:**

Книсс Владимир Александрович

Доктор биологических наук, профессор  
Башкирский государственный  
университет

Профессор кафедры физиологии  
человека и зоологии

Николенко Алексей Геннадьевич

Доктор биологических наук, профессор  
Федеральное государственное  
бюджетное учреждение науки  
Институт биохимии и генетики  
Уфимского научного центра РАН  
Заведующий лабораторией биохимии  
адаптивности насекомых

**Ведущая организация:**

ГНУ Всероссийский институт защиты  
растений РАСХН

Защита диссертации состоится «\_\_\_» ноября 2013 г. в «\_\_\_\_\_» часов  
на заседании диссертационного совета Д 002.133.01 при  
Федеральном государственном бюджетном учреждении науки  
Институте биохимии и генетики Уфимского научного центра РАН по адресу:  
450054, Уфа, пр. Октября, 71. ИБГ УНЦ РАН

С диссертацией и авторефератом можно ознакомиться в научной библиотеке  
Уфимского научного центра РАН по адресу: Уфа, пр. Октября, 71;  
с электронной версией автореферата - на сайтах ВАК РФ и ИБГ УНЦ РАН:  
<http://ibg.anrb.ru>

e-mail: [molgen@anrb.ru](mailto:molgen@anrb.ru).

Автореферат разослан «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2013г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета, к.б.н



С.М. Бикбулатова

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность темы.** Колорадский жук (*Leptinotarsa decemlineata* Say) является инвазивным видом, появившимся в агроэкосистемах вслед за картофелем, и наиболее массовым фитофагом этого культурного растения (Ушатинская, 1981). В настоящее время в агроценозах картофеля обнаруживается много хищных насекомых, которые в той или иной мере способны к питанию колорадским жуком (Гусев, 1991; Вилкова и др., 2005; Коваль, 1999, 2005, 2009: 2012). В первую очередь это распространённые представители семейств жужелиц (Coleoptera, Carabidae) и божьих коровок (Coleoptera, Coccinellidae). Комплексы этих энтомофагов в агроценозах могут быть устойчивыми и в то же время эволюционно лабильными, что позволяет предположить о протекании процессов адаптации энтомофагов к питанию новым видом жертв (колорадский жук), а также возможной сопряжённой эволюции (коэволюции) между популяциями колорадского жука и его энтомофагов. Эти процессы представляют интерес не только в рамках разработки методов биологической защиты картофеля, но и позволяют исследовать эколого-генетическую систему хищник-жертва. Исследование закономерности взаимодействий в такой системе представляет важную фундаментальную проблему современной экологической генетики и эволюционной экологии.

**Цели работы** – выявление популяционно-генетических закономерностей формирования адаптационного и коэволюционного взаимодействия в системе «фитофаг – энтомофаг» на примере колорадского жука и его энтомофагов из семейств жужелицы (Coleoptera, Carabidae) и божьи коровки (Coleoptera, Coccinellidae).

Для достижения данной цели были поставлены следующие задачи:

1. Исследование структуры населения хищных насекомых в модельных агроценозах и определение спектра возможных энтомофагов колорадского жука в Республике Башкортостан.
2. Подтверждение хищничества предполагаемых энтомофагов в отношении колорадского жука молекулярно-генетическими методами.
3. Определение динамической плотности и половозрастных характеристик популяций массовых энтомофагов модельных агроценозов, и оценка действия инсектицидов на массовых энтомофагов и сообщества хищных насекомых в агроценозах.

4. Исследование корреляции пространственного распределения энтомофагов и колорадского жука на разных стадиях развития.

5. Определение избирательности питания энтомофагов, выживаемости и оценка развития стресса при кормлении яйцами и личинками колорадского жука с использованием биохимических маркеров.

6. Установление взаимосвязей генетического полиморфизма особей энтомофагов с различными параметрами экологической пластичности.

7. Морфометрический анализ изменчивости в популяциях энтомофагов, оценка флуктуирующей асимметрии особей из разных агроценозов и выявление возможной эволюционной динамики.

**Научная новизна.** Впервые выявлен состав и структура населения жужелиц и божьих коровок картофельных агроценозов Республики Башкортостан с привлечением анализа половозрастной динамики и методов многомерной статистики. Установлен спектр видов, тесно связанных с данными агроценозами. Показано влияние божьих коровок на количество яйцекладок и личинок колорадского жука в естественных условиях. Впервые на точечных данных полевых учётов подтверждены выводы математической модели о влиянии хищников на пространственное распределение и агрегированность фитофагов. Впервые с помощью анализа содержимого кишечника определён спектр энтомофагов колорадского жука в Республике Башкортостан. Проведена экспериментальная оценка приспособленности *Coccinella septempunctata* L. и *Harpalus rufipes* DeGeer к питанию личинками колорадского жука с помощью биохимических маркеров стресса. По данным о генетическом разнообразии впервые показано действие факторов естественного отбора, который приводит к выщеплению менее полиморфной части популяции энтомофагов, способной к питанию колорадским жуком. Показано, что исследованные группы энтомофагов являются частью генетически и фенотипически полиморфных популяций, обладающих единым адаптационным потенциалом.

**Положения, выносимые на защиту:**

1. Адаптация энтомофагов к жизни в агроценозах и питанию колорадским жуком носит не фрагментарный характер, а является частью их общего полиморфизма.

2. Питание колорадским жуком приводит в ходе естественного отбора к закреплению комплекса неспецифических признаков широко распространенных, но локально редких адаптивных генотипов.

3. Реакция на появление нового объекта питания у двух видов энтомофагов: *C. septempunctata* и *H. rufipes* – имеет адаптивный характер, но их внутривидовые процессы различаются.

**Теоретическая и практическая значимость.** Данные по питанию энтомофагов колорадским жуком применимы в мониторинге численности этого вредителя. Установленные закономерности динамики агрегированности в распределении хищника и жертвы могут использоваться в моделях коэволюционных процессов. Выявленные закономерности популяционно-генетических процессов, протекающих в популяциях энтомофагов, позволяют прогнозировать дальнейшее развитие коадаптаций в системе хищник-жертва.

**Степень достоверности результатов.** Все результаты основаны на обширных полевых и экспериментальных исследованиях и анализе фактических данных с помощью современных статистических методов.

**Апробация результатов работы.** Материалы работы представлены в виде устных и постерных докладов на следующих конференциях: «IX European congress of Entomology» (Венгрия, Будапешт, 2010), VIII Межрегиональное совещание энтомологов Сибири и Дальнего Востока – «Энтомологические исследования в Северной Азии» (Новосибирск, 2010), «Любищевские чтения – современные проблемы эволюции» (Ульяновск, 2011 – 2013), «Фундаментальные проблемы энтомологии в XXI веке» (Санкт-Петербург, 2011), школа-конференция молодых ученых «Биомика – наука 21 века» (Уфа, 2011), «Sixth International Symposium on Molecular Insect Science» (Нидерланды, Амстердам, 2011), II Всероссийская научно-практическая конференция студентов, аспирантов и молодых учёных «Экология и природопользование: прикладные аспекты» (Уфа, 2012), XXIV International Congress of Entomology «New Era in Entomology» (Республика Корея, Тэгу, 2012), XIV съезд Русского энтомологического общества (Санкт-Петербург, 2012).

**Публикации.** По основным результатам исследования опубликовано 23 работы, в том числе 4 статьи в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных ВАК, и 2 статьи в зарубежных журналах.

**Структура и объем работы.** Диссертация состоит из 5 глав, заключения, выводов, списка цитированной литературы и приложения. Она изложена на 174 страницах машинописного текста. Основной текст диссертации содержит 44 рисунка и 45 таблиц. Список использованной литературы включает 191 источник, в том числе 97 на иностранных языках.

## **СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ**

### **АНАЛИЗ ВЗАИМООТНОШЕНИЙ ХИЩНИКА И ЖЕРТВЫ В ПОПУЛЯЦИОННО-ГЕНЕТИЧЕСКОМ АСПЕКТЕ (литературный обзор)**

Раздел содержит сведения о процессах коэволюции, которые могут протекать в условиях агроценоза. Рассмотрены возможности быстрых эволюционных преобразований в популяциях хищников и их жертв вследствие коэволюции. Приводятся данные по биологии и распространению колорадского жука, его возможных хищников и паразитоидов. Подробно рассмотрена проблема определения количественных показателей взаимодействия хищников и их жертв в агроценозах.

### **МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ**

Для исследования использовали насекомых из трех агроэкосистем, расположенных в Бирском, Кармаскалинском и Баймакском районах Республики Башкортостан. Районы исследования расположены в трёх разных растительных зонах: лесной, лесостепной и степной. Энтомофагов собирали почвенными ловушками (Крыжановский, 1983) и вручную с растений. Для анализа корреляции пространственного распределения божьих коровок и колорадского жука использовали учётные площадки 2x2 м (~20 кустов картофеля), которые находились на расстоянии 12 м друг от друга. Собранных особей помещали в 40 – 45% раствор этиленгликоля (тосол 60) или 70% раствор этилового спирта. Всего было собрано более 4000 особей. Часть насекомых была собрана в пластиковые контейнеры с перфорацией для содержания в лаборатории.

Для идентификации насекомых использовали Определитель насекомых Европейской части СССР под редакцией Бей-Биенко (1965), и Определитель жуков Среднего Поволжья (Исаев, 2007). Определение жужелиц и божьих коровок

уточнялось аспирантом кафедры энтомологии Саратовского государственного университета Сажневым А.С. Для анализа биоразнообразия использовали индекс Шеннона. Фаунистическое сходство вычисляли по коэффициенту Жаккара, количественное – по коэффициенту Серенсена (Мэгарран, 1992). Доминирование определяли по относительному обилию и встречаемости особей вида. Для доминантных видов определяли половую структуру, динамику относительной численности и возрастные характеристики. По состоянию жирового тела, половых органов и придатков определяли пол и возраст имаго (Беспалов, 2011, Wallin, 1987, 1988). Выделяли 4 возраста.

В лабораторных экспериментах использовали 726 особей насекомых. В токсикологических и трофических экспериментах для питания коровок использовалась замороженная тля, 15% сахарный сироп, яйца колорадского жука или гомогенат из личинок колорадского жука IV возраста. Для питания жужелиц использовали личинок колорадского жука III-IV возрастов и мясной фарш. Для оценки чувствительности к инсектицидам использовали следующие препараты: Децис, Банкол, Актара, Регент, Актеллик. Диагностические дозы инсектицидов наносили топикально (Беньковская и др., 2010).

Для биохимического анализа развития стресс-реакции использовали гемолимфу из спинного сосуда насекомого. Определяли активность ДОФА-оксидазы, тирозиназы, ацетилхолинэстеразы и концентрацию производных тирозина (Беньковская, Мустафина, 2012), получены данные по 160 особям насекомых.

Для определения трофической активности из собранных насекомых извлекали кишечник, из его содержимого выделяли ДНК и проводили ПЦР с видоспецифичными праймерами к гену цитохромоксидазы мтДНК колорадского жука (Greenstone et al., 2007). Отдельно выделяли ДНК из жирового тела и мышц. Всего выделено 612 образцов ДНК.

В качестве молекулярно-генетических маркеров полиморфизма участков ДНК использовали метод РАПД-ПЦР (Williams, 1990). Для анализа использовали 196 особей *Coccinella septempunctata*.

Для определения внутривидового фенотипического полиморфизма божьих коровок и жужелиц и выявления популяционной структуры использовали методы морфометрического анализа в комплексе с интегральными показателями

стабильности развития (флуктуирующая асимметрия). В качестве метрических показателей определяли длину и ширину надкрылий, ширину переднеспинки имаго жуков, а у семиточечных божьих коровок также длину передней ячейки крыла. Использовали выборки жуков из всех биотопов, предварительно определив пол и генеративное состояние (возраст). Произвели обмеры 196 имаго *Coccinella septempunctata* и 458 имаго *Harpalus rufipes*.

Для анализа пространственного распределения использовали показатели агрегированности, основанные на индексе дисперсии (Покаржевский и др., 2007). Среднюю плотность, индекс Грина, индекс средней уплотненности и индекс пятнистости рассчитывали в программе Passage 2 (Rosenberg, Anderson, 2011). В той же программе провели парный и частный тест Мантеля (Mantel, 1967; Mantel, Valand, 1970; Sokal, 1979). Анализ ассоциаций в распределении божьих коровок и особей колорадского жука на разной стадии развития проводили в программном комплексе SADIEshell (Perry, 1998; Perry et al., 1999; Winder et al., 2001; Perry, Dixon, 2002).

Достоверность различий между группами считали по матрицам попарных генетических расстояний между особями всех групп с использованием теста Мантеля в программе Passage 2 (Rosenberg, Anderson, 2011). Индивидуальные генетические расстояния определяли по Хэммингу (знаковая сходность последовательностей) по наборам строк присутствия/отсутствия наблюдаемых РАПД-локусов. В качестве второй матрицы использовали матрицу групповых расстояний (Miller, 1999). Кластеризацию проводили в программах Structure 2.3.4 (Pritchard et al., 2000; 121. Falush et al., 2003, 2007) и Structure Harvester (Evanno et al., 2005; Earl et al., 2012), а также Flock&Trace (Duchesne, Turgeon, 2012).

Относительную асимметрию рассчитывали по отношению разности правого и левого признака к их сумме. Общую флуктуирующую асимметрию по нескольким мерным признакам оценивали по формуле (Гелашвили и др., 2004).

Нормальность распределения мерных признаков определяли по критерию Колмогорова-Смирнова в программе SPSS Statistics for Windows 17.0 (Бююль, Цёфель, 2005). Различия между выборками определяли дискриминантным анализом в той же программе. Оценку различий выборок проводили по значению  $\lambda$  Уилкса (Алексеева, 2010, Бессокирная, 2003). Для оценки стандартного отклонения флуктуирующей асимметрии отдельных признаков использовали ресэмплинг методом

«складного ножа» (Efron, 1982). Обобщенную дисперсию вычисляли, используя ковариационные матрицы признаков. Значимость различий обобщенной дисперсии определяли с помощью F-теста (Животовский, 1991).

## **РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ**

### **1. Экологическая характеристика сообществ хищных насекомых агроценозов картофеля**

#### **1.1. Население жужелиц (Coleoptera, Carabidae) и их влияние на численность и структуру популяции колорадского жука**

Обнаружено 25 видов жужелиц в составе 12-ти родов (Таблица 1). Наибольшее количество видов было выявлено на обочинах полей, что соответствует концепции высокого биоразнообразия экотонов в агроэкосистемах (Чернышев, 2001). Проанализировав распространение разных видов жужелиц и оценив кумулятивное количество видов, наблюдаемое в разных биотопах, мы сделали заключение, что в агроценозах картофеля обитает не менее 12-ти видов жужелиц, из которых, по крайней мере, 7 видов являются общими для всех агроэкосистем (агроценозов и прилегающих биотопов) (Таблица 1).

Общий сравнительный анализ динамики относительной численности жужелиц в агроценозах показывает, что постоянно доминирующим видом в картофельных и прочих агроценозах является *H. rufipes*. Половозрастная структура *H. rufipes* в агроценозах показывает, что местами размножения являются картофельные агроценозы. В этих агроценозах наибольшая концентрация молодых (ювенильных и имматурных) особей, также очень высока численность в целом.

Анализ половозрастной структуры других доминирующих видов жужелиц показал, что они тесно связаны с агроценозами в своем индивидуальном развитии. Повышение их численности на отдельных полях связано не с миграциями из окружающих естественных местообитаний, а с размножением и переходом в имагинальное состояние в агроценозе.

Таблица 1

Виды семейства жуужелиц (Carabidae), обнаруженные в агроценозах и прилегающих биотопах

Вид	Районы*	Биотопы**	Статус вида
<i>Amara fusca</i> Dej., 1828	1	1, 2	малочисленный
<i>Amara lugens</i> Zimm., 1832	1	1	малочисленный
<i>Calathus ambiguus</i> Payk., 1790	2	6	малочисленный
<i>Calathus melanocephalus</i> Linne, 1758	1, 2	2, 6	малочисленный
<i>Calosoma investigator</i> Illiger, 1798	1, 3	1, 2, 4, 5	доминантный
<i>Carabus granulatus</i> L., 1758	2	6	малочисленный
<i>Curtonotus aulica</i> Panzer, 1796	1, 2, 3	1, 2, 4, 6	доминантный
<i>Curtonotus desertus</i> Krynicki, 1866	2	2	малочисленный
<i>Dolichus halensis</i> Schaller, 1783	1, 2, 3	1, 2, 3, 4, 5	эудоминантный
<i>Harpalus affinis</i> Schrank, 1781	1, 2	1, 2, 4, 5, 6	субдоминантный
<i>Harpalus calceatus</i> Duft., 1812	1, 2, 3	1, 2, 4, 5	доминантный
<i>Harpalus distinguendus</i> Duft., 1812	1, 2	1, 2, 6	субдоминантный
<i>Harpalus griseus</i> Panzer, 1796	1	1, 5	малочисленный
<i>Harpalus hirtipes</i> Panzer, 1796	3	4	малочисленный
<i>Harpalus progrediens</i> Schaub., 1922	1	2	малочисленный
<i>Harpalus rufipes</i> DeGeer, 1774	1, 2, 3	1, 2, 3, 4, 5, 6	эудоминантный
<i>Harpalus smaragdinus</i> Duft., 1812	1, 2	1	малочисленный
<i>Ophonus azureus</i> Fabricius, 1775	1, 2	2, 3, 4, 6	субдоминантный
<i>Poecilus cupreus</i> L., 1758	1, 2, 3	1, 2, 3, 4, 5, 6	эудоминантный
<i>Pterostichus anthracinus</i> Illiger, 1798	2	6	малочисленный
<i>Pterostichus macer</i> Marsham, 1802	1	1, 2, 3	субдоминантный
<i>Pterostichus melanarius</i> L., 1758	1, 2	1, 2, 3, 4, 6	доминантный
<i>Pterostichus niger</i> Schaller, 1783	1, 2	2, 6	субдоминантный
<i>Synuchus vivalis</i> Illiger, 1798	1, 2	1, 2, 3, 4, 5, 6	доминантный

Примечание.

\*Районы: 1 – Бирский, 2 – Кармаскалинский, 3 – Баймакский.

\*\*Биотопы: 1 – картофель, 2 – обочина, 3 – пар, 4 – злаки, 5 – севооборот, 6 – луг.

Проведя кластерный анализ сходства агроценозов, мы выявили стабильный кластер, объединяющий картофельные поля в Кармаскалинском р-не и Бирском р-не (рис. 1). Исходя из этого, мы заключили, что в картофельных агроценозах формируется своя, достаточно устойчивая структура сообщества жужелиц. Сообщество жужелиц агроценозов достаточно стабильно, но его количественные характеристики зависят от возделываемых культур, причем вне зависимости от окружения.

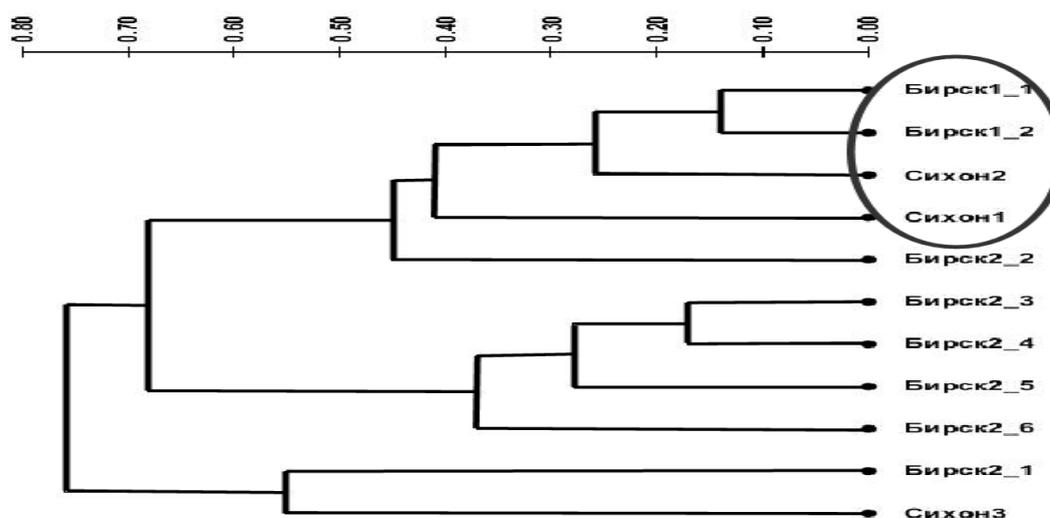


Рис.1. Дендрограмма расстояний по коэффициентам количественного сходства. Выделены картофельные агроценозы.

В токсикологических экспериментах протестировали чувствительность имаго *H. rufipes* к широко применяемым инсектицидам. Выявили устойчивость к диагностическим дозам фосфоорганических, пиретроидных и неоникотиноидных инсектицидов (Доли устойчивых особей в выборке соответственно 0,98; 0,40; 0,94) , в то же время сохраняется высокая чувствительность к фенилпиразолам (доля устойчивых 0,03).

Положительные корреляции в распределении жужелиц и колорадского жука отсутствуют. При корреляционном анализе динамики численности личинок колорадского жука IV возраста и численности *H. rufipes* обнаруживается отрицательная корреляция ( $r = -0,961$  при значимости  $p = 0,039$ ) на поле хозяйственного картофеля и ( $r = -0,603$  при  $p = 0,045$ ) на полях коллекций картофеля. Однако, такие результаты могут быть обусловлены особенностями

преимагинального развития обоих видов. Но на полях хозяйственного картофеля общая численность колорадского жука была меньше, чем на полях с коллекциями сортов картофеля, причем для *H. rufipes* наблюдалась обратная картина.

## 1.2. Население божьих коровок (Coleoptera, Coccinellidae) и их влияние на численность и структуру популяции колорадского жука

Обнаружено 8 видов божьих коровок из 6 родов (Таблица 2). Наибольшее количество видов этой группы обнаружено в агроценозах. Возможно, это связано с концентрацией в них естественной пищи божьих коровок – разных видов тли и трипсов.

Таблица 2

Виды семейства божьих коровок (Coccinellidae), обнаруженные в агроценозах и прилегающих биотопах в исследованных районах

Виды	Районы*	Биотопы**	Статус вида
<i>Anatis ocellata</i> L. 1758	1	1	малочисленный
<i>Coccinella quinquepunctata</i> L. 1758	1	1,2	субдоминантный
<i>Coccinella septempunctata</i> L. 1758	1, 2, 3	1, 2, 3	доминантный
<i>Coccinula quatuordecimpustulata</i> L. 1758	1	1, 2	субдоминантный
<i>Hippodamia tredecimpunctata</i> L. 1758	1	2	малочисленный
<i>Hippodamia variegata</i> Goeze, 1777	1, 2, 3	1, 2, 3	доминантный
<i>Propylaea quatuordecimpunctata</i> L. 1758	1, 2	1, 2	доминантный
<i>Psyllobora vigintiduopunctata</i> L. 1758	1, 3	1	малочисленный

Примечание.

\*Районы: 1 – Бирский, 2 – Кармаскалинский, 3 – Баймакский.

\*\*Биотопы: 1 – картофель, 2 – злаки, 3 – обочины.

Наиболее массовыми видами являются *Coccinella septempunctata* и *Hippodamia variegata*. В картофельных агроценозах часто встречается большинство из обнаруженных видов, кроме *H. tredecimpunctata* – этот вид в основном присутствует на злаках (ячмень, рожь).

В токсикологических экспериментах выявили устойчивость имаго *C. septempunctata* к диагностической дозе фипронила (Регент), доля устойчивых составила 0,64.

Анализ дисперсионных индексов показал, что особи колорадского жука распределены в пространстве картофельного поля очень агрегировано на всех стадиях развития, причем на более поздних стадиях преимагинального развития агрегированность возрастает. Имаго божьих коровок ведут активный образ жизни, их распределение соответствует случайному, агрегированности не наблюдается, группы из 2-3 особей достаточно редки. Анализ пространственных корреляций с помощью теста Мантеля (Mantel, 1967; Sokal, 1979) и ассоциаций по X SADIE (Winder et al., 2001; Perry, Dixon, 2002) показал отсутствие связей в распределении имаго божьих коровок и преимагинальных особей колорадского жука. Достоверные ассоциации наблюдаются только между распределением особей колорадского жука: имаго, яйцекладками и личинками первого возраста.

Для проверки гипотезы о влиянии *C. septempunctata* на агрегированность особей колорадского жука на разных стадиях развития использовали ряды значений средней плотности и дисперсионных индексов, полученные при ресэмплинге и удовлетворяющие критериям нормального распределения. Получили значимые отрицательные корреляции между средней плотностью *C. septempunctata*, плотностью яйцекладок и личинок первого возраста колорадского жука в обоих исследованных агроценозах (Бирский и Баймакский р-ны). Положительные корреляции наблюдаются также между агрегированностью личинок колорадского жука и численностью имаго *C. septempunctata*. Следовательно, этот вид активно хищничает в отношении личинок первого возраста, хотя повышение агрегированности личинок первого возраста может происходить и при поедании этими хищниками яйцекладок колорадского жука. Божьи коровки не могут полностью уничтожить популяции колорадского жука, но могут оказать влияние на численность преимагинальных особей, до достижения точки стабилизации взаимной динамики численности в локальном пространстве.

## **2. Эколого-генетические особенности адаптаций представителей семейства Carabidae и Coccinellidae к питанию колорадским жуком**

### **2.1. Подтверждение питания энтомофагов колорадским жуком**

Трофическую активность энтомофагов в отношении колорадского жука определяли методом анализа содержимого кишечника с помощью ПЦР с видоспецифическими праймерами. Мы проанализировали экскременты жужелиц,

питавшихся первоначально личинками колорадского жука, а затем личинками комнатной мухи, и выявили, что период выведения остатков первоначальной пищи с экскрементами достаточно длителен и составляет не менее 3-х суток, что подтверждает применимость метода для исследования трофической активности хищников в отношении колорадского жука в агроценозах.

Для анализа содержимого кишечника было отобрано 172 особи насекомых из наиболее массовых встречаемых нами в агроценозах хищников-генералистов. Результаты ПЦР-анализа содержимого кишечника представлены в таблице 3.

Таблица 3

Результаты ПЦР-анализа содержимого кишечника массовых видов хищников-насекомых с праймерами, видоспецифичными для колорадского жука

Виды	Обследовано особей	Доля положительных, %
<i>Coccinella septempunctata</i>	64	39
<i>Hippodamia variegata</i>	40	0
<i>Harpalus rufipes</i>	33	9
<i>Pterostichus melanarius</i>	7	0
<i>Calosoma investigator</i>	15	7
<i>Poecilus cupreus</i>	16	0
<i>Dolychus halensis</i>	8	0

Виды, которые показали положительный результат при ПЦР-анализе содержимого кишечника, использовались нами для дальнейшего анализа трофической активности в искусственных условиях. Наиболее активный энтомофаг колорадского жука – *Coccinella septempunctata*.

Количество съедаемых личинок колорадского жука сопоставимо с размерами жужелиц. *Calosoma investigator* съедает  $1,9 \pm 0,7$  личинок четвертого возраста за сутки, а *H. rufipes*  $0,6 \pm 0,2$ . *Coccinella septempunctata* потребляют  $5,7 \pm 0,5$  яиц колорадского жука в сутки. В первые сутки содержания в лаборатории этот показатель равен  $10,7 \pm 1,1$ , на вторые снижается до  $6,2 \pm 0,5$ , а затем снижается ещё более значительно.

## 2.2. Оценка приспособленности *C. septempunctata* и *H. rufipes* к питанию колорадским жуком с помощью биохимических маркеров стресса

Непривычная пища способствует развитию стресса. Развитие стресса у

насекомых можно определить по динамике активности тирозиназы, ДОФА-оксидазы и концентрации катехоламинов в гемолимфе (Сухорукова, 2002; Беньковская, 2009, 2010), кроме того имеет большое значение активность ацетилхолинэстеразы (Беньковская, 2012).

Результаты анализа данных, полученных в эксперименте с питанием *C. septempunctata* разной пищей, приведены в таблице 4.

Таблица 4

Парные сравнения данных биохимического анализа  
в вариантах опыта с *C. septempunctata*

Сравниваемые варианты питания	$\lambda$	Значимость p
Тлей/яйцами колорадского жука	0,171	0,220
Яйцами/гомогенатом из личинок колорадского жука	0,465	0,590
Тлей/гомогенатом из личинок колорадского жука	0,006	0,005

Наибольшие различия здесь наблюдаются между группами питавшимися тлей и гомогенатом из личинок колорадского жука. В остальных же случаях дискриминация не столь выражена. Можно сделать вывод, что среди семиточечных божьих коровок есть особи, приспособленные к питанию яйцами колорадского жука.

Оценка приспособленности *H. rufipes* проводилась опосредованно через сравнение биохимических параметров стресс-реакции в разных вариантах кормления. Результаты показывают, что достоверно различаются по стресс-реакции самцы с разных полей и самки в группах с разной историей питания в лаборатории. Этот результат позволяет предположить наличие каких-то адаптаций, существующих у самцов и самок, но проявляющихся сильнее у самцов.

Корреляции между различными параметрами жизнедеятельности или разными органами возрастают при действии неблагоприятных факторов или индивидуальном развитии (Ростова, 1991, 2002), а также адаптационном напряжении или «групповом стрессе» (Горбань и др., 2007), поэтому мы использовали показатель скоррелированности физиолого-биохимических параметров для определения степени адаптированности к питанию личинками колорадского жука. Рассчитанные показатели скоррелированности представлены в таблице 5. Разница в уровне скоррелированности в группах особей, питавшихся личинками колорадского жука, с

ячменного и картофельного полей свидетельствует о наличии специфических адаптаций у обитателей картофельного поля, способствующих снижению интенсивности стресс-реакции при питании колорадским жуком.

Таблица 5

Показатели скоррелированности ( $r_s$ ) для групп особей *H. rufipes*

Происхождение	Варианты питания	$r_s$
Ячменное поле	без корма	0,00007
	личинки колорадского жука	0,07412
	мясной фарш	0,53602
Картофельное поле	без корма	0,00006
	личинки колорадского жука	0,36251
	мясной фарш	0,56796

Данные по избирательности питания и выживаемости при питании яйцами или личинками колорадского жука не позволяют сделать однозначные выводы о степени приспособленности к тому или другому виду корма. По данным биохимического анализа можно сделать вывод о том, что некоторые особи *C. septempunctata* приспособлены к питанию яйцами колорадского жука, а некоторые особи *H. rufipes* – к питанию личинками колорадского жука.

### 3. Сравнительный анализ популяционно-генетических процессов в популяциях энтомофагов колорадского жука

#### 3.1. Морфометрический анализ разнообразия и сходства внутрипопуляционных групп *C. septempunctata*

Значимые отличия средних значений и вариации используемых признаков между особями из разных районов отсутствуют, что позволяет сделать вывод об их общности, принадлежности их к одной популяции.

При проведении сравнения самцов и самок обнаружилось значимое различие в длине надкрылий. Так, длина надкрылий самок больше, чем длина надкрылий самцов, что является проявлением полового диморфизма. Другие признаки не показывают такой большой разницы, по-видимому, их изменчивость сопряжена с другими факторами.

Сравнение групп имаго, питавшихся и не питавшихся яйцами колорадского жука, не выявило отличия средних значений, но показало значимые отличия коэффициента вариации отдельных признаков. У особей, питавшихся яйцами колорадского жука, вариация оказалась ниже. Обобщенная дисперсия в группе коровок, питавшихся колорадским жуком, существенно ниже, чем в группе не питавшихся, 0,022 и 0,027, соответственно. Проведя анализ обобщенной дисперсии в локальных выборках, определили, что значимость различий достоверна ( $p=0,0007$ ). Это означает, что коровки, питающиеся колорадским жуком, подвержены действию естественного отбора, снижающего полиморфизм в пользу локальной адаптации.

### 3.2. Анализ генетических процессов по неспецифическим молекулярно-генетическим маркерам в популяциях *C. septempunctata*

Значимость генетических различий проверяли с помощью теста Мантеля по корреляции между матрицами групповых и генетических расстояний. Значимых различий между группами особей, обитающих в разных районах, выявлено не было (значимость  $p=0,430$ ). Различия между группами особей, питавшихся и не питавшихся колорадским жуком, в общей выборке оказались достоверны ( $p=0,024$ ). Различия между группами в локальной популяции Баймакского района оказались меньше и недостоверны ( $p=0,143$ ).

Проведя анализ выборок из трех районов по выявленным в ходе РАПД-ПЦР локусам с помощью программы Structure 2.3.4 (Pritchard et al., 2000; Falush et al., 2003, 2007), мы выявили наличие трех кластеров. Но распределение особей по кластерам не позволяет разграничить внутривидовые группы (рис. 2).

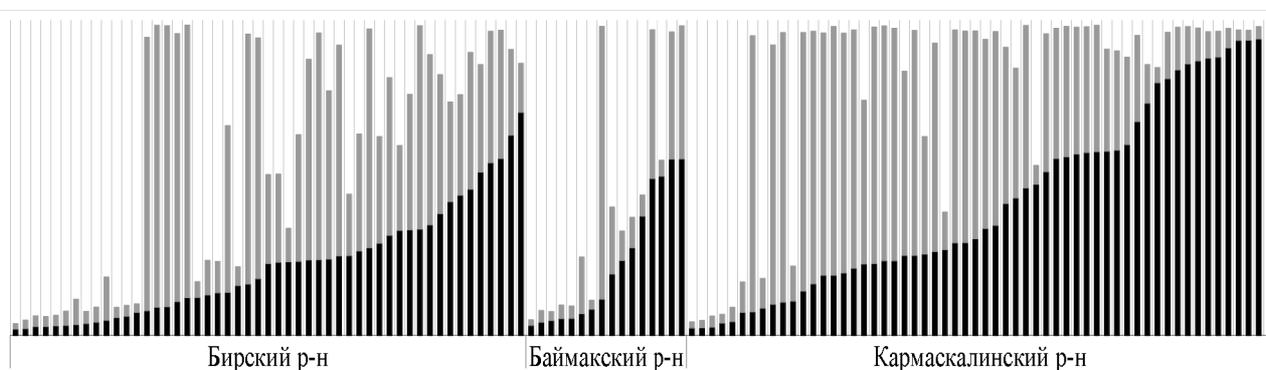


Рис. 2. Распределение трех генетических кластеров (черный, серый, белый цвета) в выборках *C. septempunctata* из трех районов.

Проведя такой же анализ в программе Flock&Trace (Duchesne, Turgeon, 2012), мы не выявили явной подразделенности выборок на кластеры. Таким образом, многомерный анализ генетических различий показал, что все исследованные особи относятся к одной полиморфной популяции.

### **3.3. Морфометрический анализ разнообразия и сходства внутрипопуляционных групп *H. rufipes***

Используя размерные признаки, мы определили, что самки *H. rufipes* больше самцов так же, как у *C. septempunctata*. Показатели изменчивости (коэффициент вариации и обобщенная дисперсия) самцов выше, чем у самок, особенно высока изменчивость молодых особей, которые встречаются преимущественно в картофельном биотопе. При многомерном анализе различий между особями *H. rufipes* разных поколений 2010-11 гг. выявлено наличие стабилизирующего отбора. В период размножения в картофельном агроценозе происходит увеличение изменчивости по комплексу признаков, которая затем снижается за счет миграций в близлежащие биотопы и смертности в период зимовки.

## **ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

Анализ фенотипической и генотипической изменчивости в исследуемых популяциях показал, что адаптация энтомофагов к жизни в агроценозах и питанию колорадским жуком носит не фрагментарный характер, а является частью их общего полиморфизма. В агроценозах формируются популяционные комплексы сложной структуры, которые поддерживаются за счёт различных популяционно-генетических процессов. Питание колорадским жуком приводит в ходе естественного отбора к закреплению комплекса неспецифических признаков широко распространенных, но локально редких адаптивных генотипов. В то же время в ходе этих процессов не меняется структура популяции, а меняется общая адаптивность внутрипопуляционных группировок. Снижение общей вариативности, фенотипического и генетического полиморфизма компенсируется другими популяционными процессами – прежде всего скрещиванием и миграциями. Популяции двух видов энтомофагов: *C. septempunctata* и *H. rufipes*, обладают одинаковым адаптивным потенциалом, и реакция на появление нового объекта

питания у обоих видов имеет адаптивный характер, но их внутривидовые процессы различаются. Отличия проявляются, прежде всего, из-за разницы в местах размножения и особенностей индивидуального развития. Вид *H. rufipes* в размножении тесно связан с картофельными агроценозами, а *C. septempunctata* – с естественными биотопами.

## ВЫВОДЫ

1. Установлен спектр возможных энтомофагов колорадского жука в Республике Башкортостан: 5 видов семейства Carabidae и 2 вида семейства Coccinellidae. Молекулярно-генетическими методами подтверждается питание колорадским жуком особей трех видов: *Coccinella septempunctata* L. (Coccinellidae), *Harpalus rufipes* DeG., и *Calosoma investigator* L. (Carabidae).

2. Структура населения жужелиц в агроценозах определяется несколькими эудоминантными видами, размножение которых происходит в агроценозах. У массовых энтомофагов регистрируется устойчивость к часто применяемым инсектицидам.

3. Оценка корреляции пространственного распределения энтомофагов и колорадского жука (на разных стадиях развития) показала значимое влияние *C. septempunctata* на численность, пространственное распределение и агрегированность яйцекладок и личинок колорадского жука.

4. В экспериментальных условиях выявлено наличие физиолого-биохимических адаптаций у особей *C. septempunctata* и *H. rufipes* к питанию колорадским жуком на преимагинальных стадиях.

5. Установлено наличие в популяции *C. septempunctata* генетических различий по признаку питания яйцами колорадского жука и снижение генетического и фенетического полиморфизма в группе, способной к этому типу питания вследствие естественного отбора.

6. Доказано существование во всех районах исследования единой полиморфной популяции *C. septempunctata*, в которой не завершены процессы коадаптации.

7. Формирование адаптации к питанию личинками колорадского жука в популяциях *H. rufipes* в картофельном агроценозе сопровождается действием на

структуру популяции стабилизирующего отбора, что подтверждено результатами анализа изменчивости.

## **ПУБЛИКАЦИИ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ**

### **Публикации в научных рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК**

1. Китаев К.А. Молекулярно-генетические методы анализа хищничества среди насекомых в агроценозах / Китаев К.А., Удалов М.Б., Беньковская Г.В. // Экологическая генетика. - 2011. - Т. VIII. - № 4. - С. 15-24.

2. Китаев К.А. Исследование формирования трофических отношений на примере колорадского жука и его хищников / Китаев К.А. // В мире научных открытий. - 2012. - №2.5 (26). - С. 309-318.

3. Марданшин И.С. Как замедлить процесс возникновения резистентности у колорадского жука к препарату регент / Марданшин И.С., Беньковская Г.В., Китаев К.А., Сурина Е.В., Леонтьева Т.Л., Удалов М.Б. // Защита и карантин растений. - 2012. - № 5. - С. 14-15.

4. Марданшин И.С., Сравнительная оценка эффективности различных инсектицидов в экспериментах по защите сортов картофеля от колорадского жука / Марданшин И.С., Беньковская Г.В., Сурина Е.В., Китаев К.А., Удалов М.Б. // Агрехимия. - 2012. - №9. - С. 58 – 63.

### **Публикации в иностранных журналах**

5. Kitaev K.A., Choosing predators for biocontrol of Colorado potato beetle in the South Ural / Kitaev K.A., Udalov M.B., Benkovskaya G.V. // Resistant Pest Management Newsletter. - 2011. - Vol. 21. - No. 1. - P 2–3.

6. Kitaev K.A. Genetic Modeling of the Fipronil Resistance's Increase in the Population of Colorado potato beetle / Kitaev K.A., Surina E.V., Benkovskaya G.V., Udalov M.B. // Resistant Pest Management Newsletter. - 2012. - Vol. 22. - No1. - P 29–32.

### **Публикации в сборниках и материалах конференций**

7. Kitaev K. Method for ecological monitoring based on research of ground beetle fauna (Coleoptera, Carabidae) / Kitaev K. // "IX European congress of Entomology" programme and book of abstracts. Budapest. - 2010. - P. 215.

8. Китаев К.А. Динамика сообщества жужелиц (Coleoptera, Carabidae) в пойменном биотопе левобережья р. Белой / Китаев К.А. // "Энтомологические исследования в Северной Азии" материалы VIII Межрегионального совещания энтомологов Сибири и Дальнего Востока, с участием зарубежных ученых. Новосибирск. - 2010. - С. 96-98.

9. Китаев К.А. Козволюционные модели в агроэкосистемах / Китаев К.А., Сурина Е.В., Беньковская Г.В. // "XXV Любищевские чтения - 2011" Современные проблемы эволюции. Сборник материалов международной конференции. Ульяновск. - 2011. - С. 138-141.

10. Китаев К.А. Исследование формирования трофических связей насекомых на примере колорадского жука и его хищников / Китаев К.А., Беньковская Г.В. // "Фундаментальные проблемы Энтомологии в XXI веке" материалы международной научной конференции. С-Пб. - 2011. - С. 63.

11. Китаев К.А. ПЦР – анализ трофических отношений в биомах / Китаев К.А., Удалов М.Б., Беньковская Г.В. // Биомика. - 2011. - Том 1. - №2. - С. 53-54.

12. Китаев К.А. Биомика как наука взаимодействия / Китаев К.А. // Биомика. - 2011. - Том 1. - №2. - С. 51-52.

13. Kitaev K.A. New approaches in investigation of insect predation in the case of invasive species / Kitaev K.A., Udalov M.B., Benkovskaya G.V. // Sixth International Symposium on Molecular Insect Science. Amsterdam, The Netherlands. - 2-5 October 2011. - P1.25.

14. Китаев К.А. Влияние инсектицидов на население жужелиц (Coleoptera: Carabidae) картофельных агроценозов республики Башкортостан / Китаев К.А. Беньковская Г.В. // Экология и природопользование: прикладные аспекты: материалы II Всероссийской (с международным участием) научно-практической конференции студентов, аспирантов и молодых ученых. Уфа. - 2012. - С. 107–109.

15. Китаев К.А. Популяционно-генетический анализ *Coccinella septempunctata* L. в картофельном агроценозе / Китаев К.А., Удалов М.Б., Беньковская Г.В. // "XXVI Любищевские чтения - 2012" Современные проблемы эволюции. Сборник материалов международной конференции. Ульяновск. - 2012. - С. 228–230.

16. Китаев К.А. Функция и форма, взаимодействие и коэволюция // "XXVI Любимцевские чтения - 2012" Современные проблемы эволюции. Сборник материалов международной конференции. Ульяновск. - 2012. - С. 113–118.
17. Китаев К.А. Особенности формирования разнообразия сообщества жуков (Carabidae) в агроценозах / Китаев К.А. Удалов М.Б. // Современные зоологические исследования в России и сопредельных странах: материалы II Международной научно-практической конференции. Чебоксары. - 2012. - С. 81-84.
18. Kitaev K. Population genetics of interactions *Leptinotarsa decemlineata* and *Coccinella septempunctata* / Kitaev K., Udalov M., Benkovskaya G. // Abstracts of XXIV International Congress of Entomology. Daegu, Korea. - Aug.19-25, 2012. - S1402TU04.
19. Kitaev K. Choosing predators for biocontrol of Colorado potato beetle in the South Ural / Kitaev K., Udalov M., Benkovskaya G. // Abstracts of XXIV International Congress of Entomology. Daegu, Korea. - Aug.19-25, 2012. - O407F12
20. Kitaev K. Genetic modeling of the fipronil resistance's increase in the population of Colorado potato beetle / Kitaev K., Surina E., Udalov M., Benkovskaya G. // Abstracts of XXIV International Congress of Entomology. Daegu, Korea. - Aug.19-25, 2012. - PS4TH005.
21. Китаев К.А., Оценка приспособленности имаго *Harpalus rufipes* De Geer (Coleoptera, Carabidae) к питанию личинками *Leptinotarsa decemlineata* Say (Coleoptera, Chrysomelidae). / Китаев К.А., Беньковская Г.В. // Материалы XIV съезда Русского энтомологического общества. С-Пб. - 2012. - С. 182.
22. Китаев К.А. Моделирование генетических процессов формирования резистентности к фипронилю в модельных популяциях *Leptinotarsa decemlineata* Say / Китаев К.А., Сурина Е.В., Удалов М.Б. // Материалы Всероссийской школы-конференции молодых учёных «Актуальные проблемы генетики человека, животных, растений и микроорганизмов». Уфа. - 2012. - С. 65 – 69.
23. Китаев К.А. Пространственное распределение *Leptinotarsa decemlineata* Say и *Coccinella septempunctata* L. / Китаев К.А., Пенкин Л.Н. // "XXVII Любимцевские чтения – 2013" Современные проблемы эволюции. Сборник материалов международной конференции. Ульяновск. - 2013. - С. 343–345.