

Identification of a point mutation associated with organophosphorus insecticide resistance in Colorado Potato Beetle, *Leptinotarsa decemlineata* populations from northwestern Iran

Maryam Malekmohammadi[✉]

Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Bu-Ali Sina University, Hamedan, Iran

Corresponding author[✉] m.malekmohammadi@basu.ac.ir**Abstract****Keywords**Acetylcholinesterase,
Insecticide resistance,
Leptinotarsa decemlineata,
PCR-RFLP, S291G
Substitution

The Colorado potato beetle (*Leptinotarsa decemlineata*) stands out as one of the most problematic agricultural pests worldwide, largely due to its extraordinary capacity to rapidly acquire resistance to diverse classes of insecticides. Although a wide array of genetic variations may arise in essential target-site genes such as acetylcholinesterase, only a limited number of these alterations play a direct role in conferring insecticide resistance. Monitoring the distribution and frequency of well-characterized mutations, including the S291G substitution, is therefore a critical element of resistance surveillance programs. The replacement of serine with glycine at position 291 of the acetylcholinesterase enzyme has been demonstrated to markedly diminish enzyme susceptibility to organophosphate compounds. Building on this knowledge, the present investigation evaluated the prevalence of the S291G mutation in *L. decemlineata* populations collected from Ardabil, Naqadeh, Bostanabad, and Zanjan using this mutation as a molecular proxy for assessing organophosphate resistance. Molecular analyses confirmed that individuals from the susceptible laboratory strain exclusively possessed the wild-type *ace* genotype. In contrast, examination of field populations revealed that 61.25% of sampled individuals carried the S291G mutation, with 23.75% exhibiting homozygosity for the resistant allele and 37.5% displaying heterozygous genotypes. Considerable geographic variation was observed, as mutation frequencies ranged from a maximum of 70% in the Ardabil population to a minimum of 55% in Bostanabad. The high prevalence and purity of the S291G mutation, along with potential cross-resistance to organophosphates and related insecticides, threaten the future efficacy of current pest control strategies, underscoring the need for diversified and integrated management approaches.

Received: 18 April 2026**Revised:** 15 June 2026**Accepted:** 29 June 2026**Available online:** 23
August 2026**Cite this article:**

Malekmohammadi M, 2026. Identification of a point mutation associated with organophosphorus insecticide resistance in Colorado Potato Beetle, *Leptinotarsa decemlineata* populations from northwestern Iran. *Appl Res Plant Prot* 15 (2): 123–134.

<https://dx.doi.org/10.22034/arpp.2026.22197>



Copyright© 2026 University of Tabriz, Published by the University of Tabriz.

This is an open access article under the CC BY NC license (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/2.0/>)

شناسایی جهش مرتبط با مقاومت به حشره‌کش‌های فسفره در جمعیت‌های سوسک برگ‌خوار *Leptinotarsa decemlineata* از نواحی شمال غربی ایران

مریم ملک‌محمدی✉

گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی سینا، همدان، ایران

نویسنده مسئول: m.malekmohamadi@basu.ac.ir✉

دریافت: ۱۴۰۵/۰۱/۲۹ بازنگری: ۱۴۰۵/۰۳/۲۵ پذیرش: ۱۴۰۵/۰۴/۰۸

چکیده

سوسک برگ‌خوار *Leptinotarsa decemlineata* یک ابر-آفت جهانی با توانایی مقاومت بالا و سریع به تمامی گروه‌های اصلی ترکیبات آفت‌کش است. پایش دائمی تغییرات ایجاد شده در فراوانی جهش‌های خاص همانند جهش S291G در جمعیت‌های آفت، ضرورتی اجتناب‌ناپذیر در مدیریت مؤثر مقاومت به آفت‌کش‌ها شناخته می‌شود. با توجه به نقش ثابت شده و تأثیرگذار جهش سرین به گلايسین (S291G) در کاهش حساسیت آنزیم استیل‌کولین‌استراز به آفت‌کش‌های ارگانوفسفره، در بررسی حاضر فراوانی جایگزینی سرین به گلايسین در جمعیت‌های مزرعه‌ای شهرستان‌های اردبیل، نقده، بستان آباد و زنجان به‌عنوان راه میان‌بر پایش ماهیت مقاومت به آفت‌کش‌های فسفره در جمعیت‌های *L. decemlineata* بررسی گردید. بر اساس نتایج این بررسی، تمامی افراد سویه حساس برای آلل حساسی ژن *ace* خالص گزارش شد. در مجموع چهار جمعیت، جهش S291G در ۶۱/۲۵ درصد از افراد ردیابی شد، ۲۳/۷۵ درصد حشرات بالغ برای جهش S291G در آلل مقاوم *ace* خالص و ۳۷/۵ درصد نیز ناخالص تشخیص داده شد. بیشترین و کمترین درصد فراوانی جهش، به‌ترتیب برای جمعیت‌های اردبیل (۷۰ درصد) و بستان‌آباد (۵۵ درصد) به ثبت رسید. نظر به درصد فراوانی و درصد خلوص جهش S291G در جمعیت‌ها و با در نظر گرفتن امکان مقاومت تقاطعی آفت‌کش‌های فسفره با دیگر گروه‌های آفت‌کش، در شرایط حاضر تکیه بر استفاده از این گروه از ترکیبات آفت‌کش و یا دیگر گروه‌های آفت‌کش با روش تأثیر مشابه، می‌تواند چالش برانگیز بوده و آینده کنترل این آفت در مناطق موردنظر را با مشکلات جدی مواجه سازد.

کلمات کلیدی: استیل‌کولین‌استراز، جهش S291G، مقاومت به آفت‌کش‌ها، *Leptinotarsa decemlineata*، PCR-RFLP

مقدمه

۶۰ سال تحقیق در خصوص نحوه تکامل مقاومت در جمعیت‌ها، هنوز اهمیت نسبی سازوکارهای تکامل مقاومت به آفت‌کش‌ها روشن نشده است (Ffrench-Constant & Bass 2017; Pelissie et al. 2018). در زمینه فهم کنترل مولکولی اولیه مقاومت، پژوهش‌های متعددی انجام شده است، اما هنوز پرسش‌های متعددی درخصوص پیچیدگی‌های ژنتیکی مقاومت، نحوه گزینش و وسعت جغرافیایی سازگاری‌ها مطرح است (Daborn et al. 2002; Labbe et al. 2007; Kamdem et al. 2017). موفقیت مدل‌های ژنتیک جمعیت مدیریت مقاومت، در برخی از سناریوهای مدیریتی، گزارش شده است (Tabashnik et al. 2013)، در عین حال، الگوهای مشاهده شده تکامل مقاومت به حشره‌کش‌ها در عمل، بسیاری از فرضیات اولیه مدل‌های تکاملی را به چالش کشیده است. برطبق نظریه‌ی فرنچ-کانستنت و همکاران (Ffrench-Constant et al. 1998)، از بین مجموعه‌ای از جهش‌های نقطه‌ای که ممکن است در ژن‌های کلیدی همچون ژن استیل‌کولین‌استراز رخ دهند، تنها تعداد محدودی از آن‌ها با مقاومت جمعیت‌های آفت به آفت‌کش‌ها مرتبط هستند، از

آفات گیاه‌خوار هر ساله حدود ۲۰-۱۸ درصد محصولات را از بین برده و خسارتی نزدیک به ۴۷۰ بلیون دلار در مقیاس جهانی را رقم می‌زنند (Sharma et al. 2017). توانایی حشرات آفت در مقاومت به ترکیبات آفت‌کش برهم زنده امنیت غذایی بوده و تهدیدی جدی برای کشاورزی پایدار، به‌ویژه در مقاومت به استراتژی‌های جدید کنترلی به شمار می‌آید. گونه‌های ابر-آفت مدام در حال مقاوم شدن به ترکیبات حشره‌کش، حتی ترکیبات جدیدی هستند که هیچ سابقه مواجه با آن‌ها را نداشته‌اند، نتیجه چنین شرایطی مسابقه مسلحانه‌ای است که تردمیل آفت‌کش‌ها نامیده می‌شود (McCaffery & Nauen 2006). فنوتیپ‌های مقاوم گونه‌های ابر-آفت، قادرند به سرعت به نوسان و تغییر ماهیت فشار تحمیلی آفت‌کش‌ها بر جمعیت، واکنش نشان داده و بر آن فائق آیند، فرایندی که امکان آن برای همه گونه‌ها فراهم نیست. تمایل گونه‌های ابر-آفت و برخی از جمعیت‌های خاص به سازگاری با ترکیبات آفت‌کش جدید، نقش ژنتیک گونه‌ها در ظهور و گسترش بعدی آن را به اثبات می‌رساند. به‌رغم بیش از

همین‌رو، پایش دائمی تغییرات ایجاد شده در فراوانی جهش‌های خاص همانند جهش S291G در جمعیت‌های آفت، ضرورتی اجتناب‌ناپذیر در مدیریت مؤثر مقاومت به آفت‌کش‌ها به شمار می‌رود. پیش‌آگاهی مقاومت و مدیریت مؤثر آن، منوط به انجام ارزیابی‌های مولکولی زودبازده و کارآمدی همچون واکنش زنجیره‌ای پلیمراز- چندشکلی طول قطعه محدود شونده (PCR-RFLP, Polymerase Chain Reaction-Restriction) (Fragment Length Polymorphism) است، از روش PCR-RFLP به‌عنوان یک روش مقطع‌گیری ژنومی (Genome) (profiling method)، برای اولین بار در اواسط دهه ۱۹۸۰ میلادی جهت ردیابی تفاوت‌های ژنتیکی در جمعیت‌ها استفاده شد (Khudyakov & Fields 2003). در صورت واقع شدن یک جهش مقاومتی در داخل یک جایگاه برش (Restriction site) می‌توان به کمک برش قطعه‌ای تکثیر شده با استفاده از اندونوکلاز هضمی (Restriction endonuclease) مناسب و سپس تجزیه‌ی پروفیل اندازه قطعات هضم شده بر روی ژل آگارز، جهش مذکور را شناسایی نمود. به این ترتیب ژنوتیپ یک فرد برای RFLP می‌تواند به‌صورت هموزیگوت -/- در صورتی که دو مولکول DNA همولوگ حامل جایگاه اختیاری نباشند و یا هتروزیگوت +/- در صورت وجود جایگاه بر روی یکی و عدم وجود آن بر روی دیگری، تعیین گردد. مزیت آشکار PCR-RFLP سرعت و حساسیت بالای آن است، کل مراحل آزمایش را می‌توان در عرض ۲۴ ساعت و فقط با مقدار اندکی DNA کروموزومی (۱۰ ng) انجام داد (Serre 2006). ردیابی جهش‌ها در جمعیت‌های هدف و تشخیص هم‌زمان ژنوتیپ‌های خالص و ناخالص حساس و مقاوم به کمک چندشکلی طول قطعه‌ی محدود شونده امکان‌پذیر است. استفاده از افراد مقاوم با ژنوتیپ معلوم در بررسی‌هایی از این دست، نشان داده است که روش تشخیصی PCR-RFLP، به خوبی می‌تواند تنوع آلی جمعیت‌های مورد بررسی را آشکار سازد.

نقش آنزیم استیل‌کولین‌استراز تغییر یافته، به‌عنوان سازوکار اصلی مقاومت به ترکیب فسفره آزینفوس متیل تایید شده است (Argentine et al. 1989). بررسی‌های تکمیلی (Zhu & Clark 1994, 1995) نشان داد که تغییر ایجاد شده هم زیر جایگاه استراتیکی (Estratic subsite) و هم جایگاه آنیونی محیطی (Peripheral anionic site) آنزیم را تحت تأثیر قرار داده است. ژو و کلارک (Zhu & Clark 1995b) به کمک همسانه‌سازی و توالی‌یابی موفقیت‌آمیز cDNA از یک سویه‌ی ایزوژنیک نزدیک سوسک برگ‌خوار سیب‌زمینی، توانستند جهش عامل مقاومت

(Ser/Gly)، را شناسایی کنند. جهش سرین به گلايسین در تمامی افراد سویه‌ی مقاوم به آزینفوس متیل دارای شکل مقاوم آنزیمی مشاهده شد، حال آن‌که در هیچ یک از افراد سویه‌ی حساس چنین جایگزینی شناسایی نگردید. بررسی‌های تکمیلی نقش جهش مذکور در ایجاد مقاومت به حشره‌کش‌های فسفره را تایید نمود (Kim et al. 2006, 2007). در ژن آنزیم استیل‌کولین‌استراز که *ace* نامیده می‌شود، چندین جهش در گونه‌های مختلف حشرات گزارش شده است که تقریباً در تمامی این موارد، جهش‌های ایجاد شده ریشه‌های آمینواسیدی واقع در شکاف جایگاه فعال آنزیم را تحت تأثیر قرار می‌دهند (Mutero et al. 1994). تمامی این جهش‌ها، به کمک ایجاد ممانعت فضایی در ریشه‌های جایگاه فعال، از ورود حشره‌کش‌ها به داخل جایگاه فعال و پیوند آن‌ها با ریشه‌های آمینواسیدی جایگاه ممانعت به عمل آورده و در عین حال کارایی (راندمان) فسفریله شدن آنزیمی را نیز تحت تأثیر قرار می‌دهند. تنها گزارش مستند از یک جهش مرتبط با مقاومت در خارج از ناحیه‌ی کاتالیتیک آنزیم، جهش S291G از گونه *L. decemlineata* بوده است (Zhu et al. 1996). در این مورد خاص، عقیده بر این است که مقاومت با تغییر کلی‌تر ساختمان ثانوی آنزیم مرتبط بوده است.

سوسک کلرادوی برگ‌خوار سیب‌زمینی، یک ابر- آفت (super-pest) جهانی با توانایی مقاومت بالا و سریع به ترکیبات آفت‌کش است، تاکنون مقاومت این ابر- آفت به بیش از ۵۰ حشره‌کش مختلف از تمامی گروه‌های اصلی ترکیبات آفت‌کش تایید شده است، در برخی موارد ظهور مقاومت در همان اولین سال مصرف ترکیبات حشره‌کش اتفاق افتاده است (Alyokhin et al. 2008). این آفت، در ابتدا جزء آفات قرنطینه‌ای کشور بود و اولین بار کاظمی در بهار ۱۳۶۳، در منطقه اردبیل به آن برخورد نمود. به رغم اهمیت این آفت در ایران، متأسفانه بررسی‌ها در خصوص مقاومت این گونه ابر- آفت به ترکیبات آفت‌کش محدود بوده است. کشندگی مطلوب حشره‌کش‌های ایندوکساکارب و متوکسی‌فنوزاید به روش غوطه‌وری برگ روی سوسک کلرادوی سیب‌زمینی، در شرایط آزمایشگاهی تایید شده است (Karimzadeh & Hejazi 2015). در تحقیقی مشابه (Mohammadi et al. 2007)، با هدف بررسی امکان مقاومت *L. decemlineata* به حشره‌کش اندوسولفان در مزارع سیب‌زمینی استان‌های آذربایجان شرقی و اردبیل، سویه‌ی مقاومی از مزارع بستان‌آباد، واقع در استان آذربایجان شرقی با نرخ مقاومت ۲۲۰ و ۱۰۹ به‌ترتیب در سال‌های ۲۰۰۳ و ۲۰۰۴ شناسایی گردید. با توجه به پایین بودن نرخ سینرژیسم، مشخص شد که متابولیسم



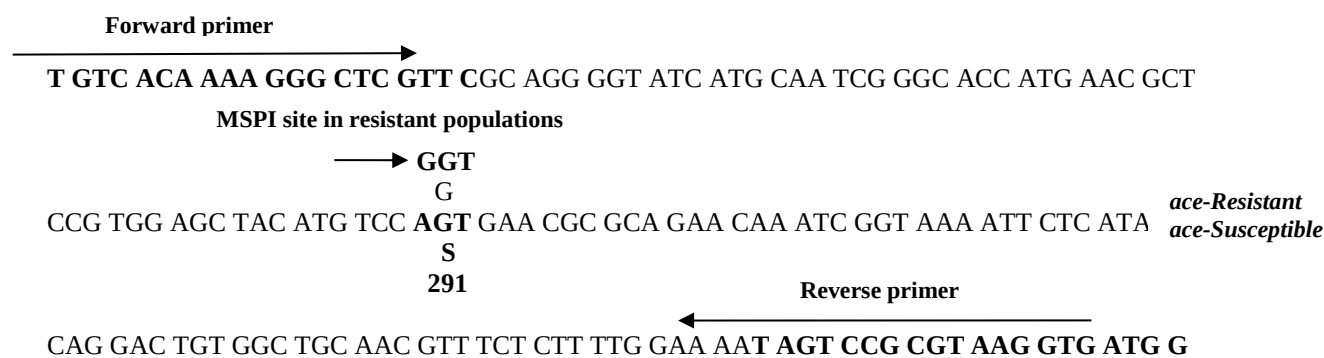
جدول ۱. مشخصات آغازگرهای مورد استفاده جهت تکثیر قطعه‌ی در بر گیرنده جایگاه برش و توالی‌یابی.

Table 1. Primers used in PCR amplification and DNA sequencing experiments.

Primers	Sequences (5'-3')	Product size (bp)	Codons
Ldace forward primer	TGTCACAAAAGGGCTCGTTC	164	267-320
Ldace reverse primer	CCATCACCTTACGCGGACTA		

داده شده بر روی ژل اکریل آمید ۱۲ درصد در بافر الکتروفورز TBE یک درصد، جدا شده و رنگ آمیزی به روش نیترا ت نقره انجام شد. در پایان، تحلیل نهایی از وضعیت نمونه‌های برش خورده بر اساس شرایط باندها صورت پذیرفت. به رغم رعایت حداقل ۳ تکرار برای تمامی نمونه‌های مورد بررسی به روش RFLP، جهت اطمینان بیشتر و نیز تأیید نهایی، توالی‌یابی دست کم نیمی از مواردی که وجود جهش در آن‌ها با استفاده از روش RFLP، تأیید شده بود، صورت پذیرفت. ترجمه کروماتوگرام به دست آمده از دستگاه توالی‌یاب با استفاده از نرم‌افزار Chromas انجام گرفت. توالی‌های DNA ژنومی به دست آمده با توالی مرجع از ژن کدکننده‌ی استیل‌کولین‌استراز سویه حساس (شماره دسترسی بانک ژن L41180.1) از بانک اطلاعاتی NCBI مقایسه گردیده و موارد تفاوت و شباهت برای هر نمونه به دست آمد. تجزیه و تحلیل توالی‌ها به کمک نرم‌افزار BioEdit (BioEdit software, version 5.0) انجام شد.

برش قطعه‌ی تکثیر شده با استفاده از آنزیم MSPI، مؤید حضور هموزیگوتی و یا هتروزیگوتی آلل مقاوم و یا عدم حضور آن (افراد هموزیگوت برای توالی حساس) می‌باشد. در افراد مقاوم جمعیت‌های مزرعه‌ای، قطعه‌ی ۱۶۴ bp به دو قطعه‌ی ۷۲ bp و ۹۲ bp در اثر عمل آنزیم MSPI برش می‌خورد. با توجه به تعداد نمونه‌های در نظر گرفته شده برای انجام PCR، حجم مورد نیاز از dNTP، بافر (10X Taq Buffer)، کلرید منیزیم (۰/۰۵ mM)، آغازگر مستقیم (۱ μM/p)، آغازگر معکوس (۱ μM/p)، ژنوم، آنزیم (Taq DNA polymerase) و در صورت نیاز دی‌متیل‌سولفوکساید (Dimethyl sulfoxide, DMSO) (۷-۱۵ درصد) انتخاب شده و با هم مخلوط گردید. در ادامه، پنج میکرولیتر از محصول PCR، با یک میکرولیتر آنزیم محدودکننده در بافر واکنش ۱X به مدت یک شبانه روز، در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد برش داده شد. پس از اتمام این مرحله و جهت غیرفعال‌سازی آنزیم، ۲۰ دقیقه استراحت، در دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد در نظر گرفته شد. در مرحله پایانی، محصولات برش



شکل ۱. موقعیت آغازگرها و جهش ایجادکننده‌ی جایگاه برش برای آنزیم محدودکننده MSPI در توالی ژن استیل‌کولین‌استراز سوسک کلرادو.

Figure 1. Positions of the primers locations and restriction enzyme MspI site in the sequence of *Leptinotarsa decemlineata* AChE gene.

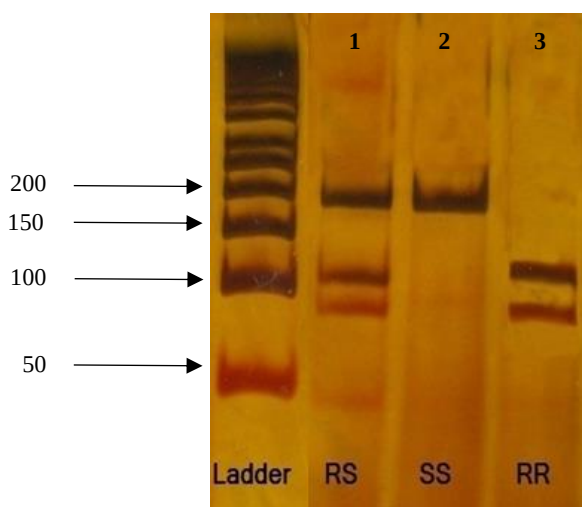
ردیابی و اندازه‌گیری کمی و کیفی آلل‌های مقاومت در داخل جمعیت‌ها حائز اهمیت بسیاری است. مدیریت مؤثر مقاومت و ردیابی آن در داخل جمعیت‌های آفت مستلزم وجود روش‌های تشخیصی کارآمدی است که به کمک آن امکان ردیابی ژنوتیپ‌های حساس (SS)، مقاوم (RR) و هتروزیگوت (RS) در بین افراد جمعیت امکان‌پذیر باشد. تأیید مقاومت جمعیت‌های آفت، تعیین نرخ مقاومت و درک سازوکارهای پدیدآورنده آن

نتایج و بحث

بازبینی داده‌های ژنومی در بندپایان خسارت‌زا، پیچیدگی‌های جغرافیایی و ژنتیکی مقاومت را آشکار می‌سازد (Cheng et al. 2017; Anderson et al. 2018; Lucas et al. 2019; Calla et al. 2020). جمعیت‌های آفت می‌توانند به سرعت از وضعیت حساس به مقاوم تغییر ماهیت دهند، از این‌رو، نقش روش‌های تشخیصی ارزان قیمت، قابل‌اعتماد و کارآمد جهت

RFLP، جهت بررسی ارتباط ژنتیکی بین مقاومت به اثر ضربه‌ای و توالی‌های پارا- ارتولوگ کانال سدیمی در چندین گونه از حشرات استفاده شده است (Taylor et al. 1993; Williamson et al. 1993; Dong & Scott 1994; Lee et al. 1999). Hawkes et al. (2005) نیز جهت شناسایی جهش‌های نقطه‌ای مرتبط با مقاومت مگس میوه زیتون (*Bactrocera oleae* (Rossi) به حشره‌کش‌های فسفره‌ی آلی از همین روش استفاده نمودند. بر اساس نتایج تحقیق پیش‌رو (جدول ۲)، تمامی افراد سویه حساس برای آلل حساس ژن *ace*، خالص گزارش شد. در مجموع چهار جمعیت، جهش S291G در ۶۱/۲۵ درصد از افراد ردیابی شد، ۲۳/۷۵ درصد حشرات بالغ برای جهش S291G در آلل مقاوم *ace*، خالص و ۳۷/۵ درصد نیز ناخالص تشخیص داده شد. بالاترین درصد فراوانی جهش برای جمعیت اردبیل و کمترین درصد فراوانی نیز برای جمعیت بستان‌آباد به ثبت رسید. به استثنای دو مورد، نتایج حاصل از توالی‌یابی، نتایج به‌دست آمده از RFLP را تأیید نمود. در مجموع، فراوانی جهش S291G در جمعیت‌های مزرعه‌ای، از ۵۵ تا ۷۰ درصد متغیر برآورد شد.

منوط به انجام زیست‌سنجی‌های دقیق و استاندارد است، در عین حال به کمک ابزارهای تشخیصی بیوشیمیایی و مولکولی می‌توان ارزیابی‌های بسیار دقیقی از فراوانی ژن‌های مقاومت در داخل جمعیت‌ها به‌دست آورد (Byrne et al. 2003). چنانچه دو مولکول DNA مشابه (Homolog)، از نظر وجود و یا عدم‌وجود یک جایگاه محدودشونده در یک موقعیت خاص از توالی، با یکدیگر تفاوت داشته باشند، برش این دو مولکول توسط آنزیم محدودکننده دو نتیجه متفاوت را به دنبال خواهد داشت، در صورت وجود جایگاه، دو قطعه‌ی کوچک و در صورت عدم وجود جایگاه، یک قطعه‌ی بزرگ به‌وجود خواهد آمد، به این حالت چندشکلی طول قطعه‌ی محدودشونده (RFLP) گفته می‌شود. بر همین اساس، در افراد مقاوم جمعیت‌های مزرعه‌ای در بررسی حاضر، قطعه‌ی ۱۶۴ bp به دو قطعه‌ی ۷۲ bp و ۹۲ bp در اثر عمل آنزیم MSPI برش خورد (شکل ۲). از آنجایی که این نوع چندشکلی، شبیه یک نشانگر دو آللی (Di-allelic marker) رفتار می‌کند ('+' وجود جایگاه و '-' عدم وجود جایگاه)، بنابراین همان‌گونه که انتظار می‌رفت ژنوتیپ‌های سه گانه RS، RR و SS در جمعیت‌ها شناسایی شد. تاکنون از روش دو مرحله‌ای PCR-



شکل ۲. شناسایی جهش S291G در جمعیت‌های مزرعه‌ای سوسک کلرادوی سیب‌زمینی با استفاده از روش PCR-RFLP. سمت راست نشانگر اندازه ۵۰ (مضریب از قطعات ۵۰ bp)، خطوط ۱-۳ شامل محصولات حاصل از برش آنزیمی MSPI حشرات بالغ اعم از خالص برای آلل حساس (SS): خط ۲، خالص برای آلل مقاوم S291G (خط ۳) و یا ناخالص (RS: خط ۱). (خط ۳ دارای دو نوار به طول‌های ۷۲ و ۹۲، خط ۲ دارای تک باند ۱۶۴ bp).

Figure 2. PCR-RFLP analysis to identify the presence of the S291G point mutation in field population of Colorado Potato Beetle. Lanes 1–3 represent the products generated from enzymatic digestion of MSPI in adults of *Leptinotarsa decemlineata*: heterozygous individuals (RS: lane 1), homozygous susceptible (SS: lane 2), and homozygous resistant carrying the S291G mutation (RR: lane 3). Lane 3 shows distinct fragments of 72 bp and 92 bp long, whereas line 2 exhibits a single fragment of 164 bp long. The right-hand side indicates a 50 bp DNA ladder as a molecular size marker.

جدول ۲. فراوانی آلل مقاومت، S291G در جمعیت‌های مزرعه‌ای *Leptinotarsa decemlineata* با استفاده از روش PCR-RFLP.

Table 2. Frequency of resistance allele, S291G, in field populations of *Leptinotarsa decemlineata* by PCR-RFLP method.

Population/ Strain	Sample size	%S291G allelic frequencies (heterozygote/homozygote)
Susceptible	15	-
Bostan-Abad	20	55 (7/4)
Ardebil	20	70 (8/6)
Naghadeh	20	60 (9/3)
Zanjan	20	60 (6/6)

نسبت به آفت‌کش‌ها، بدون هیچ نوع پیشینه مصرفی از آفت‌کش موردنظر یا آفت‌کش‌های هم‌گروه، نشان می‌دهد آلل‌های مقاومت به آفت‌کش‌ها، می‌توانند بدون تحمیل هیچ نوع هزینه شایستگی، از پیش و به تعداد کافی در جمعیت‌ها وجود داشته باشند (Hartley et al. 2006)، مقاومت سوسک کلرادو به ایمیداکلوپرید تابع چنین شرایطی است (Duchesne & Parent 1991). (۳) نکته مهم دیگر آن‌که، به رغم گسترش سریع مکانی آفت در مناطق آلوده، جمعیت‌های این گونه به لحاظ ژنتیکی، متمایز از یکدیگر بوده (Grapputo et al. 2005; Izzo et al. 2018) و مقاومت این گونه‌ی ابر- آفت به آفت‌کش‌ها نیز از نظر جغرافیایی ناهمگن می‌باشد (Szendrei et al. 2012; Crossley et al. 2018; Dively et al. 2020)، حتی در مقیاس محلی (Crossley et al. 2017). به‌طور مثال، سوسک‌های کلرادوی منطقه لانگ‌آیلند (نیویورک)، به داشتن بالاترین سطح مقاومتی پایه به آفت‌کش‌ها معروف هستند و به‌طور معمول، اولین جمعیتی هستند که نسبت به گروه‌های مختلف ترکیبات آفت‌کش مقاومت نشان می‌دهند (Hitchner et al. 2012; Dively et al. 2020)، درحالی‌که جمعیت‌های شمال غربی اقیانوس آرام، به رغم طول دوره مواجهه مساوی و روش‌های کنترلی قابل مقایسه با جمعیت لانگ‌آیلند، همچنان حساسیت خود نسبت به آفت‌کش‌ها را در طول زمان حفظ نموده‌اند (Rondon 2012; Dively et al. 2020). جمعیت‌های غیرآفت این گونه، بومی گریت پلینز (Great Plains) و مکزیک هستند، جایی که از گیاهان میزبان اجدادی خود، عمدتاً *Solanum rostrum* Dunal تغذیه می‌کنند (Hsiao 1978). گونه‌های نزدیک به هم از جنس *Leptinotarsa* بخش‌های جنوبی محدوده جغرافیایی گسترش این آفت به‌صورت همزیست فعالیت دارند (Hsiao 1988). مشخص نیست که آیا جمعیت‌ها یا گونه‌های مختلف دیگر در تنوع موجود در جمعیت‌های سوسک کلرادو دخالت دارند یا خیر (Izzo et al. 2018)، (۴) در عین حال گزارش‌هایی نیز وجود دارد که بر اساس آن‌ها ظهور و گسترش مقاومت در بین جمعیت‌های سوسک کلرادو بیشتر از آن‌که نتیجه پیدایش مقاومت در یک منطقه و

مدیریت مؤثر مقاومت جمعیت‌های آفت به ترکیبات آفت‌کش، مستلزم درک فرایندهای تکاملی دخیل در تبدیل وضعیت گونه‌ها به آفات اقتصادی و شناخت سازوکارهای پدیدآورنده تغییرات فنوتیپی و ژنوتیپی زمینه‌ساز آن می‌باشد (Fritz et al. 2018; Pelissie et al. 2018). بندپایان خسارت‌زا در مواجهه با فشار تحمیلی گروه‌های آفت‌کش از دو سازوکار (۱) ایجاد تغییر در ژن‌های تنظیمی حیاتی و (۲) پیدایش جهش‌های نوظهور بهره می‌گیرند (Whitehead et al. 2017). جهش‌های ایجاد شده در ژن‌های تنظیمی حیاتی (سازوکار اول)، با هدف قرار دادن مسیرهای مولکولی پایین‌دستی، فرایندهای تکاملی موفق‌تری را در جمعیت‌ها رقم می‌زنند، این گروه از جهش‌ها، محدود به گونه خاصی نبوده و در گونه‌های مختلف با عملکردی یکسان تکرار می‌شوند (Lopez-Maury et al. 2008; Roelofs et al. 2010; Reid et al. 2016). در صورت بزرگی جمعیت گونه (بزرگ‌تر از 10^6)، جهش‌های نوظهور (سازوکار دوم) می‌توانند در پاسخ به فشار تحمیلی گروه‌های آفت‌کش، به دفعات در جمعیت‌ها تکرار شوند (Barton 2010; Cutter et al. 2013). نتیجه چنین شرایطی، ظهور جهش‌های مستقل در جایگاه‌های ژنی حیاتی و تکامل پویا و هوشمند مقاومت در جمعیت‌ها خواهد بود (Rinkevich et al. 2012)، ظهور جهش S291G در ژن حیاتی استیل‌کولین‌استراز در جمعیت‌های مقاوم به آفت‌کش‌های فسفره از جمله همین موارد است. در مورد برخی از گونه‌های ابر- آفت، به‌طور مشخص سوسک کلرادو، شرایط به مراتب پیچیده‌تر نیز می‌باشد که در ادامه به آن اشاره می‌گردد، (۱) برخی مسیرهای مولکولی اختصاصی همانند مسیرهای مولکولی دخیل در رفتار تخصصی گونه‌های آفت در تغذیه از گیاهان سمی، در تقویت تنوع ژنتیکی و تکامل مقاومت به آفت‌کش‌ها مؤثر است (Hardy et al. 2018; Rane et al. 2019; Laruson et al. 2020). تغذیه سوسک کلرادو از گیاه تنباکو *Nicotiana tabacum* L. از جمله همین موارد است، ماده فعال شیره تنباکو، آلکالوئیدی سمی برای حشرات، به نام نیکوتین است (Duchesne & Parent 1991). (۲) وجود گزارش‌های تایید شده از سطوح بالای مقاومت

پیش‌بینی پیامدهای عملی چنین تفاوت‌هایی با در نظر گرفتن طیف متغیرهای مؤثر در پیدایش مقاومت و بزرگی آن، نمی‌توان پیش‌بینی و تفسیر احتمالی دقیقی را ارائه نمود. داده‌های این تحقیق تنها بخشی از پازل مقاومتی در جمعیت‌های مزرعه‌ای سوسک کلرادو در شهرستان‌های بستان‌آباد، اردبیل، نقده و زنجان را تکمیل می‌کند. نظر به درصد فراوانی و درصد خلوص جهش S291G در جمعیت‌ها و با در نظر گرفتن امکان مقاومت تقاطعی آفت‌کش‌های فسفره با دیگر گروه‌های آفت‌کش، در شرایط حاضر تکیه بر استفاده از این گروه از ترکیبات آفت‌کش و یا دیگر گروه‌های آفت‌کش با روش تأثیر مشابه می‌تواند چالش برانگیز بوده و آینده کنترل این آفت در مناطق موردنظر را با مشکلات جدی مواجه سازد.

مقاومت به آفت‌کش‌ها، جدی‌ترین تهدید برای موفقیت درازمدت این ترکیبات در کنترل آفات به شمار می‌رود، بنابراین حتی در مواردی که هیچ‌گونه گزارشی درمورد مقاومت برخی گونه‌های خاص به حشره‌کش‌ها وجود ندارد، بررسی جمعیت‌هایی که تحت فشار انتخابی این دسته از ترکیبات قرار دارند، ضروری به‌نظر می‌رسد (Byrne et al. 2003). نقش سازوکارهای ژنتیکی در موفقیت فرایندهای تکاملی مرتبط با فشار مواجهه با ترکیبات آفت‌کش در گونه‌های ابر-آفت به درستی روشن نیست، در عین حال آگاهی از اطلاعات ژنتیکی جمعیت‌ها در شناسایی و تعیین اهمیت سازوکارهای پدیدآورنده تغییرات تکاملی سریع در جمعیت‌ها و پیامدهای اختصاصی تغییرات تحمیلی بر جمعیت، ضروری به نظر می‌رسد (Pelissie et al. 2018). باید تأکید کرد که این سازوکارهای سازگاری، لزوماً انحصاری نیستند، با این وجود همچنان روشن نیست که هر یک چگونه به موفقیت تکاملی بندپایان ابرآفات کمک می‌کنند. مجموعه داده‌های ژنومی نوظهور این فرصت را فراهم می‌کنند تا با جست‌وجوی نشانگان ژنومی فرایندهای انتخابی در جمعیت‌ها، اهمیت سازوکارهای مختلف زیربنای تغییرات تکاملی سریع شناسایی و کمی‌سازی شود. ردیابی جهش‌های کلیدی شناخته شده در جمعیت‌های آفت، نقطه شروع چنین بررسی‌هایی خواهد بود.

سپاسگزاری

از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه بوعلی‌سینا، به جهت حمایت مالی بررسی حاضر، تشکر و قدردانی می‌گردد.

سپس گسترش جغرافیایی آن به سایر نقاط باشد، حاصل فشار انتخابی ناشی از مصرف حشره‌کش‌ها در همان منطقه خاص می‌باشد (Bishop & Grafius 1996). گونه‌های پرجمعیت به پشتوانه تنوع بالای ژنتیکی خود، از تنوع و سرعت بالایی در سازگاری با استرس‌های محیطی، همانند مواجهه با ترکیبات آفت‌کش برخوردار بوده و در این راه از طیف متنوعی از راه‌کارها بهره می‌برند (De Carvalho et al. 2010; Correa et al. 2019). در یک جمع‌بندی با در نظر گرفتن مجموعه‌ی تفاوت‌ها، سوسک کلرادو، مدل مناسبی برای شناخت سازوکارهای پدید آورنده تکامل سریع و آسان به آفت‌کش‌ها به شناخته می‌شود. به رغم اهمیت تاریخچه جمعیتی، تنوع ژنتیکی و رژیم مصرف آفت‌کش‌ها علیه گونه‌های آفت، متأسفانه شناسنامه دقیقی از سابقه مصرف ترکیبات آفت‌کش در شهرستان‌های بستان‌آباد، اردبیل، نقده و زنجان در دست نیست، مطالعه خاصی نیز درخصوص الگوی مقاومت تقاطعی در این جمعیت‌ها صورت نگرفته است. شرایط زمانی پیچیده‌تر می‌شود که به خاطر داشته باشیم برخی تغییرات ژنتیکی غیر از جایگزینی‌های آمینواسیدی همچون کپی‌برداری از ژن و تغییر در بیان ژن نیز وجود دارند که می‌توانند با ظهور مقاومت به آفت‌کش‌ها و گسترش بعدی آن‌ها در جمعیت‌ها مؤثر باشند، در برخی از گونه‌های حشرات نظیر *Nephotettix cincticeps* (Uhler) (Tomita et al. 2000)، *Helicoverpa armigera* (Hubner) (Ren & Han 2002)، *Bemisia tabaci* (Gennadius) و *Trialeurodes vaporariorum* (Westwood) (Javed et al. 2003) و *Cuprina* (Wedmann) (Newcomb et al. 1997)، بین ژن‌های کدکننده اشکال حساس و غیرحساس آنزیمی استیل‌کولین‌استراز به‌عنوان جایگاه هدف آفت‌کش‌های فسفره و کاربامات، هیچ‌گونه جهش مقاومتی گزارش نشده است، بررسی‌های تکمیلی تغییر در پیرایش پس از ترجمه‌ای (an alteration in the post translation modification of the enzyme) (Mutero et al. 1994) و یا وجود ژن استیل‌کولین‌استراز دیگری، غیر از ژن استیل‌کولین‌استراز کلون شده، را دلیل مقاومت به آفت‌کش‌ها معرفی نمود. گزارش گونه‌هایی که نرخ‌های بالای مقاومت در آن‌ها با تغییر در ژن جایگاه هدف و جایگزینی‌های آمینواسیدی همراه نبوده است، نشان می‌دهد که علاوه بر جهش‌های نقطه‌ای، عوامل دیگری نیز در کاهش حساسیت جایگاه‌های هدف ترکیبات آفت‌کش به آفت‌کش‌ها دخالت دارند. از همین‌رو، در خصوص تفاوت در فراوانی جهش S291G در جمعیت‌ها و

References

- Alyokhin A, Baker M, Mota-Sanchez D, Dively G, Grafius E, 2008. Colorado potato beetle resistance to insecticides. *American Journal of Potato Research* 85: 395–413.
- Anderson CJ, Oakeshott JG, Tay WT, Gordon KHJ, Zwick A, *et al.*, 2018. Hybridization and gene flow in the mega-pest lineage of moth, *Helicoverpa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 115: 5034–5039.
- Argentine JA, Clark JM, Ferro DN, 1989. Relative fitness of insecticide-resistant Colorado potato beetle strains (Coleoptera, Chrysomelidae). *Environmental Entomology* 18: 705–710.
- Barton N, 2010. Understanding adaptation in large populations. *PLoS Genetics* 6: e1000987.
- Bishop BA, Grafius EJ, 1996. Insecticide resistance in the Colorado potato beetle. pp 355–377. In Jolivet PHA, Cox ML, [eds.], Chrysomelidae biology, vol. 1: the classification, phylogeny and genetics. SPB Academic Publishing, Amsterdam, The Netherlands.
- Byrne FJ, Mello K, Toscano NC, 2003. Biochemical monitoring of cetylcholinesterase sensitivity to organophosphorous insecticides in Glassy-Winged Sharpshooter *Homalodisca coagulata* Say (Homoptera: Cicadellidae) and smoke tree sharpshooter *H. lacert* Fowler. *Journal of Economic Entomology* 96: 1849–185.
- Calla B, Demkovich M, Siegel JP, Viana JPG, Walden KKO, Robertson HM, Berenbaum MR, 2020. Selective sweeps in a nutshell: the genomic footprint of rapid insecticide resistance evolution in the almond agroecosystem. *Genome Biology & Evolution* 13: evaa234.
- Cheng T, Wu J, Wu Y, Chilukuri RV, Huang L, *et al.*, 2017. Genomic adaptation to polyphagy and insecticides in a major East Asian noctuid pest. *Nature Ecology & Evolution* 1: 1747–1756.
- Correa AS, Cordeiro EM, Omoto C, 2019. Agricultural insect hybridization and implications for pest management. *Pest Management Science* 75: 2857–2864.
- Crossley MS, Chen YH, Groves RL, Schoville SD, 2017. Landscape genomics of Colorado potato beetle provides evidence of polygenic adaptation to insecticides. *Molecular Ecology* 26: 6284–6300.
- Crossley MS, Rondon SI, Schoville SD, 2018. A comparison of resistance to imidacloprid in Colorado potato beetle (*Leptinotarsa decemlineata* Say) populations collected in the Northwest and Midwest US. *American Journal of Potato Research* 95: 495–499.
- Cutter AD, Jovelín R, Dey A, 2013. Molecular hyperdiversity and evolution in very large populations. *Molecular Ecology* 22: 2074–2095.
- Daborn PJ, Yen JL, Bogwitz MR, Le Goff G, Feil E, *et al.*, 2002. A single P450 allele associated with insecticide resistance in *Drosophila*. *Science* 297: 2253–2256.
- De Carvalho D, Ingvarsson PK, Joseph J, Suter L, Sedivy C, *et al.*, 2010. Admixture facilitates adaptation from standing variation in the European aspen (*Populus tremula* L.), a widespread forest tree. *Molecular Ecology* 19: 1638–1650.
- Dively GP, Crossley MS, Schoville SD, Steinhauer N, Hawthorne DJ, 2020. Regional differences in gene regulation may underlie patterns of sensitivity to novel insecticides in *Leptinotarsa decemlineata*. *Pest Management Science* 76: 4278–4285.
- Dong K, Scott JG, 1994. Linkage of *kdr*-type resistance and the *para*-homologous sodium channel gene in German cockroaches (*Blattella germanica*). *Insect Biochemistry & Insect Molecular Biology* 24: 647.
- Duchesne, RM Parent JC, 1991. The flowering tobacco as a new alternative host for the Colorado potato beetle. *American Potato Journal* 68: 743–750.
- Ffrench-Constant RH, Bass C, 2017. Does resistance really carry a fitness cost? *Current Opinion in Insect Science* 21: 39–46.
- Ffrench-Constant RH, Pittendrigh B, Vaughan A, Anthony N, 1998. Why are there so few resistance-associated mutations in insecticide target genes? *Philosophical Transactions: Biological Sciences* 353: 1685–1693.
- Fritz ML, DeYonke AM, Papanicolaou A, Micinski S, Westbrook J, *et al.*, 2018. Contemporary evolution of a *Lepidopteran* species, *Heliothis virescens*, in response to modern agricultural practices. *Molecular Ecology* 27: 167–181.
- Grapputo A, Boman S, Lindstrom L, Lyytinen A, Mappes J, 2005. The voyage of an invasive species across continents: genetic diversity of North

- American and European Colorado potato beetle populations. *Molecular Ecology* 14: 4207–4219.
- Hardy NB, Peterson DA, Ross L, Rosenheim JA, 2018. Does a plant-eating insect's diet govern the evolution of insecticide resistance? Comparative tests of the pre-adaptation hypothesis. *Evolutionary Applications* 11: 739–747.
- Hartley CJ, Newcomb RD, Russell RJ, Yong CG, Stevens JR, *et al.*, 2006. Amplification of DNA from preserved specimens shows blowflies were preadapted for the rapid evolution of insecticide resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103: 8757–8762.
- Hawkes NJ, Janes RW, Hemingway J, Vontase J, 2005. Detection of resistance-associated point mutations of organophosphate-insensitive acetylcholinesterase in the olive fruit fly, *Bactrocera oleae* (Gmelin). *Pesticide Biochemistry & Physiology* 81: 154–183.
- Hitchner EM, Kuhar TP, Dively GP, Youngman RR, Philips CR, *et al.*, 2012. Baseline toxicity and field efficacy of metaflumizone on Colorado potato beetle (Coleoptera: Chrysomelidae). *Journal of Economic Entomology* 105: 207–213.
- Hsiao TH, 1978. Host plant adaptations among geographic populations of the Colorado potato beetle. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 24: 437–447.
- Hsiao TH, 1988. Host specificity, seasonality and bionomics of *Leptinotarsa* beetles. In: Jolivet P, Petitpierre E, Hsiao TH, editors. *Biology of Chrysomelidae*. Dordrecht: Springer. Pp. 581–599.
- Izzo VM, Chen YH, Schoville SD, Wang C, Hawthorne DJ, 2018. Origin of pest lineages of the Colorado potato beetle (Coleoptera: Chrysomelidae). *Journal of Economic Entomology* 111: 868–878.
- Javed N, Viner R, Williamson MS, Field LM, Devonshire AL, *et al.*, 2003. Characterization of acetylcholinesterase, and their genes, from the hemipteran species *Myzus persicae* (Sulzer), *Aphis gossypii* (Glover), *Bemisia tabaci* (Gennadius) and *Trialeurodes vaporariorum* (Westwood). *Insect Molecular Biology* 12: 613–620.
- Kamdem C, Fouet C, Gamez S, White BJ, 2017. Pollutants and insecticides drive local adaptation in African malaria mosquitoes. *Molecular Biology & Evolution* 34: 1261–1275.
- Karimzadeh R, Hejazi MJ, 2015. The effects of Indoxacarb and Methoxyfenozide against Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata* (Say) (Coleoptera: Chrysomelidae). *Journal of Applied Research in Plant Protection* 4: 93–102.
- Kim HJ, Dunn JB, Yoon KS, Clark JM, 2006. Target site insensitivity and mutational analysis of acetylcholinesterase from a carbufuran-resistant population of Colorado Potato Beetle, *Leptinotarsa decemlineata* (Say). *Pesticide Biochemistry & Physiology* 84: 165–179.
- Kim HJ, Yoon KS, Clark JM, 2007. Functional analysis of mutations in expressed acetylcholinesterase that result in azinphosmethyl and carbofuran resistance in Colorado potato beetle. *Pesticide Biochemistry & Physiology* 88: 181–190.
- Khudyakov YE, Fields HA, 2003. Artificial DNA: Methods and application. CRC Press, LLC. pp: 435.
- Labbe P, Berticat C, Berthomieu A, Unal S, Bernard C, *et al.*, 2007. Forty years of erratic insecticide resistance evolution in the mosquito *Culex pipiens*. *PLOS Genetics* 3: e205.
- Larson AJ, Yeaman S, Lotterhos KE, 2020. The importance of genetic redundancy in evolution. *Trends in Ecology & Evolution* 35: 809–822.
- Lee SH, Dunn JB, Clark JM, Soderlund DM, 1999. Molecular analysis of kdr-like resistance in a permethrin resistant strain of Colorado potato beetle. *Pesticide Biochemistry & Physiology* 63: 63.
- Lopez-Maury L, Marguerat S, Bahler J, 2008. Tuning gene expression to changing environments: from rapid responses to evolutionary adaptation. *Nature Reviews Genetics* 9: 583–593.
- Lucas ER, Miles A, Harding NJ, Clarkson CS, Lawniczak MK, *et al.*, 2019. Anopheles gambiae 1000 Genomes Consortium. Whole-genome sequencing reveals high complexity of copy number variation at insecticide resistance loci in malaria mosquitoes. *Genome Research* 29: 1250–1261.
- Malekmohammadi M, Hejazi MJ, Mossadegh MS, Galehdari H, Khanjani M, *et al.*, 2012. Molecular diagnostic for detecting the acetylcholinesterase, mutations in insecticide-resistant populations of Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata* (Say). *Pesticide Biochemistry & Physiology* 104:

- 150–156.
- Malekmohammadi M, Mossadegh MS, Hejazi MJ, Goodarzi MT, Khanjani M, *et al.*, 2010. Synergism of resistance to phosalone and comparison of kinetic properties of acetylcholinesterase from four field populations and a susceptible strain of Colorado potato beetle. *Pesticide Biochemistry & Physiology* 98: 254–262.
- McCaffery A, Nauen R, 2006. The insecticide resistance action committee (IRAC): public responsibility and enlightened industrial self-interest. *Outlooks Pest Management* 17: 11–14.
- Mohammadi Sharif M, Hejazi MJ, Mohammadi A, Rashidi MR, 2007. Resistance status of the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata*, to endosulfan in East Azarbaijan and Ardabil provinces of Iran. *Journal of Insect Science* 7: 1–7.
- Mutero A, Pralavorio M, Bride JM, Fournier D, 1994. Resistance-associated point mutations in insecticide-insensitive acetylcholinesterase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91: 5922–5926.
- Newcomb RD, Campbell PM, Russell RJ, Oakeshott JG, 1997. cDNA cloning, baculovirus-expression and kinetic properties of the esterase, E3, involved in organophosphorus resistance in *Lucilia cuprina*. *Insect Biochemistry & Molecular Biology* 27: 15–25.
- Pelissie B, Crossley MS, Cohen Z, Schoville SD, 2018. Rapid evolution in insect pests: the importance of space and time in population genomics studies. *Current Opinion in Insect Science* 26: 8–16.
- Rane RV, Ghodke AB, Hoffmann AA, Edwards OR, Walsh TK, *et al.*, 2019. Detoxifying enzyme complements and host use phenotypes in 160 insect species. *Current Opinion in Insect Science* 31: 131–138.
- Reid NM, Proestou DA, Clark BW, Warren WC, Colbourne JK, *et al.*, 2016. The genomic landscape of rapid repeated evolutionary adaptation to toxic pollution in wild fish. *Science* 354: 1305–1308.
- Ren XX, Han ZJ, 2002. Mechanism of monocrop resistance in cotton Bollworm, *Helicoverpa armigera* (Hubner). *Archives of Insect Biochemistry & Physiology* 51: 103–110.
- Rinkevich FD, Su C, Lazo TA, Hawthorne DJ, Tingey WM, *et al.*, 2012. Multiple evolutionary origins of knockdown resistance (kdr) in pyrethroid-resistant Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata*. *Pesticide Biochemistry & Physiology* 104: 192–200.
- Roelofs D, Morgan J, Sturzenbaum S, 2010. The significance of genome wide transcriptional regulation in the evolution of stress tolerance. *Evolutionary Ecology* 24: 527–539.
- Rondon SI, 2012. Pest management strategies for potato insect pests in the Pacific Northwest of the United States. In: Perveen F, editor. *Insecticides – pest engineering*. Rijeka, Croatia: InTech. Pp. 309–333.
- Serre JL, 2006. Techniques and tools in molecular biology used in genetic diagnoses. In: Serre JL, *Diagnostic techniques in genetics*. John Wiley and Sons, Ltd. Pp. 55–57.
- Szendrei Z, Grafius E, Byrne A, Ziegler A, 2012. Resistance to neonicotinoid insecticides in field populations of the Colorado potato beetle (Coleoptera: Chrysomelidae). *Pest Management Science* 68: 941–946.
- Tabashnik BE, Brevault T, Carriere Y, 2013. Insect resistance to Bt crops: lessons from the first billion acres. *Nature Biotechnology* 31: 510–521.
- Taylor MFJ, Heckel DG, Brown TM, Kreitman ME, Black B, 1993. Linkage of pyrethroid insecticide resistance to a sodium channel locus in the tobacco Budworm. *Insect Biochemistry & Molecular Biology* 23: 763.
- Tomita T, Hidoh O, Kono Y, 2000. Absence of protein polymorphism attributable to insecticide-insensitivity of acetylcholinesterase in the green rice leafhopper, *Nephotettix cincticeps*. *Insect Biochemistry & Molecular Biology* 30: 325–333.
- Whitehead A, Clark BW, Reid NM, Hahn ME, Nacci D, 2017. When evolution is the solution to pollution: key principles, and lessons from rapid repeated adaptation of killifish (*Fundulus heteroclitus*) populations. *Evolutionary Applications* 10: 762–783.
- Williamson MS, Denholm I, Bell CA, Devonshire AL, 1993. Knockdown resistance (kdr) to DDT and pyrethroid insecticides maps to a sodium channel gene locus in the housefly (*Musca domestica*). *Molecular Genetics & Genomics* 240: 17.
- Zhu KY, Clark MJ, 1994. Purification and characterization of acetylcholinesterase from the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata*.

- Insect Biochemistry & Molecular Biology* 24: 453–461.
- Zhu KY, Clark JM, 1995. Cloning and sequencing of a cDNA encoding acetylcholinesterase in Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata*. *Insect Biochemistry & Insect Molecular Biology* 25: 1129–1138.
- Zhu KY, Lee SH, Clark JM, 1996. A point mutation of acetylcholinesterase associated with azinphosmethyl resistance and reduced fitness in Colorado potato beetle. *Pesticide Biochemistry & Physiology* 55: 100–108.

