ЭКОБИОТЕХ

ISSN 2618-964X

<http://ecobiotex-journal.ru>

МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ СВЕРХЧУВСТВИТЕЛЬНОГО ОТВЕТА РАСТЕНИЙ КАРТОФЕЛЯ НА КЛАДКИ КОЛОРАДСКОГО ЖУКА ДЛЯ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ В СЕЛЕКЦИОННОЙ РАБОТЕ

Марданшин И.С.¹, Сорокань А.В.^{*2},
Гордеев А.А.³, Бенковская Г.В.²

¹ Башкирский научно-исследовательский институт сельского хозяйства Уфимского Федерального исследовательского центра РАН, Уфа (Россия)

² Институт биохимии и генетики Уфимского Федерального исследовательского центра РАН, Уфа (Россия)

³ Башкирский государственный педагогический университет имени М. Акмуллы, Уфа (Россия)

*E-mail: Fourtyanns@googlegmail.com

Создание новых сортов картофеля с врожденными высокоэффективными механизмами защиты от колорадского жука является актуальной задачей селекционной работы с культурой, требующей разработки методик, позволяющих стандартизировать определенные реакции растений на воздействие фитофага в лабораторных условиях. Откладка яиц насекомыми на поверхности растения приводит к развитию интенсивной защитной реакции и продукции овицидов, интенсивному отмиранию ткани с последующим отпадением яиц или их высушиванием. Для имитации откладки яиц на листья нами был использован смыв с поверхности кладок колорадского жука, содержащий пул элиситоров защитных реакций. На сортах Башкирский (высокая устойчивость к колорадскому жуку) и Удача (средне-устойчивый сорт) наблюдалось засыхание участков листа в ответ на обработку нижней поверхности листовой пластинки, а на сорте Ранняя роза (малоустойчивый сорт) реакция отсутствовала. Высушенные пятна на листовой пластинке были строго ограничены местом нанесения смыва. Было установлено, что образование активных форм кислорода в ответ на нанесение препарата происходит только на сортах картофеля Башкирский и Удача при развитии сверхчувствительной реакции, что соответствовало наблюдаемому в полевых условиях засыханию листовых пластин в местах прикрепления кладок. Локализация перекиси водорода и супероксид аниона происходит в клетках сосудистых пучков и прилегающих к ним тканей. На сорте Ранняя роза нанесение смыва не приводило к накоплению в листовой ткани активных форм кислорода и засыханию листьев.

Ключевые слова: реакция сверхчувствительности ♦ супероксид анион ♦ перекись водорода ♦ яйца колорадского жука ♦ картофель

METHOD FOR DETERMINING THE HYPER SENSITIVE RESPONSE OF POTATO PLANTS TO CLUSTERS OF THE COLORADO POTATO BEETLE EGGS FOR USE IN BREEDING

Mardanshin I.S.¹, Sorokan A.V.^{*2},
Gordeev A.A.³, Benkovskaya G.V.²

¹ Bashkir Research Institute of Agriculture, Ufa Federal Research Center, Russian Academy of Sciences, Ufa (Russia)

² Institute of Biochemistry and Genetics, Ufa Federal Research Center, Russian Academy of Sciences, Ufa (Russia)

³ Bashkir State Pedagogical University named after M. Akmulla, Ufa (Russia)

*E-mail: Fourtyanns@googlegmail.com

The creation of new varieties of potato revealing innate highly effective mechanisms of protection against Colorado potato beetle is an urgent task of breeding, which requires the development of methods that allow standardizing certain plant responses to different aspects of the influence of this phytophage under laboratory conditions. The laying of eggs by insects on the surface of plant leaves leads to the development of an intense protective reaction and the production of ovicidins, intensive death of tissue, followed by the loss of eggs or their drying. To simulate the laying of eggs on the leaves, we used a washout from the surface of the clutches of the Colorado potato beetle containing a pool of elicitors of plant defense reactions. On cultivars Bashkirsky (high resistance to the Colorado potato beetle) and Udacha (medium-resistant cultivar), drying of leaf areas was observed in response to the treatment of the lower surface of the leaf blade, and on cultivar Rannyya rosa (unstable cultivar), there was no reaction. The dried spots on the leaf blade were strictly limited to the place where the wash was applied. It was found that the formation of reactive oxygen species in response to the application of the washout occurs only on potato varieties Bashkirsky and Udacha with the development of a hypersensitive response, which corresponded to the drying of leaf blades observed under the field conditions at the sites of clutch attachment. Localization of hydrogen peroxide and superoxide anion occurs in the cells of the vascular bundles and adjacent tissues. On the Rannyya Rosa cultivar, the application of the washout did not lead to the accumulation of reactive oxygen species in the leaf tissue and the drying of the leaves.

Keywords: hypersensitive response ♦ superoxide anion ♦ hydrogen peroxide ♦ eggs of the Colorado potato beetle ♦ potato

Поступила в редакцию: 11.11.2021

ВВЕДЕНИЕ

Картофель в России практически повсеместно повреждается колорадским жуком *Leptinotarsa decemlineata* Say (Coleoptera, Chrysomelidae), отнесенным к вредителям-супердоминантам. В перспективе основным фактором стабилизации картофельных агроценозов будет возделывание устойчивых к вредителю сортов [Малюга и др., 2020]. В последние годы в селекции картофеля значительно усилился интерес к генам, контролирующим механизмы индуцирования защитных реакций растений в период, предшествующий нападению на них насекомых-вредителей, то есть при откладке вредителем яиц на листовую поверхность [Fürstenberg-Hägg et al., 2013, Вилкова и др., 2004], что позволяет растению полностью избежать или значительно снизить потери биомассы при нападении фитофагов. На рубеже XX-XXI веков было установлено, что индуцированный фитоиммунитет связан с определенными сигнальными молекулами (элиситорами) - химическими соединениями биогенной и абиогенной природы, ответственными за запуск определенных химических реакций или их каскадов, результатом которых является транскрипция генов защиты растения и синтез защитных соединений [Тарчевский, 2001].

Биогенными элиситорами защитных реакций растений в ответ на повреждение фитофагами могут быть химические соединения, входящие в состав секрета яйцекладущих самок или находящиеся на поверхности хориона откладываемых яиц, например, производные жирных кислот – волицитин (N-(17-гидроксилиноленоил)-L-глутамин [Alborn, 2006] и производные жасмоновых кислот [Tooker et al., 2007; Ojeda-Martinez et al., 2021]. Предполагают, что данные соединения играют ведущую роль в активации защитных реакций растений при откладке яиц насекомыми, что, в частности, проявляется в развитии сверхчувствительной реакции (СВЧ). Одними из ключевых участников запуска реакции СВЧ у растений являются активные формы кислорода, такие как перекись водорода и супероксид анион [Bittner et al., 2017], которые проявляют как функции сигнальных молекул [Тарчевский, 2001], так и прямой антибиотический эффект против атакующих растение организмов [Huang et al., 2019].

СВЧ широко используется в практике селекции при создании устойчивости к фитофторозу, а биохимические механизмы развития этого защитного механизма хорошо изучены и активно применяются при составлении селекционных программ [Рогозина, 2011]. В тоже время механизмы развития СВЧ растений на откладку яиц насекомыми изучены недостаточно. Так, достаточно давно сообщалось, что гибель клеток в результате СВЧ-подобной реакции в местах прикрепления яиц *Pieris brassicae* является важнейшим защитным механизмом у растений *Brassica oleraceae* [Pashalidou et al., 2015]. Показано, что экстракт яиц этого вредителя так же вызывал гибель клеток листовой пластины арабидопсиса и накопление перекиси водорода в месте нанесения [Groux et al., 2021].

Работ по изучению элиситоров, присущих яйцам колорадского жука, а так же механизмов развития СВЧ на откладку яиц колорадского жука в листьях картофеля не проводилось. Ранее нами было показано, что при наследовании в линиях от самоопыления сорта Башкирский происходит расщепление по фенотипу проявления феномена СВЧ на кладки колорадского жука в виде непрерывного вариационного ряда изменчивости [Марданшин, Сорокань, 2018]. Это, по-видимому, обусловлено тем, что признак СВЧ контролируется серией полигенов с аддитивным эффектом. Различное фенотипическое проявление изменчивости СВЧ наблюдалось нами и на широко распространенных сортах [Марданшин и др., 2010], что, по всей видимости, связано с различием в образовании и

метаболизме активных форм кислорода. Так как селекционная работа по выведению сортов, устойчивых к колорадскому жуку, требует разработки стандартных тестов, позволяющих в лабораторных или полевых условиях определять потенциал сорта, нами были сделаны смывы с поверхности яиц колорадского жука, предположительно, содержащие элиситоры.

Целью наших исследований было изучение локализации супероксид аниона и перекиси водорода в листьях растений картофеля с различным фенотипическим проявлением СВЧ на кладки яиц колорадского жука в модельной системе с использованием смыва с яиц колорадского жука.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В опытах были использованы три сорта с различной устойчивостью к колорадскому жуку: Ранняя роза (неустойчивый), Удача (среднеустойчивый) и выведенный ранее устойчивый сорт Башкирский, отличающийся засыханием листьев с кладками колорадского жука [Марданшин, Сорокань, 2018]. Полевые исследования проводились на опытных полях Уфимского федерального научного центра РАН (опытная станция Бирск, 55°25'47.4"N и 55°35'49.9" E) в полевые сезоны 2019 и 2020 годов. Поля располагались на серых лесных почвах (северная лесостепь). Почвы не заболочены, по текстуре супесчаные. Содержание гумуса 3,5-4,0%, pH почвы 5,5-6,5. Клубни высаживали в первой декаде мая на глубину 5 см, по схеме посадки 75×30 см (ширина междурядий 75 см, расстояние в рядке 30 см). Планируемая густота стояния растений 45 000 шт/га. Использовалась сеялка Grimme GL 34T (ГРИММЕ-Рус, Россия). Каждый сорт был высеян на три делянки по 40 растений. Учет количества кладок и личинок колорадского жука проводился в период наибольшего сезонного обилия (24.06.2019 и 17.06.2020). В лабораторных условиях растения выращивались в условиях гидропоники при искусственном освещении лампами ДНАТ-400, при 16 часовом периоде освещения.

Смыв с поверхности кладок колорадского жука, содержащий элиситоры защитного ответа растений, получали, помещая снятые с листьев картофеля целые кладки яиц колорадского жука в 40%-ный этанол на 3-5 минут при постоянном встряхивании. На 5 мл раствора брали 10 кладок (суммарно около 250 яиц). Смыв наносили на один лист на каждом из 10 растений каждого сорта каплей объемом 20 мкл на нижнюю поверхность. На листья контрольных растений наносили 20 мкл 40%-ного этанола.

Определение локализации перекиси водорода и супероксид аниона проводили через 24 часа после нанесения смыва. Фенотипическое проявление СВЧ реакции фиксировали через 7 суток.

Определение локализации перекиси водорода проводили модифицированным методом с использованием 0,01% 3,3'-диаминобензидина и 0,5 мг/мл пероксидазы хрена (Sigma-Aldrich, USA) в 0,1 М фосфатном буфере с pH 6.2. Супероксид анион определяли по окрашиванию листьев с использованием раствора 1 г/л нитросинего тетразолия хлорида (Диаэм, Россия) как описано ранее [Sorokan et al., 2018]. Листья инфильтровали под мягким вакуумом с описанными окрашивающими смесями в течение 30 мин. Реакцию окрашивания прекращали через 1 ч после инфильтрации, а листья фиксировали в этаноле в течение 3 сут и после помещали в смесь этанол:глицерин 1:1. Локализацию H₂O₂ и супероксид аниона определяли в окрашенных участках с помощью светового микроскопа Biozero BZ-X700 (Keyence, Japan). Результаты воспроизведены в двух независимых экспериментах.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В полевых условиях при откладке яиц на сорте Ранняя роза отсутствуют фенотипические проявления СВЧ. На сорте Удача засыхание листьев наблюдается на 3-5 день после откладки яиц, на сорте Башкирский - на 2-3 день после откладки яиц (рис. 1(I)).

Рис. 1. Засыхание листовой пластинки через 7 дней после откладывания яиц (I) и нанесения смыва с кладок (II): А - сорт Башкирский; Б – сорт Ранняя Роза; В – сорт Удача; Г- место прикрепления яйца колорадского жука к листовой пластинке.

Эти данные коррелируют с полевой устойчивостью сортов к колорадскому жуку и количеством яиц и вылупившихся из них личинок I возраста (таблица 1). Так, наибольшее количество яиц было отложено вредителем на листьях растений сорта Ранняя роза, причем на растениях данного сорта было обнаружено так же наибольшее число вылупившихся личинок. Наименьшая заселенность отмечалась в случае сорта Башкирский, при этом обращает на себя внимание значительно меньшее количество вылупившихся личинок относительно количества отложенных яиц, что свидетельствует об элиминации части кладок. Сорт Удача занимал промежуточное положение по двум параметрам (табл. 1).

Таблица 1. Количество яиц и личинок I возраста на растениях картофеля с различным фенотипическим проявлением реакции СВЧ на кладки яиц колорадского жука.

Год	Показатель/растение	Сорт		
		Удача	Ранняя Роза	Башкирский
2019	яйца	38,4±7,94а*	48,5±7,34б	25±3,13в
	личинки I возраста	18,5±4,42а	29,5±5,24б	8,8±3,67в
2020	яйца	24,5±6,3а	42,5±8,65б	13,5±3,97в
	личинки I возраста	13,2±2,97а	35,9±7,52б	4,7±1,27в

*разными буквами отмечены статистически различающиеся данные (по отдельному параметру в соответствующем году).

В качестве модели развития СВЧ были использованы листья растений картофеля всех указанных выше сортов, обработанные спиртовым смывом с поверхности кладок яиц насекомого. На рисунке 1(Г) видно, что яйца колорадского жука крепятся к листовой пластинке секретом желез, выделяющимся самкой одновременно с откладкой яиц.

Желеобразная масса, удерживающая яйца на поверхности листовой пластинки содержит в себе вещества – элиситоры, которые могут инициировать защитную реакцию растения [Ojeda-Martinez et al., 2021]. Как видно на рисунке 1(II) А и В, на сортах Башкирский и Удача наблюдается усыхание участка листовой пластинки в ответ на обработку нижней поверхности листовой пластинки смывом, имеющее вид пятна, состоящего из полностью высохшей, но не разрушившейся листовой ткани и строго ограниченного местом нанесения препарата. По виду реакция практически идентична пятнам, наблюдаемым в полевых условиях на месте прикрепления кладок яиц колорадского жука к листьям сортов Башкирский и Удача (рис. 1). На листьях растений сорта Ранняя роза (рис. 1(II) Б) отмирание тканей отсутствует. Таким образом, в использованном нами в опыте спиртовом смыве с кладок яиц колорадского жука содержатся элиситоры, запускающие защитные реакции в растениях устойчивых к колорадскому жуку сортов.

Рис. 2. Локализация активных форм кислорода в листовой ткани различных сортов картофеля: А – распределение перекиси водорода в контроле без обработки; Б – распределение перекиси водорода в листьях обработанных спиртовым смывом с кладок насекомого; В - распределение супероксид аниона в контрольных листьях без обработки; Г- распределение супероксид аниона в листьях, обработанных спиртовым смывом с кладок насекомого.

У сорта Ранняя Роза отсутствовала реакция сверхчувствительности в ответ на воздействие веществ, содержащихся в смыве, поэтому обработка нижней поверхности листовой пластинки данного сорта не вызвала накопления ни перекиси водорода, ни супероксид аниона (рис. 2).

Обработка нижней поверхности листовой пластинки сортов Удача и Башкирский препаратом вызвала значительное повышение уровня содержания супероксид аниона, однако на листьях картофеля сорта Башкирский происходило так же накопление более устойчивой формы АФК – перекиси водорода. Развитие реакции сверхчувствительности на сортах Удача и Башкирский происходит, по-видимому, в результате локального разрушения клеток проводящих сосудов и мезофилла в месте нанесения смыва под действием повышенных концентраций перекиси водорода и супероксид аниона. Эти участки на фотографиях видны как лишенные окраски, истонченные области, вокруг которых концентрируются активные формы кислорода. Локализация повышенной концентрации перекиси водорода и супероксид аниона происходит в клетках сосудистых пучков и прилегающих к ним тканей (рис. 2 В, Г), что по-видимому приводит к синтезу каллозы и закупорке сосудов.

ОБСУЖДЕНИЕ

Наличие СВЧ к элиситорам, содержащимся в кладках колорадского жука, коррелирует с уровнем полевой устойчивости растений к вредителю, что позволяет предположить участие этих триггеров в запуске не только реакции синтеза АФК, но и других защитных механизмов. В то же время, необходимо отметить, что наблюдаемая нами степень развития СВЧ в опыте не является максимально возможным результатом развития процесса. Ранее в потомстве от самоопыления растений сорта Башкирский нами выделены формы картофеля с развитием СВЧ в виде сплошного локального распада ткани и образованием отверстия на месте кладок яиц фитофага, что приводило к 100% гибели эмбрионов [Марданшин, Сорокань, 2018]. Предположительно для развития СВЧ ответа в таком ключе необходимы дальнейшее накопление H_2O_2 , активация НАДФН-оксидазы и гиперпродукция АФК, что приводит к апоптозу растительных клеток в месте прикрепления кладки. СВЧ-подобный ответ на яйца бабочек-белянок на листьях *Arabidopsis* связан с накоплением АФК, таких как перекись водорода, повышенным содержанием фитогормона салициловой кислоты и индукцией салицилат-чувствительных генов в тканях под кладками [Bruessow et al. 2010; Gouhier-Darimont et al. 2013]. Перспективность поиска генетических источников, несущих признаки СВЧ по типу апоптоза, обуславливается тем, что в зависимости от условий вегетации эмбриональная смертность потомства колорадского жука при развитии на устойчивых сортах составляет порядка 10-25%; СВЧ повышает эмбриональную смертность до 80-95%, а при падении кладки на почву в результате лизиса листовой пластинки шансов на выживание у потомства вредителя нет. В месте откладки яиц *Spodoptera exigua* на растения паслена *Solanum dulcamara* наблюдались разрастания тканей и появление хлорозов, накопление АФК и индукция транскрипции защитных генов. Опосредованная растениями смертность яиц у *S. dulcamara* отсутствовала для генотипа, не проявляющего СВЧ-подобной реакции местах кладки яиц, где яйца подвергались меньшему воздействию перекиси водорода [Geuss et al., 2017].

Полученные нами результаты позволяют утверждать, что спиртовой смыв с кладок колорадского жука содержит вещества, которые выступают как элиситоры СВЧ реакции. Обработка листьев чувствительных сортов спиртовым смывом с кладок колорадского жука

инициирует сигнальные каскады, которые в конечном итоге приводят к синтезу активных форм кислорода и к локальному отмиранию растительной ткани. Способность реагировать на элиситоры кладок колорадского жука может служить диагностическим признаком устойчивости линий картофеля к колорадскому жуку в селекционной работе. Важно, что разработанный метод использования смывов с кладок позволяет стандартизировать проведение опытов в лабораторных условиях и может стать основой для удобного теста, реализуемого в селекционном процессе при отборе перспективных гибридов и сортов картофеля с интенсивно выраженным механизмом СВЧ реакции на кладки колорадского жука, способным существенно снизить эмбриональную выживаемость личинок в кладке вредителя. Для включения данного признака в селекционные программы необходимо создать доноров в гомозиготном состоянии. Отбор перспективного материала необходимо проводить по степени интенсивности фенотипической экспрессии развития некроза.

ФИНАНСОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена в рамках Госзадания № АААА-А21-121011990120-7 при частичной финансовой поддержке РФФИ № 17-44-020347-р_ с использованием оборудования ЦКП «Биомика» (Отделение биохимических методов исследований и нанобиотехнологии РЦКП «Агидель») и УНУ «КОДИНК».

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Вилкова Н.А., Нефедова Л.И., Асякин Б.Л., Фасулати С.Р., Конарев Ал.В., Юсупов Т.М. Научно обоснованные параметры конструирования устойчивых к вредителям сортов сельскохозяйственных культур. СПб, ВИЗР, 2004, 76 с.
2. Малюга, А. А., Чуликова Н. С., Енина Н. Н. Особенности формирования фитосанитарной ситуации и эффективность средств защиты растений против колорадского жука и ризоктониоза в посадках цветных сортов картофеля // Агрохимия. 2020. № 5. С. 62-71.
3. Марданшин И.С., Ибрагимов Р.И., Умаров И.А., Беньковская Г.В., Удалов М.Б. Традиционная селекция – экологичный метод решения проблемы защиты картофеля от колорадского жука // Достижения науки и техники АПК. 2010. № 1. С. 22-23.
4. Марданшин И.С., Сорокань А.В. Различия в фенотипическом проявлении гиперчувствительного ответа на отложение яиц колорадского жука у растений картофеля и перспектива его использования в селекции культуры // Защита картофеля. 2018. № 2. С. 14-17.
5. Тарчевский И.А. Метаболизм растений при стрессе. Казань: Изд-во "Фэн", 2001. 448с.
6. Alborn T. An elicitor of plant volatiles from beet armyworm oral secretion // Science. 1997. V. 276. P. 945–949. DOI: 10.1126/science.276.5314.945
7. Bittner N., Trauer-Kizilelma U., Hilker M. Early plant defence against insect attack: involvement of reactive oxygen species in plant responses to insect egg deposition // Planta. 2017. 245(5). P. 993-1007. DOI: 10.1007/s00425-017-2654-3
8. Bruessow F., Gouhier-Darimont C., Buchala A. et al. Insect eggs suppress plant defence against chewing herbivores // The Plant Journal. 2010. V. 62. P. 876 – 885. DOI: 10.1111/j.1365-3113.2010.04200.x
9. Fürstenberg-Hägg J., Zagrobelny M., Bak S. Plant defense against insect herbivores // International journal of molecular sciences. 2013. T. 14. №. 5. С. 10242-10297. <https://doi.org/10.3390/ijms140510242>

10. Huang, H., Ullah, F., Zhou, D.-X., Yi, M., Zhao, Y. Mechanisms of ROS regulation of plant development and stress responses // *Frontiers in Plant Science*. 2019. V. 10. A. 800. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00800>
11. Geuss, D., Stelzer, S., Lortzing, T., Steppuhn, A. *Solanum dulcamara*'s response to eggs of an insect herbivore comprises ovicidal hydrogen peroxide production // *Plant, Cell & Environment*. 2017. V. 40. P. 2663– 2677. DOI: [10.1111/pce.13015](https://doi.org/10.1111/pce.13015)
12. Gouhier-Darimont C., Schmiesing A., Bonnet C. et al. Signalling of *Arabidopsis thaliana* response to *Pieris brassicae* eggs shares similarities with PAMP-triggered immunity // *Journal of Experimental Botany*. 2013. V. 64. P. 665– 674. DOI: [10.1093/jxb/ers362](https://doi.org/10.1093/jxb/ers362)
13. Groux R., Fouillen L., Mongrand S., Reymond P. Sphingolipids are involved in *Pieris brassicae* egg-induced cell death in *Arabidopsis thaliana* // *bioRxiv*. 2021.07.09.451813. DOI: [10.1101/2021.07.09.451813](https://doi.org/10.1101/2021.07.09.451813)
14. Ojeda-Martinez D., Martinez M., Diaz I. et al. Spider mite egg extract modifies *Arabidopsis* response to future infestations // *Science Reports* . 2021. V. 11. A. 17692. DOI: [10.1038/s41598-021-97245-z](https://doi.org/10.1038/s41598-021-97245-z)
15. Pashalidou F.G., Fatouros N.E., Van Loon J. et al. Plant-mediated effects of butterfly egg deposition on subsequent caterpillar and pupal development, across different species of wild *Brassicaceae* // *Ecological Entomology*. 2015. V. 40. P. 444-450. DOI: [10.1111/een.12208](https://doi.org/10.1111/een.12208)
16. Sorokan A.V., Burhanova G.F., Maksimov I.V. Anionic peroxidase-mediated oxidative burst is required for jasmonic acid-dependent *Solanum tuberosum* L. defense against *Phytophthora infestans* (Mont) de Bary // *Plant Pathology*. 2018. V. 67. P. 349-357; DOI: [10.1111/ppa.12743](https://doi.org/10.1111/ppa.12743)