

Пятая международная научная конференция PlantGen2019

Индукцированная устойчивость представителей рода *Triticum* к обыкновенной злаковой тле *Schizaphis graminum* Rond.

С.Д. Румянцев , С.В. Веселова, Г.Ф. Бурханова, И.В. Максимов

Институт биохимии и генетики – обособленное структурное подразделение Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук, Уфа, Россия

 e-mail: Rumyantsev-Serg@mail.ru

Обыкновенная злаковая тля *Schizaphis graminum* Rond. наносит значительный ущерб посевам зерновых культур, поэтому повышение устойчивости растений к тлям – одна из первоочередных задач. Проблема создания устойчивых сортов к насекомым, питающимся флоэмным соком, стоит достаточно остро, так как механизмы, характеризующие устойчивость растений к насекомым, до конца не изучены. Тем не менее в современной литературе описывают механизмы, связанные с изменением редокс-статуса растений, заселенных тлей. Кроме того, в последнее время все большее внимание уделяется изучению механизмов индуцируемой устойчивости пшеницы к тлям, регулируемой гормональными сигнальными системами. Для обнаружения связи между редокс-статусом, показателями устойчивости растений пшеницы (антибиозом и выносливостью) к вредителю и индукцией жасмонат (ЖАК)- и салицилат (СК)-сигнальных путей у представителей трех видов растений пшеницы, *Triticum aestivum* L., *T. monococcum* L. и *T. timopheevii* Zhuk., заселенных обыкновенной злаковой тлей *S. graminum*, были проведены исследования с помощью физиологических, биохимических и молекулярно-генетических методов. Тесты на антибиоз и выносливость показали, что устойчивыми по отношению к *S. graminum* были образцы *T. timopheevii* – к-58666 и *T. monococcum* – к-39471, последний из которых оказался наиболее выносливым. Устойчивые образцы отличались высоким содержанием перекиси водорода и повышенной активностью пероксидазы. В нашей работе исследована экспрессия генов, кодирующих PR-белки, маркеры и регуляторы СК- (*TaRboh*, *TaPAL*, *TaPr1*, *TaPrx*) и ЖАК-сигнальных путей (*TaPI*, *TaLOX*, *TaPrx*). При ранних ответных реакциях после заселения тлей у восприимчивого сорта Салават Юлаев (*T. aestivum*) активировалась экспрессия только ЖАК-зависимых генов, что отражало реакцию растений на повреждение. У устойчивого образца *T. timopheevii* к-58666 повышалась транскрипционная активность СК-зависимых генов, при этом тля практически не размножалась. У устойчивого образца *T. monococcum* к-39471, проявившего наибольшую выносливость, увеличивалась экспрессия как СК-, так и ЖАК-зависимых генов. Мы предполагаем, что окислительный взрыв у устойчивых форм пшеницы индуцировался благодаря запуску СК-сигнального пути, что имело решающее значение в дальнейшем каскаде химических реакций, ведущих к развитию устойчивости.

Ключевые слова: *Schizaphis graminum* Rond.; *Triticum aestivum* L.; *T. monococcum* L.; *T. timopheevii* Zhuk.; полимерная цепная реакция; фитоиммунитет; редокс-метаболизм; гормональные сигнальные системы; экспрессия генов.

Для цитирования: Румянцев С.Д., Веселова С.В., Бурханова Г.Ф., Максимов И.В. Индуцированная устойчивость представителей рода *Triticum* к обыкновенной злаковой тле *Schizaphis graminum* Rond. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2019;23(7):865-872. DOI 10.18699/VJ19.560

Induced resistance to the greenbug aphid *Schizaphis graminum* Rond. in species of the genus *Triticum*

S.D. Rumyantsev , S.V. Veselova, G.F. Burkhanova, I.V. Maksimov

Institute of Biochemistry and Genetics – Subdivision of the Ufa Federal Research Centre, RAS, Ufa, Russia

 e-mail: Rumyantsev-Serg@mail.ru

The greenbug aphid *Schizaphis graminum* Rond. causes a significant loss of the grain harvest. Therefore, to improve plant resistance to aphids is one of the topical tasks. The problem of creating varieties resistant to phloem-feeding insects is quite urgent, since the mechanisms procuring the resistance of plants to insects are not fully understood. Nevertheless, modern literature describes some mechanisms associated with changes in the redox state of colonized plants. Besides, attention is being increasingly focused on the study of mechanisms that underlie inducible resistance to aphids in wheat and are regulated by hormonal signaling systems. To detect connections among the redox status, indicators of resistance (antibiosis and endurance) of wheat plants to the pest, and induction of the jasmonate (JA) and salicylate (SA) signaling pathways, we studied accessions of three species of wheat plants – *Triticum aestivum* L., *T. monococcum*, and *T. timopheevii* Zhuk. – infested with *S. graminum* greenbugs by physiological, biochemical, and molecular methods. Analysis of antibiosis and endurance showed that *T. timopheevii* k-58666 and *T. monococcum* k-39471 were resistant to *S. graminum*, the latter accession being the most enduring. High hydrogen peroxide contents and high peroxidase activities were detected in the resistant plants. We investigated the expression of genes encoding PR

proteins, including markers and regulators of the salicylate (*TaRboh*, *TaPAL*, *Tapr1*, *TaPrx*) and jasmonate (*TaPI*, *TaLOX*, *TaPrx*) signaling pathways. At the early stage of infestation in the susceptible *T. aestivum* variety Salavat Yulaev, the expression of only jasmonate-dependent genes was activated in response to plant damage. In the resistant *T. timopheevii* accession k-58666, expression of only salicylate-dependent genes was activated, while the aphid reproduction was practically absent. In the resistant *T. monococcum* accession k-39471, expression was activated in both the salicylate-dependent and jasmonate-dependent gene groups. We assume that the oxidative burst in the resistant forms of wheat was induced via the activation of the SA signaling pathway, which was of crucial importance in the further cascade of chemical reactions leading to the development of resistance.

Key words: *Schizaphis graminum* Rond.; *Triticum aestivum* L.; *T. monococcum* L.; *T. timopheevii* Zhuk.; polymerase chain reaction; plant immunity; redox metabolism; hormonal signaling systems; gene expression.

For citation: Rumyantsev S.D., Veselova S.V., Burkhanova G.F., Maksimov I.V. Induced resistance to the greenbug aphid *Schizaphis graminum* Rond. in species of the genus *Triticum*. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2019;23(7):865-872. DOI 10.18699/VJ19.560 (in Russian)

Введение

Значительный ущерб посевам пшеницы среди насекомых-вредителей наносит злаковая тля (*Schizaphis graminum*) (Morkunas et al., 2011; Радченко, 2012). На сегодняшний день повышение устойчивости зерновых культур к тлям является одной из первостепенных задач как науки, так и практики. Один из подходов решения этой проблемы – селекция устойчивых генотипов растений. Однако генофонд *Triticum aestivum* L. относительно беден устойчивыми формами, поэтому возникает необходимость изучать дикорастущие виды пшеницы. Показано, что большинство образцов *T. monococcum* L. и *T. timopheevii* Zhuk. обладает комплексной устойчивостью к целому ряду вредителей и болезней (Радченко, 2012). Но для создания устойчивого сорта необходимо знание молекулярных механизмов устойчивости.

Защита растений от насекомых, питающихся флоэмным соком, обеспечивается за счет механизмов как специфической устойчивости по типу ген-на-ген, так и неспецифической резистентности, связанной с гормональными сигнальными системами растений (Morkunas et al., 2011; Радченко, 2012). В последнее время все большее внимание уделяется изучению механизмов индуцируемой (активной, по Н.И. Вавилову) устойчивости пшеницы к тлям. Индуцируемая неспецифическая устойчивость растений, развивающаяся против насекомых-фитофагов, регулируется гормональными сигнальными путями, включая жасмонат (ЖАК)-, этилен- и салицилат (СК)-сигнальные пути, что ведет к изменению экспрессии генов, синтезу защитных белков, различным ферментов, изменению редокс-метаболизма растений, повышению активности пероксидаз в апопласте, укреплению клеточных стенок растений и др. (War et al., 2012). Гормональные сигнальные пути не функционируют независимо друг от друга, но образуют сложную сеть взаимодействий, что играет важную роль в регуляции тонких механизмов защитных реакций растений (Morkunas et al., 2011). Показано, что заселение тлями запускало в растениях как ЖАК-, так и СК-зависимые защитные ответы (Morkunas et al., 2011; Kerchev et al., 2012). К сожалению, тонкие механизмы взаимодействия этих сигнальных путей при ответе растений на поражение тлями до конца не изучены. Активацию ЖАК-защитного пути наблюдали как у восприимчивых, так и у устойчивых растений, а индукция СК-защитного пути происходила быстрее и сильнее только у устойчивых генотипов (Morkunas et al., 2011).

Вместе с тем было продемонстрировано, что как ЖАК-, так и СК-сигнальный путь вызывали накопление активных форм кислорода (АФК), в частности пероксида водорода (H_2O_2) в растениях, заселенных тлей (Morkunas et al., 2011). Известно, что АФК являются главным сигналом растения на стрессовые факторы окружающей среды, а редокс-статус растения, заселенного тлей, – один из важных показателей устойчивости сорта (Morkunas et al., 2011; Koch et al., 2016). Окислительный взрыв при заселении тлями считается типичной реакцией формирования устойчивости растений к вредителю (Koch et al., 2016). Показано вовлечение АФК в ранний сигнальный ответ и регуляцию защитного ответа как по ЖАК-, так и по СК-сигнальному пути, но молекулярный механизм, лежащий в основе этих процессов, неизвестен (Kerchev et al., 2012).

Цель настоящей работы – обнаружение связи между редокс-статусом, показателями устойчивости растений пшеницы (антибиозом и выносливостью) к вредителю и индукцией ЖАК- и СК-сигнальных путей у представителей трех видов пшеницы, *Triticum aestivum*, *T. monococcum* и *T. timopheevii*, заселенных обыкновенной злаковой тлей (*Schizaphis graminum* Rond.).

Материалы и методы

Объекты исследования. Обыкновенную злаковую тлю (*Schizaphis graminum* Rond.) для экспериментов размножали на молодых проростках мягкой яровой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) сорта Салават Юлаев, выращенных в изолированных сосудах с прожаренной при 180 °С почвой в климатической камере КС-200 СПУ (Смоленский СКТЬ СПУ, Россия) с 16-часовым световым периодом при температуре 20/24 °С (ночь/день), интенсивность света 146 Вт/м² (лампы Osram L 36W/77). В экспериментах использовали восприимчивый сорт мягкой яровой пшеницы *T. aestivum* – Салават Юлаев (СЮ), а также один образец *T. monococcum* к-39471 и один образец *T. timopheevii* к-58666, из Всероссийского института генетических ресурсов растений им. Н.И. Вавилова (Санкт-Петербург).

Биохимические параметры. Для экспериментов трехсуточные проростки пшеницы, выращенные в изолированных пластиковых сосудах на водной культуре (10 % раствор Хогланда–Арнона) в условиях, описанных выше, заселяли тлями. Для этого одинаковое количество тлей разных возрастов стряхивали в каждый сосуд с растениями так, чтобы нагрузка на одно растение составляла 10 особей тлей (Радченко, 2008). Затем сосуды накрывали

пластиковыми изоляторами, затянутыми пористым нетканым материалом. Измерение генерации пероксида водорода (H_2O_2) и активность фермента пероксидазы (ПО) через 1, 3 и 10 сут после заселения проростков пшеницы *S. graminum* выполняли, как описано ранее (Веселова и др., 2016).

Тест на антибиоз. На трехсуточные всходы под изоляторы подсаживали личинок первого возраста из расчета одна особь на растение. Через 14 дней подсчитывали абсолютное количество живых тлей, а также число погибших взрослых особей и личинок (Радченко, 2008). Смертность выражали в процентах от общего количества тлей. Коэффициент размножения рассчитывали по формуле: $K = (\text{средняя плодовитость самки за время опыта}) / (\text{продолжительность опыта в днях})$ (Радченко, 2008).

Тест на выносливость растений. В возрасте трех суток измеряли длину проростков от уровня плотика до кончика листа, а затем каждое растение заселяли 20 бескрылыми самками и изолировали. Постоянную численность тлей поддерживали путем удаления через каждые 48 ч отрождающихся личинок в течение двух недель. В конце эксперимента повторно измеряли высоту первого и второго листьев растений, не заселенных и заселенных тлями, и результаты сравнивали с первоначальным измерением (Радченко, 2008). Выносливость выражали в виде процентов ингибирования роста листа по сравнению с незаселенным тлей контролем.

Транскрипционная активность генов. Выделение тотальной РНК из контрольных и опытных растений пшеницы, зафиксированных в жидком азоте, через 3 и 10 сут после заселения тлями, осуществляли с помощью реагента Trizol, согласно протоколу фирмы-поставщика (Sigma, Германия). Концентрацию нуклеиновых кислот измеряли при A260/A280 на спектрофотометре Smart Spec Plus (Bio-Rad, США). Для синтеза кДНК проводили реакцию обратной транскрипции с помощью M-MuLV обратной транскриптазы (Синтол, Россия). На основе кДНК выполняли ПЦР с праймерами, фланкирующими консервативные участки генов изучаемых PR-белков, в амплификаторе типа ТП4-ПЦР-01-«Тердик» (ДНК-Технология, Россия). В работе применяли праймеры к генам, кодирующим PR1-белок (*TaPr1*, AF384143) (Веселова и др., 2016), ингибиторы протеиназ (*TaPI*, EU293132.1), анионную пероксидазу (*TaPrx*, TC151917), НАДФН-оксидазу (*TaRboh*, HE674332) (Веселова и др., 2019), фенилаланин-амиаклиазу (*TaPAL*, X99725) (Ding et al., 2011), липоксигиназу (*TaLOX*, VJ223744) (Diallo et al., 2014). Для вычисления уровня нормализованной экспрессии генов использовали праймеры к гену конститутивно экспрессирующегося белка ингибитора РНКаз (RNase L inhibitor-like) (*TaRLI*, AY059462) (Веселова и др., 2016). Праймеры к этим генам были подобраны к *T. aestivum* L. В предварительных опытах с использованием данных праймеров получены гомологичные гены у *T. monococcum* и *T. timopheevii*. Известно, что у представителей первичного (например, *T. monococcum*, *Ae. tauschii* Coss., *T. spelta* L., *T. compactum* Host., *T. durum* Desf., *T. dicoccum* (Schrank.) Schuebl.) и вторичного (*T. timopheevii*, *T. araraticum* Jakubz., *Ae. speltoides* Tausch., *Ae. sharonensis* Eig, *Ae. longissima* Schw. et Musch.) генофондов содержатся геномы с высокой или частич-

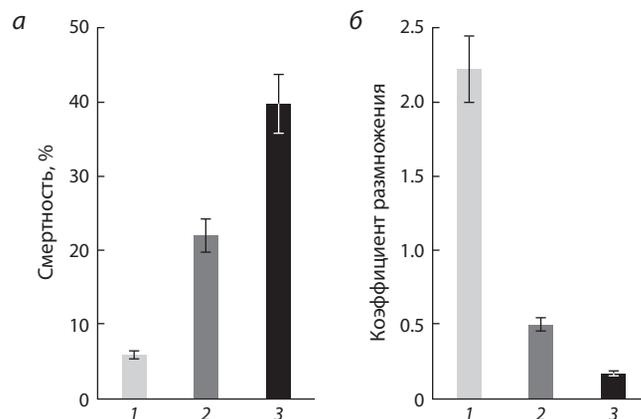


Рис. 1. Показатели смертности (а) и размножения (б) обыкновенной злаковой тли *S. graminum* на разных видах пшеницы.

1 – *Triticum aestivum* сорт Салават Юлаев; 2 – образец *T. timopheevii* к-58666; 3 – образец *T. monococcum* к-39471.

ной гомологией с геномами А, В и D мягкой пшеницы *T. aestivum* (Chaudhary et al., 2014).

Статическая обработка. Все эксперименты повторяли три раза и проводили в трех биологических и трех аналитических повторностях (общее $n = 9$), кроме тестов на антибиоз и выносливость, где эксперименты включали не менее 10 биологических повторов (общее $n = 30$). Средние арифметические значения и их доверительные интервалы, рассчитанные по стандартным ошибкам, представлены на рис. 1–4 и в табл. 1–2. Достоверность различий между вариантами опыта оценивали по t -критерию Стьюдента при доверительном уровне $p \leq 0.05$.

Результаты

Показатели толерантности вида или сорта. Исследовано два типа устойчивости растений к тлям – антибиоз и выносливость. Тест на антибиоз показал, что тли, кормившиеся на сорте СЮ, проявляли наименьшую смертность и самый высокий коэффициент размножения (рис. 1, а, б), т.е. этот сорт был восприимчив к обыкновенной злаковой тле. Смертность тлей на образце *T. timopheevii* к-58666 была примерно в 3–4 раза выше, а коэффициент размножения – в 4–5 раз ниже, чем у тлей, кормившихся на восприимчивом сорте (см. рис. 1, а, б). Однако больше всего на жизнеспособность тлей повлиял образец *T. monococcum* к-39471, так как у заселенных на нем тлей были обнаружены самая высокая смертность и самый низкий коэффициент размножения (см. рис. 1, а, б). *T. monococcum* к-39471 оказался самым устойчивым среди изученных образцов.

В наших экспериментах установлена низкая выносливость сорта СЮ по отношению к *S. graminum*, проявившаяся в сильном ингибировании роста 1-го и 2-го листьев (табл. 1). Образец *T. timopheevii* к-58666 показал среднюю выносливость к обыкновенной злаковой тле (см. табл. 1). Наиболее толерантным оказался образец *T. monococcum* к-39471, так как заселение тлями не ингибировало рост 1-го листа, торможение роста 2-го листа было минимальным (см. табл. 1).

Таблица 1. Показатели выносливости растений пшеницы разных видов *Triticum* spp., заселенных обыкновенной злаковой тлей *S. graminum*

Вид пшеницы	Ингибирование роста, %	
	1-го листа	2-го листа
<i>Triticum aestivum</i> – СЮ	25.8±6.1	45.0±3.7
<i>T. timopheevii</i> – к-58666	12.3±6.6	22.6±4.2
<i>T. monococtum</i> – к-39471	0.1±2.4	7.6±2.8

Таблица 2. Влияние обыкновенной злаковой тли *S. graminum* на содержание H₂O₂ и активность пероксидазы в листьях трех видов пшеницы *Triticum* spp. на разных стадиях кормления

Вариант опыта	Время после заселения, сут		
	1	3	10
Содержание H ₂ O ₂ , мкМ H ₂ O ₂ /г сырой массы			
СЮ	25.2±5.6	26.8±1.7	26.3±2.7
СЮ + <i>S. graminum</i>	12.6±1.3	19.0±2.4	27.0±1.1
к-58666	27.8±5.3	28.9±2.8	22.9±1.7
к-58666 + <i>S. graminum</i>	58.7±5.5	48.6±4.5	28.0±3.3
к-39471	28.2±3.6	28.7±3.1	28.8±1.1
к-39471 + <i>S. graminum</i>	53.7±5.3	20.4±3.0	12.0±1.2
Активность пероксидазы, оп. ед./мг белка мин			
СЮ	30.4±0.7	29.0±0.4	30.3±1.8
СЮ + <i>S. graminum</i>	26.1±1.0	25.8±0.6	28.8±1.2
к-58666	29.6±0.4	31.4±0.8	28.7±1.7
к-58666 + <i>S. graminum</i>	35.7±1.2	36.0±0.3	57.1±2.2
к-39471	23.6±0.5	32.1±1.1	30.2±1.2
к-39471 + <i>S. graminum</i>	43.2±1.4	60.5±2.6	90.7±3.4

Редокс-статус заселенных тлей растений. Заселение восприимчивого сорта СЮ тлями приводило к уменьшению содержания H₂O₂ на начальных этапах кормления – первые и третьи сутки (табл. 2). Напротив, у устойчивых растений пшеницы *T. timopheevii* к-58666 обнаружено повышение содержания H₂O₂ во время ранних ответных реакций после заселения тлей (см. табл. 2). У толерантного к *S. graminum* образца *T. monococtum* к-39471 наблюдали резкое накопление H₂O₂ к 1-м суткам после заселения тлей и снижение генерации H₂O₂ к 3-м суткам кормления (см. табл. 2). На 10-е сутки после заселения тлей содержание H₂O₂ оставалось на уровне контрольных растений у восприимчивого сорта СЮ и образца *T. timopheevii* к-58666 и достаточно сильно снижалось у устойчивого образца *T. monococtum* к-39471 (см. табл. 2).

Во время ранних ответных реакций после заселения тлей (1-е–3-и сутки) у устойчивых к *S. graminum* образцов *T. timopheevii* к-58666 и *T. monococtum* к-39471 на фоне повышенной генерации H₂O₂ обнаружено увеличение активности ПО (см. табл. 2). Через 10 сут после заселения тлей активность ПО у устойчивых генотипов продолжала повышаться, особенно у образца *T. monococtum* к-39471 (см. табл. 2). Напротив, у восприимчивого сорта пшеницы СЮ как в начальный период кормления, так и через 10 сут после заселения тлей на фоне пониженного содержания H₂O₂ не обнаружено увеличения активности ПО (см. табл. 2).

Транскрипционная активность генов, связанных с редокс-метаболизмом. Во время ранних ответных реакций после заселения тлей (3 сут) содержание мРНК гена *Rboh* повышалось у устойчивых образцов *T. timopheevii* к-58666 и *T. monococtum* к-39471, но не увеличивалось у восприимчивого сорта СЮ (рис. 2, а). Во время долгосрочных ответных реакций после заселения тлей (10 сут), напротив, содержание транскриптов гена *Rboh* возрастало только у восприимчивого сорта СЮ, а у устойчивых образцов снижалось примерно в два раза (см. рис. 2, а). Содержание мРНК гена *Prx* у восприимчивого сорта СЮ

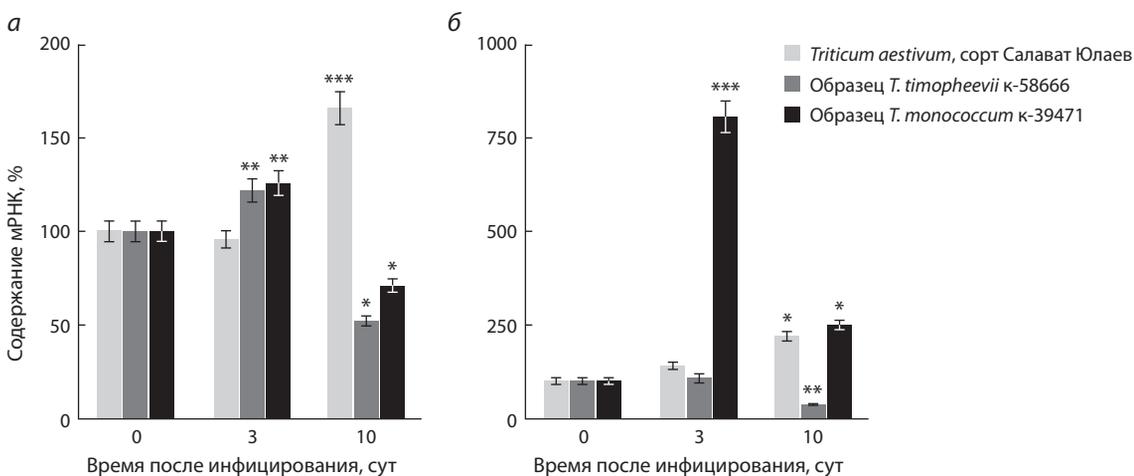


Рис. 2. Влияние обыкновенной злаковой тли *S. graminum* на содержание мРНК генов *Rboh* (а) и *Prx* (б) в листьях трех видов пшеницы *Triticum* spp. на разных стадиях кормления.

Звездочки показывают статистически достоверные отличия от контрольной группы; разное количество звездочек – статистически достоверные различия между вариантами при $p \leq 0.05$.

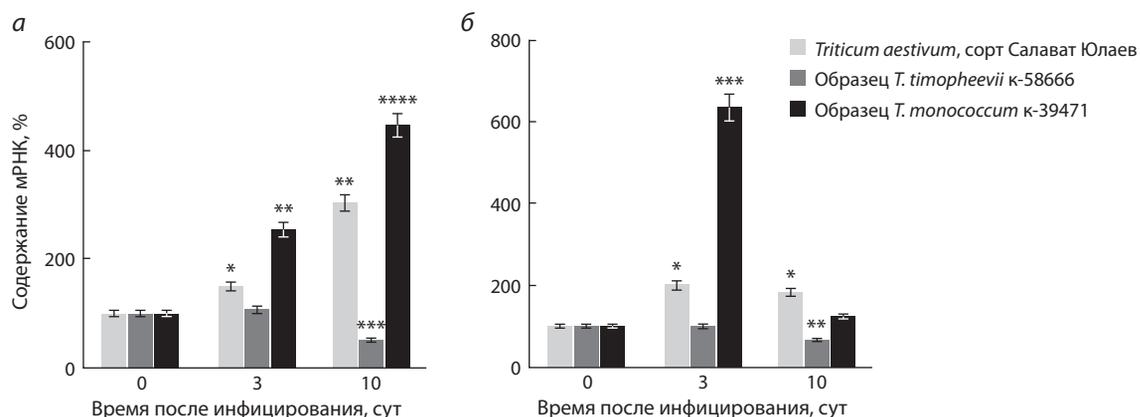


Рис. 3. Влияние обыкновенной злаковой тли *S. graminum* на содержание мРНК генов *LOX* (а) и *PI* (б) в листьях трех видов пшеницы *Triticum* spp. на разных стадиях кормления. Обозначения см. на рис. 2.

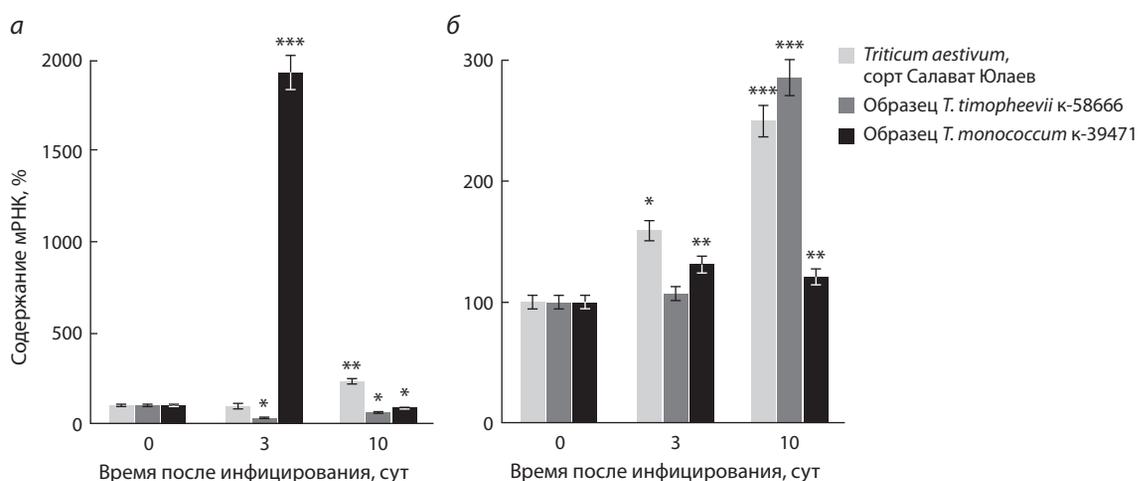


Рис. 4. Влияние обыкновенной злаковой тли *S. graminum* на содержание мРНК генов *Pr1* (а) и *PAL* (б) в листьях трех видов пшеницы *Triticum* spp. на разных стадиях кормления. Обозначения см. на рис. 2.

повышалось незначительно, а у образца *T. timopheevii* к-58666 снижалось в течение всего эксперимента (см. рис. 2, б). У образца *T. monosocum* к-39471 обнаружено значительное увеличение мРНК гена *Prx*: через 3 сут после заселения тлей – в 8 раз, а через 10 сут – в три раза (см. рис. 2, б).

Транскрипционная активность генов, регулируемых ЖАК-зависимым сигнальным каскадом. У восприимчивого сорта СЮ повышение содержания транскриптов генов *LOX*, *PI*, регулируемых ЖАК-сигнальным каскадом, наблюдали как через 3 сут, так и через 10 сут после заселения тлей (рис. 3, а, б). У устойчивого образца *T. timopheevii* к-58666 транскрипция изученных генов не повышалась, а к 10-м сут даже снижалась (см. рис. 3, а, б). У устойчивого образца *T. monosocum* к-39471 обнаружено значительное повышение мРНК генов ЖАК-сигнального пути (*LOX*, *PI*) уже через 3 сут после заселения тлей: гена *LOX* – в 2.5 раза, гена *PI* – в 6.4 раза (рис. 3, а, б). Через 10 сут инфицирования у данного образца обнаружено значительное накопление транскриптов только гена *LOX* – в 3.7 раза (рис. 3, а).

Транскрипционная активность генов, регулируемых СК-зависимым сигнальным каскадом. У восприимчивого сорта СЮ двукратное накопление транскриптов гена *Pr1* обнаружено только через 10 сут после заселения тлей (рис. 4, а). У устойчивого образца *T. timopheevii* к-58666 транскрипция главного гена СК-сигнального пути несколько снижалась в течение всего эксперимента (см. рис. 4, а). Напротив, у устойчивого образца *T. monosocum* к-39471, проявившего наибольшую выносливость, обнаружено значительное 20-кратное повышение мРНК гена *Pr1* уже через 3 сут после заселения тлей (см. рис. 4, а). Характер изменения содержания транскриптов гена *PAL* у восприимчивого сорта СЮ и устойчивого образца *T. timopheevii* к-58666 был одинаковым: повышение содержания мРНК на 20–50 % на 3-и сутки инфицирования и почти трехкратное увеличение транскриптов через 10 сут кормления тлей (см. рис. 4, б). У устойчивого образца *T. monosocum* к-39471 обнаружено небольшое повышение транскрипции изученного гена на 20–30 % по сравнению с незаселенным контролем в течение всего эксперимента (см. рис. 4, б).

Обсуждение

При изучении механизмов формирования устойчивости растений к насекомым, питающимся флоэмным соком, важно различать быстрые ответы, обнаруживающиеся у растений в течение первых пяти дней, и долгосрочные ответы, проявляющиеся после десяти дней заселения вредителем (Koch et al., 2016). Быстрые ответы устойчивых растений характеризуются усилением генерации АФК и активацией базального иммунитета. При этом защитная роль повышенной генерации АФК в растениях в ответ на заселение тлями заключается как в их сигнальной функции, запускающей системную устойчивость (Morkunas et al., 2011), так и в прямом повреждающем действии высоких концентраций H_2O_2 на тлей, приводящем к подавлению выживаемости вредителя (Morkunas et al., 2011; War et al., 2012; Koch et al., 2016). При долгосрочных ответах индуцированные ранним ответом защитные системы растения запускают систему детоксикации АФК и восстановления роста (Koch et al., 2016).

Наши результаты показали, что *T. monosocum* к-39471 был самым устойчивым среди изученных образцов к обыкновенной злаковой тле *S. graminum*. Это совпадает с данными литературы о резистентности многочисленных образцов *T. monosocum* к разным видам тлей (Радченко, 2012). Образец *T. timopheevii* к-58666 обладал средней устойчивостью к вредителю. В литературе имеются противоречивые сведения о проявлениях этого показателя у пшениц вида *T. timopheevii* к различным видам злаковых тлей, однако в основном этот вид пшениц проявляет резистентность к вредителю и слабо заселяется тлями (Радченко, 2012).

У устойчивых образцов *T. timopheevii* к-58666 и *T. monosocum* к-39471 обнаружены повышения генерации H_2O_2 во время ранних ответных реакций после заселения вредителем и снижение данного показателя на позднем этапе заселения тлей (табл. 2), что приводило к высокой смертности тлей (см. рис. 1) и достаточно большой выносливости растений (см. табл. 1). У восприимчивых растений пшеницы сорта СЮ наблюдали подавление окислительного взрыва во время ранних ответных реакций после заселения вредителем и отсутствие снижения содержания H_2O_2 во время долгосрочных ответных реакций после заселения тлей (см. табл. 2), что обуславливало высокую плодовитость насекомого (см. рис. 1) и низкой выносливости растений (см. табл. 1). Так, на растениях ячменя, колонизированных ячменной тлей *Diuraphis plexis*, и на растениях арабидопсиса, заселенных персиковой тлей *Myzus persicae*, окислительный взрыв был обнаружен только у устойчивых, а не у восприимчивых форм растений (Lei, Zhu-Salzman, 2015).

Повышение генерации H_2O_2 у устойчивых форм пшеницы в наших экспериментах, скорее всего, обеспечивалось за счет увеличения транскрипционной активности генов *Rboh* и *Prx* (см. рис. 2), что было показано ранее на примере патосистемы пшеница–*Staganospora nodorum* (Веселова и др., 2018). Кроме того, с помощью мутантных растений арабидопсиса, лишенных гена *RbohD*, было показано, что НАДФН-оксидаза играла ключевую роль в генерации АФК при повреждении растений тлями (Kerchev et al., 2012).

Окислительный взрыв индуцирует иммунный ответ растения, однако излишнее количество АФК ингибирует фотосинтез, тормозит ростовые процессы и может привести к повреждениям в клетке, поэтому у толерантных растений запускается механизм детоксикации АФК, в котором участвуют антиоксидантные ферменты, такие как ПО и др. (Koch et al., 2016). В наших экспериментах у устойчивых образцов *T. timopheevii* к-58666 и *T. monosocum* к-39471 активность ПО начала повышаться уже во время ранних ответных реакций после заселения тлей, на фоне повышенного содержания H_2O_2 , и продолжала повышаться во время долгосрочных ответных реакций (см. табл. 2). Эти результаты могут говорить о вовлечении H_2O_2 и ПО в синтез токсичных фенольных соединений и реорганизацию клеточных стенок растений за счет лигнификации, что может быть причиной снижения жизнеспособности вредителя (Morkunas et al., 2011; War et al., 2012; Koch et al., 2016), которое было выявлено у устойчивых образцов в наших экспериментах (см. рис. 1). У восприимчивого сорта СЮ не обнаружено повышения активности ПО как при ранних ответных реакциях, так и во время долгосрочных ответных реакций после заселения тлей (см. табл. 2).

Таким образом, активация пероксидаз может играть решающую роль в развитии устойчивости растений к тлям за счет детоксикации больших количеств АФК (War et al., 2012; Koch et al., 2016). Кроме того, молекула H_2O_2 при защите растений от тлей выполняет также сигнальную функцию, активируя и регулируя гормональные сигнальные пути при развитии системной устойчивости (Kerchev et al., 2012). Первичным фактором, индуцирующим защитный ответ растений на заселение тлями, считается механическое поранение, включающее ЖАК-зависимую активацию ингибиторов протеиназ и липоксигеназ (Morkunas et al., 2011). Затем растение отвечает на химические детерминанты, содержащиеся в слюне тлей, и индуцирует защитный ответ, схожий с реакцией растений на биотрофные фитопатогены, при этом запускается СК-зависимый сигнальный каскад (Morkunas et al., 2011). Из изученных в нашей работе генов защитных белков гены *Pr1* и *PAL* индуцировались СК-зависимым сигнальным каскадом (Van Loon et al., 2006). Нужно отметить, что ген *Rboh* также регулировался СК-зависимым сигнальным каскадом (Kerchev et al., 2012). Гены *PI* и *LOX* запускались ЖАК-зависимым сигнальным каскадом (Van Loon et al., 2006). Ген *Prx*, кодирующий анионную ПО, запускался и при формировании ЖАК- и СК-зависимых защитных реакций (Van Loon et al., 2006).

В нашей работе у устойчивого образца *T. timopheevii* к-58666 как на раннем, так и на позднем этапе кормления повышалось содержание транскриптов генов *Rboh* и *PAL*, регулируемых только СК-зависимым сигнальным путем (см. рис. 2, а, 3, б), на фоне повышенной генерации H_2O_2 во время ранних ответных реакций и высокой активности ПО (см. табл. 2). Эти результаты предполагают вовлечение фермента фенилаланин-аммиак-лиазы (ген *PAL*), основного фермента фенилпропаноидного пути, в синтез лигнина и фенольных соединений, в том числе СК. Следует отметить, что лигнификация клеточных стенок растений осуществляется только при активации апопластных пероксидаз на фоне высокого содержания H_2O_2 (Herrero

et al., 2013). Помимо этого, запуск СК-сигнального пути, вероятно, является совместным механизмом антибиоза и отпугивания тлей у устойчивых форм растений (Morkunas et al., 2011).

У устойчивого образца *T. monococtum* к-39471 уже во время ранних ответных реакций после заселения тлей значительно увеличивалась концентрация мРНК всех изученных генов, регулируемых как СК-, так и ЖАК-зависимым сигнальным каскадом (см. рис. 2–4). Во время долгосрочных ответных реакций после заселения тлей содержание транскриптов некоторых генов уменьшалось, однако концентрация мРНК гена *LOX* продолжала повышаться (см. рис. 2–4). Наиболее важная функция липоксигеназы в защите растений от вредителей – окисление линоленовой кислоты с последующим синтезом ЖАК и активацией работы ЖАК-сигнальной системы, что приводит к синтезу ингибиторов протеаз и ферментов синтеза лигнина, суберина и кутина, а также генерации летучих органических соединений, действующих на насекомых как репелленты (Wasternack, Strnad, 2018). Ингибиторы протеиназы связываются с пищеварительными ферментами в кишечнике насекомых и ингибируют их активность, тем самым уменьшая переваривание белка, приводя к нехватке аминокислот, медленному развитию и голоду насекомых (War et al., 2018). Однако именно индукция генов СК-зависимого сигнального пути (*Pr1*, *PAL*, *Rboh* и *Prx*) обеспечивала окислительный взрыв во время ранних ответных реакций после заселения тлей, запускающий каскад последующих защитных ответов растений против тлей. Скорее всего, это происходило за счет направленного снижения активности каталазы вследствие связывания СК с каталазой и ингибирования ее активности (Mohase, van der Westhuizen, 2002). Известно, что некоторые виды тлей повышают активность этого фермента для уменьшения окислительного взрыва и обеспечения благоприятных условий для своей жизнедеятельности (Lei, Zhu-Salzman, 2015). Кроме того, ранее нами было показано, что высокое содержание H_2O_2 у устойчивых образцов *T. timopheevii* к-58666 и *T. monococtum* к-39471 обеспечивалось, в том числе за счет пониженной активности каталазы (Румянцев и др., 2018).

У восприимчивого сорта Сю во время ранних ответных реакций после заселения тлей на фоне пониженного содержания H_2O_2 не обнаружено какого-либо значительного повышения содержания транскриптов генов, регулируемых СК-зависимым сигнальным каскадом, кроме небольшого повышения содержания мРНК гена *PAL* (см. рис. 2, 3). Однако обнаружено повышение содержания транскриптов генов *LOX* и *PI*, регулируемых ЖАК-сигнальным каскадом (см. рис. 4), что, скорее всего, отражало реакцию растения на повреждение (Morkunas et al., 2011). Во время долгосрочных ответных реакций после заселения тлей у восприимчивого сорта активировались гены как ЖАК-, так и СК-сигнального пути, однако отсутствие окислительного взрыва, по-видимому, не позволило запустить каскад защитных реакций.

Заключение

Таким образом, индукция окислительного взрыва у устойчивых форм пшеницы происходила благодаря запуску

СК-сигнального пути, что имело решающее значение в дальнейшем каскаде химических реакций, ведущих к развитию устойчивости. Немаловажным в развитии защитных реакций и взаимодействии гормональных сигнальных систем СК и ЖАК оказался временной фактор. Индукция только ЖАК-сигнального пути не обуславливала развитие устойчивости, тогда как запуск СК-защитного пути отдельно или вместе с ЖАК-сигнальным каскадом приводил к развитию устойчивости у образцов *T. timopheevii* к-58666 и *T. monococtum* к-39471 соответственно.

Список литературы / References

- Веселова С.В., Бурханова Г.Ф., Нужная Т.В., Максимов И.В. Роль этилена и цитокининов в развитии защитных реакций в растениях *Triticum aestivum*, инфицированных *Septoria nodorum*. Физиол. раст. 2016;63(5):649-660.
- [Veselova S.V., Burkhanova G.F., Nuzhnaya T.V., Maksimov I.V. Roles of ethylene and cytokinins in development of defense responses in *Triticum aestivum* plants infected with *Septoria nodorum*. Russ. J. Plant Physiol. 2016;63(5):609-619. DOI 10.1134/S1021443716050150.]
- Веселова С.В., Бурханова Г.Ф., Нужная Т.В., Максимов И.В. Роль НАДФН-оксидазного сигнального каскада в развитии устойчивости мягкой яровой пшеницы к возбудителю септориоза *Stagonospora nodorum* Berk. Изв. Уфимского научного центра РАН. 2018;3(1):66-74. DOI 10.31040/2222-8349-2018-1-3-66-74.
- [Veselova S.V., Burkhanova G.F., Nuzhnaya T.V., Maksimov I.V. Effect of NADPH oxidases cascade on mechanisms regulating defense common wheat reactions under the disease *Stagonospora nodorum* Blotch. Izvestiya Ufmskogo Nauchnogo Tsentra RAN = Proceedings of the RAS Ufa Scientific Centre. 2018;3(1):66-74. DOI 10.31040/2222-8349-2018-1-3-66-74. (in Russian)]
- Веселова С.В., Бурханова Г.Ф., Румянцев С.Д., Благова Д.К., Максимов И.В. Бактерии рода *Bacillus* в регуляции устойчивости пшеницы к *Schizaphis graminum*. Прикл. биохимия и микробиология. 2019;55(1):56-63. DOI 10.1134/S0555109919010185.
- [Veselova S.V., Burkhanova G.F., Rumyantsev S.D., Blagova D.K., Maksimov I.V. Strain of *Bacillus* spp. regulate wheat resistance to greenbug aphid *Schizaphis graminum* Rond. Appl. Biochem. Microbiol. 2019;55(1):41-47. DOI 10.1134/S0003683819010186.]
- Радченко Е.Е. Злаковые тли. Изучение генетических ресурсов зерновых культур по устойчивости к вредным организмам. М.: Россельхозакадемия, 2008;214-257.
- [Radchenko E.E. Cereal aphids. In: The Study of the Genetic Resources of Cereal Crops for Pest Resistance. Moscow: Rossel'khozakademiya Publ., 2008;214-257. (in Russian)]
- Радченко Е.Е. Учение Н.И. Вавилова о естественном иммунитете растений к вредным организмам и селекция зерновых культур на устойчивость к тлям. С.-х. биология. 2012;47(5):54-63.
- [Radchenko E.E. N.I. Vavilov's theory on natural immunity of plants to harmful organisms and breeding of cereal crops for aphid resistance. Selskokhozyaystvennaya Biologiya = Agricultural Biology. 2012;47(5):54-63. DOI 10.15389/agrobiol.2012.5.54rus. (in Russian)]
- Румянцев С.Д., Веселова С.В., Черепанова Е.А., Максимов И.В. Устойчивость различных видов пшеницы к обыкновенной злаковой тле *Schizaphis graminum* Rond. Изв. Уфимского научного центра РАН. 2018;3(5):18-24. DOI 10.31040/2222-8349-2018-5-3-18-24.
- [Rumyantsev S.D., Veselova S.V., Cherepanova E.A., Maksimov I.V. The resistance of different wheat species to greenbug aphid *Schizaphis graminum* Rond. Izvestiya Ufmskogo Nauchnogo Tsentra RAN = Proceedings of the RAS Ufa Scientific Centre. 2018;3(5):18-24. DOI 10.31040/2222-8349-2018-5-3-18-24. (in Russian)]
- Chaudhary H.K., Kaila V., Rather S.A., Badiyal A., Hussain W., Jambwal N.S., Mahato A. Wheat. In: Pratap A., Kumar J. (Eds.). Alien

- Gene Transfer in Crop Plants. Vol. 2. Achievements and Impacts. New York: Springer-Verlag, 2014;1-27. DOI 10.1007/978-1-46149572-7_1.
- Diallo A.O., Agharbaoui Z., Badawi M.A., Ali-Benali M.A., Moheb A., Houde M., Sarhan F. Transcriptome analysis of an mvp mutant reveals important changes in global gene expression and a role for methyl jasmonate in vernalization and flowering in wheat. *J. Exp. Bot.* 2014;65(9):2271-2286. DOI 10.1093/jxb/eru102.
- Ding L., Xu H., Yu H., Yang L., Kong Z., Zhang L., Xue S., Jia H., Ma Z. Resistance to hemi-biotrophic *F. graminearum* infection is associated with coordinated and ordered expression of diverse defense signaling pathways. *PLoS One.* 2011;6(4):e19008. DOI 10.1371/journal.pone.0019008.
- Herrero J., Esteban-Carrasco A., Zapata J.M. Looking for *Arabidopsis thaliana* peroxidases involved in lignin biosynthesis. *Plant Physiol. Biochem.* 2013;67:77-86. DOI 10.1016/j.plaphy.2013.02.019.
- Kerchev P.I., Fenton B., Foyer C.H., Hancock R.D. Plant responses to insect herbivory: interactions between photosynthesis, reactive oxygen species and hormonal signalling pathways. *Plant Cell Environ.* 2012;35(2):441-453. DOI 10.1111/j.1365-3040.2011.02399.x.
- Koch K.G., Chapman K., Louis J., Heng-Moss T., Sarath G. Plant tolerance: a unique approach to control hemipteran pests. *Front. Plant Sci.* 2016;7:1363. DOI 10.3389/fpls.2016.01363.
- Lei J., Zhu-Salzman K. Enhanced aphid detoxification when confronted by a host with elevated ROS production. *Plant Signal. Behav.* 2015;10(4):e1010936. DOI 10.1080/15592324.2015.1010936.
- Mohase L., van der Westhuizen A.J. Salicylic acid is involved in resistance responses in the Russian wheat aphid – wheat interaction. *J. Plant Physiol.* 2002;159(6):585-590. DOI 10.1078/0176-1617-0633.
- Morkunas I., Mai V.C., Gabrys B. Phytohormonal signaling in plant responses to aphid feeding. *Acta Physiol. Plant.* 2011;33(6):2057-2073. DOI 10.1007/s11738-011-0751-7.
- van Loon L.C., Rep M., Pieterse C.M. Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annu. Rev. Phytopathol.* 2006;44:135-162. DOI 10.1146/annurev.phyto.44.070505.143425.
- War A.R., Paulraj M.G., Ahmad T., Buhroo A.A., Hussain B., Ignaci-muthu S., Sharma H.C. Mechanisms of plant defense against insect herbivores. *Plant Signal. Behav.* 2012;7(10):1306-1320. DOI 10.4161/psb.21663.
- War A.R., Taggar G.K., Hussain B., Taggar M.S., Nair R.M., Sharma H.C. Plant defence against herbivory and insect adaptations. *AoB Plants.* 2018;10:ply037. DOI 10.1093/aobpla/ply037.
- Wasternack C., Strnad M. Jasmonates: news on occurrence, biosynthesis, metabolism and action of an ancient group of signaling compounds. *Int. J. Mol. Sci.* 2018;19(9):pii: E2539. DOI 10.3390/ijms19092539.

ORCID ID

S.D. Rumyantsev orcid.org/0000-0002-5331-448X
S.V. Veselova orcid.org/0000-0002-1219-2383
G.F. Burkhanova orcid.org/0000-0003-2346-3502
I.V. Maksimov orcid.org/0000-0002-5707-3265

Благодарности. Работа выполнена в рамках госзадания по теме № AAAA-A16-116020350027-7 и частично – по теме № AAAA-A19-119021190011-0 с использованием оборудования ЦКП «Биомика» (Отделение биохимических методов исследований и нанобиотехнологии, Региональный центр коллективного пользования «Агидель») и уникальной научной установки «КОДИНК».

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 01.06.2019. После доработки 26.07.2019. Принята к публикации 29.07.2019.