

Перспектива использования ингибиторного барьера в селекции картофеля на устойчивость к колорадскому жуку

И. С. Марданшин^{1✉}, И. А. Шпирная², Л. И. Пусенкова¹

¹ Башкирский научно-исследовательский институт сельского хозяйства Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук, Уфа, Россия

² Башкирский государственный университет, Уфа, Россия

✉ E-mail: ildar.mardanshin1966@yandex.ru

Аннотация. Цель работы – определение наиболее эффективного способа использования ингибиторного барьера в селекции картофеля на устойчивость к повреждению колорадским жуком. **Методы.** В работе использован метод закладки полевого опыта. Лабораторную оценку ингибирования активности липаз и протеиназ проводили с использованием субстратов, иммобилизованных в агарозном геле. **Результаты.** На основе проведения полевых опытов установлено, что уровень относительной устойчивости сортов и гибридов картофеля к повреждению колорадским жуком, снижение выживаемости личинок насекомого и потерь урожая клубней ассоциируются с высокой активностью растительных ингибиторов липаз и протеиназ кишечника личинок колорадского жука и интенсивным развитием реакции сверхчувствительности (СВЧ-реакции) листьев картофеля на кладки яиц фитофага. В лабораторных опытах установлен факт повышения активности ингибиторов трипсина при кладке яиц фитофага на листья картофеля сорта Башкирский. **Научная новизна.** На основе анализа результатов собственных многолетних попыток использования ингибиторного барьера в селекции картофеля на устойчивость к вредителю предложен новый подход вовлечения генов, кодирующих синтез и накопление в тканях ингибиторов протеаз и липаз. Методический подход при этом должен основываться на регистрации модификации ингибиторной активности гидролаз у гибридов, имеющих интенсивную СВЧ-реакцию листовой ткани на кладки колорадского жука, что значительно снизит объем проведения лабораторной оценки материала. Гибриды, не отвечающие на кладки яиц СВЧ-реакцией, с высокой вероятностью также не будут модифицировать активность ингибиторов гидролаз. Генотипы с локальным кратковременным накоплением ингибиторов липопротеиназного комплекса в зоне отрождения потомства вредителя создают наибольший депрессирующий биологический эффект для выживаемости личинок 1–2-го возраста. Создание подобных генотипов, вероятно, будет перспективной моделью высоко устойчивых к колорадскому жуку сортов.

Ключевые слова: селекция картофеля, устойчивость к вредителям, ингибиторы гидролаз.

Для цитирования: Марданшин И. С., Шпирная И. А., Пусенкова Л. И. Перспектива использования ингибиторного барьера в селекции картофеля на устойчивость к колорадскому жуку // Аграрный вестник Урала. 2022. № 02 (217). С. 2–11. DOI: 10.32417/1997-4868-2022-217-02-2-11.

Дата поступления статьи: 03.11.2021, **дата рецензирования:** 15.12.2021, **дата принятия:** 25.12.2021.

Постановка проблемы (Introduction)

Производство картофеля в Российской Федерации в последние годы находится на уровне 19–22 млн тонн и сильно колеблется по годам. Одной из основных причин стагнации производства культуры является ухудшение фитосанитарной обстановки на полях картофеля. Наряду с другими вредными факторами серьезной проблемой для картофелеводства страны до сих пор остается колорадский картофельный жук (*Leptinotarsa decemlineata* Say) [1, с. 9]. Данный вредитель широко распро-

странился по территории страны после 1975 года, быстро приспосабливается к применяемым инсектицидам, значительно снижая урожай картофеля (до 55 %). Ежегодные вспышки численности насекомых приводят к потерям урожая, особенно страдают посадки культуры на приусадебных участках населения. Применение для контроля численности вредителя химических инсектицидов приводит к загрязнению как окружающей среды, так и конечной продукции, что несет с собой угрозу здоровью нации и безопасности страны.

Высокий уровень резистентности колорадского жука к большинству инсектицидов актуализирует создание высокоустойчивых к насекомому сортов, способных обеспечивать урожай клубней при минимальном уровне химической защиты. Одним из перспективных и экологически безопасных способов создания устойчивости у растений к повреждению насекомыми является использование ингибиторного барьера. Нарушение физиологии пищеварения колорадского жука защитными белками растений является значимым фактором при разработке инновационных методов борьбы с важнейшим вредителем картофеля. **Целью настоящего исследования** является определение наиболее эффективного способа использования ингибиторного защитного барьера в селекции картофеля на устойчивость к повреждению колорадским жуком.

Ингибиторный барьер в виде специфических белков, блокирующих активность пищеварительных ферментов насекомого, является важной составной частью защитных механизмов растений. Большинство ингибиторов гидролаз растений активны лишь по отношению к экзогенным ферментам, что позволяет рассматривать их в качестве защитных факторов по отношению к вредителям [2, с. 441]. Имеются данные о корреляции между активностью ингибиторов трипсина и хомотрипсина и устойчивостью сорта картофеля к колорадскому жуку [3, с. 10]. Значительный вклад в понимание влияния ингибиторов, выделяемых картофелем на гидролазы пищеварительного тракта колорадского жука, внесли исследования других ферментов. Нарушение ингибитором α -амилазы усвоения пищи и пищеварительной активности у колорадского жука приводит к значительному повышению смертности личинок и гиперпродукции этого фермента у личинок после линьки [4, с. 149–152]. Установлено, что ингибиторы сериновых протеиназ оризацистатин I и II эффективно снижают показатели жизнеспособности личинок только при совместной экспрессии [5, с. 775]. Имеется много работ по генетической модификации растений со сверхэкспрессией ингибиторов гидролитических ферментов насекомого. Но, к сожалению, ингибиторы гидролаз растений пока остаются «многообещающим инсектицидом XX века с ограниченным успехом» [6, с. 188]. Главной причиной этого является наблюдаемая быстрая (в течение нескольких дней) адаптация насекомого к трансформированному пищеварительному субстрату, что осложняет создание устойчивости к насекомым этим методом [7, с. 14–16]. Необходимо отметить, что протеолитические ферменты личинок колорадского жука обладают широкой субстратной специфичностью и насекомое преодолевает ингибиторный барьер за счет выработки нечувствительных к действию ингибиторов трипсина – цистеиновых протеиназ [8, с. 8; 9, с. 6].

Попытки использовать в создании относительно устойчивых к колорадскому жуку генотипов картофеля данные о повышенной активности в листьях растений ингибиторов гидролаз пока не привели к ожидаемому результату. Напротив, при проведении нами на большом объеме гибридного материала определения в листьях генотипов картофеля ингибиторной активности трипсина в полевых условиях не было выявлено значимой положительной корреляционной зависимости с уровнем относительной устойчивости растений к повреждению колорадским жуком. Очевидно, что насекомые в ходе совместной эволюции выработали механизмы для преодоления данного защитного фактора. Вероятно, подход к использованию ингибиторного защитного барьера при создании устойчивости картофеля к колорадскому жуку требует совершенствования методики его воплощения в организме растений.

Методология и методы исследования (Methods)

Полевые опыты закладывались в климатических условиях Предуральской лесостепной зоны в Бирском научном подразделении Башкирского НИИСХ. В период проведения наблюдений (июнь – июль) в 2018 году фон среднесуточных температур находился в пределах 16,8–21,8 °С, сумма осадков составила 136 мм, которые выпадали равномерно. В 2019 г. фон среднесуточных температур находился на уровне 16,1–20,6 °С, сумма осадков составила 95 мм, они выпадали также относительно равномерно. Каждый сорт высаживался в количестве 20 растений в трехкратной повторности, расположение делянок рандомизированное. В опыте использованы сорта картофеля с разным уровнем относительной устойчивости к повреждению колорадским жуком. Сорта Невский и Луговской относительно неустойчивые к повреждению ботвы фитофагом, сорта Башкирский и Удача – среднеустойчивые, сорт Бурновский и гибрид 4292-149 (81.1.36 × Зарево) – устойчивые. Опыты размещались в паропропашном севообороте. Предшественник – озимое тритикале. Почва темно-серая лесная. Содержание гумуса – 4,9 %, обменного калия – 28 мг / 100 г почвы, содержание подвижного фосфора в почве по Чирикову – 19 мг/кг, рН – 5,8. Посадка картофеля проводилась в конце второй декады мая под лопату по схеме 70 × 35 см в предварительно нарезанные культиватором КОН-2,8 гребни. Уход за посадками состоял из одной дождевой, одной повсходовой междурядных обработок и окучивания перед смыканием рядков культиватором КОН-2,8. Растения свободно заселялись колорадским жуком, который питался листьями и откладывал на них яйца. Оценку устойчивости растений к повреждению фитофагом оценивали в баллах через семь суток после массового отрождения личинок вредителя по при-

нятой методике [10, с. 37]. Развитие СВЧ-реакции листьев на кладки колорадского жука определяли в момент отрождения личинок фитофага. Оценку интенсивности развития СВЧ-реакции проводили по разработанной нами оригинальной пятибалльной шкале: 0 баллов – отсутствие СВЧ-реакции, 1 балл – выпирание листовой пластинки в месте прикрепления кладки, 2 балла – развитие некроза на 25 % площади занимаемой кладкой, 3 балла – развитие некроза на 50 % площади занимаемой кладкой, 4 балла – развитие некроза на 100 % площади занимаемой кладкой, 5 баллов – прободение листовой пластинки в месте прикрепления кладки. По каждому сорту учет развития СВЧ-реакции проводился по 10 листьям.

Определение активности гидролитических ферментов и их ингибиторов гидролаз проводили с использованием субстратов, иммобилизованных в агарозном геле, согласно описанной ранее методике [11, с. 234].

Результаты (Results)

Для решения поставленной нами задачи первоначально было показано, что вредитель в нашей зоне характеризуется высокой пищевой активностью к картофелю, листья баклажана потребляет немного хуже, а листья томатов – плохо. Пищевую специализацию подтверждают данные изучения активности гидролитических ферментов в кишечнике личинок колорадского жука. При кормлении личинок насекомого листьями картофеля и баклажана значительно увеличивается уровень активности пищеварительных ферментов по сравнению с уровнем активности у контрольных личинок, находящихся в состоянии голодного ожидания. Полученные данные позволяют характеризовать популяцию колорадского жука в зоне проведения исследований как относительно однородную и хорошо адаптированную к питанию листьями растений картофеля. Результаты электрофореза аффинно очищенных протеиназ личинок колорадского жука показали, что фермент имеет пять молекулярных форм и их состав не зависит от типа потребляемого растительного субстрата [12, с. 32]. Наличие протеолитических ферментов важно для усвоения растительной пищи насекомыми-вредителями, поэтому они являются объектом атаки защитных систем растения. Известно, что при повреждении листьев томата и картофеля колорадским жуком в растениях наблюдается резкое повышение содержания ингибиторов трипсина и химотрипсина, а при длительном повреждении синтезируются также и ингибиторы цистеиновых и аспартатных протеиназ. У колорадского жука синтезируются протеазы, нечувствительные к растительным ингибиторам, что приводит к значительным повреждениям растений. Повышение содержания ингибиторов протеаз в растении про-

исходит, как правило, не за счет увеличения концентрации конститутивных соединений, а за счет синтеза их новых специальных форм [13, с. 444].

Первая стадия переваривания растительной массы, поедаемой насекомыми, которая происходит в средней кишке насекомого, предполагает разрушение клеточных оболочек растительной ткани и частичную деполимеризацию компонентов пищи. Нами не обнаружено зависимости между устойчивостью к колорадскому жуку и активностью ингибиторов ферментов, расщепляющих основную материал цитоскелета растительной ткани. По всей видимости, растительная масса, попадающая в кишечник насекомого, имеет достаточную степень фрагментации и механической деформации растительной ткани и уровень активности этих ферментов критически не влияет на усвоение пищевого субстрата. Другим объяснением данного феномена может служить избыточный объем пищевой массы, поедаемый насекомыми. Так, при весе тела 100–140 мг взрослое насекомое потребляет от 22 до 37 мг растительной массы в сутки, а личинки насекомого в расчете на массу тела потребляют еще больше. В этой связи использование высокого уровня активности ингибиторов ферментов, разрушающих цитоскелет растительной ткани для формирования устойчивости к колорадскому жуку, возможно лишь при создании сортов картофеля с достаточно прочной клеточной оболочкой, то есть с очень грубой ботвой, что требует изменения архитектоники строения растительной ткани. За решение этой задачи исследователи пока не берутся.

При исследовании ингибиторной активности в экстрактах листьев картофеля в отношении липаз и протеиназ кишечника колорадского жука обнаружена прямая зависимость между устойчивостью сортов к повреждению имаго колорадского жука и уровнем их активности. Для оценки потерь урожая от вредителя изучаемые сорта и гибриды возделывались на фоне инсектицидной обработки и без нее. Установлено, что потери урожая клубней картофеля от повреждения колорадским жуком на устойчивых сортах Башкирский, Удача, Бурновский и гибриде 4292-149 были в 2–5 раз ниже, чем на неустойчивых сортах Невский и Луговской. Исходя из полученных данных было сделано предположение, что устойчивость генотипов картофеля к повреждению колорадским жуком ассоциируется с повышенной активностью специфичных к ферментам насекомых – ингибиторов липаз и протеиназ (таблица 1).

Снижение эффективности функционирования желудочно-кишечного тракта, по-видимому, нарушает синхронизацию процессов роста и развития личинок вредителя, что приводит к значительному снижению выживаемости при их питании на

Таблица 1
Активность ингибиторов гидролитических ферментов имаго *L. Decemlineata* в листьях различных сортов картофеля (среднее за 2 года)

Сорта и гибриды картофеля	Ингибиторы липазы колорадского жука		Ингибиторы протеиназы колорадского жука		Потери продуктивности от повреждения ботвы вредителем, %
	ИЕ/г сырой массы	% ингибирования	ИЕ/г сырой массы	% ингибирования	
Невский	0,4 ± 0,1	4	39,5 ± 0,5	23,2	25,4
Луговской	0,9 ± 0,1	9,4	66,2 ± 0,8	39,0	20,5
Удача	1,9 ± 0,1	20	28,5 ± 0,7	16,7	9,3
Башкирский	6,2 ± 0,2	64	75,6 ± 0,4	44,4	8,9
Бурновский	1,2 ± 0,2	12	72,3 ± 0,9	42,5	7,7
4292 (81.1.36 × Зарево)	7,4 ± 0,3	77	57,5 ± 0,8	33,8	4,8

Table 1
Activity of inhibitors of hydrolytic enzymes of adults *L. decemlineata* in leaves of various potato varieties (average over 2 years)

Varieties and hybrids potatoes	Colorado potato beetle lipase inhibitors		Colorado potato beetle proteinase inhibitors		Loss of productivity from damage to the haulm by a pest, %
	IU/g of raw mass	% of inhibition	IU/g of raw mass	% of inhibition	
<i>Nevskiy</i>	0.4 ± 0.1	4	39.5 ± 0.5	23.2	25.4
<i>Lugovskoy</i>	0.9 ± 0.1	9.4	66.2 ± 0.8	39.0	20.5
<i>Udacha</i>	1.9 ± 0.1	20	28.5 ± 0.7	16.7	9.3
<i>Bashkirskiy</i>	6.2 ± 0.2	64	75.6 ± 0.4	44.4	8.9
<i>Burnovskiy</i>	1.2 ± 0.2	12	72.3 ± 0.9	42.5	7.7
4292-149	7.4 ± 0.3	77	57.5 ± 0.8	33.8	4.8

пищевых субстратах с высокой активностью специфичных ингибиторов. Так, на устойчивых сортах Башкирский, Удача и гибриде 4292-149 наблюдается многократное увеличение смертности личинок на преимагинальной стадии развития (таблица 2).

Необходимо отметить, что сорт Невский в значительной степени повреждается колорадским жуком (потери урожая – 25,4 %), но при этом личинки колорадского жука также имеют высокую смертность в конце четвертого возраста развития (28,8 % выживаемости). Вследствие этого питание личинок на данном сорте приводит к значительному снижению выживаемости личинок вредителя до четвертого возраста, но уже после нанесения значительной потери ботвы растениям картофеля. Примерно то же самое нами наблюдалось на этом сорте в ходе проведения ряда других исследований. Это натолкнуло нас на мысль о том, что защитный эффект должен снижать выживаемость вредителя на возможно ранних этапах развития его потомства.

Неудачи в использовании признака повышенной активности ингибиторов гидролаз фитофагов в селекционном отборе картофеля на устойчивость к повреждению колорадским жуком как конституционального защитного барьера объясняются в первую очередь эволюционной приспособленностью вредителя к нему. Адаптация насекомых к белковым ингибиторам протеиназ может проис-

ходить за счет усиления экспрессии генов пищеварительных протеиназ, синтеза протеиназ, нечувствительных к ингибиторам или гидролизующих ингибиторы, а также путем блокирования синтеза растением защитных белков, включая ингибиторы, посредством выделения насекомым соединений, нарушающих функционирование сигнальных систем растений. В то же время необходимо отметить, что в ранний период развития личинки колорадского жука имеют не столь совершенный пищеварительный аппарат [14, с. 201–204]. Личинки колорадского жука первого возраста после выхода из яиц питаются растительной тканью непосредственно в зоне прикрепления кладки к листу, личинки второго возраста также питаются на том же листе, где и появились на свет. Только при достижении третьего личиночного возраста личинки начинают расползаться по растению. Поэтому логично предположить, что высокая активность ингибиторов гидролитических ферментов насекомых в растительных тканях будет критична для жизнеспособности личинок на начальных стадиях развития, то есть в зоне отрождения личинок вредителя. Встает вопрос, как осуществить этот жестко локализованный в пространстве и времени процесс накопления ингибиторов гидролаз в растениях. Ответ на данный вопрос, возможно, кроется в использовании особенностей взаимоотношений между растением и насекомым.

Растения картофеля, относительно устойчивые к повреждению колорадским картофельным жуком, реагируют образованием локальной реакции сверхчувствительности (СВЧ-реакцией) листовой пластинки на размещения кладки яиц насекомого [15, с. 15]. Данный фенотипический признак может использоваться в селекции картофеля для отбора устойчивых к колорадскому жуку генотипов в полевых условиях [16, с. 20]. Ранее исследователями на модели арабидопсис (*Arabidopsis thaliana*) – яйца капустной белянки (*Pieris brassicae*) – было установлено, что откладка яиц насекомого вызывает индукцию комплекса защитных реакций растения от вредителя, в том числе модифицируется активности ингибиторов гидролаз в тканях листьев [17, с. 1019–1030]. То есть имеются все основания полагать, что развитие СВЧ-реакции листовой пластинки картофеля на кладки колорадского жука, так же, как и на модельном объекте, косвенно может свидетельствовать о модификации ингибиторной активности растения, и, что самое важное, этот процесс визуализируется.

Полученные нами данные (таблица 2) свидетельствуют о том, что во всех устойчивых сортах картофеля отмечалась не только повышенная активность ингибиторов протеиназ и липаз, но и интенсивная СВЧ-реакция листовой пластинки на кладки насекомого (3,3–4,1 балла). У неустойчи-

вого сорта Луговской этой реакции не отмечено, а у сорта Невский интенсивность СВЧ-реакции составляет только 2,5 балла. Известно, что растения способны через распознавание «молекулярных образов» идентифицировать нападение вредителей и после восприятия сигналов запускают механизмы прямой и непрямой защиты, например, посредством действия гормона – жасмоновой кислоты, которая управляет защитными механизмами в отношении преимущественно грызущих насекомых. По всей видимости, СВЧ-реакция на кладки является результатом распознавания «молекулярных образов» предстоящей угрозы со стороны насекомого. На этой основе была создана рабочая гипотеза о том, что индукция накопления ингибиторов гидролаз колорадского жука может ассоциироваться с развитием СВЧ-реакции на кладки насекомого. Для проверки данного предположения был заложен лабораторный опыт на сорте картофеля Башкирский, характеризующийся образованием СВЧ-реакции на кладки насекомого.

В ходе проведения исследований установлено, что обработка листьев картофеля метилжасмоновой кислотой приводит к устойчивому повышению активности ингибитора трипсина в растительной ткани в течение всего периода наблюдения. Откладка яиц колорадским жуком так же изменяет уровень активности ингибиторов протеиназ (таб-

Таблица 2
Плодовитость имаго и выживаемость на протяжении онтогенеза колорадского жука на растениях картофеля (среднее за 2 года)

Сорта и гибриды	Интенсивность СВЧ-реакции листовой пластинки на кладки насекомого, балл	Плодовитость самок		Отрождение яиц, %	Выживаемость личинок до 4 возраста, % к отложенным яйцам
		Количество яиц на 1 самку, шт.	Количество яиц в кладке, шт.		
Луговской	0	109	23,5	82,2	82,2
Невский	2,5	134	29,8	65,5	28,8
Удача	3,3	110	24,6	43,7	22,6
Башкирский	3,9	204	27,2	13,1	4,0
Бурновский	4,1	124	28,3	11,4	8,3
4292-149	4,0	141	33,0	31,6	15,4

Table 2
Fecundity of imago and survival rate during ontogeny of the Colorado potato beetle on potato plants (average over 2 years)

Varieties and hybrids	Intensity of the HR of the leaf blade to insect clutches, points	Fertility of females		Egg hatching, %	Survival of larvae larva 4 instars of age, % to laid eggs
		Quantity eggs per female, pcs.	Number of eggs in masonry, pcs.		
Lugovskoy	0	109	23.5	82.2	82.2
Nevskiy	2.5	134	29.8	65.5	28.8
Udacha	3.3	110	24.6	43.7	22.6
Bashkirskiy	3.9	204	27.2	13.1	4.0
Burnovskiy	4.1	124	28.3	11.4	8.3
4292-149	4.0	141	33.0	31.6	15.4

Активность ингибиторов трипсина в листьях картофеля, обработанных метилжасмоновой кислотой и размещением кладки яиц колорадским жуком

Время после обработки, ч	Варианты обработки	Активность ингибиторов, мИЕ/мл экстракта
6	Контроль	3,93 ± 0,41
	Метилжасмонат	4,93 ± 0,44*
	Кладка яиц	5,18 ± 0,25*
12	Контроль	5,16 ± 0,42
	Метилжасмонат	5,26 ± 0,38
	Кладка яиц	4,4 ± 0,41
24	Контроль	4,31 ± 0,24
	Метилжасмонат	4,51 ± 0,43
	Кладка яиц	4,37 ± 0,42
48	Контроль	5,63 ± 0,4
	Метилжасмонат	5,83 ± 0,27
	Кладка яиц	4,02 ± 0,43*

* $p \leq 0,05$.

Table 3
Activity of trypsin inhibitors in potato leaves treated with methyl jasmonate and placing a clutch of Colorado eggs beetle

Time after processing, h	Processing options	Inhibitor activity in mIE/ml extract
6	Control	3.93 ± 0.41
	Methyl jasmonate	4.93 ± 0.44*
	Clutch of eggs	5.18 ± 0.25*
12	Control	5.16 ± 0.42
	Methyl jasmonate	5.26 ± 0.38
	Clutch of eggs	4.4 ± 0.41
24	Control	4.31 ± 0.24
	Methyl jasmonate	4.51 ± 0.43
	Clutch of eggs	4.37 ± 0.42
48	Control	5.63 ± 0.4
	Methyl jasmonate	5.83 ± 0.27
	Clutch of eggs	4.02 ± 0.43*

* $p \leq 0,05$.

лица 3). Так, через 6 часов после обработки отмечается повышение активности ингибиторов трипсина из листьев картофеля при наличии кладки яиц насекомого на 31 % по сравнению с контролем. По истечении 12 часов и в последующем ингибиторная активность снижается.

В этом опыте наглядно видно, что индуцирование накопления активности ингибиторов трипсина посредством обработки листьев защитным гормоном – метилжасмоновой кислотой – по сравнению с действием откладки яиц фитофага на этот процесс значительно продолжительнее. Однако мы и не ставили своей целью доказать, что кладка яиц может заменить индуцирование активности ингибитора трипсина гормоном. В то же время однозначно установлено, что кладка яиц на листья сорта картофеля Башкирский, реагирующего на нее СВЧ-реакцией, однозначно приводит к повышению активности ингибитора трипсина. Этот вывод позволяет усовершенствовать подход к ис-

пользованию ингибиторного защитного барьера при создании устойчивости растений картофеля к колорадскому жуку следующим образом:

– отбор гибридного материала по результатам оценки уровня активности ингибиторов трипсина следует проводить среди генотипов, реагирующих образованием некроза листовой пластинки в ответ на размещение кладок яиц колорадского жука;

– генотипы, не отвечающие на кладки яиц СВЧ-реакцией, с высокой долей вероятности также не будут модифицировать активность ингибиторов гидролаз. Это полностью согласуется с положениями современной теории иммунитета, согласно которой основной, но не строго универсальной особенностью функцией NBS-LRR-белков, распознающих присутствие вредного объекта, является инициация гибели клеток в результате СВЧ-реакции в месте распознавания патогена и развития реакции устойчивости [18, с. 5].

Обсуждение и выводы (Discussion and Conclusion)

На основе полученных нами результатов исследований можно сделать заключение, что перспективным подходом в селекции картофеля на устойчивость к повреждению колорадским жуком является вовлечение генов, кодирующих синтез и накопление в тканях листьев картофеля специфичных ингибиторов протеаз и липаз колорадского жука. Методический подход при этом должен основываться на регистрации модификации ингибиторной активности гидролаз у гибридов, имеющих интенсивную СВЧ-реакцию листовой ткани на кладки колорадского жука, что значительно снизит

объем работ по лабораторной оценке материала. Генотипы картофеля, характеризующиеся локальным кратковременным накоплением ингибиторов липопротеиназного комплекса в зоне отрождения потомства вредителя, будут иметь наибольший депрессирующий биологический эффект для выживаемости личинок 1–2-го возраста и не вызывать ускорения микроэволюционных процессов внутри популяции колорадского жука с появлением новых форм, способных преодолеть данный тип устойчивости [19, с. 5]. Создание подобных генетических конструкций, вероятно, станет перспективным методом контроля численности колорадского жука в ближайшем будущем.

Библиографический список

1. Говоров Д. Н., Живых А. В., Барков В. А. Распространение колорадского жука на посадках картофеля в Российской Федерации в 2014–2016 годах // Защита картофеля. 2017. № 1. С. 9–14.
2. Цветков В. О., Яруллина Л. Г. Структурно-функциональные особенности гидролитических ферментов насекомых-фитофагов и белковых ингибиторов растений (обзор) // Прикладная биохимия и микробиология. 2019. Т. 55. № 5. С. 441–450. DOI: 10.1134/S0555109919050155.
3. Воронкова М. В. Активность ингибиторов протеиназ в листьях картофеля // Современные условия взаимодействия науки и техники: сборник трудов международной научно-практической конференции. Орел, 2017. С. 9–10.
4. Ashouri S., Pourabad R. F. Regulation of gene expression encoding the digestive α -amylase in the larvae of Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata* (Say) in response to plant protein extracts // Gene. 2021. Т. 766. Pp. 145–159.
5. Cingel A., Savić J., Lazarević J., Čosić T., Raspor M., Smigocki A., Ninković S. Coexpression of the proteinase inhibitors oryzacystatin I and oryzacystatin II in transgenic potato alters Colorado potato beetle larval development // Insect science. 2017. Т. 24. No. 5. Pp. 768–780.
6. Singh S. Singh, A., Kumar, S., Mittal, P., & Singh, I. K. Protease inhibitors: recent advancement in its usage as a potential biocontrol agent for insect pest management // Insect science. 2020. Т. 27. No. 2. Pp. 186–201. DOI: 10.1111/1744-7917.12641.
7. Akbar S. M. D., Jaba J., Regode V., Siva Kumar G., Sharma H. C. Plant protease inhibitors and their interactions with insect gut proteinases [e-resource] // The The Biology of Plant-Insect Interactions: A Compendium for the Plant Biotechnologist. Department of Biology Western Kentucky University-Owensboro Owensboro, KY USA, 2018. URL: <http://oar.icrisat.org/10519/1/Plant%20Protease%20Inhibitors%20and%20their%20Interactions%20with%20Insect%20Gut%20Proteinases.pdf> (date of reference: 14.09.2021).
8. Raspor M., Cingel A. Genetically Modified Potato for Pest Resistance: Thrift or Threat? [e-resource] // Solanum tuberosum – A Promising Crop for Starvation Problem. 2021. DOI: 10.5772/intechopen.98748. URL: <https://www.intechopen.com/chapters/77340> (date of reference: 14.09.2021).
9. 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 10. 2018. Vol. 10. Iss. 4. DOI: 10.1093/aobpla/ply037.
10. Молявко А. А., Марухленко А. В., Еренкова Л. А., Борисова Н. П., Белоус Н. М., Ториков В. Е. Устойчивость картофеля к колорадскому жуку // Вестник Брянской государственной сельскохозяйственной академии. 2019. № 5 (75). С. 34–41.
11. Шпирная И. А., Цветков В. О., Рябцева Н. Д. Методы количественного анализа гидролитической активности с использованием гелей с иммобилизованным субстратом // Современные проблемы биохимии, генетики и биотехнологии: материалы III Всероссийской научной конференции с международным участием. Уфа, 2021. С. 234–239.
12. Ибрагимов Р. И., Цветков В. О., Шпирная И. А., Марданшин И. С., Яруллина Л. Г. Влияние пищевого субстрата на активность гидролаз колорадского жука // Известия Уфимского научного центра РАН. 2018. № 3-4. С. 29–34.
13. Цветков В. О., Яруллина Л. Г. Структурно-функциональные особенности гидролитических ферментов насекомых-фитофагов и белковых ингибиторов растений (обзор) // Прикладная биохимия и микробиология. 2019. Т. 55. № 5. С. 441–450. DOI: 10.1134/S0555109919050155.

14. Salim M., Bakhsh A., Gökçe A. Stacked insecticidal genes in potatoes exhibit enhanced toxicity against Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata* (Coleoptera: Chrysomelidae) // *Plant Biotechnology Reports*. 2021. T. 15. No. 2. Pp. 197–215. DOI: 10.1007/s11816-021-00668-3.
15. 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.
16. Mardanshin I. S., Shakirzyanov A. Kh. The prospect of using a necrotic protective barrier in the creation of potato varieties resistant to the Colorado potato beetle // *Agrarian Bulletin of the Urals*. 2020. No. 12 (203). Pp. 15–21. DOI: 10.32417/1997-4868-2020-203-12-15-21.
17. Lortzing V., Oberländer, J., Lortzing, T., Tohge, T., Steppuhn, A., Kunze, R., Hilker M., Insect egg deposition renders plant defiance against hatching larvae more effective in a salicylic acid-dependent manner // *Plant, Cell & Environment*. 2019. T. 42. No. 3. Pp. 1019–1032. DOI: 10.1111/pce.13447.
18. Wilkinson S. W., Magerøy M. H., López Sánchez A., Smith L. M., Furci L., Cotton, T. A., Ton J. Surviving in a hostile world: plant strategies to resist pests and diseases // *Annual review of phytopathology*. 2019. No. 57. Pp. 505–529. DOI: 10.1146/annurev-phyto-082718-095959.
19. Конарев А. В. Молекулярные механизмы иммунитета и создание устойчивых к вредителям форм растений // *Защита и карантин растений*. 2017. № 11. С. 3–8.

Об авторах:

Ильдар Салимьянович Марданшин¹, кандидат биологических наук, заведующий лабораторией селекции и семеноводства картофеля, ORCID 0000-0001-6174-5151, AuthorID 159051; +7 905 181-54-69, ildar.mardanshin1966@yandex.ru

Ирина Андреевна Шпирная², кандидат биологических наук, доцент кафедры биохимии и биотехнологии, ORCID 0000-0002-6348-8467, AuthorID 158649

Людмила Ивановна Пусенкова¹, кандидат сельскохозяйственных наук, заведующая лабораторией растительно-микробных взаимодействий, ORCID 0000-0001-6341-0486, AuthorID 158748

¹ Башкирский научно-исследовательский институт сельского хозяйства Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук, Уфа, Россия

² Башкирский государственный университет, Уфа, Россия

The prospect of using an inhibitory barrier in potato breeding for resistance to the Colorado potato beetle

I. S. Mardanshin¹✉, I. A. Shpirnaya², L. I. Pusenkova¹

¹ Bashkir Research Institute of Agriculture – Subdivision of the Ufa Federal Research Center of the Russian Academy of Sciences, Ufa, Russia

² Bashkir State University, Ufa, Russia

✉E-mail: ildar.mardanshin1966@yandex.ru

Abstract. The purpose of the work is the determination of the most effective method of using the inhibitory barrier in potato breeding for resistance to damage by the Colorado potato beetle. **Methods.** In the work, the method of setting up a field experiment was used, as well as a laboratory method for assessing the inhibition of the activity of lipases and proteinases was carried out using substrates immobilized in an agarose gel. **Results.** On the basis of field experiments, it was found that the level of relative resistance of potato varieties and hybrids to damage by the Colorado potato beetle, a decrease in the survival rate of insect larvae and loss of tuber yield are associated with a high activity of lipase and proteinase inhibitors and an intensive development of a hypersensitivity reaction to phytophage egg clutches. In laboratory experiments, it was established that the activity of trypsin inhibitors increased during the laying of phytophage eggs on the leaves of potato varieties Bashkirskiy. **Scientific novelty.** Based on the analysis of the results of world practice and our own long-term attempts to use the inhibitory barrier in breeding potatoes for resistance to the pest, a new approach has been proposed to involve genes encoding the synthesis and accumulation of protease and lipase inhibitors in tissues when creating potato resistance to damage by the Colorado potato beetle. In this case, the methodological approach should be based on the registration of the modification of the inhibitory activity of hydrolases in hybrids with an intense microwave reaction of the leaf tissue to the clutches of the Colorado potato beetle, which will significantly reduce the volume of laboratory

assessment of the material. Genotypes that do not respond to egg clutches with a microwave reaction with a high degree of probability will also not modify the activity of hydrolase inhibitors. Genotypes with local short-term accumulation of inhibitors of the lipoproteinase complex in the zone of hatching of the pest offspring create the greatest depressing biological effect for the survival of 1-2 instar larvae. The creation of such genotypes is likely to be a promising model for highly resistant varieties of the Colorado potato beetle.

Keywords: potato selection, resistance to pests, hydrolase inhibitors.

For citation: Mardanshin I. S., Shpirnaya I. A., Pusenkova L. I. Perspektiva ispol'zovaniya ingibitornogo bar'era v selektsii kartofelya na ustoychivost' k koloradskomu zhuku [The prospect of using an inhibitory barrier in potato breeding for resistance to the Colorado potato beetle] // Agrarian Bulletin of the Urals. 2022. No. 02 (217). 2–11. DOI: 10.32417/1997-4868-2022-217-02-2-11. (In Russian.)

Date of paper submission: 03.11.2021, **date of review:** 15.12.2021, **date of acceptance:** 25.12.2021.

References

1. Govorov D. N., Zhivykh A. V., Barkov V. A. Rasprostranenie koloradskogo zhuka na posadkakh kartofelya v Rossiyskoy Federatsii v 2014–2016 godakh [Distribution of the Colorado potato beetle on potato plantings in the Russian Federation in 2014–2016] // Zashchita kartofelya. 2017. No. 1. Pp. 9–14. (In Russian.)
2. Tsvetkov V. O., Yarullina L. G. Strukturno-funktsional'nye osobennosti gidroliticheskikh fermentov nasekomykh-fitofagov i belkovykh ingibitorov rasteniy (obzor) [Structural and functional characteristics of hydrolytic enzymes of phytophagous insects and plant protein inhibitors (review)] // Prikladnaya biokhimiya i mikrobiologiya. 2019. T. 55. No. 5. Pp. 460–469. (In Russian.)
3. Voronkova M. V. Aktivnost' ingibitorov proteinaz v list'yakh kartofelya. [The activity of proteinase inhibitors in potato leaves] // Sovremennye usloviya vzaimodeystviya nauki i tekhniki: sbornik trudov Mezhdunarodnoy nauchno-prakticheskoy konferentsii. Orel, 2017. Pp. 9–10. (In Russian.)
4. Ashouri S., Pourabad R. F. Regulation of gene expression encoding the digestive α -amylase in the larvae of Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata* (Say) in response to plant protein extracts // Gene. 2021. T. 766. Pp. 145–159.
5. Cingel A., Savić J., Lazarević J., Čosić T., Raspor M., Smigocki A., Ninković S. Coexpression of the proteinase inhibitors oryzacystatin I and oryzacystatin II in transgenic potato alters Colorado potato beetle larval development // Insect science. 2017. T. 24. No. 5. Pp. 768–780.
6. Singh S. Singh, A., Kumar, S., Mittal, P., & Singh, I. K. Protease inhibitors: recent advancement in its usage as a potential biocontrol agent for insect pest management // Insect science. 2020. T. 27. No. 2. Pp. 186–201. DOI: 10.1111/1744-7917.12641.
7. Akbar S. M. D., Jaba J., Regode V., Siva Kumar G., Sharma H. C. Plant protease inhibitors and their interactions with insect gut proteinases [e-resource] // The Biology of Plant-Insect Interactions: A Compendium for the Plant Biotechnologist. Department of Biology Western Kentucky University-Owensboro Owensboro, KY USA, 2018. URL: <http://oar.icrisat.org/10519/1/Plant%20Protease%20Inhibitors%20and%20their%20Interactions%20with%20Insect%20Gut%20Proteinases.pdf> (date of reference: 14.09.2021).
8. Raspor M., Cingel A. Genetically Modified Potato for Pest Resistance: Thrift or Threat? [e-resource] // Solanum tuberosum – A Promising Crop for Starvation Problem. 2021. DOI: 10.5772/intechopen.98748. URL: <https://www.intechopen.com/chapters/77340> (date of reference: 14.09.2021).
9. 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 10. 2018. Vol. 10. Iss. 4. DOI: 10.1093/aobpla/ply037.
10. Molyavko A. A., Marukhlenko A. V., Erenkova L. A., Borisova N. P., Belous N. M., Torikov V. E. Ustoychivost' kartofelya k koloradskomu zhuku // Vestnik Bryanskoy gosudarstvennoy sel'skokhozyaystvennoy akademii. 2019. No. 5 (75). Pp. 34–41. (In Russian.)
11. Shpirnaya I. A., Tsvetkov V. O., Ryabtseva N. D. Metody kolichestvennogo analiza gidroliticheskoy aktivnosti c ispol'zovaniem geley s immobilizovannym substratom. [Methods for the quantitative analysis of hydrolytic activity using gels with an immobilized substrate] // Sovremennye problemy biokhimii, genetiki i biotekhnologii: sbornik materialov III Vserossiyskoy nauchnoy konferentsii s mezhdunarodnym uchastiem. Ufa, 2021. Pp. 234–239. (In Russian.)
12. Ibragimov R. I., Tsvetkov V. O., Shpirnaya I. A., Mardanshin I. S., Yarullina L. G. Effect of food substrate on the activity of Colorado potato beetle hydrolases // News of the Ufa Scientific Center of the Russian Academy of Sciences. 2018. No. 3-4. Pp. 29–34. (In Russian.)
13. Tsvetkov V. O., Yarullina L. G. Strukturno-funktsional'nye osobennosti gidroliticheskikh fermentov nasekomykh-fitofagov i belkovykh ingibitorov rasteniy (obzor) [Structural and functional features of hydrolytic enzymes

of phytophagous insects and protein inhibitors of plants (review)] // *Prikladnaya biokhimiya i mikrobiologiya*. 2019. T. 55. No. 5. Pp. 441–450. DOI: 10.1134/S0555109919050155. (In Russian.)

14. Salim M., Bakhsh A., Gökçe A. Stacked insecticidal genes in potatoes exhibit enhanced toxicity against Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata* (Coleoptera: Chrysomelidae) // *Plant Biotechnology Reports*. 2021. T. 15. No. 2. Pp. 197–215. DOI: 10.1007/s11816-021-00668-3.

15. Mardanshin I. S., Sorokan' A. V. Razlichiya v fenotipicheskom proyavlenii giperchuvstvitel'nogo otveta na otlozhenie yaits koloradskogo zhuka u rasteniy kartofelya i perspektiva ego ispol'zovaniya v selektsii kul'tury [Differences in the phenotypic manifestation of the hypersensitive response to the deposition of eggs of the Colorado potato beetle in potato plants and the prospect of its use in crop breeding] // *Zashchita kartofelya*. 2018. No. 2. Pp. 14–17. (In Russian.)

16. Mardanshin I. S., Shakirzyanov A. Kh. The prospect of using a necrotic protective barrier in the creation of potato varieties resistant to the Colorado potato beetle // *Agrarian Bulletin of the Urals*. 2020. No. 12 (203). Pp. 15–21. DOI: 10.32417/1997-4868-2020-203-12-15-21.

17. Lortzing V., Oberländer, J., Lortzing, T., Tohge, T., Steppuhn, A., Kunze, R., Hilker M., Insect egg deposition renders plant defiance against hatching larvae more effective in a salicylic acid-dependent manner // *Plant, Cell & Environment*. 2019. T. 42. No. 3. Pp. 1019–1032. DOI: 10.1111/pce.13447.

18. Wilkinson S. W., Magerøy M. H., López Sánchez A., Smith L. M., Furci L., Cotton, T. A., Ton J. Surviving in a hostile world: plant strategies to resist pests and diseases // *Annual review of phytopathology*. 2019. No. 57. Pp. 505–529. DOI: 10.1146/annurev-phyto-082718-095959.

19. Konarev A. V. Molekulyarnye mekhanizmy immuniteta i sozdanie ustoychivyykh k vreditelyam form rasteniyu [Molecular mechanisms of immunity and the creation of pest-resistant forms of plants] // *Zashchita i karantin rasteniy*. 2017. No. 11. Pp. 3–8. (In Russian.)

Authors' information:

Ildar S. Mardanshin¹, candidate of biological sciences, head laboratory of selection and seed production of potatoes, ORCID 0000-0001-6174-5151, AuthorID 159051; +7 905 181-54-69, ildar.mardanshin1966@yandex.ru

Irina A. Shpirnaya², candidate of biological sciences, associate professor of the department of biochemistry and biotechnology, ORCID 0000-0002-6348-8467, AuthorID 158649

Lyudmila I. Pusenkova¹, candidate of agricultural sciences, head of the laboratory of plant-microbial interactions, ORCID 0000-0001-6341-0486, AuthorID 158748

¹Bashkir Research Institute of Agriculture – Subdivision of the Ufa Federal Research Center of the Russian Academy of Sciences, Ufa, Russia

²Bashkir State University, Ufa, Russia