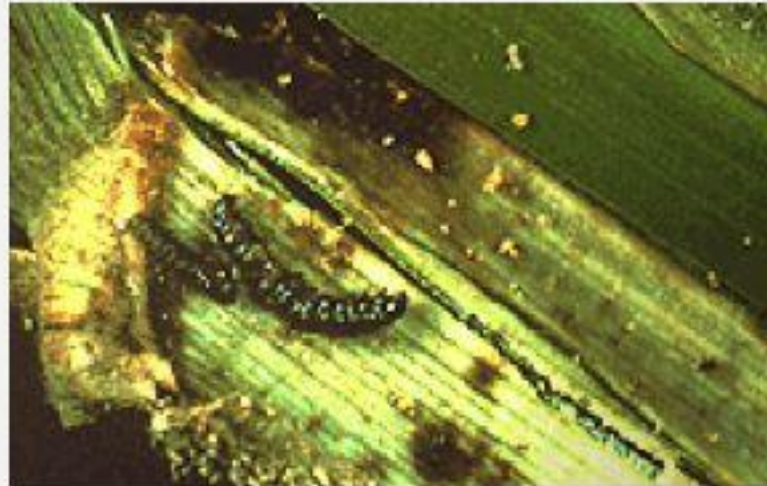
The background of the slide is a close-up photograph of green foliage. Several ladybugs are visible on the leaves, and there are some red, berry-like structures. The text is overlaid on a light green rectangular background.

**Биотехнология
в селекции растений**
Часть 6.
Селекция на устойчивость к
насекомым

Genetically Modified Organisms



European corn borer larvae
infected with *Bacillus thuringiensis*.
Courtesy Nova Nordisk Entotech, Inc.

1938 - *Bacillus Thuringiensis* - biopesticide

Crops: vegetables, cotton, tobacco, tree crops,
forest crops, landscaping

Research contributed by: Andrea Lalama

Bt gene is transferred from the Bacillus into corn



European corn borer feeds on the corn plant and ingests the protein encoded by the Bt gene



The Bt protein penetrates and collapses the cells lining the gut and the insect dies



Потери урожая картофеля от колорадского жука **40-50 %**.

Распространен по всей **европейской части России**, в странах **Закавказья** и **Средней Азии**.

Чрезвычайно **высокая экологическая пластичность**, определяемая генетическим и эколого-физиологическим полиморфизмом
Заселение новых территорий сопровождается **глубокими микроэволюционными процессами** в популяциях

Фактические потери зависят от:

- численности и заселенности кустов картофеля
- периода повреждения
- темпов и способности к регенерации
выращиваемого сорта

При плотности **25 личинок** и более на куст степень повреждения листьев может достигать **50-80 %**, урожай снижается на **25-52 %**. Без борьбы потери урожая **60-70 %**.

Причины **фитосанитарной дестабилизации**:

- многоукладность форм землепользования
- утрата защитой растений комплексности и планомерности – защита носит эпизодический характер

Препарат **банкол** – наиболее эффективен: гибель вредителя через сутки составила **92-98 %**, срок токсического действия на **баклажанах 14-17 дней**, на **картофеле 18-25 дней**.

На Украине картофель **1,6 млн. га**, 98 % посадок приходится на частный сектор
Урожай **10-15 т/га** при потенциальной урожайности **36-60 т/га**.

Механизмы устойчивости сортов, в родословной которых были дикие виды, характеризуются **антиксенозом** (непривлекательностью для откладки яиц), **антибиозом** (непригодностью питательных веществ для развития личинок) и **ювенильной смертностью** 40-80 %.

Наиболее **вредоносно первое поколение**, которое питается молодыми всходами картофеля.

Полиморфность может быть связана с вероятной **эволюционной молодостью** колорадского жука как биологического вида.

КЖ обладает и **внешним полиморфизмом** по ряду изменчивых признаков рисунка тела имаго.

Подтверждена принципиальная взаимосвязь **адаптационного полиморфизма КЖ с внешними признаками** особей, и прежде всего с основными типами рисунка центральной части переднеспинки имаго:

- средняя плодовитость самок
- пищевое предпочтение
- выносливость к голоданию
- восприимчивость к определенным инсектицидам и др.

Также маркерным признаком являются **оттенки пигментации яиц** - разные особенности регуляции сезонного цикла и типы диапаузы

Наиболее выраженные **дифференциаторы популяций и форм** – малопригодные в качестве хозяев растения (томат, устойчивые межвидовые гибриды картофеля)

Различия внутрипопуляционных форм КЖ по показателям пищевой специализации – основа экологической и эволюционной стратегии вида.

В структуре политипического вида КЖ можно выделить **аллопатрические** и **симпатрические** формы, соответствующие всем основным биотаксономическим единицам внутривидовой систематики

| Наименования единиц | Соответствующие внутривидовые формы у колорадского жука | Выраженность адаптивных и морфологических различий между формами |
|--|--|--|
| 1. ПОДВИДЫ (изолированные географические расы) | Не менее трех наиболее крупных географических изолятов: американский, европейский, среднеазиатский. | Ярко выражены |
| 2. ЭКОТИПЫ (экологические и смежные эколого-географические расы) | Смежные популяционные комплексы в основных ландшафтно-климатических зонах. | Статистически достоверны |
| 3. ПОПУЛЯЦИИ | основные единицы населения вида. | В пределах экотипа незначительны |
| 4. ЭКОЭЛЕМЕНТЫ | Локальные субпопуляции на посадках разных видов и сортов кормовых растений в конкретных агробиоценозах. | Не всегда статистически достоверны |
| 5. ИЗОРИАГЕНТЫ (морфобиологические группы) | Внутрипопуляционные группы особей с различными сочетаниями внешних признаков (тип рисунка переднеспинки, пигментация яиц). | Наиболее ярко выражены |
| 6. БИОТИПЫ | Особи с минимальными генетическими различиями; ввиду бесконечного множества их идентификация не имеет смысла. | |

Таблица 2.
Биотаксономические единицы по классификации К.М. Завадского (1961) и соответствующие им внутривидовые формы колорадского жука

Индукторами и ведущими факторами микроэволюции КЖ являются пищевые, связанные с лимитирующими развитие вредителя особенностями хозяина и как среды обитания, и как источника питания – **механизмы устойчивости** (ФАВ и продукты их окисления)

Возделывание устойчивого сорта – направленный отбор КЖ с адекватной пищевой адаптацией

Устойчивый сорт лучше проявляет свои свойства там, где ни он, ни генетически близкие сорта не возделывались и потому непривычны для местной популяции вредителя.

Возможно, идет процесс адаптации КЖ к **томатам**.

Первый этап - селекция на устойчивость основывается на высокой концентрации в растениях вторичных метаболитов, но это делает их непригодными в пищу.

Второй этап – создание выносливых генотипов, характеризующихся высокой способностью к компенсаторному образованию листьев и побегов.

Третий этап – создание образцов с хорошо выраженными репарационными, антиксенотическими и антибиотическими свойствами при сохранении высоких вкусовых и питательных качеств.

Наиболее антиксенотическое и антибиотическое
воздействие:

Solanum polyadenium,

S. pinnatisectum,

S. brachystotrichum,

S. jamtsiin,

S. demissum,

S. chacoense,

S. lantiforme,

S. cardiophyllum,

S. trifidum.



Гибель **от 50 до 100 % личинок**, снижение массы тела
выживших, отставание в росте, не окукливаются, из
окуклившихся нежизнеспособные особи.

Устойчивых пасленовых:

Конституциональная устойчивость

Морфологический барьер – отличия в строении тканей и органов

Физиологический – отличия физиологических процессов и метаболизма

Атрептический – отличия в структуре биополимеров

Индукцированная устойчивость

Репарационный

Оксидативный

Ингибиторный

Рисунок 1

Система иммуногенетических барьеров растений

Конституциональные барьеры растений (барьеры вегетативных и репродуктивных органов)

Индукцированные барьеры растений (барьеры вегетативных и репродуктивных органов)

Атлетический (отличия в структуре диплолимеров)

Морфологический (отличия в структуре тканей и органов)

Ростовой (отличия процессов роста)

Физиологический (отличия физиологических процессов и обмена веществ)

Органогенетический (отличия в процессах дифференциации)

Некротический (процессы отмирания клеточных комплексов тканей и органов)

Галлогенетический (процессы формирования галлов)

Репарационный (процессы заместительного возобновления органов)

Тератогенетический (процессы болезнью-вая пороков роста и развития)

Оксидативный (процессы окисления продуктов обмена веществ)

Ингибиторный (проявление ингибирующего эффекта у конституциональных соединений)

Морфоанатомические свойства:

- длинные междоузлия,
- мелкие листья,
- острый угол отхождения листьев,
- слабая облиственность,
- большая плотность, грубость листьев,
- густое железистое опушение

Большое иммунологическое значение имеют гликоалкалоиды:

соланин, демиссин, томатин, соласанин, соламатин, лептин, чаконин, солакаулин и др.

Тетразиды (соланин и томатин) более токсичны, включаются в метаболизм насекомых, образуют труднорастворимые комплексы с холестерином и другими стеринами, препятствуют синтезу белка, снижают адсорбцию фитостеролов, необходимых для синтеза экдизона – замедление роста личинок, торможение окукливания, часто гибель.

Атрептивный барьер

Особенности структуры углеводов, белков, липидов, от которых зависит стереохимическое соответствие фермент-субстрат при пищеварении насекомых, это определяет эффективность атакуемости биополимеров гидролазами насекомых.

Питание на картофеле устойчивых сортов

приводит к снижению массы тела, торможению развития половой продукции (резорбция ооцитов и семенников), снижению плодовитости, повышению смертности и т.д.

1-й тип реакций – снижение уровня углеводного, липидного и белкового обмена – формирование синдрома неполного голодания

2-й тип реакций – резкий дисбаланс ключевых обменных процессов, гетерохрония, переключение путей метаболизма, нарушается регуляция метаболизма – формирование стресса, элиминация вредителя.

Адаптация к атрептическому, морфологическому и ингибиторному барьерам **затруднена**, а физиологический и оксидативный **способствуют микроэволюции**.

У растений **ингибиторы** – регуляторы эндогенных ферментов в онтогенезе, защитные белки, генетические маркеры в эволюции, систематике, сортовой идентификации, иммунитета, препараты для медицины

Природные мишени белковых ингибиторов – протеиназы, амилазы, эндополигалактуроназы и другие гидролазы

Ингибиторы у пасленовых активны, гетерогенны и изменчивы.

Системный ответ запускается гормоноподобным пептидом **системином**.

Гидролазы насекомых

Видовая специфичность активности и роли отдельных компонентов спектра **трипсино-, эластаза-, химотрипсиноподобные, цистеиновые** и др.

Может быть большинство или какой-то один преобладать

В кишечнике КЖ химотрипсиноподобные и цистеиновые ферменты, ведущую роль при этом играет **кислая аспартильная киназа** типа катепсина D – инициация расщепления белков, который продолжают другие протеиназы

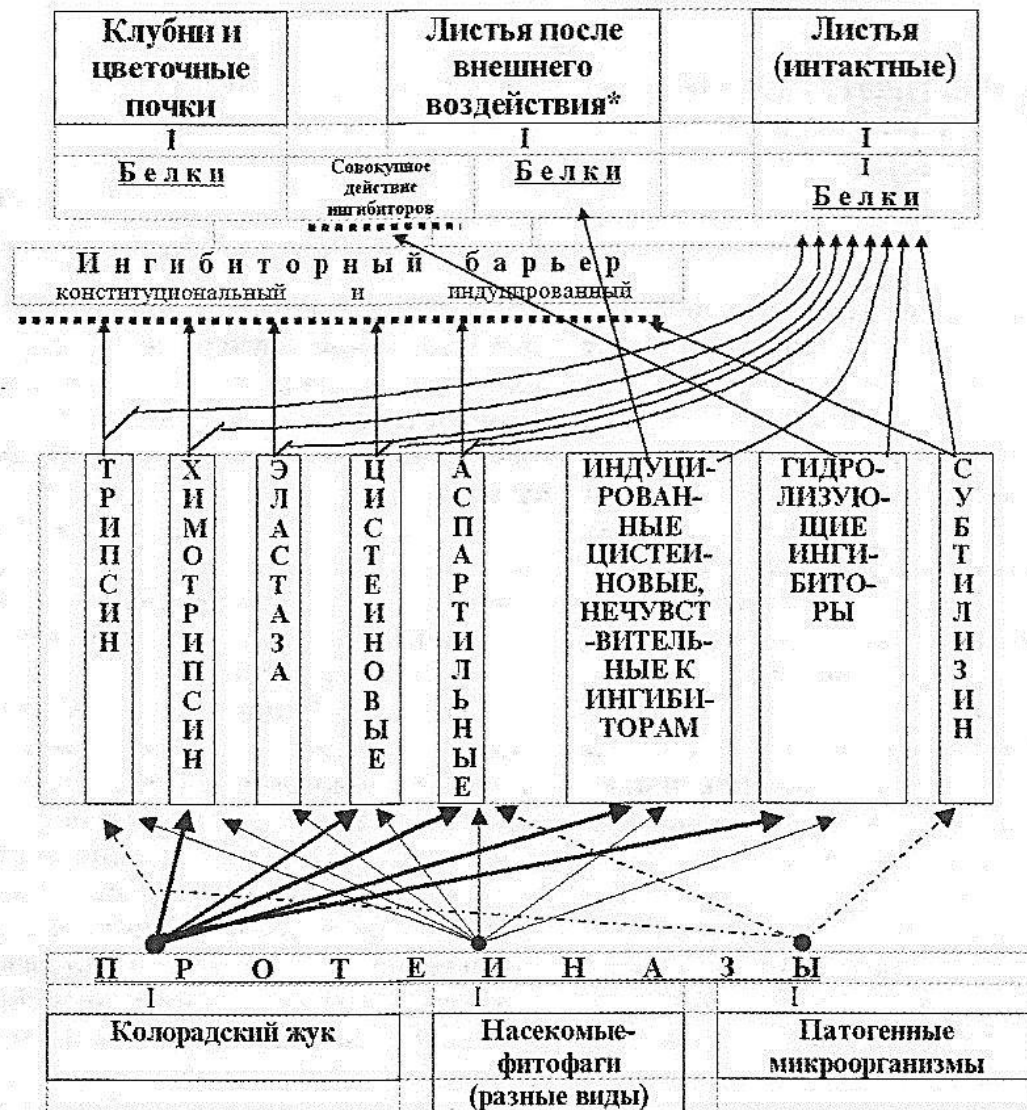


Рисунок 1. Ингибиторы протеиназ в защитных механизмах картофеля и других растений (схема составлена по литературным сведениям и данным автора). “Внешнее воздействие” включает атаки фитофагов, механическое, термическое или иное повреждение

Белковые ингибиторы гидролаз

Гетерогенные ингибиторы большинства **сериновых протеиназ** (трипсин, химо tripsин, эластаза, субтилизин) и **цистеиновых протеиназ** (папаин, катепсины В и Н).

Ингибиторы **аспартильных протеиназ** (катепсин D)

ИП участвуют в регуляции **эндогенных ферментов** в покоящихся клубнях

Повреждение листьев фитофагами вызывает реакцию **накопления защитных белков** – ПФО, хитиназы, PR-белки, ИП

Фитофаги могут преодолевать ИП путем гидролиза

Совокупный эффект ингибиторов:

ингибиторы α -амилаз + протеиназ

ингибиторы сериновых и тиоловых протеиназ

Питание на табаке с **высоким уровнем экспрессии** ингибитора трипсина вызывало **угнетение**, а растения с **низким уровнем поражались больше**, чем контрольные – задействованы разные типы протеиназ

Сорта отличаются по составу ИП в клубнях, по способности к накоплению в листьях и составу.

Индукцированные ингибиторы – маркеры устойчивости, даже если сами не вовлечены в ответ.

6 типов физиологического покоя у КЖ:

- 1. Зимняя диапауза** (август-ноябрь) – экономное расходование резервных веществ
- 2. Зимняя олигопауза** – замещает зимнюю диапаузу, обеспечивает поддержание низкого уровня метаболизма
- 3. Летний сон** – 1-10 дней, среди лета, до половины перезимовавших особей
- 4. Летняя диапауза** – в наиболее жаркий период лета
- 5. Повторная диапауза** – в конце лета у однажды или дважды зимовавших особей
- 6. Многолетняя диапауза** – 2-3 года

Многотипность проявлений покоя способствует быстрой приспособляемости к изменению режимов абиотических факторов среды - один из факторов эволюционного прогресса.

ГосНИИгенетика – биологический инсектицид против КЖ и других жесткокрылых – **Колорадо**
Действующее вещество – **эндотоксины белковой природы**

Токсины *Bt* после протеолитической активации в кишечнике насекомого связываются с ворсинками эпителия кишечника, что приводит к образованию пор в стенке кишечного тракта, а затем к лизису и полному разрушению клеток эпителия.

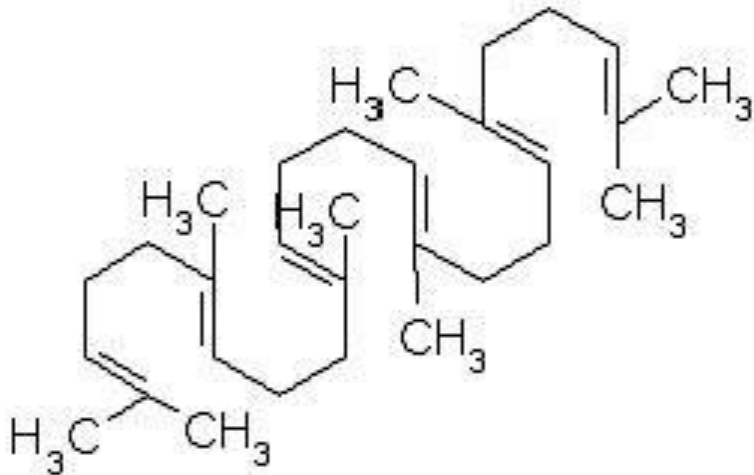
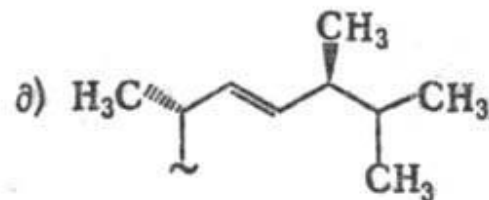
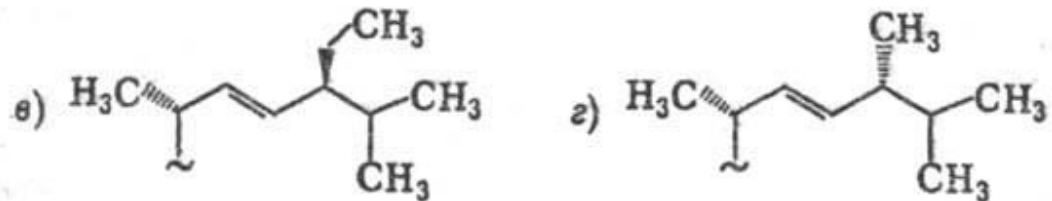
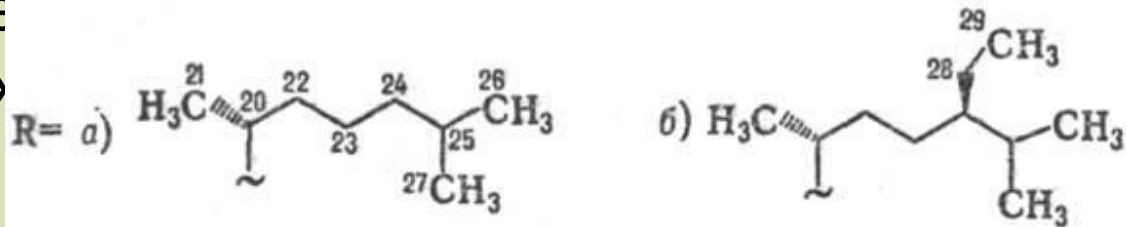
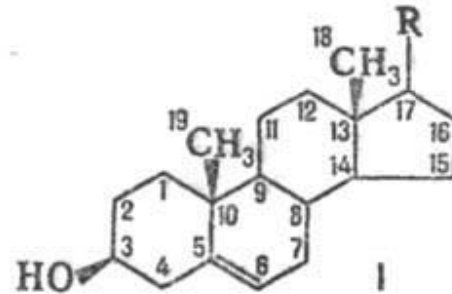
Устойчивость насекомого – за счет снижения степени связывания токсинов с ворсинками эпителия

Насекомые, питающиеся трансгенными растениями, экспрессирующими ИП, способны к **адаптации**:

- **деградация** ингибитора другой, нечувствительной к его действию протеазой
- **суперпродукция** ингибируемой протеазы
- **синтез** новой, нечувствительной к действию экзогенного ингибитора протеиназы, иногда другого класса или семейства протеолитических ферментов (цистеиновая вместо сериновой, химотрипсин и эластаза вместо трипсина)

Биосинтез стерина начинается с конденсации молекул ацетилСоА в мевалоновую кислоту и до появления сквалена он одинаков для всех живых существ.

Изменения стерина состава в пище оказывают негативное воздействие на развитие и размножение фитостеринзависимых насекомых



Селекция in vitro

Полиеновые антибиотики (филипин, нистатин, амфотерицин Б) связываются со свободной группой мембранных стеринов и вызывают деформацию и функциональную инактивацию плазмалеммы.

Обработка **ингибиторами биосинтеза стеринов** ведет к накоплению в мембране и цитоплазме неактивных промежуточных стеринов вместо нормальных фитостеринов.

Обработка мутагенами увеличивает выход стериновых мутантов

Vt-модифицированные растения:

Объекты – европейский зерновой мотылек, юго-западный зерновой мотылек, табачная листовертка, хлопковая листовертка, розовый коробочный червь (хлопковая совка), колорадский жук

| Культура | Стр-белок | Контролируемый вредитель | Год внедрения в производство |
|------------|-----------|---|------------------------------------|
| Картофель | Стр3А | Колорадский жук | 1995 |
| Хлопчатник | Стр1Ас | Табачная листовертка, коробочный червь, розовый коробочный червь | 1996 |
| Кукуруза | Стр1Ав | Европейский кукурузный мотылек, юго-западный кукурузный мотылек, хлопковая совка | 1997 |
| Кукуруза | Стр1Ас | Европейский кукурузный мотылек, юго-западный кукурузный мотылек | 1997 |

Картофель, хлопчатник, кукуруза в США (1995-1997), Канада, Аргентина, Австралия, Китай, Мексика, Испания, Франция, Португалия, Южная Африка, Румыния

Преимущества:

- снижение обработок инсектицидами
- высокая эффективность борьбы с вредителями
- повышение урожайности
- увеличение численности полезных организмов
- пониженный уровень фунгицидных токсинов
- простота использования