

На правах рукописи

ГОЛИВАНОВ ЯРОСЛАВ ЮРЬЕВИЧ

**БИОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ЗЛАКОВЫХ ТЛЕЙ И
УСТОЙЧИВОСТЬ К НИМ ЯРОВОЙ ТРИТИКАЛЕ**

Специальность 4.1.3. – Агрохимия, агропочвоведение, защита и карантин
растений

Автореферат диссертации на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

Москва 2023

Работа выполнена на кафедре генетики, селекции и семеноводства ФГБОУ ВО «Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К.А. Тимирязева»

Научный руководитель: **Гриценко Вячеслав Владимирович**, доктор биологических наук, доцент, профессор кафедры защиты растений ФГБОУ ВО «Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К.А. Тимирязева»

Официальные оппоненты: **Еськов Иван Дмитриевич** доктор сельскохозяйственных наук, профессор, заведующий кафедрой защиты растений и плодовоовощеводства ФГБОУ ВО «Саратовский государственный университет генетики, биотехнологии и инженерии имени Н. И. Вавилова»

Камаев Илья Олегович кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник, заведующий лабораторией экологии и генетики насекомых и клещей ФГБУ «Всероссийский центр карантина растений»
Ведущая организация: ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный аграрный университет»

Защита диссертации состоится 21 июня 2023 г. в 14:00 на заседании диссертационного совета 35.2.030.05, созданного на базе ФГБОУ ВО «Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К.А. Тимирязева» по адресу: 127434, г. Москва, ул. Прянишникова, д. 19, тел/факс: 8(499)976-21-84.

Юридический адрес для отправки почтовой корреспонденции (отзывов): 127434, г. Москва, ул. Тимирязевская, д. 49.

С диссертацией можно ознакомиться в Центральной научной библиотеке имени Н.И. Железнова ФГБОУ ВО «Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К.А. Тимирязева» и на сайте Университета: <http://www.timacad.ru>

Автореферат разослан «__» _____ 2023 г.

Учёный секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук, доцент

И.М. Митюшев

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы

Среди вредителей зерновых культур злаковые тли (сем. Aphididae) – одни из наиболее распространенных и массовых, особенно в северной части зоны возделывания зерновых (Артохин, 2013; Vickerman, Wratten, 1979; Гандрабур, 2019). В 2020 г. в Российской Федерации химические обработки против них были проведены на общей площади посевов озимых зерновых 1310 тыс. га, на яровых зерновых – на 1285 тыс. га (Россельхозцентр, 2021). Актуальная проблема применения химических пестицидов – гибель полезной энтомофауны и формирование резистентности ко многим пестицидам в популяциях фитофагов (Gerber et al., 2011; Есипенко, 2013; Ковалев и др., 2013; Сухорученко, 2020).

Одним из приоритетных направлений в защите зерновых культур от вредителей, в том числе от злаковых тлей, является разработка и использование устойчивых сортов, что позволяет рационально сокращать объемы применения инсектицидов и способствует сохранению полезной энтомофауны. Хотя сортовая устойчивость некоторых зерновых колосовых культур к злаковым тлям достаточно хорошо изучена (Белошапкин, 1987; Радченко, 1990, 2000, 2019), устойчивость тритикале к тлям остается практически неизвестной. Разнообразие видового состава, сложность и динамичность жизненных циклов, скорость развития и размножения, способность к быстрому наращиванию численности делает злаковых тлей актуальным объектом научных исследований на данной культуре, как и необходимость поисков доноров сортовой устойчивости к ним.

Степень разработанности темы.

Пищевые связи и вредоносность злаковых тлей изучали и отечественные, и зарубежные исследователи (Байдык, 1982; Бадулин, 1998; Гандрабур, 2015, 2016, 2019; Верещагина, 2016; Wood, 1961; Wratten, 1979; Malinga, 2007; Jimoh, 2012). Сортовая устойчивость пшеницы и ряда других зерновых культур к злаковым тлям также успешно изучалась многими авторами, и имеет практическое применение (Чесноков, 1956; Шапиро, 1985; Белошапкин, 1987; Радченко, 1990, 2000, 2019, Lowe, 1982, Westhuizen, 1998, Lu, 2010, Wang, 2015). Однако на культуре тритикале исследований по устойчивости её к тлям практически не проводили.

Цель исследования: оценить биологические особенности обыкновенной злаковой (*Schizaphis graminum* R.) и черемухово-злаковой (*Rhopalosiphum padi* L.) тли, ассоциированные с устойчивостью к ним сортообразцов тритикале в лабораторных и полевых условиях Московского региона.

Для достижения поставленной цели решались следующие **задачи:**

1. Провести оценку сроков жизни, репродуктивного периода, количества потомства двух видов злаковых тлей и влияние некоторых применяемых на зерновых культурах агрохимикатов (Экопин, Вэрва, Силиплант) на численность тлей в лабораторных условиях.

2. Оценить в полевых и лабораторных условиях устойчивость к тлям (по интенсивности заселения растений) сортообразцов яровой тритикале из коллекции РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева, с учётом влияния повреждений тлями на некоторые физиологические параметры растений.

3. Выявить генетический полиморфизм популяций тлей в полевых условиях.

Научная новизна. Приоритетно разработана методика содержания трёх видов злаковых тлей в лабораторных условиях, на которую было получено свидетельство ноу-хау (свидетельство №2022019 РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева). Установлено воздействие агрохимикатов Экопин, Вэрва и Силиплант на численность тлей при культивировании их на сортообразцах тритикале. По результатам проведенного экспресс-анализа из 66 сортообразцов яровой тритикале выделены 17 перспективных по устойчивости образцов, наименее заселяемые злаковыми тлями. Получены новые знания о генетическом полиморфизме по некоторым локусам микросателлитной ДНК в популяции большой злаковой тли.

Теоретическая и практическая значимость работы. Выделенные в лабораторных и полевых условиях сортообразцы яровой тритикале, наименее благоприятные для массового размножения злаковых тлей, перспективны для дальнейшей селекционной работы по получению устойчивых форм, а сортообразцы, оптимальные для вредителей, могут служить эталоном чувствительности в экспериментах. Установлены физиологические изменения поврежденных злаковыми тлями растений тритикале. Выявленные особенности действия препаратов Экопин, Вэрва и Силиплант на численность тлей можно использовать для усовершенствования методики лабораторного культивирования для изучения злаковых тлей, средств защиты от них, оценки устойчивости растений, а также для массового разведения тлей в программах культивирования энтомофагов в защищенном грунте.

Основные положения, выносимые на защиту.

1. Сортные особенности яровой тритикале являются одним из факторов дифференциации тлей по биотическому потенциалу размножения; репродуктивная способность тлей меняется в зависимости от заселенного сортообразца.

2. Различия по локусам микросателлитной ДНК обуславливают полиморфизм в популяции большой злаковой тли и отсутствие такового у черемухово-злаковой тли.

3. Применение препаратов Экопин, Вэрва и Силиплант влияет на рост численности обыкновенной злаковой тли и черемухово-злаковой тли, неодинаково на разных сортообразцах тритикале.

Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность результатов основана на соблюдении общих методических принципов планирования опытов в полевых и лабораторных условиях и применении стандартных статистических методов обработки

данных с использованием дисперсионного и корреляционного анализа с помощью программы MS Excel. Результаты исследований были доложены на следующих научных конференциях: Международная научно-практическая конференция, посвященная 129-й годовщине со дня рождения академика Н.И. Вавилова, г. Москва, г. Саратов, 2016 г.; XII неделя науки молодежи северо-восточного административного округа города Москвы, посвященная 160-летию К.Э. Циолковского, г. Москва, 2017г.; Международная научная конференция молодых учёных и специалистов, г. Москва, 2018 г.; Международная научная конференция, посвященная 125-летию со дня рождения В.С. Немчинова, г. Москва, 2020 г.

Личный вклад автора

Работа представляет собой оригинальное исследование, на 90% выполненное лично автором, включая постановку цели и задач исследований, библиографический анализ, планирование и реализацию лабораторных и полевых опытов, статистическую обработку данных, обобщение и анализ результатов, подготовку и публикация статей. Разработка плана работы и подбор методов исследования, обсуждение результатов работы выполнены при участии научного руководителя.

Публикации результатов исследований. По материалам диссертации опубликовано 6 научных статей и 1 учебно-методическое пособие, в том числе 2 - в изданиях, рекомендованных ВАК РФ.

Структура и объем диссертации. Диссертационная работа содержит введение, главы, заключение, включающее выводы и практические рекомендации, библиографический список из 155 наименований, в том числе – 118 иностранных авторов. Работа изложена на 144 страницах, содержит 66 рисунков, 14 таблиц, 1 приложение

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

В обзоре проанализированы научные сведения, связанные с темой исследований.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Работа проводилась на базе кафедры генетики, селекции и семеноводства РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева.

Объектами исследования послужили: коллекция яровой тритикале кафедры генетики, селекции и семеноводства института Агробиотехнологии (66 сортообразцов коллекции). Лабораторная колония обыкновенной злаковой тли из ЗАО «Матвеевское», природные популяции тлей, перенесенные в лабораторные условия, а также регуляторы роста растений Вэрва, Экопин и микроудобрение Силиплант.

Характеристика погодных условий.

Погодные условия конца весны – лета 2016 в целом были умеренно теплыми и влажными, без резких падений температуры. Это благоприятствовало массовому развитию злаковых тлей и позволило им

превысить пороги вредоносности. Весна и лето 2017 года были холодными, с заморозками в мае и прохладной первой половиной лета. Это обусловило депрессию, низкую численность и распространение злаковых тлей.

Учеты численности тлей. Учет численности в полевых условиях проводился методом учетных участков и учетных растений (Дунаев, 1997). Коллекция была высеяна деланками 1x1м в двукратной повторности рандомизированно. Тлей учитывали визуально, на пробных растениях.

Содержание тлей. Тли содержались по методике автора (Голиванов, 2022). Колонии тлей содержались на проростках ячменя в пластиковых контейнерах объемом 16 литров с субстратом из нейтрализованного верхового торфа с двойной боковой вентиляцией, контейнеры находились в парниках. Температурный режим 26-28°C. Световой режим 16 часов.

Оценка репродуктивной способности тлей проводилась в 3х кратной повторности. В 3х контейнерах (250г.) В каждом 3 растения на каждое из которых высаживалось по одной тле. Растения 3-х дневного возраста. Подсчет проводился без учета 3 изначальных, родительских особей.

Оценки каталазной активности, осмотического давления и концентрации хлорофилла. Оценка физиологических показателей проводилась согласно стандартных методик (Третьяков, 2003)

Выделение ДНК и проведение полимеразной цепной реакции. Выделение ДНК осуществляли из насекомых фенольным методом. SSR-ПЦР проводили на термоциклере Biorad T100 (США).

Измерение толщины клеточной стенки яровой тритикале Измерение толщины клеточной стенки осуществлялось с помощью микрофотонасадки «TourCam 5,1» и ее программного обеспечения, в микрометрах.

Оценка влияния регуляторов роста и удобрения Обработку регуляторами роста проводили опрыскиванием с использованием загустителя «Твин 25» в количестве 1мл/л. при достижении проростками размера 2см.

Статистическая обработка Статистический анализ результатов осуществляли с применением стандартных статистических методов обработки данных с использованием дисперсионного и корреляционного анализа с помощью программы MS Excel

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

3.1 Оценка параметров отдельных этапов онтогенеза и репродуктивной способности обыкновенной злаковой тли на разных сортообразцах яровой тритикале

Биологические особенности злаковых тлей изучены недостаточно и могут меняться в зависимости от условий. Данные показатели имеют

важность при оценке сортоустойчивости растений, так как являются своего рода ее индикаторами.

Сроки линек.

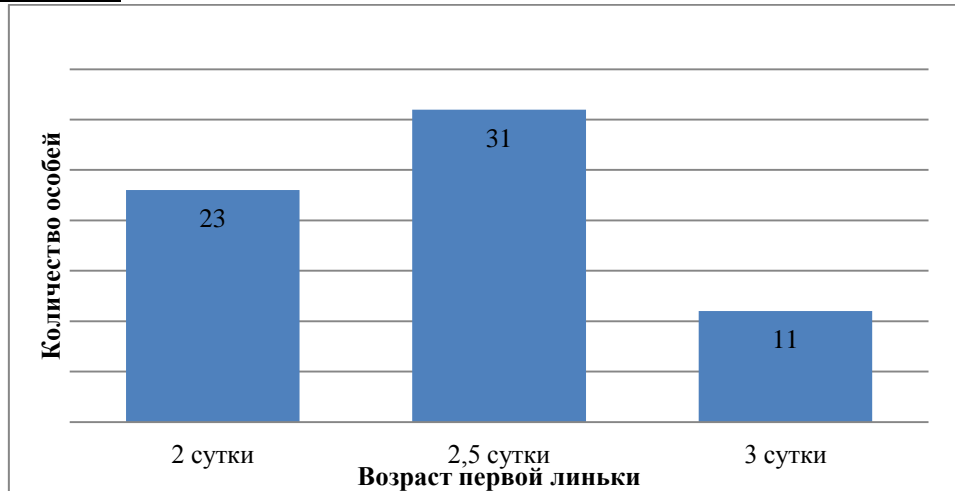


Рисунок 1. Сроки первой линьки обыкновенной злаковой тли

Проведены индивидуальные наблюдения за личиночным развитием 65 особей. Нимфы совершают свою первую линьку через 2-3 (в среднем - 2,4) суток после рождения. Вторая линька проходит более сжато, через 4-4,5 (в среднем - 4,4) суток и сопровождается заметным увеличением размеров.

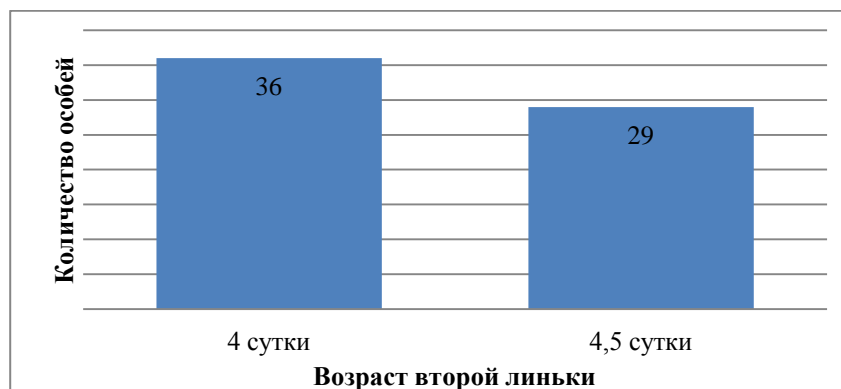


Рисунок 2. Сроки второй линьки обыкновенной злаковой тли

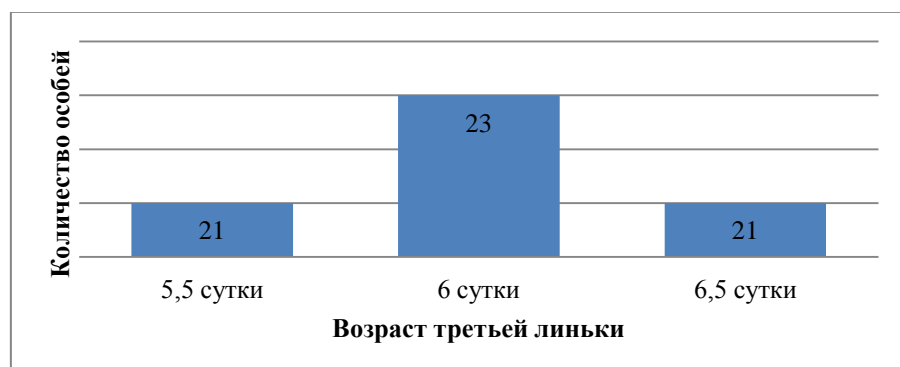


Рисунок 3. Сроки третьей линьки обыкновенной злаковой тли

Заключительная третья линька, совершается через 5,5 - 6,5 (в среднем - 6,0) суток после рождения, что составляет длительность личиночного развития при +23-26°C. Первая и третья линьки проходят более растянуто, чем вторая.

Репродуктивный период. В лабораторных условиях отмечалось только партеногенетическое размножение самок бескрылой формы. Проведены индивидуальные наблюдения за размножением 65 самок (рисунок 4).

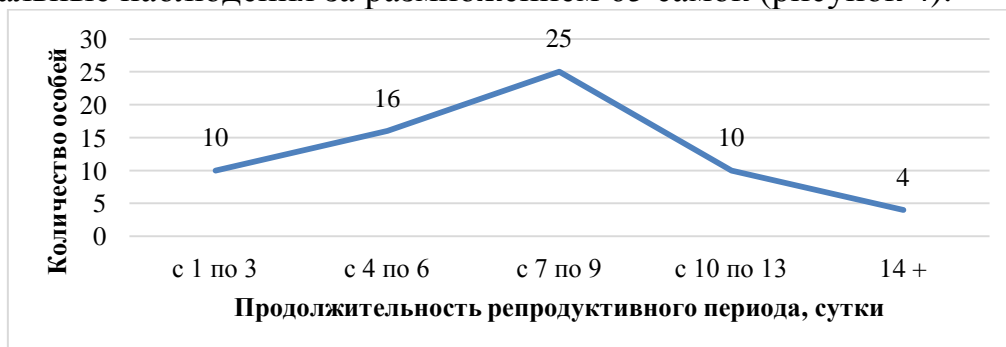


Рисунок 4. Продолжительность репродуктивного периода обыкновенной злаковой тли

Размножение начинается на следующие сутки после третьей линьки (через 7 суток от рождения). Репродуктивный период составляет в среднем $7,2 \pm 0,88$ суток.

Плодовитость. Ежесуточно самки отрождали от 2 до 6 личинок (рисунок 5). В среднем суточная плодовитость одной самки - $3,7 \pm 0,3$ личинок.



Рисунок 5. Среднее количество потомства в сутки от одной самки обыкновенной злаковой тли

Среднее количество потомства, принесенного одной самкой в течение всей жизни, составляло $27 \pm 3,89$ личинки (рисунок 6).

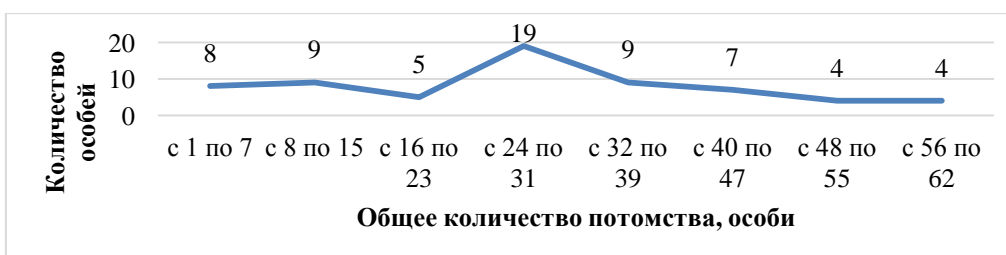


Рисунок 6. Общее количество потомства, произведенное одной особью

По литературным данным самка может произвести до 80 личинок. В проводимых исследованиях каждая самка производила по 20-30 личинок. Следует отметить значительную изменчивость репродуктивных параметров обыкновенной злаковой тли.

Продолжительность жизни. Средняя продолжительность жизни в среднем составляет $14 \pm 0,92$ суток (рисунок 7).

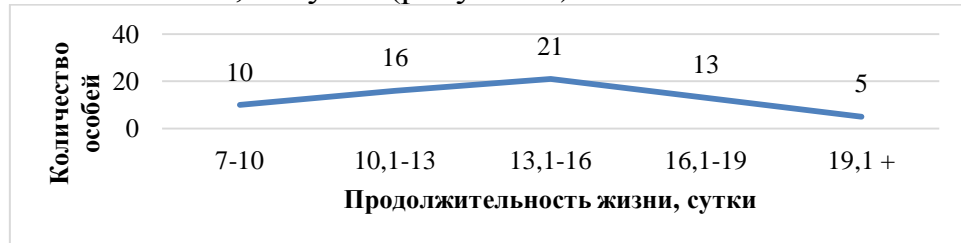


Рисунок 7. Продолжительность жизни каждой особи

Минимальная продолжительность жизни составляла 8 суток, максимальная – 25 суток. Самая долгоживущая самка в данной выборке принесла самое большое количество потомства - 62 личинки.

Оценка репродуктивной способности обыкновенной злаковой тли на разных сортообразцах тритикале в лабораторных условиях.

Способность к размножению вредителей на кормовых растениях – один из наиболее важных показателей при оценке сортоустойчивости. Для исследования использовали 66 сортообразцов коллекции яровой тритикале. Оценку проводили на проростках с индивидуальной подсадкой самок при появлении первого настоящего листа. Численность потомства оценивали на 4 день после заселения (рисунок 8).

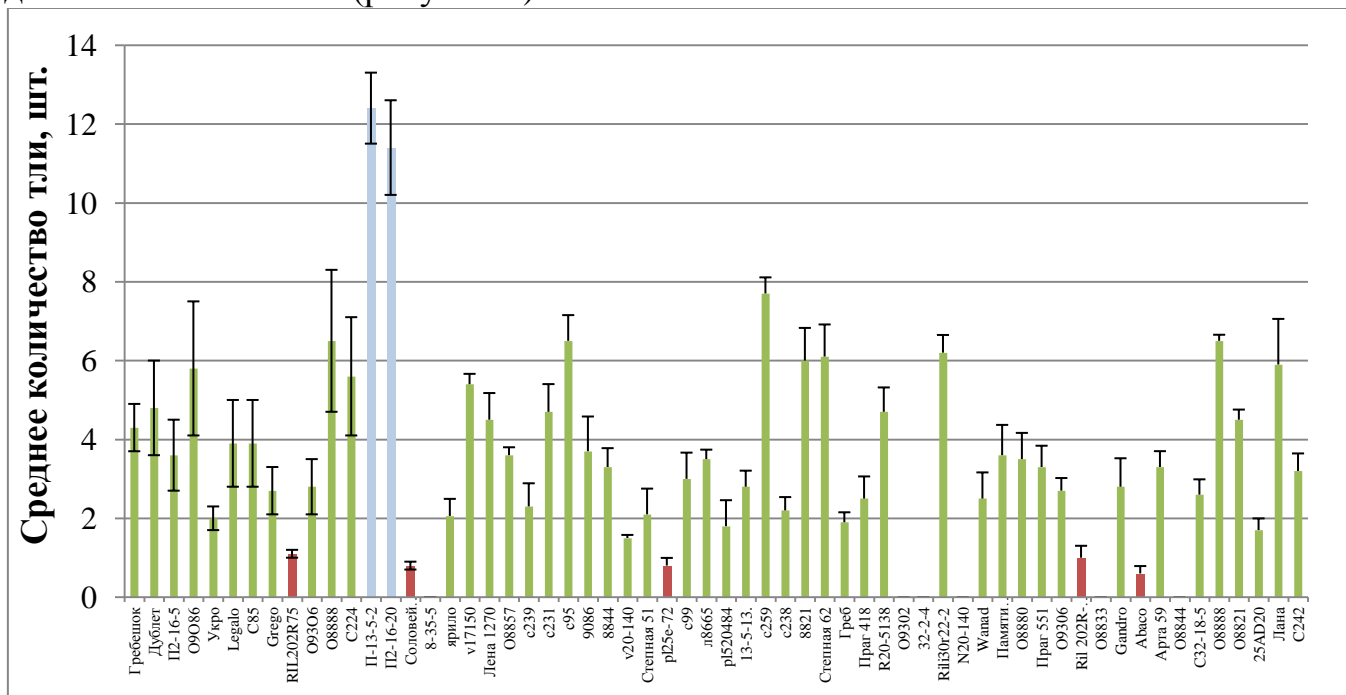


Рисунок 8. Среднее количество обыкновенной злаковой тли на сортообразцах яровой тритикале в лабораторных условиях

Анализ показал дифференциацию сортообразцов яровой тритикале по численности. Образцы 8-35-5, 08833, 08844, 32-2-4, 09302, Ri1202R75, Соловей Харьковский, P125E72, RIL202R751-62 и Abaco в условиях опыта оказались непригодными для размножения тлей. Вероятно, данные образцы обладают антибиотическими свойствами и представляют интерес для разработки сортоустойчивости к тлям. С другой стороны, сортообразцы П13-5-2 и П2-16-20 показали наивысшие результаты по репродукции тлей и могут быть рекомендованы в целях лабораторного культивирования.

По-видимому, данные различия связаны с физиолого-биохимическими различиями сортообразцов. Подобная дифференциация может быть связана с трудностями механического зондирования клеток мезофилла и повышенного содержания фенольных соединений, таких как феруловая, кумаровая и кофейная кислоты.

Выявление предпочтения обыкновенной злаковой тли при выборе растения-хозяина

При анализе репродуктивной способности оценивали количество тлей на изолированных растениях конкретного сортообразца, что не дает представления о пищевой избирательности вредителей и антиксенозе растений. В связи с этим предпринята оценка предпочтения при выборе растения-хозяина тлями на тех же сортообразцах.

В контейнер по периметру рандомизировано высаживали по одному растению 12 сортообразцов, и помещали 12 самок тлей одного возраста, предоставляя им выбирать растения и размножаться на них. В итоге подсчитывали численность тлей. Опыт проводился в трехкратной повторности (рисунок 9).

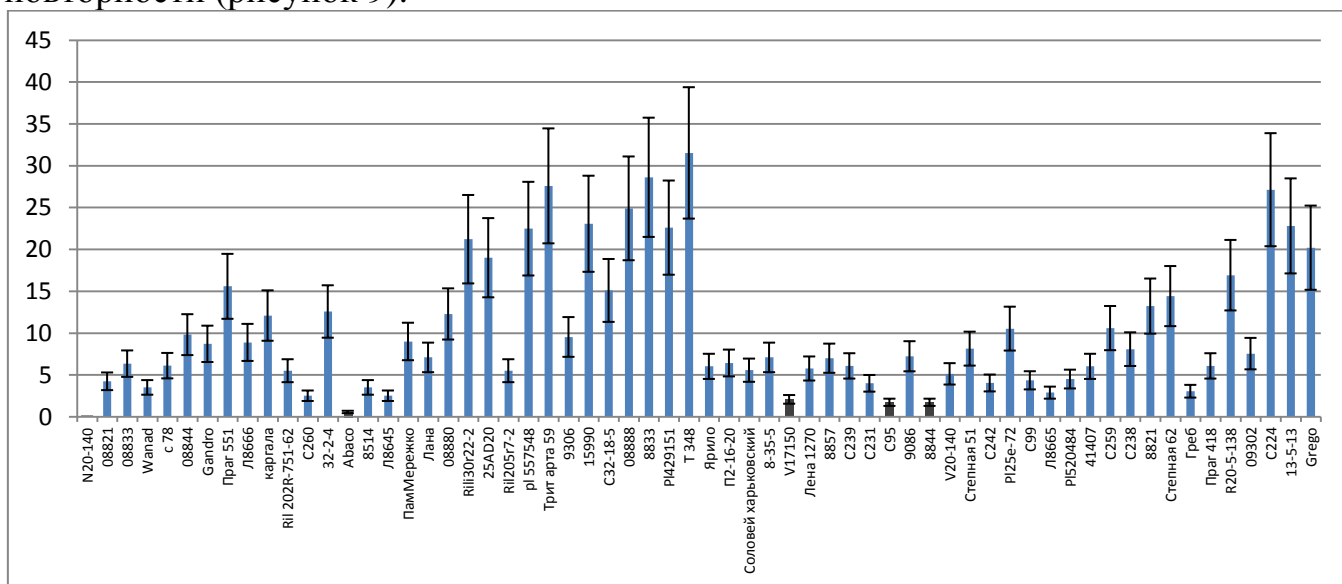


Рисунок 9. Численность тлей на сортообразцах яровой тритикале в условиях выбора

По результатам можно выделить 4 сортообразца: 8844, С95, V17150 и Авасо как самые нежелательные для тлей. Особо стоит отметить, что сортообразец Авасо оказался в группе с наименьшим значением по репродукции у тлей.

По литературным данным сорт Авасо отличается высокой активностью амилазы, что говорит о способности к быстрой мобилизации пулов запасных веществ для включения их в дыхательный метаболизм. На процессе дыхания основаны главные пути биосинтеза вторичных метаболитов в растении, в том числе фенольных соединений, которые могут являться антибиотическим фактором.

3.2 Оценка параметров отдельных этапов онтогенеза и репродуктивной способности черемухово-злаковой тли на разных сортообразцах яровой тритикале

Оценка параметров развития и размножения аналогичным образом проведена у черемухово-злаковой тли.

Сроки линек

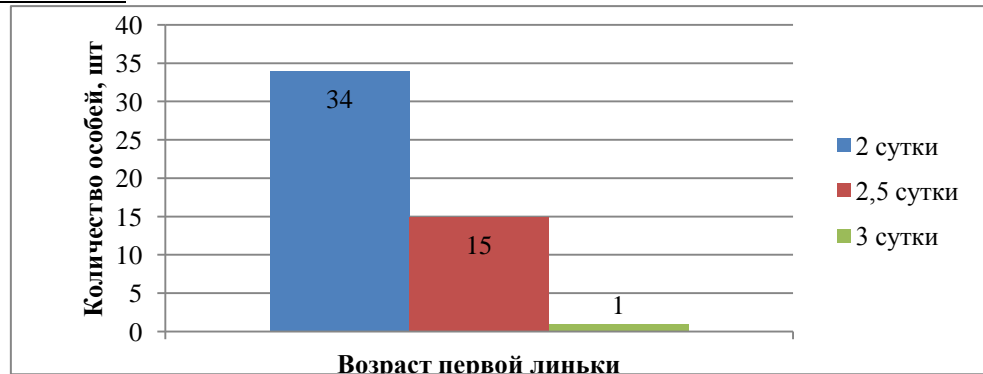


Рисунок 10. Сроки первой линьки черемухово-злаковой тли

Большинство личинок совершало первую линьку через 2-2,5 суток, вторую линьку – через 4-4,5 суток, третью линьку – через 6-6,5 суток после рождения, что составляло в данных условиях длительность личиночной фазы.

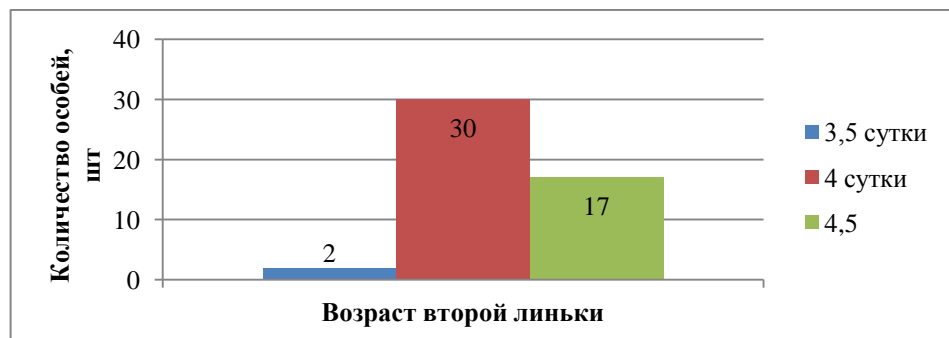


Рисунок 11. Сроки второй линьки черемухово-злаковой тли

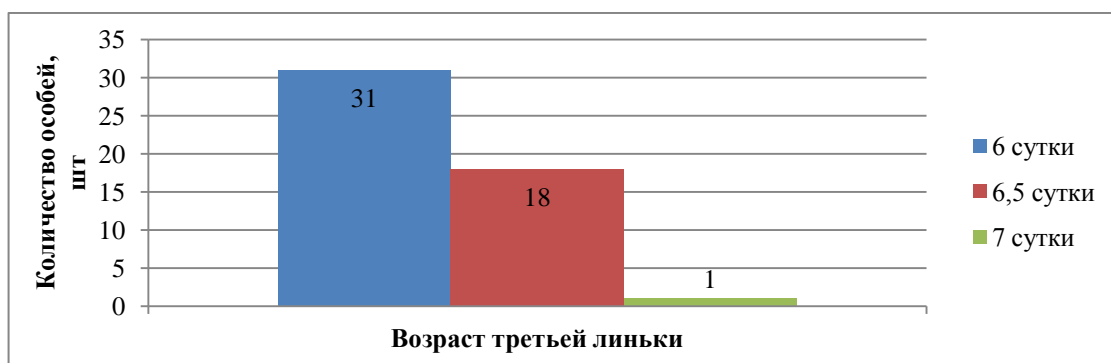


Рисунок 12. Сроки третьей линьки черемухово-злаковой тли

Таким образом, сроки личиночного развития и линек практически совпадают у обыкновенной злаковой и черемухово-злаковой тли.

Репродуктивный период. Размножение партеногенетических самок бескрылой формы начинается, в среднем, через $7,6 \pm 0,3$ суток и заканчивается в среднем, через $18,8 \pm 2,2$ суток от рождения (рисунок 13).

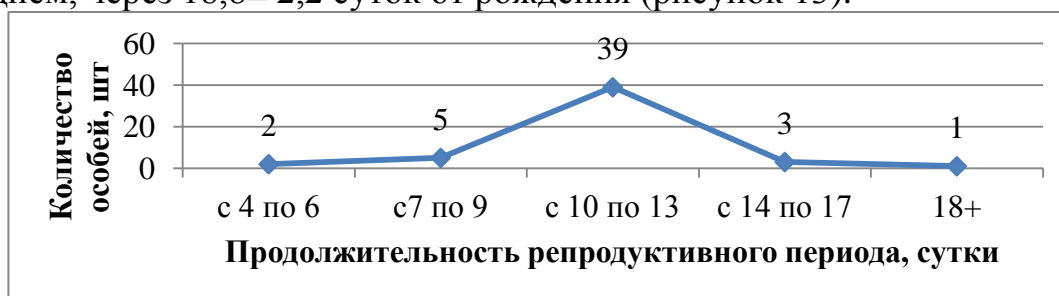


Рисунок 13. Продолжительность репродуктивного периода черемухово-злаковой тли

Длительность репродуктивного периода черемухово-злаковой тли в среднем составила $11,6 \pm 2,2$ суток, что значительно больше, чем у обыкновенной злаковой тли.

Плодовитость Каждые сутки самки отрождали от 1 до 6 нимф (рисунок 14). Средний приплод в сутки от одной самки $2,3 \pm 1,8$ личинок.

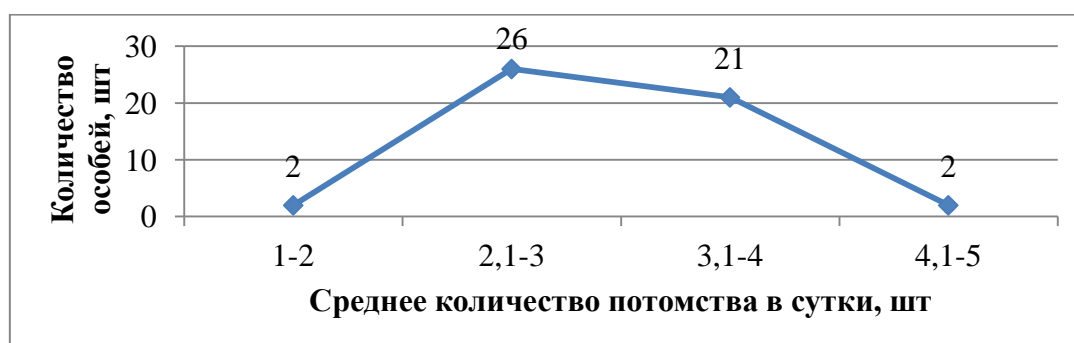


Рисунок 14. Среднее количество потомства в сутки от одной самки черемухово-злаковой тли

Среднее количество потомства, принесенного одной самкой в течение всей жизни, составило $37,2 \pm 8,7$ личинки (рисунок 15).

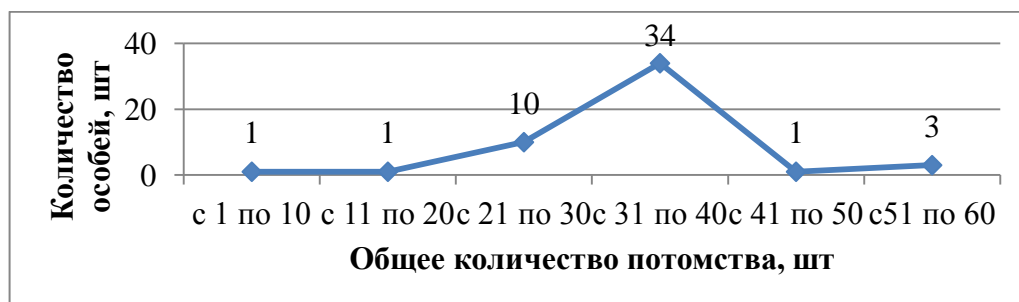


Рисунок 15. Общее количество потомства самок черемухово-злаковой тли

Черемухово-злаковая тля несколько уступает обыкновенной злаковой тле в скорости размножения, однако значительно превосходит ее по длительности репродукции и, в итоге, имеет большую общую плодовитость.

Продолжительность жизни. Средняя продолжительность жизни составляет $14 \pm 0,92$ суток (рисунок 16).



Рисунок 16. Продолжительность жизни черемухово-злаковой тли

Минимальная продолжительность жизни составляла 15,5 суток, максимальная – 26,5 суток. Самая долгоживущая особь в данной выборке принесла самое большое количество потомства в количестве 59 личинок. Средняя продолжительность жизни составила $20,76 \pm 2,48$ суток.

Оценка репродуктивной способности черемухово-злаковой тли в лабораторных условиях. Репродуктивную способность черемухово-злаковой тли оценивали на 19 сортообразцах яровой тритикале, с регистрацией численности на 2 и 4 день после заселения.

Гистограммы количества особей тлей на второй и четвертый день после заселения тлей приведены на рисунках 17 и 18.

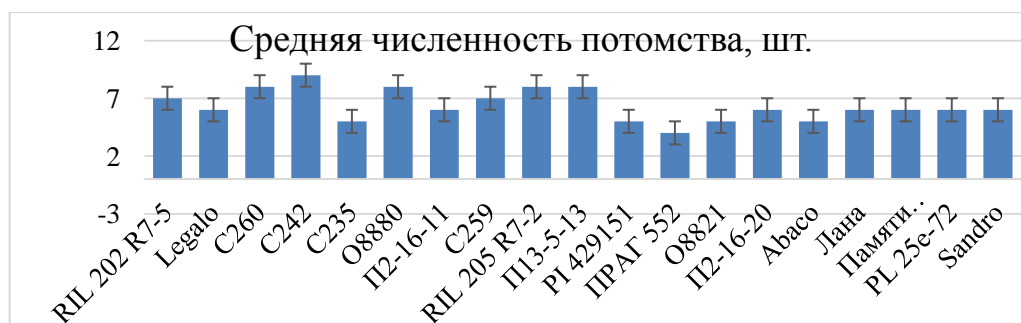


Рисунок 17. Численность потомства на второй день

Наименьшая численность на 2 день зафиксирована на образцах С235, PI 429151, Праг552, 08821, Abaco. Наибольшее количество тлей отмечено на образцах: С260, С242, С259 08880, RIL 205 R7-2, П13-5-13.

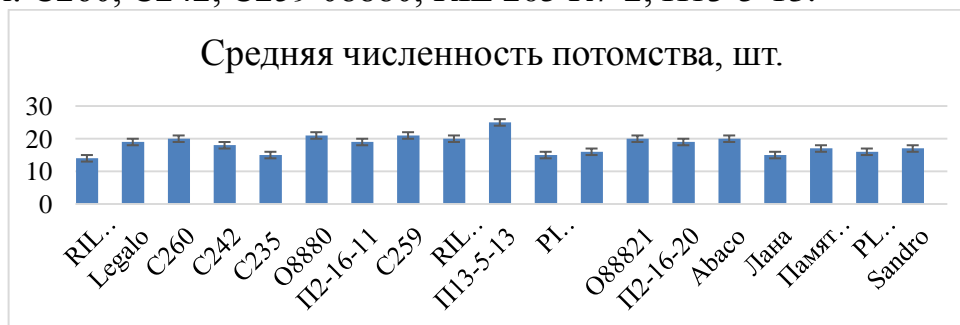


Рисунок 18. Численность потомства на четвёртый день

Наименьшая численность потомства тлей на 4 день отмечена на образцах: RIL 202 R7-5, С235, PI 429151, Праг552, Лана, PL25e-72. Наибольшая численность обнаружена на образцах: С260, 08880, С259, RIL 205 R7-2, П13-5-13, 08821, Abaco.

Рост численности колонии за два дня в среднем составил 2,98 раза. У образцов: RIL 202 R7-5, С260, С242, 08880, С259, RIL 205 R7-2, П13-5-13, PI 429151, Лана, Памяти Мережко, PL 25e-72 - рост численности был ниже среднего. Образцы: Legalo, С235, П2-16-11, ПРАГ 552, 08821, П2-16-20, Abaco - показали результат выше среднего.

Уровень дифференциации сортообразцов по численности тлей относительно невелик. Однако, вследствие малых ошибок, различия между выделенными слабо и сильно заселенными группами статистически значимы ($P < 0,01$).

3.3 Оценка численности тлей на сортовой коллекции яровой тритикале в полевых условиях.

В изучении сортоустойчивости обязательна оценка заселения растений вредителями в полевых условиях. Она проведена в сортовой коллекции яровой тритикале в 2016 -17 гг. на полевой опытной станции РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева. Учеты проводили дважды, в разные фазы развития культуры. В фазу кущения оценивали численность на листьях доминирующей в это время черемухово-злаковой тли, в фазу молочной спелости – преобладающей на колосьях большой злаковой тли *Sitobion avenae*.

2016 год. В благоприятных погодных условиях 2016 г. достигнут высокий естественный фон численности злаковых тлей. В фазе кущения выявлена значительная ($P < 0,001$) дифференциация сортообразцов яровой тритикале по заселению черемухово-злаковой тлей (рисунок 19).

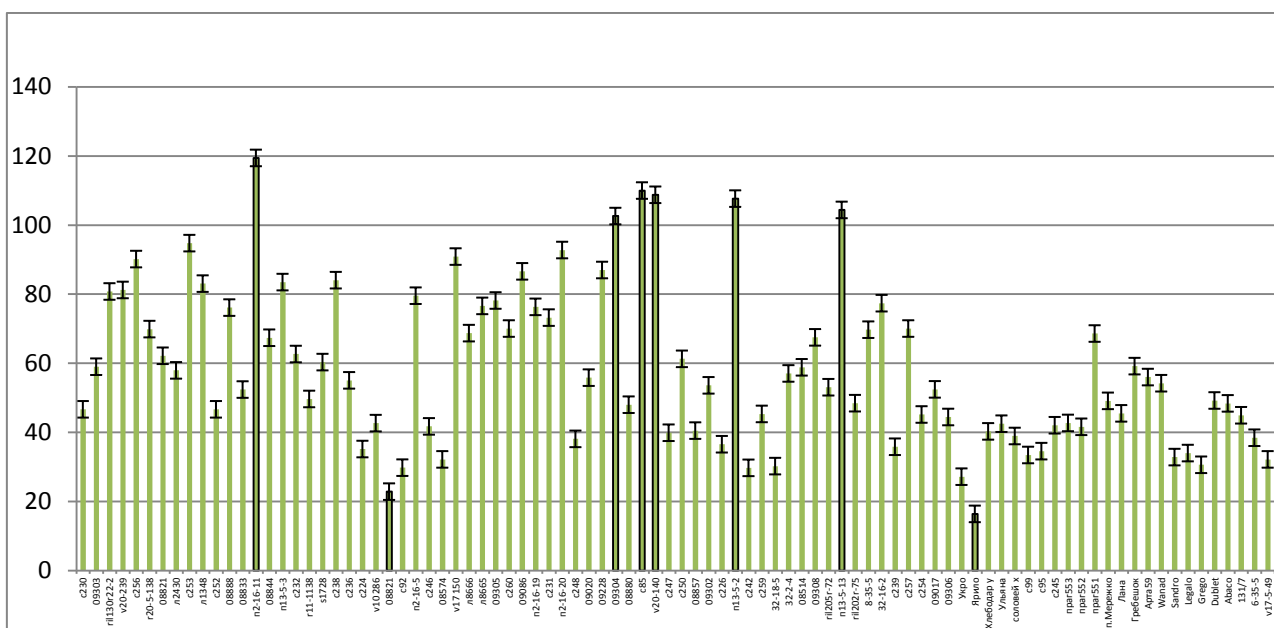


Рисунок 19. Численность черемухово-злаковой тли на сортообразцах яровой тритикале в полевых условиях в фазу кущения, 2016 г.

Сортообразцы **08821** и **Ярило** были заселены значительно менее других и перспективны в качестве источников устойчивости к черемухово-злаковой тле.

Также следует отметить образцы 08821, 09228, 09302, Лана, на которых наблюдали максимальную численность тлей.

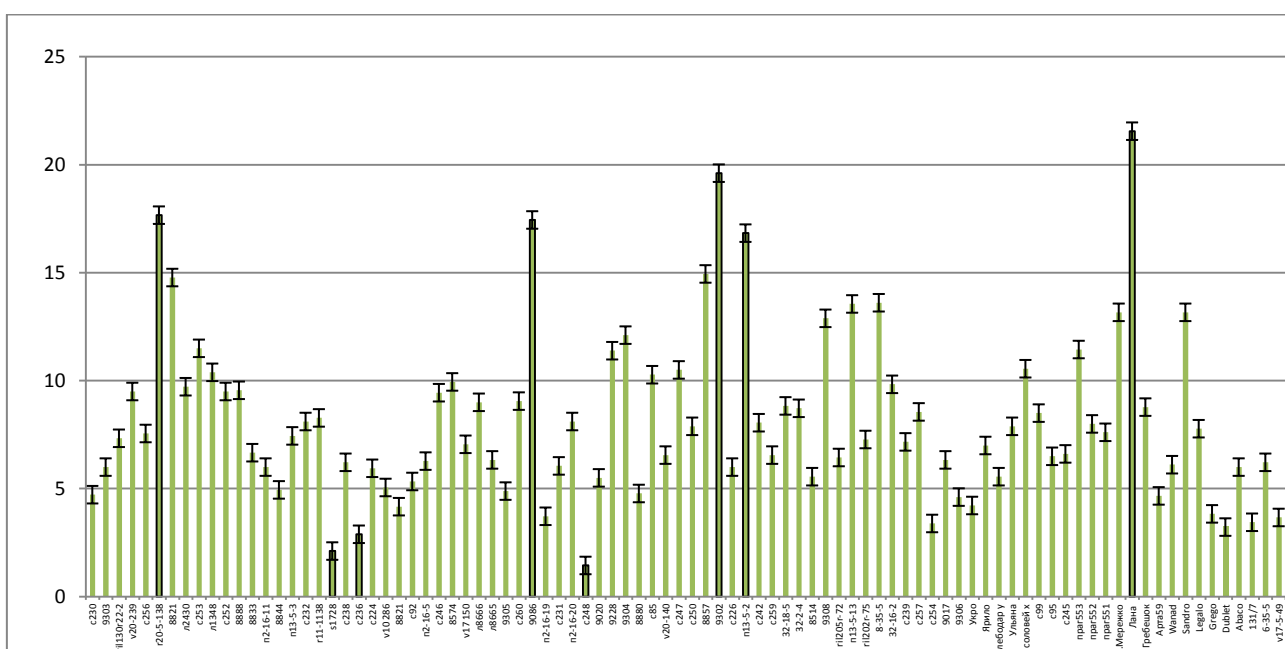


Рисунок 20. Численность большой злаковой тли на сортообразцах яровой тритикале в полевых условиях в фазу налива-молочной спелости зерна, 2016 г.

Анализ заселенности тритикале большой злаковой тлей на стадии налива – молочной спелости зерна также показал значимую ($P < 0,001$)

дифференциация сортообразцов, однако другого характера (рис. 31). Менее заселены **S1724, C236, C248, 131/7, Dublet**. Данные образцы перспективны как источники устойчивости к большой злаковой тле. Наибольшая численность тлей отмечена на образцах 08821, 09228, 09302, Л 1348, C246, П13-5-2, П13-5-13, Ярило, Лана.

При наблюдаемых различиях заселения тритикале в разные фазы разными видами тлей у образцов **C236, C248, 131/7, Dublet** отмечена низкая численность обоих видов.

2017 год. В неблагоприятных погодных условиях 2017 г. злаковые тли находились в депрессии. Фон заселения коллекции тритикале оказался крайне низким, что препятствовало оценке сортоустойчивости. Однако, на этом фоне проявились неожиданные реакции отдельных сортообразцов.

В фазу кущения численность черемухово-злаковой тли на 63 образцах составляла 0-2 особи на растение, у 2 образцов – до 5 особей, но у 1 образца, C250 превышала 30 особей.

В фазы налива – молочной спелости зерна численность большой злаковой тли на 59 сортообразцах была в пределах 0-2 особи на колос, у 6 образцов – на уровне 4-6 особей и у 1 образца, Памяти Мережко, составил 15 особей. Таким образом, единичные сортообразцы тритикале оказываются благоприятными для развития тлей в критических условиях.

3.4 Оценка генетического полиморфизма популяций разных видов тлей на территории РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева

У злаковых тлей существуют и формируются биотипы, способные преодолевать устойчивость сортов зерновых культур (Ху, 2011). Однако молекулярно-генетическая изменчивость, возможно, ассоциированная с этим процессом изучена мало. В связи с этим предпринято первичное изучение внутрипопуляционного полиморфизма у 3 видов тлей по локусам микросателлитной ДНК.

Всего проанализировано 3 вида тлей, взятых с 10 видов кормовых растений. Помимо черемухово-злаковой и обыкновенной злаковой тлей использовали также массовый многоядный вид – свекловичную листовую тлю *Aphis fabae*.

Для оценки популяции большой злаковой тли использовали четыре пары праймеров – *Sm17, S16b, Sm12, Sm10*, последний локализован в X-хромосоме, самой крупной у большинства тлей.

Размеры фрагментов ДНК варьировали от 150 до 600 пар нуклеотидов для локуса *S16b* (рисунок 37). В целом, наши данные соотносятся с данными полученными другими исследователями 160–283 п.н., некоторые различия объясняются сильно отдаленными точками сбора материала и разделением ДНК-фрагментов не на агарозном, а на полиакриламидном геле.

Схожие профили имели образцы, собранные на ячмене, один профиль имел образец, собранный с растений озимой тритикале.

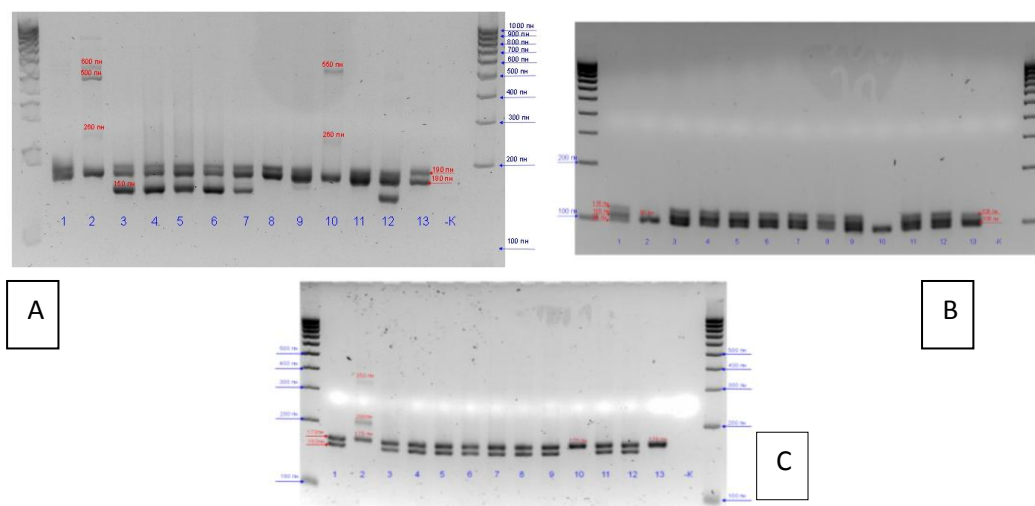


Рисунок 21. Электрофореграмма ампликонов большой злаковой тли по локусам *S16b* (A), *Sm10* (B), *Sm17*(C)

Размеры детектируемых ДНК – фрагментов варьировали от 160 до 350 пар нуклеотидов для локусов *Sm10*, от 95 до 115 для *Sm17* локусов (рисунок 21). Полученные размеры фрагментов *Sm10* локуса соотносятся с ожидаемыми размерами 152–240 п.н. Размеры ампликонов *Sm17* локуса кардинально отличаются от ожидаемых 178–183 п.н., однако фрагменты, полученные G. Malloch с соавторами, в Великобритании (2014 год), близки к нашим 92–96 п.н.

Наиболее полиморфны по двум исследуемым локусам были экземпляры, собранные на ячмене и на кукурузе

Из 5 аллелей локуса *Sm10* наиболее часто встречались аллели 160 и 170 пар нуклеотидов, из четырех аллелей локуса *Sm17* – 95 пар нуклеотидов, из трех аллелей *Sm12* – 145 пар нуклеотидов, а из восьми аллелей локуса *S16b* аллели 180 и 190 пар нуклеотидов. По литературным данным, наиболее часто встречающиеся аллели: 164 п.н. – *Sm10*; 178 п.н. ; 92 п.н.–*Sm 17*; 173 п.н. – *S16B*; 115 п.н. – *Sm 12*.

Популяция большой злаковой тли РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева генотипирована по четырем микросателлитным локусам, что в дальнейшем может являться основой для продолжения генетико-популяционных исследований этого вида.

Было проанализировано два микросателлитных локуса свекловичной тли и два черемухово-злаковой тли. Несмотря на максимально отдаленные друг от друга точки сбора материала, в рамках полевой опытной станции, полиморфизма по этим маркерам выявлено не было (рисунки 22,23), для полноценного анализа полиморфизма популяции необходимо увеличить количество исследуемых локусов и точек сбора материала. Также для черемуховой и свекловичной тли были проверены праймеры, подобранные для рода *Sitobion*, то есть для большой злаковой тли, отжига праймеров и наработки фрагментов не происходило.

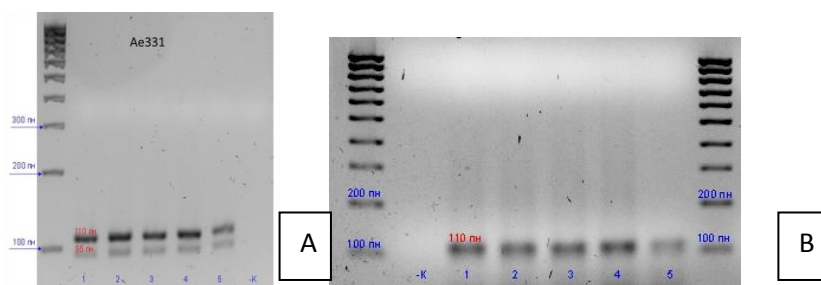


Рисунок 22. Электрофореграмма ампликонов свековичной тли по локусам *Ae331* (A) и *Ae32* (B)

При изменении программы амплификации *R3.171*, а именно увеличение времени циклической элонгации прозрачные бенды выше 300 п.н. исчезали.

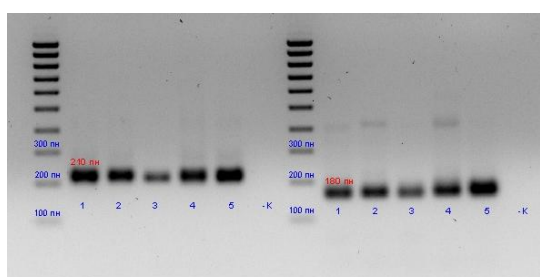


Рисунок 23. Электрофореграмма ампликонов черемухово-злаковой тли по локусам *R5.10* (слева) и *R3.171* (справа)

3.5 Оценка физиологических показателей поврежденных обыкновенной злаковой тлей растений

Каталазная активность Одной из наиболее распространенных реакций растительного организма на стрессовые условия является усиление синтеза каталазы, фермента, катализирующего процесс разложения пероксида водорода в организме растения. Активность каталазы может быть косвенным показателем уровня стрессового воздействия, индуцированного тлей. По результатам показана неоднородность данных по уровню активности каталазы, достоверных различий нет, однако прослеживается некоторая тенденция к увеличению каталазной активности при повреждении.

Уровень осмотического давления Строение колюще-сосущего ротового аппарата и характер питания тлей предполагает снижение осмотического давления в клетках поврежденных растений. С другой стороны, тли способны к осморегуляции, понижая осмотическое давление пищи за счет активности сахаразы в кишечнике (Karley et al., 2005). Пониженное давление клеток может быть фактором устойчивости растений к тлям.

Достоверной разницы между контролем и пораженными растениями не выявлено, однако прослеживается тенденция к понижению осмотического давления у растений, угнетенных тлями.

Концентрация хлорофилла a, b и каротиноидов Проанализированы концентрации пигментов поврежденных растений. Контролем служили

растения тех же сортообразцов без тлей. Результаты показали достоверное повышение концентрации хлорофиллов а и b, а также суммарного хлорофилла и снижение концентрации каротиноидов у поврежденных растений. Повышение концентрации хлорофилла, вероятно, является компенсаторной реакцией растений в ответ на повреждения. Снижение концентрации каротиноидов может быть прямым следствием питания тлей.

Кроме того, можно отметить специфичность адаптивных физиологических реакций сортообразцов тритикале в ответ на повреждения.

3.6 Оценка сортообразцов яровой тритикале по количеству белка

В отмеченном выше лабораторном определении интенсивности размножения обыкновенной злаковой тли на разных сортообразцах яровой тритикале обнаружена значительная дифференциация коллекции (рис.19). Одним из предполагаемых факторов, способствующих массовому размножению, является содержание белка в кормовых растениях.

У наиболее заселенных тлями образцов П13-5-2 и П2-16-20 содержание белка оказалось выше среднего. Однако при сравнении данных образцов с рядом мало заселенных (8-35-5, 0833, 08844, 32-2-4, 04302, Ril202R75, Соловей харьковский, P125E72, Ril202R751-62 и Abaco) достоверных различий по содержанию белка не выявлено.

Белок может являться одним из ключевых компонентов при потреблении флоэмного сока, однако наличие других биологически активных веществ может препятствовать развитию тлей.

3.7 Измерение толщины клеточной стенки без обработки и с обработкой кремниевым удобрением Силиплант

Еще одним показателем сортоустойчивости может являться толщина клеточной стенки – один из защитных механизмов высших растений против различных насекомых, включая и тлей.

В данной части работы предполагается, что сорта тритикале с наиболее толстой клеточной стенкой будут наиболее устойчивыми к тлям. Одним из препаратов, который может влиять на данный показатель можно считать Силиплант. Основной его компонент – это кремний, входящий в состав клеточной стенки. Предполагается, что увеличение содержания кремния в организме растения повлечет за собой утолщение клеточных стенок, что будет дополнительным препятствием для тлей.

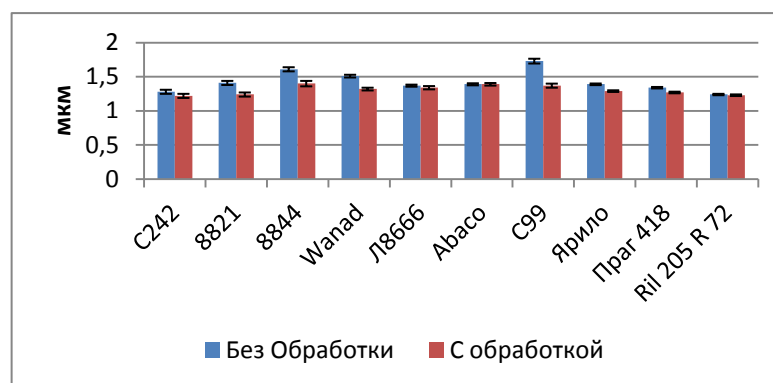


Рисунок 24. Сравнение результатов сортообразцов без обработки и с обработкой

На рисунке 55 представлены значения сортообразцов Ярило, C242, 08821, 08844, Wanad, Л8666, Abaco, C99, Праг 418 и Ril 205 R 72 без обработки и с обработкой кремниевым удобрением Силиплант. Вопреки ожидаемому, отмечается уменьшение толщины клеточной стенки с обработкой препаратом по сравнению с контролем.

3.8 Заселение обыкновенной злаковой тлей сортообразцов яровой тритикале при обработке препаратом Силиплант

Для оценки влияния обработки препаратом Силиплант на заселенность растений тлями проведен лабораторный опыт (рисунок 25).

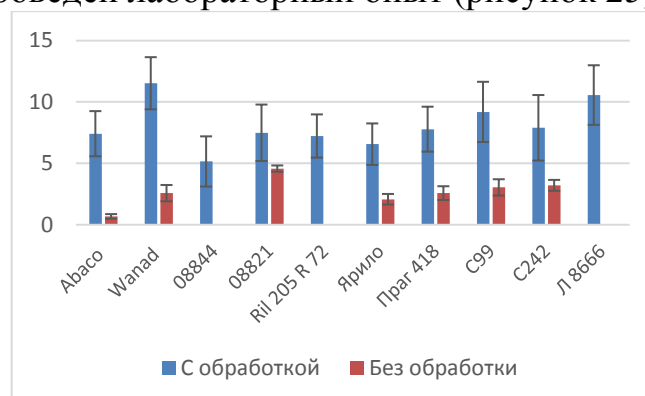


Рисунок 25. Численности обыкновенной злаковой тли на сортообразцах яровой тритикале при обработке препаратом Силиплант

Численность тлей на всех образцах яровой тритикале, не обработанных препаратом Силиплант значительно ниже, вплоть до нулевой.

Таким образом, обработка сортообразцов яровой тритикале препаратом Силиплант стимулирует увеличение численности обыкновенной злаковой тли.

Можно предположить, что данное микроудобрение вызывает утоньшение клеточных стенок за счет растяжения клеток. Клеточная стенка становится тонкой и более рыхлой, облегчая тлям проникновение в клетки мезофилла и оптимизируя их питание.

3.9 Оценка репродуктивной способности обыкновенной злаковой тли на различных сортообразцах при использовании регуляторов роста Вэрва и Экопин

Для оценки влияния применяемых на зерновых культурах регуляторов роста Вэрва и Экопин на численности тлей на различных сортообразцах яровой тритикале был проведен опыт с обработкой растений данными препаратами (рисунок 26)

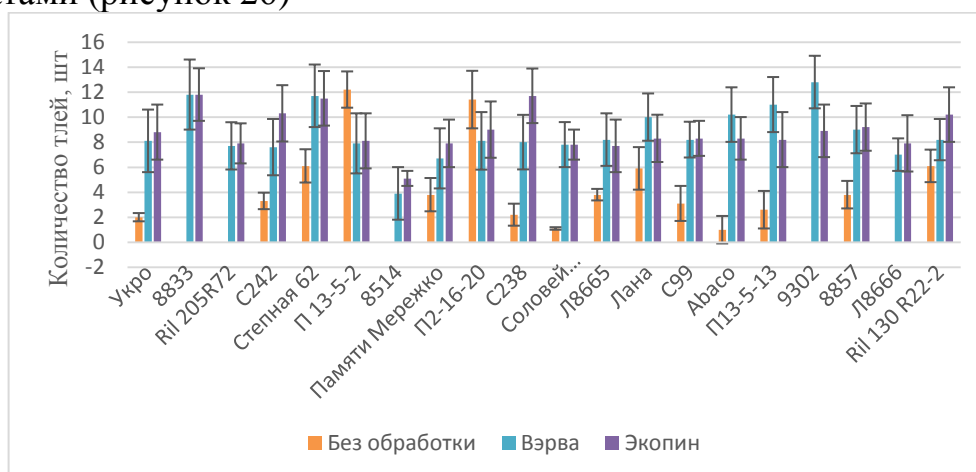


Рисунок 26. Репродуктивная способность тлей на различных сортообразцах при использовании регуляторов роста

Существенные различия численности тлей при обработке по сравнению с контролем наблюдаются у образцов Укро, 8833, С242, Степная 62, С238, Соловей Харьковский, Л8665, С99, Abaco, П13-5-13, 9302, 8857. На них численность тлей при обработке регуляторами роста, многократно выше, чем без нее.

У образцов Памяти Мережко и Ril-130 R22-2 численность тлей при обработке регулятором роста Вэрва значимо выше, чем в контроле. У сортообразца П2-16-20 нет существенных различий по численности тлей на обработанных и не обработанных растениях. У единственного сортообразца П13-5-2 численность тлей на необработанных растениях выше, чем при обработке.

Таким образом, при использовании регуляторов роста в большинстве случаев происходит увеличение численности тлей на растениях тритикале. Это может объясняться тем, что при усилении вегетативного роста под воздействием регуляторов происходит снижение толщины клеточной стенки и снижение уровня накопления защитных вторичных метаболитов вследствие увеличения объема клеток.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. В лабораторных условиях проведена оценка репродуктивного периода и количества потомства двух видов злаковых тлей. У обыкновенной злаковой тли *Schizaphis graminum* личинки проходят 3 линьки в среднем

через каждые двое суток. Средняя длительность репродуктивного периода – 7,2 суток, с плодовитостью 3,7 личинок на 1 самку в сутки. Общая плодовитость составляет в среднем 27 личинок, максимально – до 62 личинок. У черемухово-злаковой тли *Rhopalosiphum padi* период развития личинок сходен с таковым обыкновенной злаковой тли. Средняя длительность репродуктивного периода – 12,5 суток, с плодовитостью около 2,5 личинок на 1 самку в сутки. Общая плодовитость составила в среднем 34 личинок, максимально – до 59. Черемухово-злаковая тля имеет более высокий потенциал размножения, нежели обыкновенная злаковая тля.

2. При оценке численности 2-х видов злаковых тлей при заселении растений тритикале в лабораторных условиях выявлено, что сортообразцы яровой тритикале 8-35-5, 08833, 08844, 32-2-4, 04302, Ril202R75, Соловей Харьковский, P125E72, RIL202R751-62 и Abaco показали наименьшую заселенность обыкновенной злаковой тлей, что может свидетельствовать об их устойчивости.

3. Анализ численности тлей на 66 сортообразцах в коллекции яровой тритикале в полевых условиях показал статистически достоверные различия между ними по степени заселенности от максимальной – 119 особей до минимальной – 1 особь. В 2016 г. в фазе кущения черемухово-злаковой тлей были наименее заселены 2 сортообразца: 08821 и Ярило. Максимальным заселением отличалось 4 образца: 08821, 09228, 09302, Лана. Большой злаковой тлей в фазе налива-молочной спелости были наименее заселены колосья у 5 сортообразцов: S1724, C236, C248, 131/7, Dublet. Наибольшая численность вредителя была зарегистрирована на 9 сортообразцах: 08821, 09228, 09302, Л 1348, C246, П13-5-2, П13-5-13, Ярило, Лана. В 2017 г. Заселенность тлями большинства сортообразцов тритикале была крайне низкой, но сортообразец C250 характеризовался высокой численностью черемухово-злаковой тли, а образцы Памяти Мережко, C247, V10-286, C 257 имели высокую численность большой злаковой тли.

4. У 30 сортообразцов тритикале отмечена тенденция к снижению осмотического клеточного давления при повреждении тлями, некоторое снижение содержания каротиноидов и достоверное увеличение концентрации хлорофиллов а и b

5. В лабораторных экспериментах показано достоверное влияние регуляторов роста растений Экопин, ТП, Вэрва, ВЭ и кремниевого микроудобрения Силиплант, Ж на увеличение численности тлей *S. Graminum*. Обработка Силиплантом, Ж вызывала утоньшение клеточных стенок у большинства сортообразцов тритикале

6. При анализе генетической структуры популяции 3 видов тлей на территории РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева у большой злаковой тли выявлен полиморфизм по 4 локусам микросателлитной ДНК; число аллелей локуса составляло от 3 до 8.

Проведенная работа открывает обширную область для дальнейших исследований. Важно продолжить лабораторные и полевые испытания

устойчивости перспективных образцов тритикале, обращая внимание на более детальное изучение возможных факторов устойчивости: морфологических, физиологических, генетических. Выявление стимулирующего численность тлей действия некоторых агрохимикатов ставит вопрос о поиске оптимальных их форм и норм внесения для защиты растений. Обнаружение полиморфизма по молекулярно-генетическим маркерам дает возможность дальнейших исследований по выяснению эколого-популяционных факторов. Следует продолжить разработку методов лабораторного культивирования тлей, дающую возможность экспресс апробации новых средств защиты растений.

СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ

Публикации в изданиях, рекомендованных ВАК РФ

1. **Голиванов, Я. Ю.** Оценка заселения злаковыми тлями коллекции сортообразцов яровой тритикале / Я. Ю. Голиванов, С. А. Блинова, В. В. Гриценко // Известия Тимирязевской сельскохозяйственной академии. – 2021. – № 6. – С. 42-51. – DOI 10.26897/0021-342X-2021-6-42-51.

2. **Голиванов, Я. Ю.** Особенности биологического развития черемухово-злаковой тли (*Rhopalosiphum padi*) в лабораторных условиях / Я. Ю. Голиванов, В. В. Зелененко, В. В. Гриценко // Известия Тимирязевской сельскохозяйственной академии. – 2021. – № 4. – С. 142-148. – DOI 10.26897/0021-342X-2021-4-142-148.

Публикации в рецензируемых научных изданиях

3. **Голиванов, Я. Ю.** Оценка репродуктивных показателей злаковой тли на разных генотипах яровой тритикале / Я. Ю. Голиванов, С. А. Блинова, А. А. Соловьев // Вавиловские чтения - 2016 : сборник статей международной научно-практической конференции, посвященной 129-й годовщине со дня рождения академика Н.И. Вавилова, Саратов, 24–25 ноября 2016 года. – Саратов: Саратовский государственный аграрный университет им. Н.И. Вавилова, 2016. – С. 192-194.

4. **Голиванов, Я. Ю.** Устойчивость тритикале к злаковой тле / Я. Ю. Голиванов, С. А. Блинова // XII неделя науки молодёжи Северо-Восточного административного округа города Москвы, посвященная 160-летию К.Э. Циолковского : Сборник статей, Москва, 24–30 апреля 2017 года. – Москва: Российский государственный аграрный университет - МСХА им. К.А. Тимирязева, 2017. – С. 223-227.

5. Блинова, С. А. Полиморфизм популяции злаковой тли по SSR-локусам / С. А. Блинова, **Я. Ю. Голиванов** // XII неделя науки молодёжи Северо-Восточного административного округа города Москвы, посвященная 160-летию К.Э. Циолковского : Сборник статей, Москва, 24–30 апреля 2017 года. – Москва: Российский государственный аграрный университет - МСХА им. К.А. Тимирязева, 2017. – С. 217-221.

6. **Голиванов, Я. Ю.** Оценка репродуктивной способности обыкновенной злаковой тли (*Schizaphis graminum* Rondani, 1852) на сортообразцах яровой

тритикале (*Triticosecale* Wittm & Camus) в лабораторных условиях / Я. Ю. Голиванов // Доклады ТСХА, Москва, 03–05 декабря 2019 года. Том Выпуск 292, Часть IV. – Москва: Российский государственный аграрный университет - МСХА им. К.А. Тимирязева, 2020. – С. 96-98.

Учебно-методические пособия

7. **Голиванов, Я. Ю.** Содержание злаковых тлей в лабораторных условиях : Учебно-методическое пособие / Я. Ю. Голиванов. – Москва : Российский государственный аграрный университет - МСХА им. К.А. Тимирязева, 2022. – 32 с.