PROGRESS IN PLANT PROTECTION
61 (4): 308-318, 2021
eISSN 2084-4883

DOI: 10.14199/ppp-2021-033
Published online: 28.10.2021

Received: 26.08.2021 / Accepted: 15.10.2021

ARTYKUŁ ORYGINALNY

Ekspresja genów kodujących oksydazę polifenolową oraz amoniakoliazę L-fenyloalaniny pszenicy w odpowiedzi na żerowanie larw *Oulema* spp.

Expression of genes encoding polyphenol oxidase and phenylalanine ammonia-lyase in wheat in response to *Oulema* spp. larvae feeding

Beata Wielkopolan*

Streszczenie

Skrzypionki należą do ważnych gospodarczo agrofagów zbóż, ponieważ ich żerowanie, szczególnie stadium larwalnego, może znacznie zmniejszyć jakość oraz ilość uzyskanego plonu. Celem pracy było sprawdzenie ekspresji genów *PPO* oraz *PAL* biorących udział w produkcji metabolitów wtórnych, w odpowiedzi na żerowanie larw skrzypionek ze zredukowanym lub niezredukowanym komponentem bakteryjnym. Wykazano, że bakterie związane z larwami skrzypionek tłumią odpowiedź pszenicy na korzyść gospodarza – owada. Każda z trzech odmian pszenicy wykształciła unikalny mechanizm obronny na żerowanie larw skrzypionek (między innymi uszkodzenie mechaniczne czy uszkodzenie powstałe w wyniku żerowania owada). Odmiana Arkadia znacznie szybciej oraz silniej reagowała na traktowanie w porównaniu do dwóch pozostałych odmian pszenicy. Zrozumienie ekspresji genów zaangażowanych w obronę roślin przeciwko roślinożernym szkodnikom jest bardzo ważne z ekologicznego punktu widzenia i ma duży potencjał do wykorzystania w ochronie roślin.

Słowa kluczowe: *Oulema* spp., pszenica, odpowiedź obronna, bakterie, metabolity wtórne, *PPO*, *PAL*

Abstract

Cereal leaf beetle (CLB, *Oulema* spp.) are economically important pests of cereals, because their feeding, especially at the larval stage may significantly reduce the quality and quantity of the obtained crop. The aim of the study was explanation the expression level of *PPO* and *PAL* genes involved in the secondary metabolites production in response to feeding of CLB larvae with a reduced or not reduced bacterial component. It was indicated that bacteria associated with CLB larvae supressed wheat response to CLB feeding to the benefit of insect host. Each of the three wheat varieties developed a unique defence mechanism against tested stress factors (including mechanical damage or damage caused by larvae feeding). The Arkadia variety reacted much faster and stronger to treatments in comparison to the other two wheat varieties. Understanding of the expression of genes involved in the plant defence response against herbivory pests is very important from an ecological point of view and has a great potential for use in plant protection.

Key words: *Oulema* spp., wheat, defense response, bacteria, secondary metabolites, *PPO*, *PAL*

Instytut Ochrony Roślin – Państwowy Instytut Badawczy
Władysława Węgorka 20, 60-318 Poznań
*corresponding author: b.wielkopolan@iorpib.poznan.pl
ORCID: 0000-0001-5734-9148

Wstęp / Introduction

Odpowiedź obronna rośliny jest złożonym procesem, na który wpływ ma wiele czynników. W odpowiedzi na atak roślinożernych owadów, dochodzi u roślin do indukcji odpowiednich szlaków sygnalizacyjnych, następnie do zmian w ekspresji genów związanych z obroną, a w rezultacie do indukcji odpowiednich szlaków biosyntezy oraz reorganizacji metabolizmu. Istotny wpływ na całokształt odpowiedzi obronnej rośliny ma nie tylko zranienie tkanek roślinnych przez owada, ale również reakcja na mikroorganizmy z nim związane, czy elicytory znajdujące się w wydzielinie jego aparatu gębowego. Czynniki te mogą modulować odpowiedź rośliny na korzyść gospodarza – owada, poprzez supresję indukcji mechanizmów mogących mieć na niego negatywny wpływ (Wielkopolan i Obrępalska-Stęplowska 2016; War i wsp. 2018; Jones i wsp. 2019). Odpowiedź obronna rośliny występuje nie tylko w miejscu zranienia, lecz również w innych nieuszkodzonych częściach rośliny (Wielkopolan i wsp. 2018).

Obecnie dąży się do ograniczenia ilości stosowanych środków ochrony roślin do minimum, ponadto wiele z nich jest wycofywanych w krajach Unii Europejskiej, dlatego istnieje potrzeba znalezienia innych metod ochrony roślin. Jednym ze sposobów mogących ograniczyć straty wyrządzane przez agrofagi jest wykorzystanie naturalnego potencjału roślin, które wykształciły szereg biochemicznych i morfologicznych mechanizmów obronnych, by uniknąć lub zniwelować uszkodzenia wyrządzane między innymi przez roślinożerne owady. Odporność roślin oparta na zmianach biochemicznych jest uważana za bardziej efektywną z uwagi na jej bezpośredni wpływ na wzrost i rozwój owada (War i wsp. 2018). Pierwszą barierę ograniczającą straty spowodowane przez żerowanie owada stanowią struktury znajdujące się na powierzchni roślin (włoski, ciernie, grubsza ściana komórkowa, lignifikacja) oraz toksyczne terpenoidy, alkaloidy, antocyjany, fenole czy chinony, które mogą negatywnie wpływać na rozwój owadów, a nawet doprowadzić do ich śmierci (War i wsp. 2012). Jednym z ważnych aspektów reakcji obronnych rośliny przeciwko owadom jest zaburzenie ich procesów trawiennych. Do enzymów, zaburzających pobieranie składników pokarmowych przez owada należą między innymi oksydazy polifenolowe (PPO), peroksydazy askorbinianowe i inne peroksydazy, które utleniają fenole (War i wsp. 2012). Fenole są metabolitami wtórnymi rośliny i powszechnymi związkami obronnymi, które odgrywają kluczową rolę w odporności rośliny przed roślinożernymi owadami. Chinony powstałe w wyniku utleniania fenoli przez PPO i peroksydazy wiążą się z białkami liści, co wpływa na jakość odżywczą materiału roślinnego i utrudnia trawienie białek przez owady. Ponadto chinony i reaktywne formy tlenu mogą mieć toksyczny wpływ na szkodnika (War i wsp. 2012). Enzym PPO bierze również udział w tworzeniu melaniny, która zwiększa odporność ściany komórkowej rośliny na owady i patogeny (War i wsp. 2012). W literaturze jest wiele przykładów wskazujących korelację między indukcją aktywności PPO a kondycją owadów (Bhonwong i wsp. 2009; Serhi i wsp. 2009; War i wsp. 2012). Wykazano związek pomiędzy aktywnością PPO a odpornością rośliny na atak między innymi takich gatunków, jak: *Spodoptera litura*, *Helicoverpa armigera*, *Bemisia tabaci* (Gen.), *Tetranychus cinnabarinus* (Boisd.), *Myzus persicae* (Sulzer), *Empoasca fabae* (Harris), *Aphis medicaginis* (Koch), *Spodoptera exigua* (Hub), czy *Agelastica alni* (L.) (Tscharnthe i wsp. 2001; Bhonwong i wsp. 2009; Usha Rani i Jyothsna 2010; He i wsp. 2011; War i wsp. 2011, 2012).

Amoniakoliaza L-fenyloalaniny (PAL) jest enzymem uczestniczącym w regulacji przemian cyklu szlaku szikimowego, w ramach którego syntetyzowane są m.in. związki fenolowe, które mogą wykazywać właściwości antyoksydacyjne lub uczestniczyć w reakcjach obronnych roślin przed fitofagami. Tworzenie ligniny czy suberyny również zależy od aktywności PAL (Zhang i wsp. 2017).

Rośliny mogą również pośrednio wpływać na roślinożerne owady. Rośliny będące cennym źródłem związków lotnych, które ograniczają straty wyrządzane przez owady dzięki właściwościom odstraszającym szkodniki lub właściwościom przywabiającym ich naturalnych wrogów (drapieżniki, parazytoidy), mogą stanowić alternatywę przyjazną dla środowiska (Piesik i wsp. 2018, 2020; Łyczko i wsp. 2021).

Badanie interakcji roślina – owad to jedno z najważniejszych i multidyscyplinarnych przedsięwzięć mające na celu opisanie mechanizmów obronnych rośliny odpowiedzialnych za przebieg interakcji pomiędzy nią a roślinożernym owadem. Zrozumienie natury ekspresji genów związanych z obroną jest bardzo ważne z ekologicznego punktu widzenia i ma duży potencjał do wykorzystania w ochronie roślin.

Celem niniejszej pracy było zbadanie ekspresji genów kodujących enzymy zaangażowane w produkcję metabolitów wtórnych, tj. PPO oraz PAL w pszenicy, w odpowiedzi na żerowanie larw skrzypionek. Ponadto drugim celem przeprowadzonych badań było sprawdzenie, czy bakterie związane z larwami skrzypionek mogą modulować odpowiedź rośliny na korzyść owada, poprzez supresję ekspresji genu *PPO* i *PAL*. Do doświadczenia wykorzystano larwy skrzypionek, ponieważ ich żerowanie szczególnie na liściu flagowym, czy podflagowym ma duży wpływ na ilość i jakość uzyskanego plonu.

Materiały i metody / Materials and methods

Materiał roślinny

Materiał do badań stanowiły rośliny pszenicy w stadium pięciu liści. W doświadczeniu wykorzystano trzy odmiany tej rośliny, tj. Arabella (pszenica jara), Arkadia oraz Bande-

rola (pszenica ozima) (DANKO Hodowla Roślin Sp. z o.o.). Badania przeprowadzono w Centrum Badań Organizmów Kwarantannowych, Inwazyjnych i Genetycznie Zmodyfikowanych Instytutu Ochrony Roślin – Państwowego Instytutu Badawczego. Doświadczenie przeprowadzono w 2018 w następujących warunkach: fotoperiod 16L : 8D, wilgotność 40%, temperatura 17°C dzień/12°C noc. Doświadczenie obejmowało następujące traktowania: a) kontrola (rośliny nieuszkodzone), b) rośliny uszkodzone przez larwy skrzypionek ze zredukowaną (larwy potraktowano mieszaniną antybiotyków) lub c) naturalną florą bakteryjną, d) rośliny uszkodzone mechanicznie (górna warstwa tkanki liścia została zeskrobana przy użyciu sterylnej igły) oraz e) rośliny uszkodzone mechanicznie, w miejsce zranienia nałożono wydzielinę aparatu gębowego pobraną od larw skrzypionek ze zredukowaną lub f) naturalną florą bakteryjną. Materiał roślinny, tj. liście uszkodzone (odpowiedź lokalna) oraz nieuszkodzone (odpowiedź systemiczna) dla pięciu powtórzeń biologicznych zebrano w trzech punktach czasowych, tj. po 12, 24 oraz 48 godzinach od traktowania. Zebrany materiał został bezpośrednio umieszczony w ciekłym azocie, następnie był przechowywany w temperaturze –80°C do czasu izolacji RNA.

Zredukowanie ilości bakterii związanych z larwami skrzypionek

W celu sprawdzenia czy bakterie związane z larwami skrzypionek modulują odpowiedź obronną rośliny, część zebranych z pola larw skrzypionek została potraktowana mieszaniną antybiotyków celem zredukowania liczby bakterii w wydzielinie ich aparatu gębowego. Mieszanina antybiotyków (50 ml) zawierała streptomycynę (0,0003 g, Sigma-Aldrich), chlortetracyklinę (0,05 g, Sigma-Aldrich), kwas sorbowy (0,03 g, Sigma-Aldrich) oraz metyloparaben (0,04 g Sigma-Aldrich) (Chung i wsp. 2013). W celu lepszego przylegania mieszaniny do powierzchni liści, zmniejszono napięcie powierzchniowe cieczy dodając Triton X–100 (0,01%). Larwy skrzypionek zebrano z pola pszenicy na terenie Stacji Doświadczalnej Oceny Odmian w miejscowości Słupia Wielka. Larwy żerowały 2 dni na liściach pokrytych mieszaniną antybiotyków. Kontrolę stanowiły larwy, które żerowały na liściach pokrytych wodą z dodatkiem Tritonu X–100. Odpowiednio przygotowane liście umieszczano na płytkę Petriego z 1% pożywką agarozową, by liście zachowały właściwy turgor. Z części odpowiednio potraktowanych larw zebrano wydzielinę aparatu gębowego, którą rozcieńczono wodą autoklawowaną (1 : 20). Na mechanicznie uszkodzone miejsce nakładano 5 µl rozcieńczonej wydzieliny.

Izolacja całkowitego RNA z materiału roślinnego i synteza cDNA

Całkowity RNA z roztartego w ciekłym azocie materiału roślinnego wyekstrahowano przy użyciu odczynnika Tri Reagent (Invitrogen, Life Technologies). Ocenę składu jakościowego i ilościowego wyizolowanego RNA wykonano przy użyciu spektrofotometru Nano–Drop ND–1000 (Thermo Fisher Scientific). Integralność RNA sprawdzono przez rozdział elektroforetyczny w 1% żelu agarozowym. Genomowy DNA został strawiony i usunięty, a oczyszczone RNA zostało przepisane na cDNA przy użyciu zestawu do odwrotnej transkrypcji QuantiTect Reverse Transcription Kit (Qiagen) zgodnie z wytycznymi producenta. Próby cDNA po rozcieńczeniu (do 20 µl cDNA dodano 10 µl wody wolnej od DNaz) przechowywano w temperaturze –20°C do czasu nastawienia reakcji RT-qPCR.

Projektowanie starterów, PCR, RT-qPCR, analiza statystyczna

Startery dla genów *PPO* oraz *PAL* zostały zaprojektowane na podstawie sekwencji genów pszenicy dostępnych w bazie danych GenBank (National Center for Biotechnology Information): PPO (EF070148.1), PAL (AY005474.1) (tab. 1). Zaprojektowane startery zostały sprawdzone w programie OligoAnalyzer 3.1 (Integrated DNA Technologies, Inc., Skokie, IL, USA).

Reakcję PCR przeprowadzono z wykorzystaniem 10 µl mieszaniny składającej się z 1 µl buforu reakcyjnego Al-

Tabela 1. Sekwencje starterów
Table 1. Primer sequences

Gen Gene	Numer akcesyjny Accession number	Sekwencje starterów Primer seguences	Długość produktu, liczba par zasad (5'-3') Product length , number of base pairs (5'-3')	Temperatura annealingu Annealing temperature [°C]
ACT (Wielkopolan i wsp. 2018)	AB181991.1	F ctctattttggcctctcttagcac R gaccagactcatcgtactccg	79	60
PAL	AY005474.1	F accaaaggaaaagggggcacg R aacaacacaagtttgagaagctg	184	60
PPO	EF070148.1	F ataggcaacgtgtaggactgc R acctacgaaaccaacctgctaa	126	60

legroTag z dodatkiem 2,5 mM Mg^{2+} (Novazym, Poznań, Polska), 0,5 µM startera forward i reverse (tab. 1), 200 µM deoksyrybonukleotydów (dNTPs), 1 U Allegro Tag DNA polimerazy (Novazym, Poznań, Polska) przy użyciu termocyklera Biometra TProfessional Basic Thermocycler. Warunki reakcji PCR dla poszczególnych par starterów były następujące: 35 cykli po 25 s w 94°C, 20 s w 55°C, 72°C przez 25 s i końcowy etap wydłużania w 72°C przez 5 minut. Dalsze etapy, tj. rozdział produktu PCR w żelu, oczyszczanie produktu, klonowanie do wektora, izolację plazmidu i trawienie *Eco*RI, wykonano według opisu znajdującego się w publikacji Wrzesińska i wsp. (2016). Sekwencjonowanie DNA zostało wykonane przez firmę Genomed S.A. (Warszawa, Polska). Wyniki sekwencjonowania przeanalizowano za pomocą programu BioEdit Sequence Alignment Editor 7.1.11 (Hall 1999).

RT-qPCR przeprowadzono przy użyciu termocyklera LightCycler® 96 SW 1.1. Reakcję RT-qPCR przeprowadzono w 10 µl roztworze zawierającym 1 × iTagTM Universal SYBR®Green Supermix (Bio-Rad, hercules, CA, USA), 0,5 µM startera forward i reverse i 1 µl cDNA. Profil reakcji termicznej dla wszystkich par starterów był następujący: wstępna denaturacja w 95°C przez 5 minut, następnie 40 cykli w 95°C przez 10 s (denaturacja), 60°C przez 15 s (przyłączanie starterów) i 72°C przez 15 s (wydłużanie). Specyficzność każdej pary starterów została sprawdzona za pomocą krzywej dysocjacji w przedziale 65–95°C. Dla każdej badanej próby RT-qPCR wykonano w trzech powtórzeniach technicznych. Poziomy ekspresji badanych genów znormalizowano wykorzystując aktynę jako gen referencyjny (tab. 1). Dane uzyskane z RT-qPCR zostały przeanalizowane za pomocą oprogramowania GenEx ver. 6. Różnice między danymi otrzymanymi z poszczególnych wariantów doświadczeń w pierwszej kolejności analizowano z wykorzystaniem testu t-Studenta (wartość $p < 0,05$), ponieważ niektóre z uzyskanych wyników nie spełniały założeń rozkładu normalnego wykonano analizę danych z wykorzystaniem nieparametrycznego testu Manna-Whitney'a dla wartości $p < 0,05$.

Wyniki i dyskusja / Results and discussion

Odpowiedź obronna pszenicy na uszkodzenie mechaniczne i żerowanie larw skrzypionek

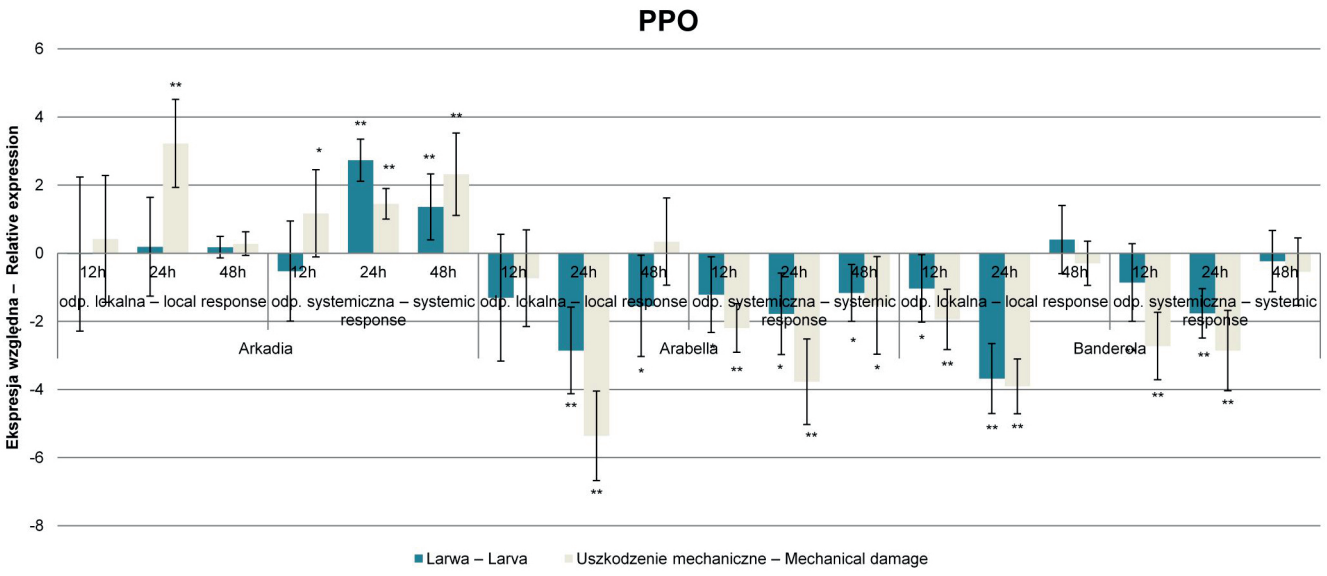
Odpowiedź obronna rośliny jest złożona, ponieważ nie tylko bezpośrednie uszkodzenie tkanek przez owada, ale również związane z nim mikroorganizmy, czy elicytory występujące w wydzielinie jego aparatu gębowego mogą mieć istotny wpływ na jej przebieg.

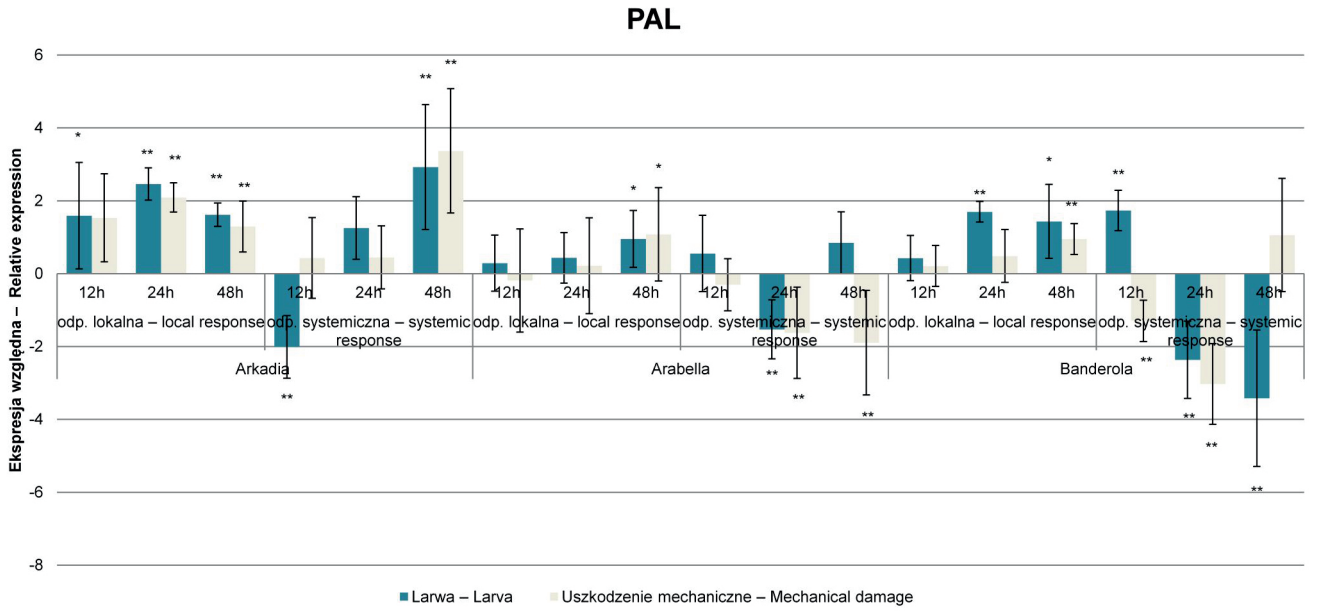
W związku z tym jednym z celów badań było sprawdzenie, czy istnieją różnice w ekspresji genów kodujących PPO oraz PAL w odpowiedzi na mechaniczne zranienie tkanki i uszkodzenie powstałe w wyniku żerowania larw skrzypionek. Z uzyskanych rezultatów wynika, że odmiana Arkadia zareagowała na uszkodzenie mechaniczne oraz uszkodzenie powstałe w wyniku żerowania larw skrzypionek poprzez wzrost poziomu ekspresji zarówno *PPO*, jak i *PAL* w przeciwieństwie do dwóch pozostałych odmian, u których zaobserwowano supresję ekspresji szczególnie genu kodującego PPO (rys. 1). Ponadto w przypadku odmiany Arkadia poziom ekspresji genu *PPO* był wyższy u roślin uszkodzonych mechanicznie (odpowiedź lokalna i systemiczna) (rys. 1), a uzyskany rezultat sugeruje, że czynniki, takie jak mikroorganizmy zawarte w wydzielinie aparatu gębowego skrzypionki mają wpływ na aktywność PPO. W zaplanowanym badaniu założono, że takim czynnikiem są bakterie związane z larwami skrzypionek.

W ramach doświadczenia wykazano, że wzrost indukcji *PAL* miał miejsce zwłaszcza w liściach uszkodzonych mechanicznie i przez larwy skrzypionek (rys. 1). Wcześniej wykonane badania wykazały wpływ uszkodzenia mechanicznego czy wyrządzonego przez roślinożernego owada na poziom ekspresji genu *PAL* na poziomie transkryptu, białka, czy enzymu (Saltveit i wsp. 2005; Ralph i wsp. 2006; Bernards i Båstrup-Spohr 2008). Na przykład, wykazano wzrost ekspresji *PAL* u *Arabidopsis* w odpowiedzi na zranienie przez *Pieris rapae* (Lepidoptera, Pieridae) (Reymond i wsp. 2004; Bernards i Båstrup-Spohr 2008), u świerka (*Picea sitchensis*) w odpowiedzi na żerowanie *Choristoneura occidentalis* (Lepidoptera, Tortricidae) i *Pissodes strobi* (Coleoptera, Curculionidae) (Ralph i wsp. 2006; Bernards i Båstrup-Spohr 2008). Zwiększoną aktywność PAL wykazano również w liściach roślin orzeszków ziemnych uszkodzonych przez *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera, Noctuidae) (War i wsp. 2013) oraz w roślinach kukurydzy uszkodzonych przez *Ostrinia furnacalis* Guenée (Lepidoptera, Crambidae) (Lv i wsp. 2017). Wykazano również, że wyciszenie *PAL* zwiększa wrażliwość pszenicy na mszyce (*Diuraphis noxia* Mordvilko, Hemiptera: Aphididae) (Van Eck i wsp. 2010).

Wpływ bakterii związanych z larwami skrzypionek na odpowiedź rośliny

Wiele badań wykazało, że bakterie związane z owadem w większości przypadków były niepatogeniczne i miały korzystny wpływ na szereg jego procesów życiowych, w tym na reprodukcję, obronę przeciwko wrogom naturalnym, procesy trawienne czy detoksykację materiału roślinnego ze szkodliwych substancji. Wykazano również, że bakterie mogą pełnić rolę efektora czy elicytora modulującego odpowiedź obronną rośliny na korzyść gospodarza – owada (Wielkopolan i Obrępalska-Stęplowska 2016). Kolejnym etapem pracy było więc sprawdzenie, czy bakterie związane z larwami skrzypionek mogą hamować indukcję ekspresji genów kodujących PPO i PAL. W tym celu na rośliny pszenicy umieszczono odpowiednio larwy z naturalną mikroflorą jelitową i zredukowaną liczbą bakterii. Założo-

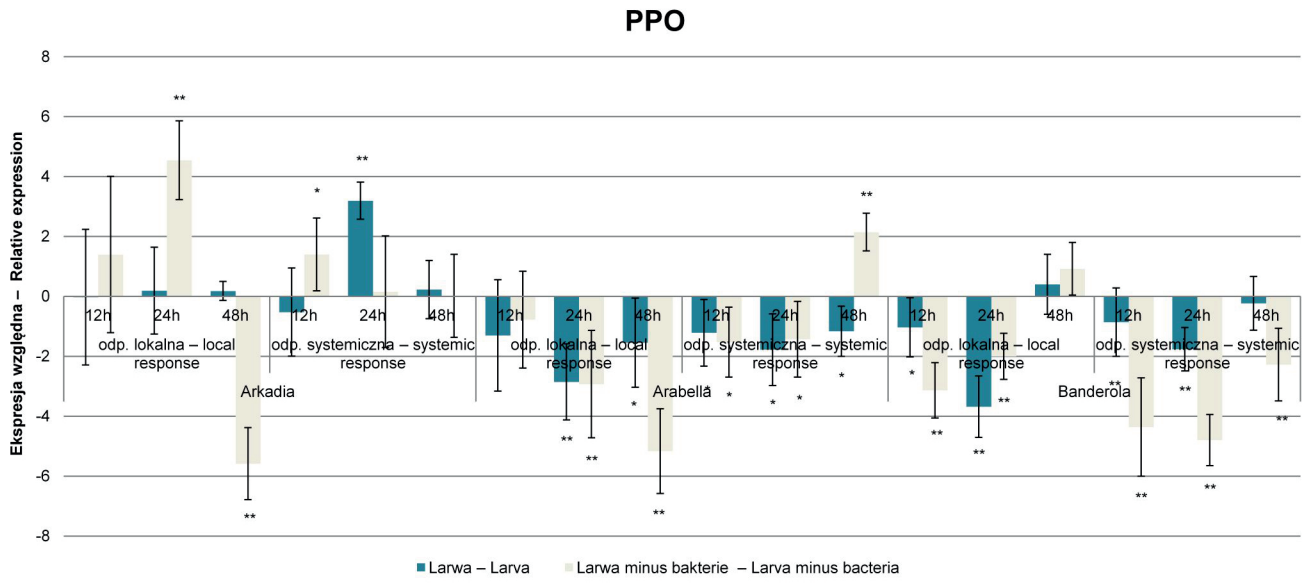


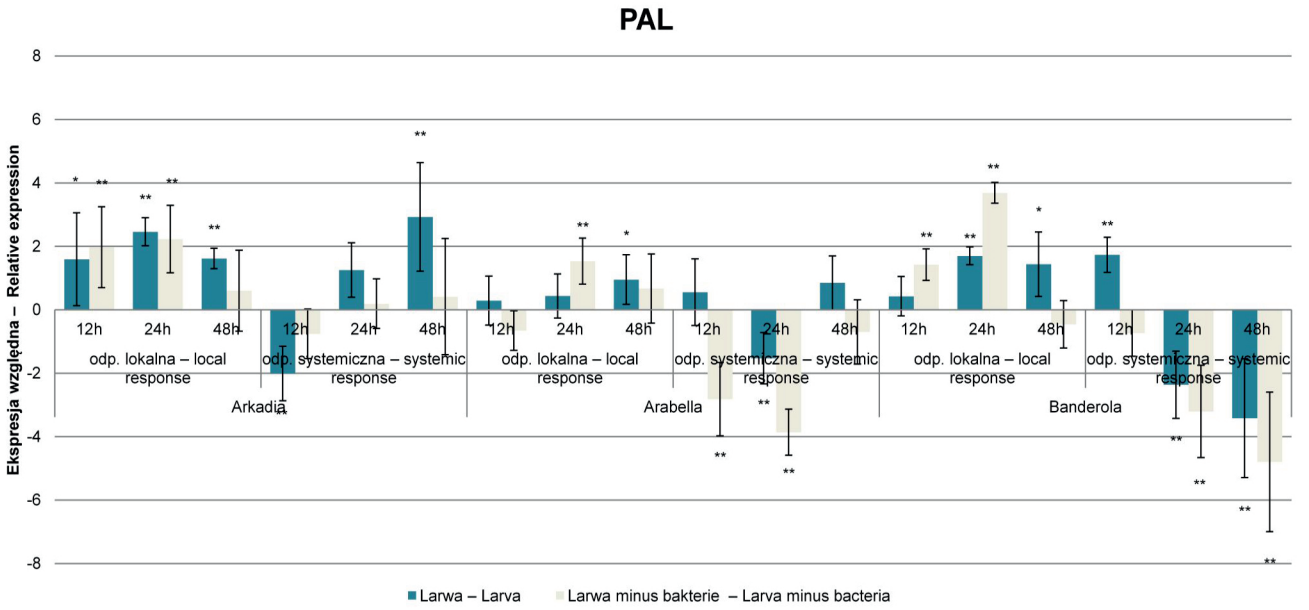


Rys. 1. Poziom ekspresji oksydazy polifenolowej (*PPO*) i amoniakoliazy L-fenyloalaniny (*PAL*) w liściach uszkodzonych (odpowiedź lokalna) i nieuszkodzonych (odpowiedź systemiczna) w trzech odmianach pszenicy (Arkadia, Arabella, Banderola) w odpowiedzi na mechaniczne uszkodzenie tkanek i żerowanie larw skrzypionek z naturalną mikroflorą jelitową (Larwa). Gwiazdki nad słupkami danych wskazują istotność statystyczną wyników: *p < 0,05; **p < 0,001, test Manna-Whitney'a

Fig. 1. Expression level of polyphenol oxidase (*PPO*) and phenylalanine ammonia-lyase (*PAL*) in wounded (local response) and undamaged leaves (systemic response) in three varieties of wheat (Arkadia, Arabella, Banderola) in response to mechanical tissue damage and CLB larvae feeding with natural intestinal microflora (Larva). The asterisks above data bar indicate the statistical significance of the results: *p < 0.05; **p < 0.001, Mann-Whitney test

no, że odpowiedź rośliny na uszkodzenie powstałe w wyniku żerowania larw z naturalną mikroflorą jelitową powinna być słabsza w porównaniu do odpowiedzi na żerowanie larw ze zredukowaną liczbą bakterii. Otrzymane wyniki potwierdzają to założenie, ponieważ wykazano, że ekspresja *PPO* wyraźnie wzrosła w odpowiedzi na żerowanie larw ze zredukowanym komponentem bakteryjnym, szczególnie w przypadku odmiany Arkadia w dwóch punktach czasowych (24 i 48 godz.). Zbliżoną reakcję obserwowano także w przypadku pozostałych badanych odmian pszenicy, przy czym u odmiany Arabella była to odpowiedź systemiczna, a u odmiany Banderola – odpowiedź lokalna (rys. 2). Generalnie silniejsza ekspresja genu *PAL* miała miejsce w liściach uszkodzonych (rys. 2).



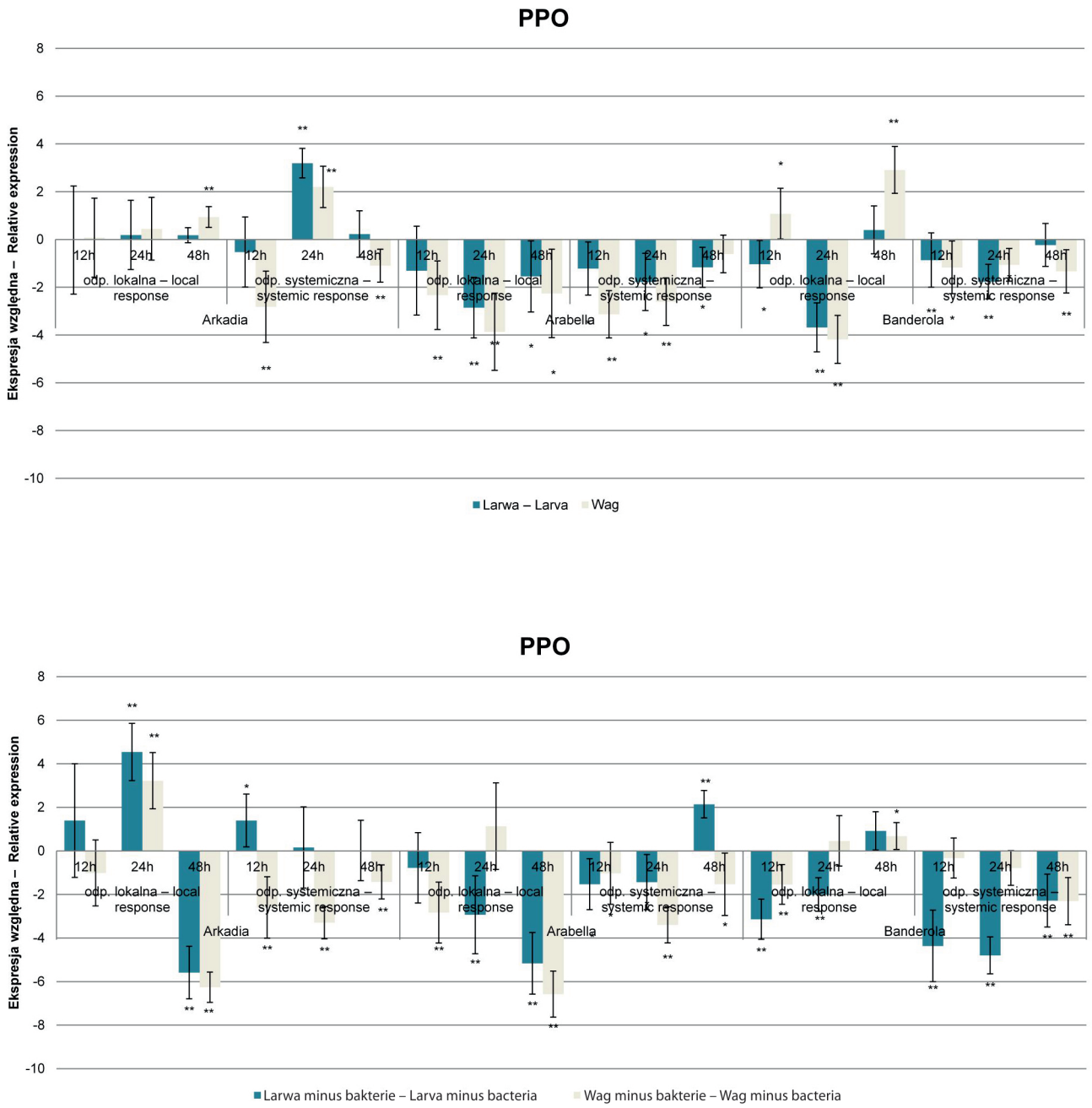


Rys. 2. Wpływ bakterii związanych z larwami skrzypionek na odpowiedź obronną rośliny. Poziom ekspresji genu kodującego oksydazę polifenolową (*PPO*) oraz amoniakoliazę L-fenyloalaniny (*PAL*) w trzech odmianach pszenicy (Arkadia, Arabella, Banderola) w odpowiedzi na żerowanie larw skrzypionek z naturalną mikroflorą jelitową (Larwa) i zredukowaną liczbą bakterii (Larwa minus bakterie). Gwiazdki nad słupkami danych wskazują istotność statystyczną wyników: *p < 0,05; **p < 0,001, test Manna--Whitney'a

Fig. 2. Influence of CLB larvae – associated bacteria on plant defense response. The expression level of the gene encoding polyphenol oxidase (*PPO*) and phenylalanine ammonia-lyase (*PAL*) in three varieties of wheat (Arkadia, Arabella, Banderola) in response to CLB larvae feeding with natural intestinal microflora (Larva) and a reduced bacteria count (Larva minus bacteria). The asterisks above data bar indicate the statistical significance of the results: *p < 0.05; **p < 0.001, Mann-Whitney test

Wpływ wydzieliny aparatu gębowego owada na odpowiedź obronną rośliny

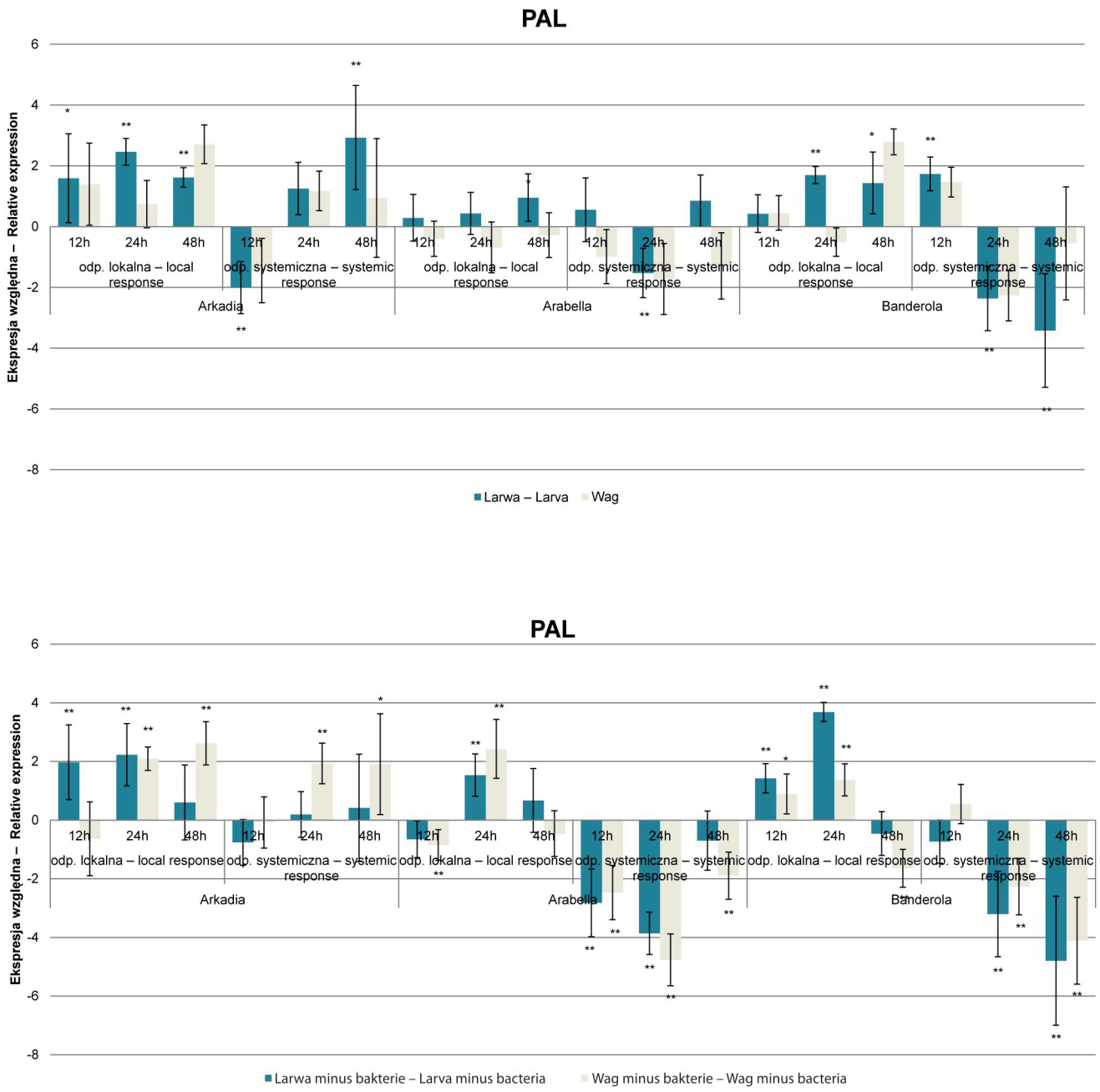
Kolejnym etapem pracy było sprawdzenie, czy sama wydzielina aparatu gębowego larw skrzypionek ma istotny wpływ na poziom ekspresji *PPO* oraz *PAL*, ponieważ skład wydzieliny jest bardzo złożony i unikalny dla danego gatunku owada i jej nałożenie na mechanicznie zranioną tkankę może mieć silny wpływ na ekspresję genów (indukcja lub supresja) (Reymond i wsp. 2004). W ramach doświadczenia na mechanicznie uszkodzone miejsca nałożono wydzielinę aparatu gębowego pobraną odpowiednio od larw z natu-



Rys. 3. Wpływ wydzieliny aparatu gębowego larw skrzypionek na reakcję obronną rośliny. Ekspresja oksydazy polifenolowej (*PPO*) u roślin uszkodzonych w wyniku żerowania larw skrzypionek ze zredukowaną (Larwa minus bakterie) lub niezredukowaną liczbą bakterii (Larwa) oraz uszkodzonych mechanicznie, w miejsce uszkodzenia nałożono wydzielinę aparatu gębowego z larw ze zredukowaną (Wag minus bakterie) lub niezredukowaną florą bakteryjną (Wag). Gwiazdki nad słupkami danych wskazują istotność statystyczną wyników: *p < 0,05; **p < 0,001, test Manna-Whitney'a

Fig. 3. Influence of CLB larvae oral secretion on plant defense response. Expression level of polyphenol oxidase (*PPO*) in plants damaged by CLB larvae feeding with reduced (Larva minus bacteria) or with no reduced bacteria count and mechanically wounded, in damaged place oral secretion from larvae with reduced (Wag minus bacteria) or non-reduced bacterial flora (Wag) was applied. The asterisks above data bar indicate the statistical significance of the results: *p < 0.05; **p < 0.001, Mann-Whitney test

ralną mikroflorą jelitową i zredukowanym komponentem bakteryjnym. Z uzyskanych analiz wynika, że generalnie odpowiedź rośliny na żerowanie owada, czy traktowanie wydzieliną jego aparatu gębowego ma podobny przebieg, tj. dochodzi do indukcji lub supresji ekspresji genów, i różnią się one poziomem ekspresji. Na przykład, u odmian Arkadia i Banderola wystąpiła silniejsza ekspresja *PPO* w liściu, gdzie na uszkodzone mechanicznie miejsce nałożono wydzielinę pobraną od larw z naturalną mikroflorą jelitową w porównaniu do liści uszkodzonych w wyniku żerowania larw skrzypionek (rys. 3). Z kolei w przypadku *PAL*, poziom ekspresji tego genu w liściach był wyż-



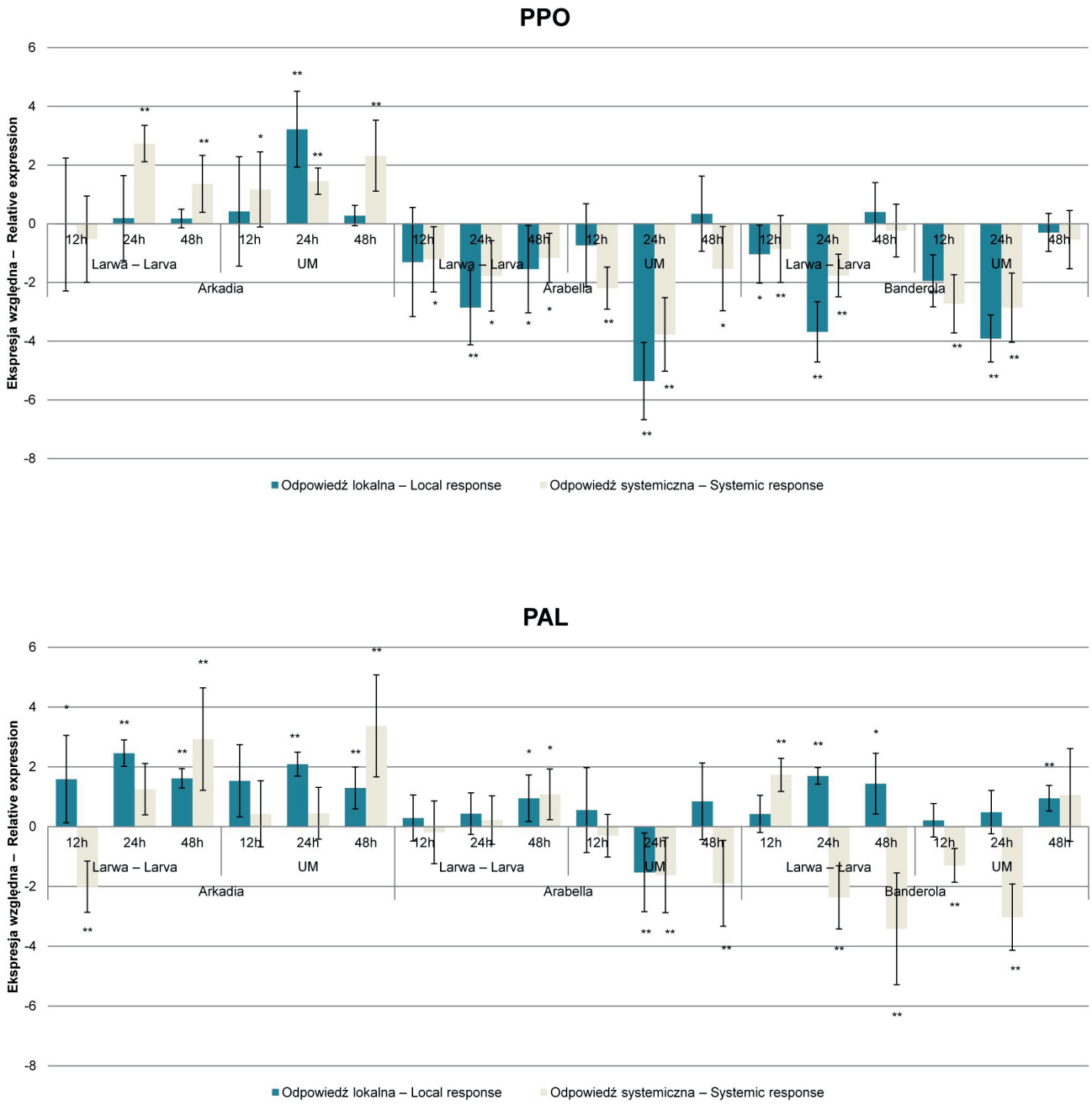
Rys. 4. Wpływ wydzieliny aparatu gębowego larw skrzypionek na reakcję obronną rośliny. Ekspresja amoniakoliazy L-fenyloalaniny (*PAL*) u roślin uszkodzonych w wyniku żerowania larw ze zredukowaną (Larwa minus bakterie) lub niezredukowaną liczbą bakterii (Larwa) oraz uszkodzonych mechanicznie, w miejsce uszkodzenia nałożono wydzielinę aparatu gębowego z larw ze zredukowaną (Wag minus bakterie) lub niezredukowaną florą bakteryjną (Wag). Gwiazdki nad słupkami danych wskazują istotność statystyczną wyników: *p < 0,05; **p < 0,001, test Manna-Whitney'a

Fig. 4. Influence of CLB larvae oral secretion on plant defense response. Expression level of phenylalanine ammonia-lyase (*PAL*) in plants damaged as a result of CLB larvae feeding with reduced (Larva minus bacteria) or with no reduced bacteria count and mechanically wounded, in damaged place oral secretion from larvae with reduced (Wag minus bacteria) or non-reduced bacterial flora (Wag) was applied. The asterisks above data bar indicate the statistical significance of the results: *p < 0.05; **p < 0.001, Mann-Whitney test

szy u odmiany Arkadia (48 godz. – odpowiedź lokalna, 24–48 godz. – odpowiedź systemiczna). Uzyskane wyniki sugerują, że wydzielina aparatu gębowego larw skrzypionek, a ściślej odpowiednie czynniki w niej zawarte mają istotny wpływ na odpowiedź obronną roślin pszenicy (rys. 4).

Odpowiedź lokalna a systemiczna

W reakcji obronnej rośliny przeciwko owadom, istotnym jest aby do indukcji mechanizmów obronnych rośliny dochodziło nie tylko w miejscu zranienia, ale również w innych nieuszkodzonych jej częściach. Zarówno lokalnie, jak



Rys. 5. Poziom ekspresji genów kodujących oksydazę polifenolową (*PPO*) i amoniakoliazę L-fenyloalaniny (*PAL*) w liściu uszkodzonym (odpowiedź lokalna) i nieuszkodzonym (odpowiedź systemiczna) w odpowiedzi na żerowanie larw skrzypionek (Larwa) i uszkodzenie mechaniczne (UM). Gwiazdki nad słupkami danych wskazują istotność statystyczną wyników: *p < 0,05; **p < 0,001, test Manna-Whitney'a

Fig. 5. Expression level of genes encoding polyphenol oxidase (*PPO*) and phenylalanine ammonia-lyase (*PAL*) in wounded (local response) and undamaged leaves (systemic response) in response to CLB larvae feeding (Larva) and mechanical damage (UM). The asterisks above data bar indicate the statistical significance of the results: *p < 0.05; **p < 0.001, Mann-Whitney test

i systemicznie może być indukowana synteza tych samych białek, ale mogą wystąpić różnice w tempie i nasileniu ich produkcji (Wielkopolan i Obrępalska-Stęplowska 2016). W przypadku odmiany Arkadia poziom ekspresji genu kodującego PPO był wyraźnie wyższy w liściach nieuszkodzonych (odpowiedź systemiczna) (rys. 5), w przeciwieństwie do *PAL*, gdzie znacznie wyższy poziom ekspresji genu miał miejsce w liściach uszkodzonych. U odmiany Arabella wystąpiła głównie supresja aktywności analizowanych genów, natomiast w przypadku odmiany Banderola zaobserwowano głównie silniejszą odpowiedź w liściach uszkodzonych (rys. 5).

Wnioski / Conclusions

1. Bakterie związane z larwami skrzypionki modulują odpowiedź rośliny na korzyść owada.
2. Każda z testowanych odmian pszenicy wykształciła unikalny mechanizm obronny na żerowanie larw skrzypionek. Odmianę Arkadia wyróżniała jednak znacznie szybsza i silniejsza odpowiedź na testowane czynniki stresogenne czyli mechaniczne uszkodzenie tkanek oraz żerowanie larw skrzypionek.
3. Zrozumienie natury ekspresji genów *PPO* i *PAL* jest bardzo ważne z ekologicznego punktu widzenia i stanowi potencjał do wykorzystania w ochronie roślin.

Podziękowanie / Acknowledgements

Podziękowania dla promotor dr hab. Aleksandry Obrępalskiej-Stęplowskiej, profesor IOR – PIB za cenne wskazówki podczas pisania tej pracy.

Finansowanie / Funding

Badania zostały sfinansowane w ramach grantu OPUS 2016/23/B/NZ9/03503 z Narodowego Centrum Nauki.

Literatura / References

Bernards M.A., Båstrup-Spohr L. 2008. Phenylpropanoid metabolism induced by wounding and insect herbivory. s. 189–211. W: Induced Plant Resistance to Herbivory (A. Schaller, red.). Springer, Dordrecht. DOI: 10.1007/978-1-4020-8182-8_9

Bhonwong A., Stout M.J., Attajarusit J., Tantasawat P. 2009. Defensive role of tomato polyphenol oxidases against cotton bollworm (*Helicoverpa armigera*) and beet armyworm (*Spodoptera exigua*). Journal of Chemical Ecology 35 (1): 28–38. DOI: 10.1007/s10886-008-9571-7

Chung S.H., Rosa C., Scully E.D., Peiffer M., Tooker J.F., Hoover K., Luthe D.S., Felton G.W. 2013. Herbivore exploits orally secreted bacteria to suppress plant defenses. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 110 (39): 15728–15733. DOI: 10.1073/pnas.1308867110

He J., Chen F., Chen S., Lv G., Deng Y., Fang W., Liu Z., Guan Z., He C. 2011. Chrysanthemum leaf epidermal surface morphology and antioxidant and defense enzyme activity in response to aphid infestation. Journal of Plant Physiology 168 (7): 687–693. DOI: 10.1016/j.jplph.2010.10.009

Jones A.G., Mason C.J., Felton G.W., Hoover K. 2019. Host plant and population source drive diversity of microbial gut communities in two polyphagous insects. Scientific Reports 9: 2792. DOI: 10.1038/s41598-019-39163-9

Lv M., Kong H., Liu H., Lu Y., Zhang C., Liu J., Ji C., Zhu J., Su J., Gao X. 2017. Induction of phenylalanine ammonia-lyase (PAL) in insect damaged and neighboring undamaged cotton and maize seedlings. International Journal of Pest Management 63 (2): 166–171. DOI: 10.1080/09670874.2016.1255804

Łyczko J., Twardowski J.P., Skalny B., Galek R., Szumny A., Gruss I., Piesik D., Sendel S. 2021. *Sarracenia alata* (Alph.Wood) Alph.Wood microcuttings as a source of volatiles potentially responsible for insects' respond. Molecules 26 (9): 2406. DOI: 10.3390/molecules26092406

Piesik D., Bocianowski J., Sendel S., Krawczyk K., Kotwica K. 2020. Beetle orientation responses of *Gastrophysa viridula* and *Gastrophysa polygoni* (Coleoptera: Chrysomelidae) to a blend of synthetic volatile organic compounds. Environmental Entomology 49 (5): 1071–1076. DOI: 10.1093/ee/nvaa082

Ralph S.G., Yueh H., Friedmann M., Aeschliman D., Zeznik J.A., Nelson C.C., Butterfield Y.S.N., Kirkpatrick R., Liu J., Jones S.J.M., Marra M.A., Douglas C.J., Ritland K., Bohlmann J. 2006. Conifer defence against insects: microarray gene expression profiling of Sitka spruce (*Picea sitchensis*) induced by mechanical wounding or feeding by spruce budworms (*Choristoneura occidentalis*) or white pine weevils (*Pissodes strobi*) reveals large-scale changes of the host transcriptome. Plant, Cell & Environment 29 (8): 1545–1570. DOI: 10.1111/j.1365-3040.2006.01532.x

Reymond P., Bodenhausen N., van Poecke R.M.P., Krishnamurthy V., Dicke M., Farmer E.E. 2004. A conserved transcript pattern in response to a specialist and a generalist herbivore. The Plant Cell 16 (11): 3132–3147. DOI: 10.1105/tpc.104.026120

Saltveit M.E., Choi Y.-J., Tomás-Berberán F.A. 2005. Involvement of components of the phospholipid-signaling pathway in wound-induced phenylpropanoid metabolism in lettuce (*Lactuca sativa*) leaf tissue. Physiologa Plantarum 125 (3): 345–355. DOI: 10.1111/j.1399-3054.2005.00574.x

Sethi A., McAuslane H.J., Rathinasabapathi B., Nuessly G.S., Nagata R.T. 2009. Enzyme induction as a possible mechanism for latex-mediated insect resistance in romaine lettuce. Journal of Chemical Ecology 35: 190–200. DOI: 10.1007/s10886-009-9596-6

Tscharntke T., Thiessen S., Dolch R., Boland W. 2001. Herbivory, induced resistance, and interplant signal transfer in *Alnus glutinosa.* Biochemical Systematics and Ecology 29 (10): 1025–1047. DOI: 10.1016/S0305-1978(01)00048-5

Usha Rani P., Jyothsna Y. 2010. Biochemical and enzymatic changes in rice plants as a mechanism of defense. Acta Physiologiae Plantarum 32: 695–701. DOI: 10.1007/s11738-009-0449-2

Van Eck L., Schultz T., Leach J.E., Scofield S.R., Peairs F.B., Botha A.-M., Lapitan N.L.V. 2010. Virus-induced gene silencing of WRKY53 and an inducible phenylalanine ammonia-lyase in wheat reduces aphid resistance. Plant Biotechnology Journal 8 (9): 1023–1032. DOI: 10.1111/j.1467-7652.2010.00539.x

War A.R., Paulraj M.G., Ahmad T., Buhroo A.A., Hussain B., Ignacimuthu S., Sharma H.C. 2012. Mechanisms of plant defense against insect herbivores. Plant Signaling & Behaviour 7 (10): 1306–1320. DOI: 10.4161/psb.21663

War A.R., Paulraj M.G., Ignacimuthu S., Sharma H.C. 2013. Defensive responses in groundnut against chewing and sap-sucking insects. Journal of Plant Growth Regulation 32: 259–272. DOI: 10.1007/s00344-012-9294-4

War A.R., Paulraj M.G., War M.Y., Ignacimuthu S. 2011. Jasmonic acid- mediated induced resistance in groundnut (*Arachis hypogaea* L.) against *Helicoverpa armigera* (Hubner) (Lepidoptera: Noctuidae). Journal of Plant Growth Regulation 30 (4): 512–523. DOI: 10.1007/s00344-011-9213-0

War A.R., Taggar G.K., Hussain B., Taggar M.S., Nair R.M., Sharma H.C. 2018. Plant defence against herbivory and insect adaptations. AoB Plants 10 (4): ply037. DOI: 10.1093/aobpla/ply037

Wielkopolan B., Krawczyk K., Obrępalska-Stęplowska A. 2018. Gene expression of serine and cysteine proteinase inhibitors during cereal leaf beetle larvae feeding on wheat: the role of insect-associated microorganisms. Arthropod-Plant Interactions 12 (4): 601–612. DOI: 10.1007/s11829-018-9608-y

Wielkopolan B., Obrępalska-Stęplowska A. 2016. Three-way interaction among plants, bacteria, and coleopteran insects. Planta 244 (2): 313–332. DOI: 10.1007/s00425-016-2543-1

Wrzesińska B., Kierzek R., Obrępalska-Stęplowska A. 2016. Evaluation of six commonly used reference genes for gene expression studies in herbicide-resistant *Avena fatua* biotypes. Weed Research 56 (4): 284–292. DOI: 10.1111/wre.12209

Zhang C., Wang X., Zhang F., Dong L., Wu J., Cheng Q., Qi D., Yan X., Jiang L., Fan S., Li N., Li D., Xu P., Zhang S. 2017. Phenylalanine ammonia-lyase2.1 contributes to the soybean response towards *Phytophthora sojae* infection. Scientific Report 7: 7242. DOI: 10.1038/s41598-017-07832-2