

М. Д. Мельничук, В. Г. Спиридонов, Н. П. Ясинская, Р. В. Облап

Генетический анализ энтомофага вида *Trichogramma pintoi* Voeg.

(Представлено членом-корреспондентом НАН Украины И. А. Григорюком)

Investigations of the genetic structure of internal noncoding transcribed spacer 2 (ITS2) of ribosomal DNA of Trichogramma pintoi Voeg. are done. The performed PCR-analysis with the following nucleotide sequence determination of ITS2 region allowed us to reveal essential interspecific distinctions. The obtained data can be used for the T. pintoi species identification.

В последние годы все большее внимание уделяется биотехнологиям и экологическим аспектам агропромышленного комплекса. Развитие биологических методов защиты растений является как логическим дополнением, так и альтернативой химизации. Правильное и своевременное применение биологических методов защиты, таких как насекомые-энтомофаги, бактериальные, вирусные и грибковые препараты, позволяет значительно сократить, а иногда и полностью отказаться от использования химических средств защиты растений. Одним из основных средств биологической борьбы с вредителями сельскохозяйственных культур в экологически ориентированных технологиях является использование трихограммы [1].

Представители рода трихограмма (*Trichogramma*) — эффективные паразиты яиц многих опасных вредителей сельскохозяйственных культур и лесных насаждений [2]. Род *Trichogramma* относится к семейству трихограмматид (Trichogrammatidae), отряда перепончатокрылых (Hymenoptera). На сегодняшний день в мире идентифицировано около 150 видов этого энтомофага [3], 26 из которых встречаются в Украине. Практическое применение нашли 5 видов (*T. pintoi* Voeg., *T. dendrolimi* Mats., *T. cacoeciae* Meyer., *T. semblidis* Auriv. и *T. evanescens* Westw.), однако наибольшее распространение получила *T. pintoi* Voeg., которую успешно разводят лишь в немногочисленных биолaborаториях и биофабриках Украины.

Основой эффективного применения трихограммы в биологической защите растений является правильный подбор видов и внутривидовых форм. Поэтому определение видового состава энтомофага в полевых и садовых агробиоценозах является основной задачей исследований биотехнологов [4]. Небольшой размер и незначительные морфологические различия между этими насекомыми затрудняют их идентификацию, что, в свою очередь, снижает эффективность проведения мероприятий по биологической защите растений. Определение видовой принадлежности трихограммы в большинстве случаев основано исключительно на морфологии гениталий мужских особей [5]. Когда самцы полностью отсутствуют или их присутствие ограничено, идентификация становится еще более трудной и отчасти невозможной. В последние годы все большее распространение получают методы оценки генетического разнообразия, основанные на полиморфизме ДНК. Молекулярно-генетические маркеры характеризуются высокой степенью полиморфизма и поэтому используются для решения многих популяционно-генетических задач, в частности характеристики близкородственных видов или идентификации неизвестных [6, 7].

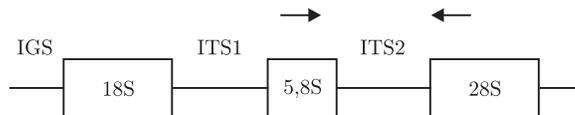


Рис. 1. Упрощенная схема строения гена рибосомальной РНК эукариот. ITS1, ITS2 — внутренние некодирующие спейсерные регионы; 28S, 18S — большая и малая субъединица рибосомальной РНК. Стрелками отмечено местонахождение праймеров

У эукариот гены, кодирующие 18S и 28S рибосомальную РНК, кластеризованы в tandemные повторы в ядерном геноме [8]. ITS регион, расположенный между 18S и 28S кодирующими областями, обычно имеет высокую степень полиморфизма, в отличие от кодирующих областей (рис. 1). Полиморфизм ITS регионов довольно широко используется для изучения таксономического статуса видов и диагностических целей. Так, R. Stouthamer с соавт. [9] использовали ITS2 регион для идентификации родственных видов трихогаммы методом полимеразной цепной реакции с последующим анализом длин рестриционных фрагментов (ПЦР-ПДРФ).

Исходя из вышесказанного, целью нашего исследования было изучение полиморфизма ITS2 региона рибосомальной ДНК вида *T. pintoii* Voeg., который разводят в лабораторных условиях для выявления видоспецифических характеристик.

Материалом для выделения ДНК служило имаго одного энтомофага. Геномную ДНК выделяли по методу [10] с предварительной обработкой протеиназой К. Концентрацию и чистоту нуклеиновой кислоты определяли на спектрофотометре “BioPhotometer” (“Eppendorf”, Германия) при длине волны $\lambda = 260$ нм.

Для амплификации ITS2 участка рибосомальной ДНК трихогаммы использовали праймеры 5'-TGTGAACTGCAGGACACATG-3'; 5'-GTCTTGCCCTGCTCTGCTCTGAG-3'. ПЦР проводили на приборе 2700 (“Applied Biosystems”, США). Продукты амплификации идентифицировали методом электрофореза в 2%-м агарозном геле.

Определение нуклеотидной последовательности ПЦР фрагментов ITS2 региона осуществляли на генетическом анализаторе ABI PRISM 3130 (“Applied Biosystems”, США) с использованием набора BigDye® terminator, v.3.1, согласно инструкции производителя.

Каждый образец анализировали в двух повторах, с правым и левым праймером. Полученные последовательности ДНК с обоих праймеров сводили в консенсусную последовательность. Результат считали достоверным, если при сопоставлении ДНК последовательностей, полученных с правого и левого праймера, не было выявлено отличий хотя бы в один нуклеотид.

ПЦР-амплификация ITS2 региона рибосомальной ДНК позволила нам получить фрагмент размером 698 п. н. Суммарно проанализировали 50 особей, из них 25 самцов и 25 самок. Следует отметить, что внутривидовых отличий по длине ПЦР-продукта не выявлено.

Для получения более детальной характеристики вида *T. pintoii* Voeg. определяли нуклеотидную последовательность ITS2 региона. Полученные характеристики обрабатывали с использованием компьютерной программы SeqAnalyses5.2 (“Applied Biosystems”) и анализировали в международной базе данных (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/). Результаты расшифровки нуклеотидной последовательности исследуемого вида (рис. 2) сопоставляли с нуклеотидной последовательностью, взятой из GenBank (Accession No. AY182757). Анализируемые нуклеотидные последовательности ITS2 региона *T. pintoii* имеют 98% сходства, 15 различий в 10 участках. Проведенный BLAST-анализ свидетельствует о том, что поли-

		Участок 1					
<i>T. pintoi</i> Voeg. AY182757	(1)	1	10	20	30	40	58
	(1)	GTCTATAAAAAATAACCCGACTGCTCAATTTTTTTTTTTTTTAAATTAATAAAAAAAGAGCG					
	(1)	GTTTATAAAAAATAACCCGACTGCTC--TTTTTTTTTTTTTAAATTAATAAAAAAAGAGCG					
		Участок 2					
<i>T. pintoi</i> Voeg. AY182757	(59)	59	70	80	90	100	116
	(59)	TTGATCTGGGCGCTCGTCGCGCGCTTATTCAAGCGCGCGACGTCGCCTCAAGCAAGAC					
	(57)	TTGATCTGGGCGCTCGTCGCGCGCTTGAAGAAAGCGCGCGACGTCGCCTCAAGCAAGAC					
		Участок 3					
<i>T. pintoi</i> Voeg. AY182757	(117)	117	130	140	150	160	174
	(117)	GCAAGAATTATAAGATCGAAAAGGATACGGGACAATCGTGAAACGACGCTCGCTCGTCTG					
	(115)	GCAAGAATTATAAGATCGAAAAGGATACGGGACAATCGTGAAACGACGCTCGCTCGTCTG					
		Участок 4					
<i>T. pintoi</i> Voeg. AY182757	(175)	175	180	190	200	210	232
	(175)	AAAGCAAGACGCAAGTCTGTTTTTACACACACGAACTCGCACGATTTTTCTCCGATTTTC					
	(173)	AAAGCAAGACGCAAGTCTGTTTTTACACACACGAACTCGCACGATTTTTCTCCGATTTTC					
		Участок 5					
<i>T. pintoi</i> Voeg. AY182757	(233)	233	240	250	260	270	290
	(233)	AATATCCGATCGTCTAGCTGGCGCGCGCGACTCTCTTGGAGAATGAGCACACACAC					
	(231)	AATATCCGATCGTCTAGCTGGCGCGCGCGACTCTCTTGGAGAATGAGCACACACAC					
		Участок 6					
<i>T. pintoi</i> Voeg. AY182757	(291)	291	300	310	320	330	348
	(291)	CGCTGTGTGCGAATTCCCGATCGTCGTCGTCGAGTCCCGGAGCTCTTTGCGAGCGGAC					
	(289)	CGCTGTGTGCGAATTCCCGATCGTCGTCGTCGAGTCCCGGAGCTCTTTGCGAGCGGAC					
		Участок 7					
<i>T. pintoi</i> Voeg. AY182757	(349)	349	360	370	380	390	406
	(349)	CGACGTCTAGAACGATTTGGCTCGTCCAAAGAGAGTTT-TTAAATAGCGTGCGATCGCCC					
	(347)	CGACGTCTAGAACGATTTGGCTCGTCCAAAGAGAGTTTATTAAATAGCGTGCGATCGCCC					
		Участок 8					
<i>T. pintoi</i> Voeg. AY182757	(407)	407	420	430	440	450	464
	(406)	GTGTGCTAGCCTCGATCGGTTTCGTGTGAAAAATCACGAGTCGTGTGCGTGT--TTACA					
	(405)	GTGTGCTAGCCTCGATCGGTTTCGTGTGAAAAATCACGAGTCGTGTGCGTGTGTGTTTACA					
		Участок 9					
<i>T. pintoi</i> Voeg. AY182757	(465)	465	470	480	490	500	522
	(462)	CTTACACTGACTTGCCGTCGTTTCTGTTGTTGCGTTGTTGTTGTTGTTCTTTCGACACA					
	(463)	CTTACACTGACTTGCCGTCGTTTCTGTTGTTGCGTTGTTGTTGTTGTTCTTTCGACACA					

Рис. 2. Нуклеотидная последовательность ITS2 региона вида *T. pintoi* Voeg. Показано сравнение с последовательностью, помещенной в GenBank (Accession No. AY182757)

морфизм данного региона может быть использован в качестве маркера видовой принадлежности, позволяющего дифференцировать данный вид от других представителей рода *Trichogramma* Westw. Метод секвенирования ITS2 региона рДНК рекомендовано использовать для генетической паспортизации вида *T. pintoi* Voeg.

1. Ткачов В. М., Онищенко Л. Г. Біологічний захист саду від шкідників і хвороб. – Київ: Урожай, 1992. – 240 с.
2. Фурсов В. Н., Сторожева Н. А. Выявление, определение и районирование хозяйственно важных видов яйцеедов рода *Trichogramma* Westw. в агробиоценозах Украины. – Киев, 1990. – С. 1–47. – (Препр. / Ин-т зоологии им. И. И. Шмальгаузена АН УССР; № 26).
3. Фурсов В. Н. Биологический метод защиты растений: междунар. исследования и приоритетное значение таксономии // Вестн. зоологии. – 2001. – **35**, № 3. – С. 97–101.
4. Бойчук Ю. Д., Злотин О. З., Головки В. О. Біологічні основи добору вихідного матеріалу для культивування комах. – Харків: РВП “Оригінал”, 1997. – 104 с.
5. Sorokina A. P. Keys to the Species of Genus *Trichogramma* Westw. (Hymenoptera, Trichogrammatidae) of the World Fauna. – Moscow: Kolos, 1993. – 76 p.

6. *Américo I.* Molecular Key to Seven Brazilian Species of Trichogramma Hymenoptera: Trichogrammatidae) Using Sequences of the ITS2 Region and Restriction Analysis // Neotropical Entomology. – 2001. – **30**, No 2. – P. 259–262.
7. *Susanta K.* Behura Molecular marker systems in insects: current trends and future avenues // Mol. Ecol. – 2006. – **15**. – P. 3087–3113.
8. *Hoy M. A.* Insect Molecular Genetics. – San Diego: Academic Press, 1994. – P. 43.
9. *Stouthamer R., Hu J., van Kan F. J. P. M., Platner G. R.* The utility of internally transcribed spacer 2 DNA sequences of the nuclear ribosomal gene for distinguishing sibling species of Trichogramma // BioControl. – 1999. – **43**. – P. 421–440.
10. *Boom R., Sol C. J., Salimans M. M. et al.* Rapid and simple method for purification of nucleic acids // J. Clin. Microb. – 1990. – **28**, No 3. – P. 495–503.

Національний аграрний університет, Київ

Поступило в редакцію 19.02.2007

УДК 581.1

© 2007

В. А. Негрецкий, Е. И. Ковзун

Инициация флорального морфогенеза у растений различной фотопериодической чувствительности и особенности экспрессии Ca²⁺-зависимой протеинкиназы С

(Представлено академиком НАН Украины К. М. Сытником)

*We study the α -isoform of Ca-dependent protein kinase C (CaPKC) expression during the induction of flowering in the leaves of different photoperiodic sensitive plants. As a result, the expression of Ca-dependent proteine kinase C in the leaves of 2 biotypes of tobacco and perilla plants is shown. The 5 long-day induction promoted the CaPKC expression in the leaves of long-day tobacco *Nicotiana silvestris* L. plants by 143%. A similar activation of the PKC expression was observed after 5 short-day (SD) inductions in SD plants of tobacco M. Mammoth and perilla. This allows us to discuss the Ca-dependent PKC participation in mechanisms of signal transduction during the photoperiodic induction and its involving in the initial stages of floral morphogenesis.*

Фотопериодическая индукция цветения кардинально изменяет метаболизм растительной клетки. Протеинкиназы (ПК) играют одну из главных ролей в начальных событиях передачи сигнала. Роль протеинкиназы С (ПКС) в трансдукции сигнала в клетке активно исследуется. Существует обширная литература по функционированию ПК в растительной клетке [1, 2]. Один из путей повышения экспрессии ПКС связан с фосфолипидным гидролизом, повышением концентрации ионов Ca²⁺ в цитозоле, внутриклеточное содержание которого активирует ПКС для дальнейшего ее участия в процессах фосфорилирования. Показана важная роль ионов Ca²⁺ в процессе зацветания растений [3, 4].

Механизм рецепции фотопериодического стимула, его передачи в клетке и между ними, амплификации сигнала у фотопериодически чувствительных растений изучен недостаточно. В настоящее время есть несколько сообщений о косвенном участии протеинкиназ