

Н.П. ДЕМ'ЯНЧУК¹, Р.В. ОБЛАП^{1,2},
Н.Б. НОВАК^{1,2}, М.Д. МЕЛЬНИЧУК¹

¹ Національний аграрний університет,
03041 Київ, вул. Героїв Оборони, 15
E-mail: roblap@hotmail.com

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНІ ДОСЛІДЖЕННЯ ЕНТОМОФАГІВ РОДУ *TRICHOGRAMMA* WESTW.



Проведено дослідження генетичної структури внутрішнього некодуючого спейсерного регіону 2, що транскрибується (*ITS2*, *internal noncoding transcribed spacer 2*), рибосомальної ДНК п'яти видів ентомофага роду *Trichogramma* Westw. — *T. pintoi* Voeg., *T. evanescens* Westw., *T. dendrolimi* Mats., *T. sacociae* Meyer. та *T. semblidis* Auriv. Виконаний ПЛР-аналіз з наступним визначенням нуклеотидної послідовності *ITS2* регіонів дозволив виявити істотні міжвидові відмінності. Отримані дані можуть бути використані для ідентифікації видів *T. pintoi*, *T. dendrolimi* та *T. semblidis*.

© Н.П. ДЕМ'ЯНЧУК, Р.В. ОБЛАП, Н.Б. НОВАК,
М.Д. МЕЛЬНИЧУК, 2008

Вступ. В останні роки все більша увага приділяється екологічним аспектам розвитку агропромислового комплексу. Розвиток біологічних методів захисту рослин є логічною альтернативою хімізації. Належне та своєчасне застосування біологічних методів захисту, таких як комахи-ентомофаги, бактеріальні, вірусні та грибові препарати, дозволяє значно скоротити, а іноді й повністю відмовитися від використання хімічних засобів захисту рослин. Одним із основних засобів біологічної боротьби зі шкідниками сільськогосподарських культур в екологічно орієнтованих технологіях є використання трихограми [1, 2].

Види, що належать до роду трихограми (*Trichogramma*), відомі як ефективні паразити яєць багатьох небезпечних шкідників сільськогосподарських культур і лісових насаджень [2–4]. Рід *Trichogramma* відноситься до родини трихограматид (*Trichogrammatidae*), ряду перетинчастокрилих (*Hymenoptera*). На сьогоднішній день у світі ідентифіковано близько 150 видів цього ентомофагу (рис. 1), 26 з яких зустрічаються в Україні [5].

Основою ефективного застосування трихограм в біологічному захисті рослин є правильний добір видів. Різні види трихограм мають специфічні вимоги до середовища існування і паразитують на яйцях визначеного кола господарів [6], тому в умовах біолабораторій і біофабрик є необхідним регулярний таксономічний контроль.

Невеликий розмір цих комах і малі морфологічні відмінності між ними ускладнюють їхню ідентифікацію, а це, в свою чергу, перешкоджає ефективному виконанню програм біологічного захисту рослин. Визначення видової приналежності трихограм у більшості випадків засновано на будові вусиків самців та особливостях їх генітального апарату [6–8]. Якщо самці повністю відсутні або присутні в дуже низьких співвідношеннях, ідентифікація ще більше ускладнюється. В останні роки все більшого поширення набувають методи оцінки генетичного різноманіття, засновані на поліморфізмі ДНК. Молекулярно-генетичні маркери характеризуються високим ступенем поліморфізму і тому використовуються для вирішення багатьох популяційно-генетичних завдань, в тому числі і таких, як характеристика близькосторіднених видів або ідентифікація невідомих [9], тому вони знаходять своє місце

і при проведенні робіт з біологічного контролю трихограм [10, 11].

Метою цієї роботи було вивчення поліморфізму ITS2 регіонів рибосомальної ДНК п'яти видів роду *Trichogramma*, що розводяться у лабораторних умовах, для виявлення видоспецифічних ознак. Вивчалися наступні види, поширені в Україні: *T. pintoi* Voeg., *T. dendrolimi* Mats., *T. cacoeciae* Meyer., *T. semblidis* Auriv. та *T. evanescens* Westw.

Матеріали та методи. Матеріалом для виділення ДНК служило імаго одного ентомофага, отримане на другий день після відродження. У кожного з п'яти досліджуваних видів було відібрано по 10 самців та самок. Геному ДНК виділяли за методом Boom [12] з попередньою обробкою протеїназою К. Концентрацію та чистоту виділеної нуклеїнової кислоти визначали на спектрофотометрі «BioPhotometer» («Eppendorf», Німеччина) при довжині хвилі $\lambda = 260$ нм.

ПЛР-ампліфікацію ITS2 регіону рибосомальної ДНК трихограм проводили на приладі 2700 («Applied Biosystems», США) з використанням наступних праймерів – 5'-TGTGAACTGC-AGGACACATG-3'; 5'-GTCTTG CCTGCTCTGCTCTGAG-3'. Реакційна суміш об'ємом 25 мкл містила 50 нг ДНК, 10 мМ Tris-HCl (рН 8,3), 50 мМ KCl, 3 мМ MgCl₂, 0,2 мМ dNTP суміші, 5 пмоля кожного з праймерів та 1U Taq-полімерази («Амплісенс», Росія). Температурний режим включав початкову денатурацію 1 хв при 95 °С з наступними 40 циклами: денатурація – 10 с при 95 °С, гібридизація праймерів – 10 с при 60 °С та синтез – 15 с при 72 °С. Завершував реакцію кінцевий синтез – 5 хв при 72 °С. Продукти ампліфікації ідентифікували методом електрофорезу в 2%-ному агарозному гелі.

Визначення нуклеотидної послідовності ПЛР-фрагментів ITS2 регіону проводили на генетичному аналізаторі ABI PRISM 3130 («Applied Biosystems», США) з використанням набору BigDye®Terminator v3.1 відповідно до інструкції виробника.

Для цього отримані ПЛР-фрагменти клонували у вектор pBluescript KS (+) за стандартною методикою [13]. Отриману плазмідну ДНК очищали з використанням комерційного набору фірми «QIAGEN» (Німеччина). Концентрацію і якість ДНК визначали спектрофо-

тометрично. Реакцію секвенування проводили на приладі Thermal Cycler 2400 («Applied Biosystems», США).

Реакційна суміш обсягом 20 мкл містила 8 мкл BigDye®Terminator mix, 1 мкл універсального M13 праймеру (3,2 пмоля), 1 мкл зразка (5–20 нг) і 10 мкл деіонізованої води. Умови реакції склалися з початкової денатурації



Рис. 1. Фотографія представника роду *Trichogramma* Westw.

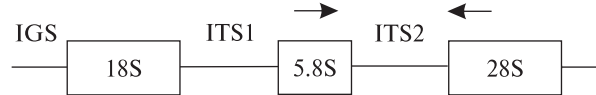


Рис. 2. Спрощена схема будови гена рибосомальної РНК еукаріотів: ITS1, ITS2 – внутрішні некодуючі спейсерні регіони; 28S, 18S – велика та мала субодиниці рибосомальної РНК. Стрілками зазначені місця розташування праймерів

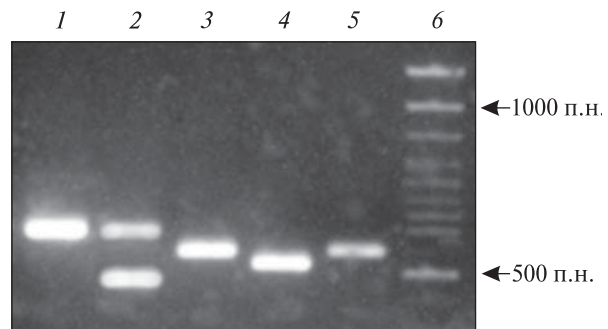


Рис. 3. Видоспецифічний ПЛР ITS2 регіону рДНК п'яти видів трихограми. Електрофоретичне розділення продуктів ампліфікації у 2%-ному агарозному гелі: 1 – *T. pintoi* (698 п.н.); 2 – *T. dendrolimi* (700, 500 п.н.); 3 – *T. cacoeciae* (586 п.н.); 4 – *T. semblidis* (528 п.н.); 5 – *T. evanescens* (583 п.н.); 6 – маркер молекулярних мас

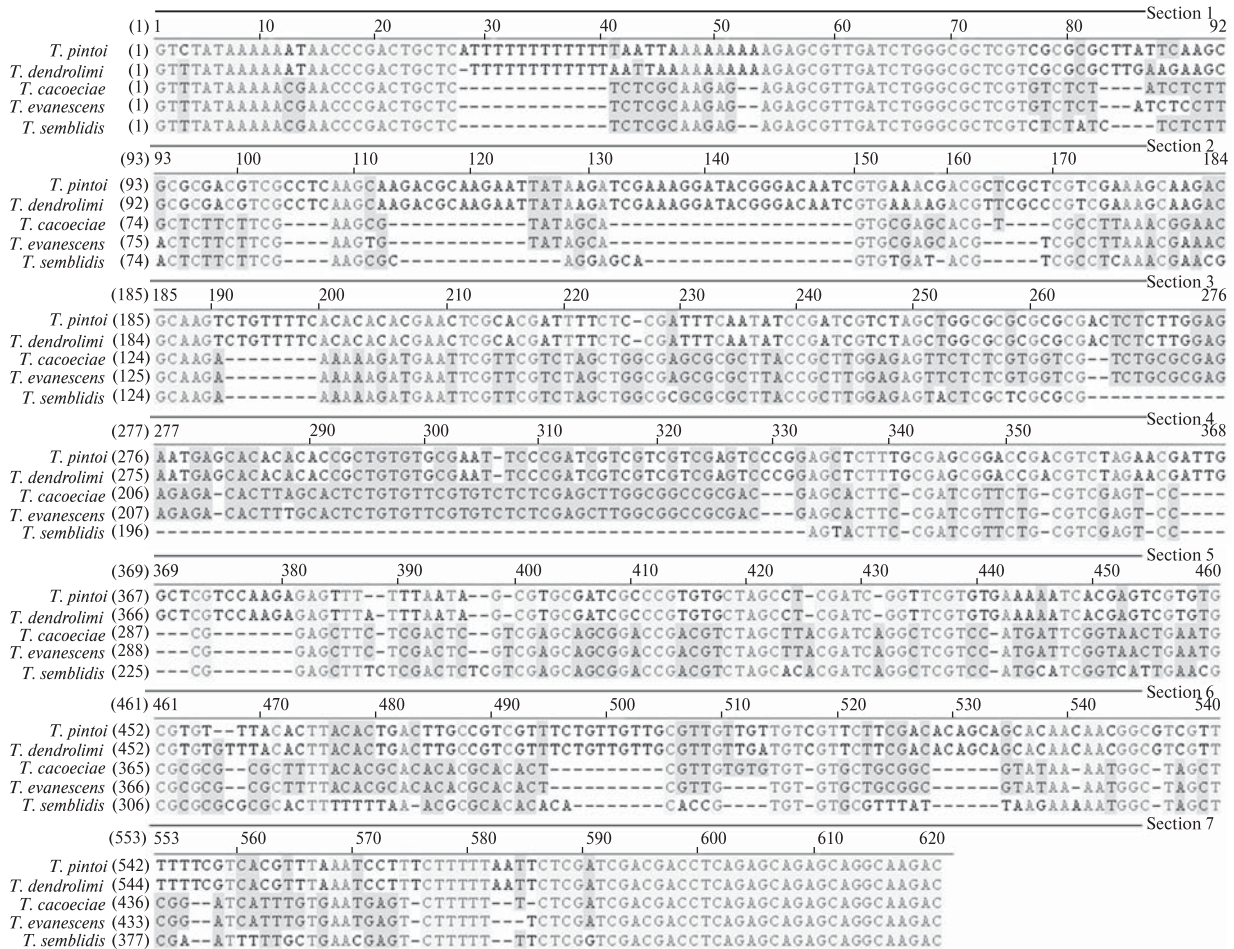


Рис. 4. Порівняльний аналіз нуклеотидної послідовності ITS2-регіону п'яти видів трихограми – *T. pintoi*, *T. dendrolimi*, *T. cacoeciae*, *T. evanescens* та *T. semblidis*

96 °C – 1 хв і наступних 25 циклів, що включали денатурацію 96 °C – 10 с, гібридизацію праймеру 50 °C – 5 с і синтез ланцюга 60 °C – 4 хв. Продукти реакції очищали шляхом Етанол/EDTA/NaAc преципітації та розчиняли у 10 мкл формаміду.

Аналіз кожного зразка проводили у двох повторях, із правим і лівим праймерами. Отримані послідовності ДНК з обох праймерів зводили до консенсусної послідовності. Результат вважався достовірним, якщо при співставленні ДНК-послідовностей, отриманих із правого і лівого праймерів, не було виявлено відмінностей хоча б в один нуклеотид.

Результати досліджень та їх обговорення. У еукаріотів гени, що кодують 18S і 28S рибосомальну РНК, кластеризовані в тандемні по-

втори у ядерному геномі. ITS-регіон, розташований між кодуєчими 18S та 28S областями (рис. 2), зазвичай має високий ступінь поліморфізму на відміну від кодуєчих областей. Поліморфізм ITS-регіонів досить широко використовується при вивченні таксономічного статусу видів, а також для діагностичних цілей. Так, Stouthamer et al. [14] використали ITS2-регіони для ідентифікації споріднених видів трихограми методом полімеразної ланцюгової реакції з наступним аналізом довжин рестрикційних фрагментів (ПЛР-ПДРФ).

На рис. 3 наведені результати ампліфікації ITS2-регіону рибосомальної ДНК п'яти досліджуваних видів трихограми. Два види трихограми (*T. cacoeciae* і *T. evanescens*) мали подібні розміри ПЛР-продуктів – 586 і 583 п.н.

відповідно. Представники виду *T. semblidis* відрізнялися від них і мали розмір 528 п.н. Вид *T. pintoi* характеризувався наявністю одного амплікону розміром 698 п.н. Слід зазначити виявлення відмінностей генетичної структури у представників різної статі виду *T. dendrolimi*. Так, самки характеризувалися наявністю двох продуктів ампліфікації розміром 700 та 500 п.н., в той час як у самців був виявлений тільки один – 500 п.н.

Для кожного виду було проаналізовано по 10 самців та самок, при цьому ніяких внутрішньовидових відмінностей виявлено не було. Отримані міжвидові відмінності дозволяють чітко диференціювати види – *T. pintoi*, *T. dendrolimi* та *T. semblidis*.

Для одержання більш детальної характеристики видів було проведено визначення нуклеотидної послідовності ITS2-регіонів. У цих цілях ПЛР-продукти, що представляють собою повну послідовність ITS2-регіону рДНК трихограми, були клоновані у вектор рBluescript KS (+) по сайту EcoRV. Реакцію секвенування проводили з використанням універсальних M13(+/-) праймерів. Отримані дані були оброблені з використанням комп'ютерної програми SeqAnalyses5.2 (Applied Biosystems) і проаналізовані в міжнародній базі даних (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/). Розшифровка нуклеотидної послідовності досліджуваних видів представлена на рис. 4. Так само, як і за ПЛР-аналізу, досліджувані види розбивалися на два кластери.

Перший кластер включав види *T. pintoi* та *T. dendrolimi*, а другий – *T. cacoeciae*, *T. semblidis* та *T. evanescens* (рис. 5). Нуклеотидна послідовність ITS2-області *T. pintoi* і *T. dendrolimi* має 98 % подібності, 16 розходжень в 12 ділянках (рис. 4).

Порівняння нуклеотидної послідовності видів *T. cacoeciae*, *T. semblidis* і *T. evanescens* виявило 87–98 % подібності між ними, в той час як обидва кластери мали між собою подібність, яка знаходилась в межах лише 61–65 %. Отримані дані, очевидно, можуть обумовлюватися історією формування видів, їхнім ареалом та колом видів-господарів, на яких вони паразитують.

Проведений BLAST-аналіз показав, що нуклеотидна послідовність ITS2-регіону може бу-

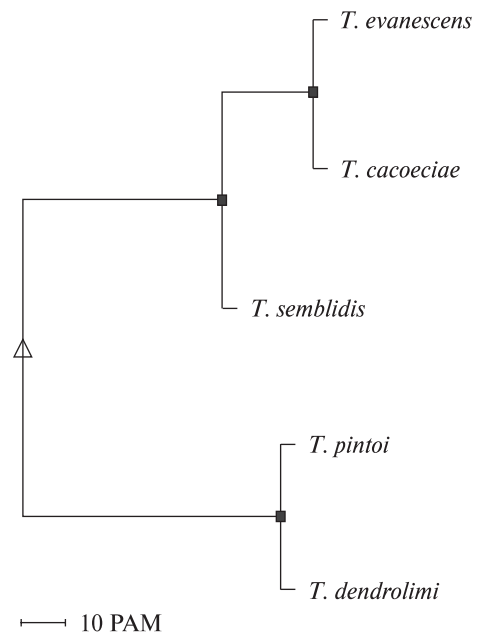


Рис. 5. Дендрограма, побудована на основі аналізу нуклеотидних послідовностей ITS2-регіону рДНК п'яти видів ентомофага роду *Trichogramma* Westw. (1 PAM відповідає одній точковій мутації на 100 нуклеотидних залишків)

ти використана як маркер видової приналежності тільки для виду *T. pintoi*.

В такий спосіб проведені нами дослідження дозволили відпрацювати метод видоспецифічної ПЛР, що дозволяє диференціювати три морфологічно подібні види роду *Trichogramma* – *T. pintoi*, *T. dendrolimi* та *T. semblidis*. Види *T. cacoeciae* та *T. evanescens* типуються разом, та для їхньої видової диференціації необхідним є використання інших видів маркерів. Метод секвенування ITS2-регіону рДНК може бути запропонований для генетичної «паспортизації» виду *T. pintoi*.

N.P. Demyanchuk, R.V. Oblap,
N.B. Novak, M.D. Melnichuk

MOLECULAR-BIOLOGICAL STUDIES OF *TRICHOGRAMMA* WESTW.

Investigations of the genetic structure of internal non-coding transcribed spacer 2 (ITS2) of ribosomal DNA of five *Trichogramma* species – *T. pintoi* Voeg., *T. evanescens* Westw., *T. dendrolimi* Mats., *T. cacoeciae* Meyer. and *T. semblidis* Auriv. were carried out. The performed PCR-analyses with the following nucleotide sequence determi-

nation of ITS2 regions allowed to reveal essential interspecific distinctions. The data can be used for *T. pintoi*, *T. dendrolimi* and *T. semblidis* species identification.

Н.П. Дем'янчук, Р.В. Облап,
Н.Б. Новак, М.Д. Мельничук

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОЕ
ИССЛЕДОВАНИЕ ЭНТОМОФАГОВ РОДА
TRICHOGRAMMA WESTW.

Проведены исследования генетической структуры внутреннего некодирующего транскрибируемого спейсерного региона 2 (ITS2, internal noncoding transcribed spacer 2) рибосомальной ДНК пяти видов энтомофага рода *Trichogramma* – *T. pintoi* Voeg., *T. evanescens* Westw., *T. dendrolimi* Mats., *T. cacoeciae* Meyer. и *T. semblidis* Auriv. Выполненный ПЦР-анализ с последующим определением нуклеотидной последовательности ITS2-регионов позволил выявить существенные межвидовые отличия. Полученные данные могут быть использованы для идентификации видов *T. pintoi*, *T. dendrolimi* и *T. semblidis*.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Ткачов В.М., Онищенко Л.Г. Біологічний захист саду від шкідників і хвороб. – К.: Урожай, 1992. – 240 с.
2. Smith S.M. Methods and timing releases of *Trichogramma* to control lepidopterous pests // Annu. Rev. Entomol. – 1994. – 32. – P. 113–144.
3. Фурсов В.Н., Сторожева Н.А. Выявление, определение и районирование хозяйственно важных видов яйцеедов рода *Trichogramma* Westw. в агробиотопозах Украины : Препринт. АН УССР / Ин-т зоологии. – 1990. – № 26. – С. 1–47.
4. Vieira A., Oliveira L., Garcia P. Effects of conventional pesticides on the preimaginal developmental stages and on adults of *Trichogramma cordubensis* (Hym.: Trichogrammatidae) // Biocon T. Science and Technol. – 2001. – 11, № 4. – P. 527–534.
5. Фурсов В.Н. Биологический метод защиты растений: международные исследования и приоритет-

ное значение таксономии // Вестн. зоологии. – 2001. – 35 (3). – С. 97–101.

6. Бойчук Ю.Д., Злотін О.З., Головка В.О. Біологічні основи добору вихідного матеріалу для культивування комах. – Харків : РВП «Оригінал», 1997. – 104 с.
7. Сугоняев Е.С. Новые данные к систематике хальцид рода *Trichogramma* Westw. (Hymenoptera, Trichogrammatidae) // Энтотол. обозрение. – Львов, 1985. – 14, вып. 4. – С. 827–833.
8. Sorokina A.P. Keys to the Species of Genus *Trichogramma* Westw. (Hymenoptera, Trichogrammatidae) of the World Fauna. – Moscow : Kolos, 1993. – 76 p.
9. Behura S.K. Molecular marker systems in insects: current trends and future avenues // Mol. Ecol. – 2006. – 15. – P. 3087–3113.
10. Hoy M.A., Jeyaprakash A., Morakote R., Lo P.K.C., Nguyen R. Genomic analyses of two populations of *Ageniaspis citricola* (Hymenoptera, Encyrtidae) suggest that a cryptic species may exist // Biol. Control. – 2000. – 17. – P. 1–10.
11. Américo I. et al. Molecular key to seven brazilian species of *Trichogramma* Hymenoptera: Trichogrammatidae) Using Sequences of the ITS2 Region and Restriction Analysis // Neotropic. Entomol. – 2001. – 30(2). – P. 259–262.
12. Boom R., Sol C.J., Salimans M.M., Jansen C.H., Wertheimvan Dillen P.M.E., Van der Noordaa J. Rapid and Simple method for purification of nucleic acids // J. Clin. Microb. – 1990. – 28, № 3. – P. 495–503.
13. Marchuk D., Drumm M., Saulino A., Collins F.S. Construction of T-vectors, a rapid and general system for direct cloning of unmodified PCR products // Nucl. Acids Res. – 1991. – 19, № 5. – P. 1154.
14. 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.

Надійшла 26.01.07