

УДК 577.152.31:595.7

О. М. Андрієвський¹, канд. біол. наук, доц., **Н. М. Непом'яца²**, магістр

Одеський національний університет імені І. І. Мечникова,

¹кафедра генетики та молекулярної біології,²кафедра зоології,

вул. Дворянська, 2, Одеса, 65082, Україна, e-mail: andriev_sear@mail.ru.

ЕКСПРЕСІЯ КАРБОКСИЕСТЕРАЗ В ОНТОГЕНЕЗІ КОМАРИКА ГРИБНОГО *BRADYSIA PILISTRIATA*

Методами електрофорезу та комп'ютерної денситометрії вивчали різноманітність та експресію молекулярних форм карбоксиестераз на окремих стадіях онтогенетичного розвитку комарика грибного *Bradysia pilistriata* Frey. Вперше показано кількісні зміни в системі естеролітичних ферментів в онтогенезі одного з головних шкідників їстівних грибів. Встановлено, що максимум типів молекулярних форм карбоксиестераз та рівня їх експресивності співпадає зі стадією личинки.

Ключові слова: карбоксиестерази, онтогенез, комарик грибний *Bradysia pilistriata*.

Основну шкоду врожаю їстівних грибів родини *Pleurotus astreatus* наносять представники двокрилих комах, які спроможні заселяти і руйнувати плодові тіла ще до початку звичайного відмирання тканин, тобто в період, коли вони є об'єктом збору. Основною перешкодою одержання високих врожаїв грибів є труднощі по знищенню кількості шкідників – комах, кліщів тощо [1, 2].

Визначення біологічних особливостей розвитку грибних комариків *Bradysia pilistriata* накреслило основні шляхи випробування препаратів для боротьби з ними. Надзвичайно висока шкідливість цих комах передбачає необхідність застосування небезпечних хімічних засобів захисту [3]. Більшість хімічних інсектицидів, в тому числі складно-ефірної природи, здатна акумулюватися в субстраті, що є передумовою до забруднення харчової продукції залишковими кількостями пестицидів. Шкідливі види комах набувають резистентності до окремих груп пестицидів, що потребує підвищення доз отрутохімікатів. Деякі хімічні препарати негативно впливають на ріст міцелію грибів.

Альтернативою хімічним інсектицидам є біологічні біопрепарати. На сьогодні при вирощуванні їстівних грибів бактеріальні препарати не використовуються, хоча згідно думці Н. В. Кандибіна та А. И. Морозова [4, 5], бактерії роду *Bacillus* можуть бути використані для боротьби з грибними комариками, що потребує подальших досліджень.

Оскільки в доступній нам літературі не було знайдено ніяких даних що до вивчення біохімічних процесів у комарика грибного, дана робота виконувалась з метою започаткування дослідження ферментативних систем цієї комахи, зокрема з'ясувати особливості експресії естеролітичних ферментів в онтогенезі *Bradysia pilistriata*. Отримані результати можуть бути використані при розробках біотехнологічних заходів боротьби з грибним комариком.

Матеріали і методи дослідження

Матеріалом для дослідження слугували личинки, лялечки та імаго (самці і самки) комарика грибного *Bradysia pilistriata*, активні форми якого мешкали на міцелії гриба *Pleurotus astreatus* при кімнатній температурі (20 °С).

Для отримання екстрактів тканин окремо взятих личинок, лялечок, самців та самок імаго (попередньо наркотизованих диетиловим ефіром) гомогенізували в еппендорфах протягом 1 хв в 10 мкл 0,1 М гліцин NaOH буфера рН 9,0, котрий вміщував 1% тритона X-100. Гомогенати центрифугували при 10000 g протягом 15 хв при 4°C, після чого до 10 мкл надосадової рідини додавали по 5 мкл 0,01% розчину бромфенолового синього, який вміщував 60% сахарози.

Приготовлені таким чином біологічні проби підлягали електрофорезу в системі лужного (рН 8,3) вертикально-пластинчастого 10% поліакриламідного гелю. Після електрофорезу кожен гелювий блок відмивали дистильованою водою до нейтрального показника рН і замочували на 15 хв в 25 мл 0,1 М трис-гліцинового буфера рН 7,4. Далі в тому ж буфері, який вміщував по 12 мг α - та β -нафтилацетату та 25 мг синього міцного, взятих в розрахунок на 25 мл, кожен гель інкубували 20 хв при температурі 25°C. Ферментативний гідроліз нафтолових ефірів зупиняли, заливаючи гелі дистильатом, доведеним до температури кипіння, після чого гелі сканували та обробляли методом комп'ютерної денситометрії.

Рівень експресивності ферментів оцінювали за показниками оптичної щільності кожної ізоформи карбоксиестерази в розрахунок на одну особину. Статистичну обробку отриманих даних проводили відповідно [6].

Результати дослідження та їх обговорення

У комах індивідуальний розвиток супроводжується радикальними змінами в активності багатьох ферментних систем [7, 8]. При цьому причиною процесів, що спостерігаються, можуть бути ті чи інші перебудови та зміни як на рівні генотипу, так і на епігеномному рівні.

Багато протеолітичних та естеролітичних ферментів, що виконують в організмі важливу роль в підтримці фізіологічного балансу вільних і зв'язаних органічних кислот, можуть цілком адекватно відображати онтогенетичні перетворення і демонструвати адаптаційні можливості організму при переході від одної фази розвитку до іншої [9]. Нажаль, гідролітичні ферменти в онтогенезі багатьох видів тварин не вивчені. Особливо це стосується комарика грибного, ферментативні системи якого, зокрема естеролітична, залишаються не дослідженими.

Нами встановлено, що в тканинах грибного комарика *Bradysia pilistriata* міститься від 7 (у личинок) до 5 (у лялечок та імаго) основних неспецифічних форм карбоксиестераз, які однаково ефективно гідролізують різні стереоізомери нафтилацетату. Як показано на рисунку 1, кожна із естераз має досить стабільні показники відносної електрофоретичної рухливості (R_f) і чітко відокремлена від інших сусідніх фракцій. При цьому значення R_f , наприклад у личинок, можна розглядати як постійну характеристику кожної окремої форми карбоксиестерази. Аналіз рівня експресії різних форм карбоксиестераз показав, що на всіх стадіях постембріонального розвитку у особин грибного комарика спостерігаються суттєві індивідуальні відмінності.

Крім того, на стадії імаго чітко виражені статеві відмінності, пов'язані з дещо вищим рівнем експресії карбоксиестерази 1 у самок.

Результати даного дослідження вказують на те, що наявність, а також рівень експресії досліджуваних карбоксиестераз в тканинах знаходяться в певній залежності від стадії постембріонального розвитку грибного комарика. Варто відзначити, що набір форм карбоксиестераз, які виявляють як α -фільність, так і β -фільність по відношенню до нафтол-похідних оцтової кислоти, в період онтогенезу майже не змінюється.

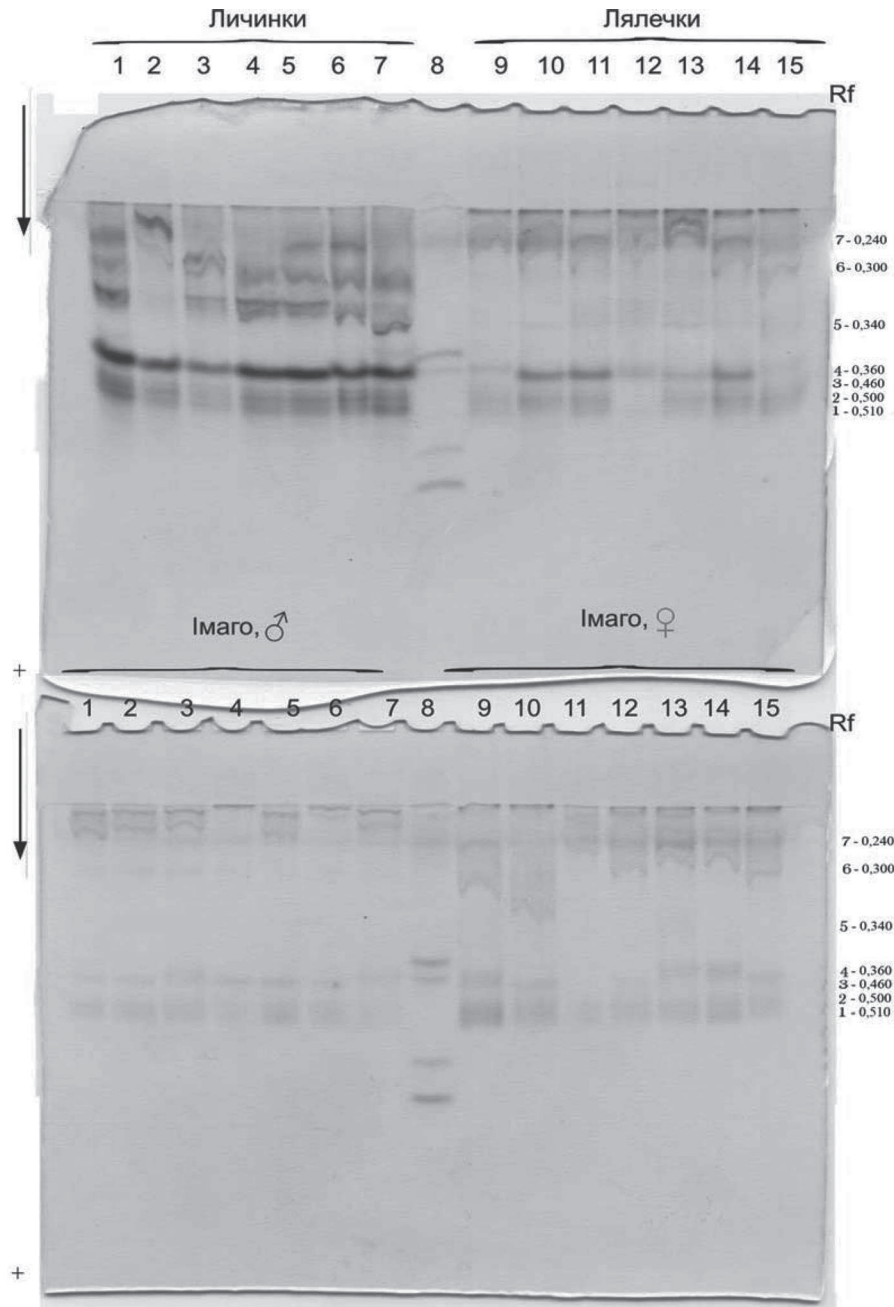


Рис. 1. Електрофоретичні спектри карбоксиестераз в онтогенезі комарика грибного *Bradysia pilistriata*: На треках № 8 – форми естераз міцелію *Pleurotus astreatus* – поживного субстрату личинок комарика грибного. 1–7 – молекулярні форми карбоксиестераз комарика грибного. Стрілками вказано напрям руху ферментів за електрофорезу

Від стадії личинки до стадії лялечки і далі до стадії дорослого грибного комарика спостерігається суттєвий спад рівня експресії окремих форм естераз. Наприклад, карбоксиестерази 1, 2 та 3 — найбільш чітко виражені у личинок; у лялечок відзначається спад їхньої активності, тоді як у дорослих імаго (самців та самок) ті ж форми ферментів майже зникають (рис. 1 і табл. 1).

Таблиця 1
Молекулярні форми та експресія карбоксиестераз у комарика грибного *Bradysia pilistriata* в онтогенезі ($M \pm m; n = 7$)

Молекулярні форми	Стадії розвитку			
	Личинки	Лялечки	Імаго	
			♂	♀
1	0,507 ± 0,038	—	—	—
2	0,529 ± 0,038	—	—	—
3	0,461 ± 0,030	0,390 ± 0,022	0,245 ± 0,004*	0,261 ± 0,010*
4	1,481 ± 0,164	0,286 ± 0,010*	0,248 ± 0,007*	0,263 ± 0,008*
5	0,514 ± 0,072	0,285 ± 0,006*	0,209 ± 0,002*	0,257 ± 0,006*
6	0,480 ± 0,038	0,347 ± 0,005	0,217 ± 0,003*	0,283 ± 0,013*
7	0,550 ± 0,038	0,282 ± 0,006*	0,250 ± 0,005*	0,276 ± 0,005*

Примітка: Дані відображають оптичну щільність (відносні одиниці) забарвлених фракцій геля, що співпадають з місцями локалізації окремих форм естераз. «—» — форма відсутня. * — відмінності в порівнянні з експресією естераз личинок достовірні при $P < 0,05$.

Слабка активність естераз у імаго найвірогідніше пов'язана з тим, що на цій фазі розвитку, комаха, скоріше за все, не використовує складні ефіри (зокрема, ефіри грибного міцелію) як джерело харчування та дуже повільно метаболізує депоновані на личиночній стадії розвитку ліпіди.

Висновки

1. Встановлено, що в тканинах грибного комарика *Bradysia pilistriata* міститься від 7 (на стадії личинки) до 5 (на стадії імаго) основних неспецифічних форм карбоксиестераз.

2. Рівень експресії всіх форм карбоксиестераз залежить від стадії розвитку грибного комарика.

3. На відміну від личинок, низька експресивність основних форм естеролітичних ферментів у імаго є наслідком зміни способу харчування, при якому майже виключається використання складних ефірів поживного субстрату.

Література

1. Ужєвская С. Ф., Зубик Н. Н., Багаєва О. С. Испытание бактериальных штаммов для борьбы с грибными комариками *Bradysia pilistriata* Frey. (*Sciaridae*) // VI Міжнародні біологічні читання, присвячені 50-річчю фак. фіз. виховання та спорту, 22–23 грудня 2006 р.: 36. наук. праць. — Миколаїв, 2006. — Вип. 2. — С. 160–161.

2. Бисько Н. А., Дудка И. А. Биология культивирования съедобных грибов рода вешенки. — К.: Наукова думка, 1987. — 110 с.
3. Мокроусова Е. П., Станюкович М. К. Перспектива использования хищных клещей *Hypoaspis Miles* (Gamasina; Laelaptidae) против грибных комариков (Diptera; Sciaridae) на шампиньонах в Ленинградской области // VII Акорологическое совещание, 28–30 сентября 1999 г.: Тез. докл. — Санкт-Петербург, 1999. — С. 50–51.
4. Кандыбин Н. В. Бактериальные средства борьбы с грызунами и вредными насекомыми. — М.: Агропромиздат, 1989. — 167 с.
5. Морозов А. И. Выращивание вешенки. — М.: АСТ, 2003. — 45 с.
6. Роклицкий П. Ф. Биологическая статистика. — Минск: Высшая школа, 1973. — 342 с.
7. Корочкин Л. И., Серов О. Л., Пудовкин А. И. и соавт. Генетика изоферментов. — М.: Наука, 1977. — 275 с.
8. Корочкин Л. И. Молекулярно-генетические механизмы регуляции тканеспецифической экспрессии генов *est S* у дрозофилы // Мол. биология. — 2000. — Т. 34, № 5. — С. 736–742.
9. Онтогенетические особенности экспрессии карбоксиэстераз у *Drosophila melanogaster* / А. М. Андриевский, В. А. Кучеров, В. Н. Тоцкий, Е. В. Деркач // Вісник ОНУ. — 2005. — Т. 10. — Вип. 5. — С. 25–35.

А. М. Андриевский¹, Н. Н. Непомящая²

Одесский национальный университет имени И. И. Мечникова,

¹кафедра генетики и молекулярной биологии,

²кафедра зоологии,

ул. Дворянская, 2, Одесса, 65082, Украина

ЭКСПРЕССИЯ КАРБОКСИЭСТЕРАЗ В ОНТОГЕНЕЗЕ КОМАРИКА ГРИБНОГО *BRADYSIA PILISTRIATA*

Резюме

Методами электрофореза и компьютерной денситометрии изучали разнообразие и экспрессию молекулярных форм карбоксиэстераз комарика грибного *Bradysia pilistriata* Frey. на отдельных стадиях онтогенетического развития. Впервые показаны количественные изменения в системе эстеролитических ферментов в онтогенезе одного из главных вредителей съедобных грибов. Установлено, что максимум количества молекулярных форм карбоксиэстераз и уровня их экспрессивности совпадает со стадией личинки.

Ключевые слова: карбоксиэстеразы, онтогенез, комарик грибной *Bradysia pilistriata*.

A. M. Andrievsky¹, N. M. Nepomyashcha²

Odessa National I. I. Mechnikov University,

¹Department of Genetics and Molecular Biology,

²Department Zoology,

Dvoryanskaya St., 2, Odessa, 65082, Ukraine

**CARBOXYLESTERASES EXPRESSION IN ONTOGENESIS OF MIDGE FUNGUS
*BRADYSIA PILISTRIATA***

Summary

The diversity and expression the molecular forms of fungus midge *Bradysia pilistriata* Frey. carboxylesterases were studied on the certain stages of ontogenetic development by the methods of electrophoresis and computer densitometry. For the first time quantitative changes in esterolytic enzyme system in ontogenesis of one of major the pests of edible mushrooms were shown. It was determined that maximum of a number of the carboxylesterases molecular forms and their expression level coincides with the larva stage.

Key words: carboxylesterases, ontogenesis, fungus midge *Bradysia pilistriata*.