

С. А. Бахвалов¹, В. В. Мартемьянов¹, В. Н. Бахвалова¹, О. В. Морозова²

Детекция ДНК вируса ядерного полиэдроза в образцах из яиц и гусениц в разных фазах популяционной динамики непарного шелкопряда *Lymantria dispar* (L.)

¹ФГБУН Институт систематики и экологии животных СО РАН, Новосибирск;
²ФГБУН Институт химической биологии и фундаментальной медицины, Новосибирск

ДНК вируса ядерного полиэдроза (ВЯП) в образцах из яиц и гусениц непарного шелкопряда, собранных в природных популяциях Западной Сибири и Урала, детектировали с помощью ПЦР с праймерами, соответствующими гену полиэдрина. Согласно данным учетов численности, западносибирская популяция *Lymantria dispar* (L.) находилась в фазе депрессии. При этом частота детекции ДНК ВЯП в яйцах ($8,6 \pm 4,8-13,6 \pm 5,2\%$) и гусеницах ($21,0 \pm 6,3-22,2 \pm 6,7\%$) достоверно не различалась. На Урале сбор насекомых проводили в очаге их массового размножения в фазе максимальной численности. Частота детекции ДНК ВЯП в яйцах ($11,4 \pm 5,0\%$) была значимо ($p < 0,001$) меньше, чем в гусеницах ($59,8 \pm 5,6\%$). По-видимому, изменение уровней вирусоносительства в онтогенезе *Lymantria dispar* (L.) от яиц к гусеницам связано с градационным циклом популяционной динамики насекомого.

Ключевые слова: непарный шелкопряд, вирус ядерного полиэдроза, вирусоносительство у насекомых, транс-вариальная передача вируса ядерного полиэдроза

Detection of the Nuclear Polyhedrosis Virus DNA in Samples from Eggs and Caterpillars at Different Stages of the Gypsy Moth *Lymantria Dispar* (L.) Population Dynamics

S. A. Bakhvalov¹, V. V. Martemyanov¹, V. N. Bakhvalova¹, and O. V. Morozova²

¹ Institute of Systematics and Ecology of Animals, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia; ² Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

The nuclear polyhedrosis virus (NPV) DNA was detected in samples from eggs and caterpillars of the gypsy moth collected in natural populations of the Western Siberia and Ural by means of PCR with primers corresponding to the polyhedrin gene. According to censuring data, the gypsy moth populations of Western Siberia were at the depression stage. The NPV DNA detection frequencies in eggs ($8.6 \pm 4.8\% - 13.6 \pm 5.2\%$) and caterpillars ($21.0 \pm 6.3\% - 22.2 \pm 6.7\%$) were not significantly differed. In the Urals, collection of the insects was performed in their gradation focus at the phase of maximal abundance. The DNA detection rate in eggs ($11.4 \pm 5.0\%$) was confidently ($p < 0.001$) lower than in caterpillars ($59.8 \pm 5.6\%$). Consequently, variations of the NPV infection prevalence during ontogenesis of *Lymantria dispar* (L.) was associated with the gradation cycle of the insect population dynamics.

Key words: gypsy moth, nuclear polyhedrosis virus, virus-carriage among insects, transovarial transmission of the nuclear polyhedrosis virus

На территории Северной Европы, Азии и Америки периодически наблюдаются вспышки массового размножения непарного шелкопряда с сильным объединением лесных насаждений, чем наносится существенный вред лесному хозяйству и экологии регионов [1, 3, 6, 8]. В естественных популяциях непарного шелкопряда в период достижения ими критических значений плотности около половины особей являются носителями латентного вируса ядерного полиэдроза (ВЯП) из семейства ДНК-содержащих бакуловирусов [4]. Бакуловирусы содержат геномную двухцепочечную кольцевую ДНК длиной более 160 тыс. п. н. (номера доступа в базе данных GenBank NC_001973 и AF081810 (длина 161046 п. н.).

Вирусоносительство во всех фазах развития насекомых с передачей вируса через яйца следующей генерации обеспечивает постоянство вирусной инфекции в поколениях насекомых и объясняет часто наблюдаемые в их популяциях одновременные заболевания полиэдрозом с гибелью большей части особей и деградацией очагов массового размножения на значительных территориях [2, 4, 5, 12].

Латентные бакуловирусные инфекции выявлены у многих видов насекомых [4, 11, 12, 18]. Они могут вызываться зрелыми вирионами и полиэдрами и посредством интеграции вирусного и клеточного геномов насекомого-хозяина [7, 10, 20]. Доказана способность вирусоносителей родительского поколения к передаче вирусов дочернему поколению насекомых через яйца [5, 10, 14, 15, 19]. Вопрос о том, насколько важна трансовальная (на поверхности хориона яйца) и трансвариальная (внутри яйца) вертикальная передача ВЯП для персистенции вирусной инфекции в популяциях насекомых, до настоящего времени является предметом исследований [4, 17, 19]. По нашим данным, вирусоносительство в ювенильных фазах развития насекомых и в фазе яйца обеспечивает постоянство вирусной инфекции в поколениях насекомых и тем самым оказывает большое влияние на динамику системы насекомое-вирус [4].

Ранее мы уже сообщали о выявлении ДНК ВЯП в яйцах и гусеницах непарного шелкопряда из различных очагов его массового размножения [5]. В продолжение этих работ мы исследовали яйцекладки и

Контактная информация:

Бахвалов Станислав Андреевич, д-р биол. наук, вед. науч. сотр.; e-mail: bahvalov60@list.ru

гусениц шелкопряда из популяций насекомого в различных фазах популяционной динамики с целью выявления в них ДНК ВЯП.

Целью работы было изучение динамики вирусносительства в онтогенезе непарного шелкопряда в зависимости от фаз его популяционного цикла.

Материалы и методы

Районы исследований и места сбора яиц и гусениц. В Западной Сибири сбор яйцекладок, а затем гусениц 4–5-го возраста непарного шелкопряда проводили в трех колковых лесонасаждениях Карасукского района Новосибирской области, расположенных на расстоянии примерно 25 км друг от друга с географическими координатами 53° 45' с.ш., 77° 43' в.д.; 53° 51' с.ш., 77° 48' в.д.; 53° 37' с.ш., 78° 30' в.д. На Урале насекомых собирали на территории Каменск-Уральского района Свердловской области в лесонасаждениях участка с географическими координатами 56° 30' с.ш. и 61° 40' в.д. Площади сборов яиц и гусениц – около 15 га. Сборы на западносибирских участках осуществляли в 2010 и 2011 гг., на уральских – в 2011 г.

Для исследования вирусносительства в яйцах шелкопряда весной перед выходом гусениц на исследуемых участках собирали яйцекладки и методом случайной выборки выбирали из них по 10 кладок. Затем одну часть яиц использовали для выращивания гусениц с последующим учетом погибших от полиэдроза, из другой части формировали пробы (по 10 яиц в каждой) для определения ДНК ВЯП.

Для выявления ДНК ВЯП в гусеницах из очага их собирали в 3–4-м возрасте на тех же участках, что и яйцекладки, и использовали для детекции ДНК ВЯП.

Выделение ДНК. Собранные пробы яиц и гусениц обрабатывали 6% раствором перекиси водорода в течение 3 мин с последующей промывкой проточной водой с целью удаления контаминирующего вируса с поверхности хориона и поверхности тела гусениц. Затем для выделения ДНК все пробы растирали до однородной массы в ступках и суспендировали в свежеприготовленном растворе 0,1 М Na₂CO₃, 0,17 М NaCl, 0,01 М EDTA при pH 10,9, добавляли додецилсульфат натрия (SDS) до 1% и протеиназу К до конечной концентрации 0,5 мг/мл и инкубировали 2 ч при 37°C. Затем проводили депротеинизацию смесью фенол–хлороформ–изоамиловый спирт (25:24:1) и осаждение нуклеиновых кислот изопропиловым спиртом, как описано в работе [7]. Для полного разрушения вирионов ВЯП проводили дополнительный лизис 100 мкл гомогената после инкубации в буфере с SDS и протеиназой К в 300 мкл раствора гуанидинотиоцианата при 65°C в течение 15–30 мин с последующей депротеинизацией смесью фенол–хлороформ при pH 8,0 и осаждением изопропанолом в соответствии с описанием в работе [16]. Для выделения суммарной ДНК из яиц непарного шелкопряда использовали метод сорбции на силикагеле [13].

ПЦР проводили, как описано ранее [5], с праймерами Ldph-F 5'-TCAGAACTCACTCTCTTCAAAGAG-3' и Ldph-R 5'-CACGTACACGATGGGCTTGTAAG-3'.

Статистическая обработка результатов. Различия между показателями частоты обнаружения ДНК ВЯП оценивали по t-критерию Стьюдента [9].

Результаты и обсуждение

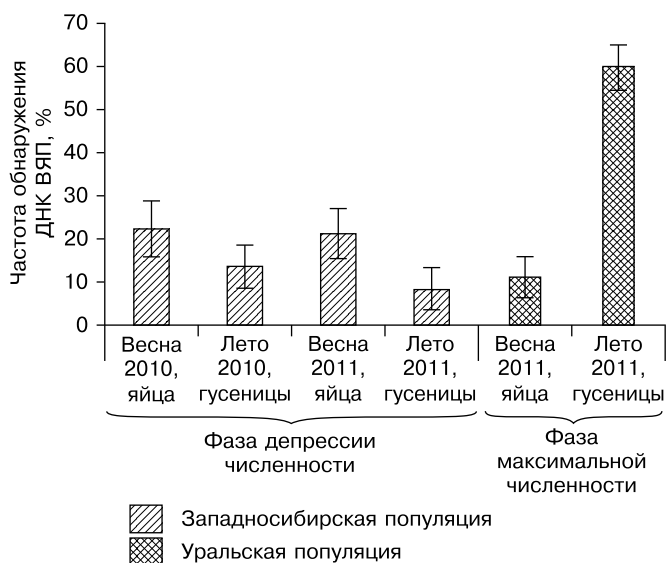
Учет численности непарного шелкопряда показал, что западносибирская популяция находилась в фазе

депрессии численности. Плотность яйцекладок насекомых в западносибирских биотопах составляла 0,2 ± 0,05 кладки/дерево, объем – 190,8 ± 67,1 яйца на кладку. Здесь в течение последних 10 лет не было вспышек массового размножения непарного шелкопряда, наблюдалась фаза депрессии или стабильной численности. Плотность яйцекладок в уральской популяции составляла 7,0 ± 3,5 на 1 дерево, объем – 220,0 ± 53 яйца на кладку, что свидетельствует об эруптивной фазе вспышки с максимальной численностью насекомых и начале деградации очага. Таким образом, уральская и западносибирская популяции шелкопряда находились в противофазах популяционного цикла.

По данным ПЦР, в пробах яиц и гусениц из всех исследованных популяций шелкопряда были выявлены ДНК ВЯП, причем среди проб яиц и гусениц из западносибирской депрессирующей популяции количество положительных оказалось таким же, как и среди проб яиц насекомых из уральской популяции в период максимальной численности (см. рисунок). При этом существенно выше ($p < 0,001$) была частота обнаружения ДНК ВЯП среди гусениц, собранных в уральской популяции, находящейся в эруптивной фазе с максимальной численностью.

Учет смертности от спонтанного полиэдроза среди гусениц, выращенных из яйцекладок, из которых яйца отбирались для исследования в ПЦР на наличие ДНК ВЯП, показал, что частота гибели от вирусной инфекции гусениц из западносибирской популяции в среднем за 2 года составила 0,93 ± 0,5%, а из уральской популяции – 9,7 ± 1,6%. Следовательно, относительное количество насекомых, погибших от спонтанного полиэдроза, было значительно ниже по сравнению с частотой детекции вирусной ДНК независимо от фазы популяционного цикла насекомого. Это свидетельствует о том, что в большинстве проб, содержащих ДНК ВЯП, вирус находился в неинфекционной форме.

В то же время согласно данным других авторов и результатам наших более ранних исследований, в период максимальной численности непарного шелкопряда и других массовых видов лесных насекомых количество



Частота детекции ДНК ВЯП в образцах яиц и гусениц непарного шелкопряда из природных популяций в различные периоды динамики численности.

вирусоносителей и уровень смертности от вирусных инфекций всегда выше, чем в период депрессии их численности [5]. Вероятно, в период высокой численности насекомых и особенно ее деградации значительно повышается уровень горизонтальной передачи вирусной инфекции в фазе гусеницы, что и обуславливает резкий рост количества насекомых с ДНК ВЯП в этот период онтогенеза. Не исключено и подавление защитных систем насекомых в период максимальной численности и деградации их численности из-за резкого ухудшения условий питания [5]. Многочисленные исследования свидетельствуют о том, что массовые заболевания насекомых и поражение их паразитоидами и патогенами в циклирующих популяциях лесных фитофагов, как правило, являются следствием снижения жизнеспособности насекомых из-за недостатка корма и его низкой питательной ценности, действия экстремальных экологических факторов и защитных механизмов растений [2]. Следовательно, взаимосвязи между растением и фитофагом могут определять характер взаимосвязей между фитофагом и представителями следующего трофического уровня – паразитами и патогенами.

Таким образом, динамика чувствительности популяции насекомых к циркулирующим в ней вирусам и вирулентность этих вирусов – две стороны одного явления, характеризующие состояние системы насекомое–вирус во времени и пространстве. Это состояние обуславливает уровень патологического воздействия вирусов на популяцию насекомых только в конкретный период популяционного цикла хозяина. Эффективность действия патогена как фактора динамики насекомое–хозяина является функцией физиологического состояния фитофага, которое в значительной мере определяется кормовым фактором, включающим количество и качество корма, а также условия его потребления.

Изменение уровня вирусоносительства в онтогенезе насекомое от яиц к гусеницам связано с градиционным циклом популяционной динамики шелкопряда: количество вирусоносителей среди яиц и гусениц в фазе депрессии, а также среди яиц в фазе максимальной численности значимо ($p < 0,001$) меньше, чем количество вирусоносителей среди гусениц в период максимальной численности и начале ее деградации (см. рисунок).

Следует отметить, что ПЦР позволяет детектировать ДНК ВЯП, однако это не является доказательством присутствия в клетках насекомых зрелых вирионов вируса. В настоящее время нет единой точки зрения относительно механизмов вертикальной передачи ВЯП насекомых. Однако большинство исследователей полагают, что основной путь передачи вирусов от родителей потомству – контаминация поверхности яиц вирусом [14, 15]. Вместе с тем сообщается, что хотя поверхностная вирусная деконтаминация яиц химическими веществами существенно снижает частоту заболевания полиэдрозом среди дочерних поколений насекомых, тем не менее не избавляет их от полиэдроза полностью [19]. В. В. Оберемок [10], используя ПЦР, показал, что ДНК ВЯП непарного шелкопряда содержатся внутри яиц этого насекомого.

Полученные нами результаты свидетельствуют о том, что вирусная ДНК содержалась в значительной части исследованных проб яиц и гусениц и их количество зависело от фазы популяционного цикла насекомых. Это указывает на то, что вирусная ДНК способ-

на передаваться следующему поколению насекомого трансвариально. Однако это не означает, что у насекомых, содержащих ДНК ВЯП, обязательно может развиваться острая вирусная инфекция с последующей их гибелью. Как нами было показано ранее, уровень гибели насекомых от спонтанной вирусной инфекции в период вспышки массового размножения, как правило, намного ниже, чем уровень выявленных ДНК ВЯП в яйцах и гусеницах насекомых [5]. Поэтому присутствие ДНК ВЯП в яйцах и гусеницах не может служить критерием вероятности возникновения острой вирусной инфекции у насекомых-вирусоносителей.

Авторы выражают благодарность д-ру биол. наук Василию Ивановичу Пономареву за сбор насекомых каменск-уральской популяции. Работа была поддержана грантами РФФИ № 11-04-10085-к, 10-04-10046-к, 10-04-02107-э_к.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ашимов К. С. Дендрофильные насекомые орехово-плодовых лесов Юго-Западного Тянь-Шаня. – Бишкек, 2005.
2. Бахвалов С. А. Вирозы насекомых // Патогены насекомых: структурные и функциональные аспекты. – М.: Круглый дом, 2001. – С. 20–75.
3. Бахвалов С. А., Ильиных А. В., Тешебаева З. А. Проявление вирусной инфекции в популяциях непарного шелкопряда (*Lymantria dispar* L.) в Западной Сибири и Кыргызстане // Современные проблемы геоэкологии и сохранения биоразнообразия: Сборник материалов 2-й Международной конф. – Бишкек, 2007. – С. 206–208.
4. Бахвалов С. А. Влияние взаимоотношений в системе растение–насекомое–паразит на развитие и популяционную динамику насекомых: Автореф. дис. ... д-ра биол. наук. – Новосибирск, 2008.
5. Бахвалов С. А., Колтунов Е. В., Мартемыанов В. В. Факторы и экологические механизмы популяционной динамики лесных насекомых-фитофагов. – Новосибирск: Издательство СО РАН, 2010.
6. Гниненко Ю. И., Матусевич Л. С. Биологическая защита лесов России: проблемы и перспективы // Лесное хозяйство. – 2001. – № 4. – С. 42–43.
7. Кок И. П., Скуратовская И. Н., Строковская Л. И. и др. Обнаружение интеграции бакуловирусного и клеточного геномов (ДНК) при латентной инфекции // Молекул. биол. – 1983. – № 34. – С. 67–69.
8. Колтунов Е. В. Экология непарного шелкопряда в лесах Евразии. – Екатеринбург: УрО РАН, 2006.
9. Лакин Г. Ф. Биометрия. – М.: «Высшая школа», 1974.
10. Оберемок В. В. Доказательство трансвариальной передачи вируса ядерного полиэдроза непарного шелкопряда *Lymantria dispar* Nucleopolyhedrovirus (Fam. Baculoviridae) методом RAPD-PCR // Журн. общей биол. – 2008. – Т. 69, № 5. – С. 397–400.
11. Anderson D. L., Gibbs A. J. Inapparent virus infection and their interactions in pupae of the honey bee (*Apis mellifera* L.) in Australia // J. Gen. Virol. – 1988. – Vol. 69, N 7. – P. 1617–1625.
12. Aruga H. Induction of virus infections // Insect pathology. An advanced treatise / Ed. E. Steinhaus. – New York: Academic Press, 1963. – Vol. 1. – P. 499–530.
13. Boom R., Sol C. J., Salimans M. M. et al. Rapid and simple method for purification of nucleic acids // J. Clin. Microbiol. – 1990. – Vol. 28, N 3. – P. 495–503.
14. Burand J. P., Horton H. M., Retnasami S., Elkinton J. S. The use of polymerase chain reaction and shortwave UV irradiation to detect baculovirus DNA on the surface of gypsy moth eggs // J. Virol. Meth. – 1992. – Vol. 36. – P. 141–150.
15. Charpentier G., Desmarteaux D., Bourassa J.-P. et al. Utilization of the polymerase chain reaction in the diagnosis of nuclear polyhedrosis virus infections of gypsy moth (*Lymantria dispar* Lep., Lymantriidae) populations // J. Appl. Entomol. – 2003. – Vol. 127. – P. 405–412.
16. Chomczynski P., Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction // Anal. Biochem. – 1987. – Vol. 162, N 1. – P. 156–159.
17. Cory J., Myers J. The ecology and evolution of insect baculoviruses // Annu. Rev. Ecol., Evol., Syst. – 2003. – Vol. 34. – P. 239–272.
18. Evans H. F. Ecology and epizootiology of baculoviruses // The biology of baculoviruses / Eds R. R. Granados, B. A. Frederici. – Boca Raton: CRC Press, 1986. – Vol. 11. – P. 89–132.
19. Kukan B. Vertical transmission of nucleopolyhedrovirus in insects // J. Invertebr. Pathol. – 1999. – Vol. 74, N 2. – P. 103–111.
20. Podgwaite J. D., Mazzone H. M. Latency of insect viruses // Adv. Virus Res. – 1986. – Vol. 31. – P. 293–320.

Поступила 24.11.11