

© ИЛЬИНЫХ А.В., ПОЛЕНОГОВА О.В., 2016  
УДК 578.841:578.42].083.2

*Ильиных А.В., Поленогова О.В.*

## ДОКАЗАТЕЛЬСТВО ВЕРТИКАЛЬНОЙ ПЕРЕДАЧИ ВИРУСА ЯДЕРНОГО ПОЛИЭДРОЗА В РЯДУ ГЕНЕРАЦИЙ НЕПАРНОГО ШЕЛКОПРЯДА *LYMANTRIA DISPAR* (L.)

ФГБУН «Институт систематики и экологии животных» СО РАН, 630091, г. Новосибирск

Вирусы насекомых могут играть значительную роль в популяционной динамике своих хозяев. Поэтому вопрос, каким образом поддерживается перманентность вирусной инфекции у особей-вирусоносителей, относится к одной из интригующих проблем общей биологии и вирусологии. В лабораторных условиях осуществлялось моделирование вертикальной передачи вируса ядерного полиэдрома (ВЯП) у непарного шелкопряда при относительно высокой смертности особей родительского поколения (60%). С помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) выполнялась диагностика скрытого вируса у насекомых до их инфицирования в лабораторных условиях, а также у особей, выживших после заражения. Показатель гибели от полиэдрома насекомых, полученных от выживших после заражения ВЯП особей, в поколениях F<sub>1</sub>, F<sub>2</sub> и F<sub>3</sub> составил 14±4, 10±4 и 5±0,5% соответственно. В последующих трех поколениях гибели насекомых от полиэдрома не отмечалось. Уровень вирусоносительства у эмбрионов во всех случаях превышал значения гибели насекомых от полиэдрома, т. е. полученные результаты показывают, что присутствие вируса у насекомых не означает неизбежной гибели хозяев. Вероятно, вирусная ДНК может полностью или частично утратить свою инфекционность, хотя и выявляться в анализируемых образцах насекомых. Вирусная инфекция может развиваться у потомков выживших после заражения насекомых и вызывать смерть особей от полиэдрома в течение трех поколений непарного шелкопряда. Уровень вирусоносительства, определенный у эмбрионов с помощью ПЦР, выше, чем количество погибших насекомых от полиэдрома среди особей дочерних поколений.

Ключевые слова: бакуловирусы; вертикальная передача; непарный шелкопряд *Lymantria dispar* L.

**Для цитирования:** Ильиных А.В., Поленогова О.В. Доказательство вертикальной передачи вируса ядерного полиэдрома в ряду поколений непарного шелкопряда *Lymantria dispar* (L.). *Вопросы вирусологии*. 2016; 61 (2): 85-88.

DOI: 10.18821/0507-4088-2016-61-2-85-88

*Ilyinykh A.V., Polenogova O.V.*

## THE PROOF OF VERTICAL TRANSMISSION OF THE NUCLEOPOLYHEDROVIRUS IN MANY GENERATIONS OF THE GYPSY MOTH *LYMANTRIA DISPAR* L.

Institute of Systematics and Ecology of Animals, Novosibirsk, 630091, Russian Federation

**Introduction.** Insect viruses can play an important role in population dynamics of their hosts. That is why the problem of permanent viral infection support among virus-positive insects is associated with one of the intriguing problems of general biology and virology.

**Materials and methods.** Under laboratory conditions, the modeling of the vertical transmission of the nucleopolyhedrovirus (NPV) gypsy moth was implemented at relatively high level of mortality among insects of parental generation (60%). The diagnostics of the occult virus was executed by the PCR method among insects before their infection under laboratory conditions, as well as among insects that survived after inoculation.

**Results.** The NPV-caused mortality among insects that survived after infection in generations F<sub>1</sub>, F<sub>2</sub>, and F<sub>3</sub> was 14 ± 4%, 10 ± 4%, and 5 ± 0.5%, respectively. In the following three generations NPV-induced mortality was not noticed.

**Discussion.** The level of the virus-positive individuals among the gypsy moth embryos in all occasions was higher than the NPV-induced mortality of insects. Thus, the given results show that the presence of virus among insect does not mean inevitable mortality of their hosts. Perhaps, the viral DNA can completely or partly lose its infectivity but may exist in the analyzed insect samples.

**Conclusions.** The viral infection can be formed among progeny surviving after inoculation of insects. It can be actuated during three generations of the gypsy moth. The level of the virus-positive individuals among the gypsy moth embryos determined by the PCR method in daughter generations was higher than the NPV-induced mortality of insects.

Key words: baculoviruses; vertical transmission; gypsy moth *Lymantria dispar* L.

**For citation:** Ilyinykh A.V., Polenogova O.V. The proof of vertical transmission of the nucleopolyhedrovirus in many generations of the gypsy moth *Lymantria dispar* L. *Voprosy Virusologii (Problems of Virology, Russian journal)*. 2016; 61(2): 85-88. (In Russ.)

DOI: 10.18821/0507-4088-2016-61-2-85-88

**For correspondence:** Alexandr V. Ilyinykh, Doctor of Biology, Leading research scientist, Institute of Systematics and Ecology of Animals, Novosibirsk, 630091, Russian Federation, E-mail: avilyinykh@mail.ru

**Information about authors:**

Ilyinykh A.V., <http://orcid.org/0000-0001-8825-7748>

Polenogova O.V., <http://orcid.org/0000-0003-3438-3217>

**Funding.** This work was supported by the Russian Foundation for Basic Research (Project № 14-04-00615a).

**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.

Received 26 September 2014

Accepted 20 November 2014

**Для корреспонденции:** Ильиных Александр Васильевич, д-р биол. наук, ведущий научный сотрудник ФГБУН «Институт систематики и экологии животных» СО РАН, 630091, г. Новосибирск, E-mail: avilyinykh@mail.ru

Вирусы насекомых могут играть существенную роль в популяционной динамике своих хозяев [1, 2]. Смертность насекомых от вироза может наступать в результате действия как экзогенного, так и эндогенного вирусов. В первом случае вирус передается от больных или погибших особей здоровым в течение одной генерации или через внешнюю среду (горизонтальная передача). Кроме того, вирус способен передаваться эндогенным путем – от родителей потомкам через внутреннее содержимое яйца (вертикальная передача) [3]. Однако некоторые принципиальные вопросы, связанные с вертикальной передачей вирусов, к настоящему времени не ясны. Прежде всего имеющиеся результаты весьма противоречивы: так, смертность от вироза среди потомков насекомых, выживших в результате заражения родительского поколения, варьирует от 0% у *Spodoptera ornitogalli* [3] до 100% у *Bombyx mori* [4]. Кроме того, большинство выполненных исследований ограничено первым дочерним поколением выживших после заражения особей [4–6 и др.]. Известны лишь 2 работы, в которых исследовался длительный эффект вертикальной передачи вируса в ряду генераций насекомых (по 5 в каждой работе): *Plodia interpunctella* [7] и *Spodoptera exigua* [8]. Однако в этих статьях нет данных о смертности особей в результате вертикальной передачи вируса, сообщается лишь о количестве насекомых-вирусоносителей (хотя вирусоносительство может и не приводить к смертности насекомых от вироза). До настоящего времени не было попыток ответить на вопрос: существует ли предел, в течение которого вирус способен передаваться и вызывать смерть особей в ряду генераций насекомого?

Поэтому в данной работе на примере непарного шелкопряда и поражающего его вируса ядерного полиэдроза (ВЯП) впервые определяли, как долго бакуловирус в результате вертикальной передачи способен передаваться и вызывать смерть особей в генерациях насекомого-хозяина при относительно высокой гибели насекомых (~60%) родительского поколения. Иными словами, моделировалась ситуация, возникающая при эпизоотическом процессе в популяциях насекомых. Кроме того, с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) дана оценка вирусоносительства у потомков особей, выживших после заражения насекомых, в течение 6 генераций. Полученные данные приближают к пониманию механизмов инициации эпизоотий (естественных и искусственных), вызванных бакуловирусами, в популяциях лесных насекомых-филлофагов.

### Материал и методы

Для экспериментов использовали яйцекладки непарного шелкопряда, собранные в очаге массового размножения на территории Новосибирской области в 2006 г. Подготовку яиц и культивирование насекомых выполняли по методике, описанной ранее [9]. Во время эксперимента гусениц содержали на ветвях березы *Betula pendula*, являющейся основным кормовым растением непарного шелкопряда в Западной Сибири и Зауралье. Для заражения гусениц вирусом из ручного опрыскивателя обрабатывали 4 примерно одинаковые ветви кормового растения, равномерно распределенные на площади 0,25 м<sup>2</sup>. В работе применяли штамм Алтайский (из коллекции микроорганизмов Института систематики и экологии животных СО РАН) в концентрации 10<sup>6</sup> полиэдров на 1 мл, количество вирусной суспензии составляло 2,5 мл в каждом случае. Инфицирование проводили через 2

дня после линьки гусениц на IV возраст, в контрольной группе корм обрабатывали дистиллированной водой. После просушивания ветви растений помещали в 3-литровые сосуды с гусеницами непарного шелкопряда по 15 особей в каждый сосуд. Количество насекомых в опыте и контроле по 150 особей. Сосуды просматривали ежедневно и при необходимости заменяли корм и удаляли погибших особей, которых анализировали под световым микроскопом (Биолам-R15; “ЛЮМО”, Россия) для определения причины гибели. Выживших насекомых выращивали до фазы имаго, скрещивали и от них получали потомство. Для исследования влияния половой принадлежности насекомых на уровень вертикальной передачи вируса скрещивали инфицированных самок с контрольными самцами, а контрольных самок с инфицированными самцами.

Для оценки значимости различий выборочных средних применяли критерий Стьюдента, используя угловое преобразование Фишера.

Часть сбора яиц непарного шелкопряда, из которых выращивали насекомых, использовали для диагностики скрытого вируса с помощью ПЦР. Для анализа отбирали по 100 яйцекладок, из отдельной яйцекладки брали по 20 жизнеспособных яиц и стерилизовали с поверхности [9]. В стерильных условиях из яиц извлекали эмбрионы и помещали в пробирки Eppendorf по 20 особей в каждую. До проведения ПЦР образцы хранили при -70°C.

Суммарную ДНК из образцов насекомых выделяли с помощью комплекта реагентов для выделения ДНК (ООО “Лаборатория МЕДИГЕН”, Россия) в соответствии с протоколом производителя. Амплификацию ПЦР-продукта гена белка слияния Ld130 проводили в 20 мкл буфера, содержащего 10 мкл PyroStart™ Fast PCR Master Mix (2X) (“Fermentas”, США); 0,1 мкМ прямого и обратного праймеров и 27,5% ДНК по объему. Дизайн специфических праймеров выполняли по полнотекстовой последовательности ВЯП непарного шелкопряда, задепонированной в базе данных GenBank под номером NC\_001973 [10]. Структура разработанных праймеров для определения ДНК ВЯП непарного шелкопряда в биологических образцах:

прямой: 5' CGGGCATCATCCGCGGCC 3' (127651–127668),

обратный: 5' CGCCCTCCAGCTCCGCGC 3' (127944–127927).

ПЦР проводили на амплификаторе DNA Engine Dyad® Peltier Thermal Cycler (“Bio-Rad”, США) в следующем режиме: денатурация 30 с – 94°C, отжиг 30 с – 68°C и синтез 30 с – 72°C 37 циклов; синтез 7 мин – 72°C. Размер амплифицируемого фрагмента составлял 294 пары нуклеотидов.

### Результаты и обсуждение

Смертность насекомых в родительском поколении при инфицировании гусениц непарного шелкопряда ВЯП составила 62±7%, в контроле – 2±0,4% ( $p < 0,001$ ). Вероятно, смертность контрольных насекомых может объясняться проявлением спонтанного полиэдроза, характерного для особей природных популяций непарного шелкопряда [9]. Смертность насекомых от вирусной инфекции у выживших после заражения потомков особей наблюдалась в поколениях F<sub>1</sub>–F<sub>3</sub> (14±4, 10±4 и 5±0,5% соответственно), в последующих генерациях гибели не отмечалось (см. таблицу).

Имеющиеся данные литературы, касающиеся ис-

**Уровень вирусоносительства и смертность непарного шелкопряда от спонтанного полиэдроза у потомков особей, выживших после инфицирования ВЯП гусениц родительского поколения**

| Поколение насекомых | Уровень вирусоносительства у насекомых, определенный с помощью ПЦР, % (n = 100) |             | Смертность насекомых от полиэдроза, % (n = 150) |             |
|---------------------|---|-------------|---|-------------|
|                     | зараженные  | контрольные | зараженные                                      | контрольные |
| F1                  | 78±9  | 42±4        | 14±4*   | 1±0,1       |
| F2                  | 46±7  | 34±7        | 10±4*   | 0           |
| F3                  | 32±5  | 24±5        | 5±0,5*  | 0           |
| F4                  | 11±2  | –           | 0   | 0           |
| F5                  | 8±1   | 10±2        | 0   | 0           |
| F6                  | 10±1  | 8±1         | 0   | 0           |

Примечание. Приведены средние значения±стандартная ошибка; \* – значимость различий выборочных средних ( $p < 0,01$ ) между потомками выживших зараженных и контрольных насекомых; (–) – нет данных.

следования вертикальной передачи вируса у непарного шелкопряда, неоднозначны. Так, по данным Муррея и Элкинтона [11], гибель насекомых от полиэдроза среди потомков особей, выживших после заражения вирусом в фазе гусеницы II возраста, составила менее 2%. Эти авторы считают, что смертность от полиэдроза среди потомков выживших особей явилась результатом случайного заражения насекомых вирусом в лаборатории. Однако Шапиро и Робертсон [12] в схожих экспериментах продемонстрировали, что гибель насекомых от вируса в дочернем поколении варьировала от 4,7 до 11,5% в зависимости от дозы вируса в родительском поколении. Эти авторы в свою очередь относят смертность насекомых среди потомков инфицированного поколения на счет вертикальной передачи вируса. Сравнивая результаты этих двух работ, необходимо подчеркнуть, что в экспериментах Шапиро и Робертсона [12] смертность от полиэдроза среди родительского поколения варьировала от 10 до 90%, а в опытах Муррея и Элкинтона [11] этот показатель составил 17%. Возможно, относительно низкая смертность от полиэдроза среди особей родительского поколения является величиной, недостаточной для демонстрации вертикальной передачи вируса.

В других экспериментах по изучению вертикальной передачи ВЯП у непарного шелкопряда зараженность особей дочернего поколения отмечалась на уровне 15% [13]. Таким образом, можно заключить, что полученные в настоящей работе результаты в целом совпадают с имеющимися для непарного шелкопряда по поколению F<sub>1</sub> литературными данными.

Интерес представляет вопрос о том, зависит ли вертикальная передача от количества погибших насекомых в родительском поколении. По данным Шапиро и Робертсона [12], смертность особей непарного шелкопряда от полиэдроза в родительском поколении прямо коррелировала со смертностью в дочернем поколении, но этих результатов недостаточно для обобщения. Различия в передаче

вируса, о которых можно судить по имеющимся работам, вероятно, связаны с возрастными различиями инфицированных насекомых и различиями в смертности особей родительского поколения.

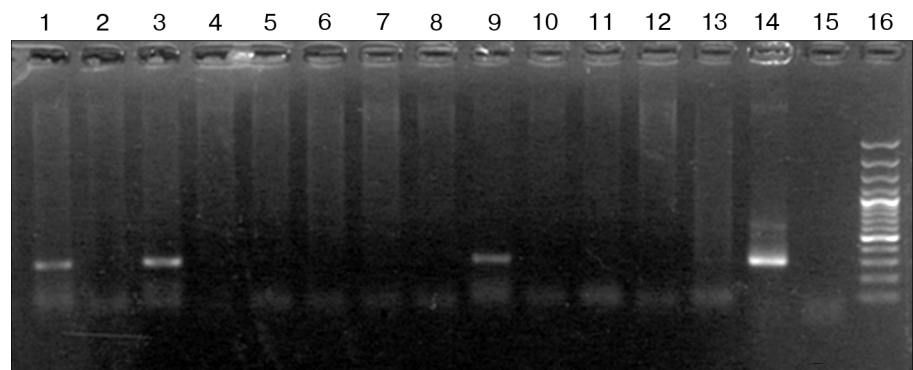
Определение уровня спонтанного полиэдроза у особей дочернего поколения F<sub>1</sub>, полученных в результате скрещивания инфицированных самок с контрольными самцами, а также контрольных самок с инфицированными самцами, достоверных различий не выявило: смертность насекомых составила 12±3 и 10±2% соответственно ( $p < 0,01$ ), т. е. вирус передавался как самцами, так и самками насекомых, выживших после инфицирования. Показано, что при инфицировании насекомых сублетальными дозами локализация и репликация вируса происходят в гонадах насекомых [6], поэтому передача вируса может осуществляться особями обоего пола.

Вопрос о том, в каком виде происходит вертикальная передача вируса у насекомых, является дискуссионным. Обсуждается возможность интеграции вируса в геном хозяина [14], передача в виде открытой вирусной инфекции [3, 15], а также в латентной форме [16–18].

Результаты ПЦР показали, что уровень вирусоносительства у эмбрионов, выделенных из яиц родительского поколения, составил 42±9%. Вероятно, этот уровень является фоновым для исследуемой популяции, поскольку у ряда видов насекомых, собранных в природных условиях, отмечено наличие скрытого вируса. В частности, применение ПЦР показало, что латентный вирус обнаруживался в популяциях зимней пяденицы *Operophtera brumata* в США на уровне 28% [19], а в различных популяциях капустной совки *Mamestra brassicae* на территории Англии – в пределах 50–100% [16].

У эмбрионов, полученных от выживших после заражения насекомых, уровень вирусоносительства снижался от 78±9% в поколении F<sub>1</sub> до 8±1% в поколении F<sub>5</sub> (см. таблицу). На рисунке представлена электрофореграмма продуктов ПЦР ДНК из эмбрионов поколения F<sub>4</sub>, полученных от выживших после заражения ВЯП насекомых. Из анализа электрофореграммы следует, что в данном случае 3 пробы из 13 оказались положительными на вирус.

По-видимому, снижение уровня вирусоносительства в ряду генераций потомков выживших после заражения насекомых отчасти вызвано элиминацией особей, погиб-



Электрофорез продуктов ПЦР гена LD 130 ВЯП непарного шелкопряда из эмбрионов (поколение F<sub>4</sub>), полученных из яиц насекомых, выживших после заражения вирусом в фазе гусеницы IV возраста.

1, 3, 9 – положительные на ВЯП пробы; 2, 4–8, 10–13 – отрицательные на ВЯП пробы; 14 – положительный контроль; 15 – отрицательный контроль; 16 – маркер O'GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder ("FERMENTAS", США).

ших от полиэдроза. Кроме того, возможно, что репликация вируса подавляется механизмами преодоления вирусной инфекции в организме насекомого-хозяина. Во всех случаях, когда отмечалось вирусоносительство, его уровень превышал количество погибших насекомых от ВЯП, т. е. присутствие вируса у насекомых не означает неизбежной гибели хозяев. Вероятно, вирусная ДНК может частично (или полностью) утратить свою инфекционность, хотя и выявляться в образцах насекомых. Однако в течение трех генераций насекомого вирус может находиться в организме хозяина, сохраняя при этом способность к литическому циклу развития.

### Заключение

Таким образом, в работе впервые в прямом эксперименте удалось продемонстрировать, что вирусная инфекция может не только развиваться у насекомых, выживших в результате воздействия бакуловируса, но также вызывать гибель определенной части особей в результате вертикальной передачи вируса в течение трех генераций. Передача вируса дочернему поколению происходит как самцами, так и самками насекомых, выживших после инфекции, а уровень вирусоносительства у насекомых-хозяев при вертикальной передаче ВЯП выше, чем смертность от полиэдроза. По-видимому, вирусная ДНК может частично (или полностью) утратить свою инфекционность, хотя и выявляться в образцах анализируемых насекомых.

**Финансирование.** Исследование было поддержано грантом РФФИ (проект № 14-04-00615а).

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

### ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Ilyinykh A. Analysis of the causes of declines in Western Siberian outbreaks of the nun moth *Lymantria monacha*. *BioControl*. 2011; 56: 123–31.
2. Opoku-Debrah J.K., Hill M.P., Knox C.B., Moore S.D. Overcrowding of false codling moth, *Thaumatotibia leucotreta* (Meyrick) leads to the isolation of five new *Cryptophlebia leucotreta* granulovirus (CrLeGV-SA) isolates. *J. Invertebr. Pathol.* 2013; 112: 219–28.
3. Kukan B. Vertical transmission of nucleopolyhedrovirus in insects. *J. Invertebr. Pathol.* 1999; 74: 103–11.
4. Khurad A.M., Mahulikar A., Rathod M.K., Rai M.M., Kanginakudru S., Nagaraju J. Vertical transmission of nucleopolyhedrovirus in the silkworm, *Bombyx mori* L. *J. Invertebr. Pathol.* 2004; 87: 8–15.
5. Kouassi L.N.G., Tsudo K., Goto C., Mukarava S., Sakamari S., Kusigemati K. et al. Prevalence of latent virus in *Spodoptera litura* (Fabricius) (Lepidoptera: Noctuidae) and its activation by heterologous virus. *Appl. Entomol. Zool.* 2009; 44 (1): 95–102.
6. Vitro C., Zarat C., Lopes-Ferber M., Murillo R., Williams T. Gender-mediated differences in vertical transmission of a nucleopolyhedrovirus. *Plos One*. 2013; 8 (8): 1–5.
7. Burden J.P., Griffiths C.M., Cory J.S., Smith P., Sait S.M. Vertical transmission of sublethal granulovirus infection in the Indian meal moth, *Plodia interpunctella*. *Mol. Ecol.* 2002; 11 (3): 547–55.
8. Cabodevilla O., Villar E., Virto C., Murillo R., Williams T., Caballero P. Intra- and intergenerational persistence of an insect nucleopolyhedrovirus: adverse effects of sublethal disease on host development, reproduction, and susceptibility to superinfection. *Appl. Environ. Microbiol.* 2011; 77 (9): 2954–60.
9. Ilyinykh A.V., Shternshis M.V., Kuzminov S.V. Exploration into a mechanism of transgenerational transmission of nucleopolyhedrovirus in *Lymantria dispar* L. in Western Siberia. *BioControl*. 2004; 49 (4): 441–54.
10. Kuzio J., Pearson M.N., Harwood S.H., Funk C.J., Evans J.T., Slavicek J.M. et al. Sequence and analysis of the genome of a baculovirus pathogenic for *Lymantria dispar*. *Virology*. 1999; 253 (1): 17–34.
11. Murray K.D., Elkinton J.S. Environmental contamination of egg masses as a major component of transgenerational transmission of gypsy moth nuclear polyhedrosis virus (LdMNPV). *J. Invertebr. Pathol.* 1989; 53: 324–34.
12. Shapiro M., Robertson J.L. Yield and activity of gypsy moth (Lepidoptera: Lymantriidae) nucleopolyhedrosis virus recovered from survivors of viral challenge. *J. Econ. Entomol.* 1987; 80: 901–5.
13. Myers J., Malakar H.R., Cory J.S. Sublethal nucleopolyhedrovirus infection effects on female pupal weight, egg mass size, and vertical transmission in gypsy moth (Lepidoptera: Lymantriidae). *Environ. Entomol.* 2000; 29: 1268–72.
14. Yamao M., Katayama N., Nakazawa H., Yamakawa M., Hayashi Y., Hara S. et al. Gene targeting in the silkworm by use of a baculovirus. *Genes Dev.* 1999; 13 (5): 511–6.
15. Cooper D., Cory J.S., Theilmann D.A., Myers J.H. Nucleopolyhedroviruses of forest and western tent caterpillars: cross-infectivity and evidence for activation of latent virus in high-density field populations. *Ecol. Entomol.* 2003; 28: 41–50.
16. Burden J.P., Nixon C.P., Hodgkinson A.E., Rossee R.D., Sait S.M., King L.A. et al. Covert infections as a mechanism for long-term persistence of baculoviruses. *Ecol. Lett.* 2003; 6: 524–31.
17. Murillo R., Hussey M.S., Possee R.D. Evidence for covert baculovirus infections in a *Spodoptera exigua* laboratory culture. *J. Gen. Virol.* 2011; 92: 1061–70.
18. Vilaplana L., Wilson K., Redman E.M., Cory J.S. Pathogen persistence in migratory insects: high levels of vertically-transmitted virus infection in field populations of the African armyworm. *Evol. Ecol.* 2010; 24: 147–60.
19. Burand J.P., Kim W., Welch A., Elkinton J.S. Identification of a nucleopolyhedrovirus in winter moth populations from Massachusetts. *J. Invertebr. Pathol.* 2011; 108: 217–9.

Поступила 26.09.14

Принята в печать 20.11.14