

ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ ГУСЕНИЦ НЕПАРНОГО ШЕЛКОПРЯДА (*LYMANTRIA DISPAR* L.) ИЗ РАЗЛИЧНЫХ ГЕОГРАФИЧЕСКИХ ПОПУЛЯЦИЙ К ВИРУСУ ЯДЕРНОГО ПОЛИЭДРОЗА

Ильиных А.В., Куреничиков Д.К., Ильиных Ф.А., Имранова Е.Л., Поленогова О.В.

Исследована чувствительность гусениц непарного шелкопряда из различных географических популяций к вирусу ядерного полиэдроза. С помощью метода ПЦР определен уровень скрытого вирусоносительства в популяциях филофага. Показано, что насекомые из хабаровской популяции значительно чувствительнее к вирусу, чем насекомые из новосибирской популяции. Установлено, что высокая чувствительность насекомых к вирусу связана с высоким уровнем вирусоносительства.

ВВЕДЕНИЕ

Непарного шелкопряда относят к наиболее значимым (в биологическом и экономическом аспектах) видам дендрофильных насекомых. Этот филофаг в различных частях своего обширного ареала периодически образует вспышки массового размножения, в том числе на территории Горного Алтая. В результате сплошной дефолиации насаждений непарным шелкопрядом может происходить их массовое усыхание, иногда на площадях, исчисляемых миллионами гектаров [1]. В свою очередь, одним из ведущих факторов динамики численности непарного шелкопряда может являться полиэдроз, вызываемый бакуловирусом. На основе вируса ядерного полиэдроза (ВЯП) созданы и совершенствуются препараты, которые находят применение в качестве агентов биологического контроля, как в России, так и за рубежом.

Для целого ряда географических изолятов бакуловирусов, выделенных из природных популяций (в том числе и непарного шелкопряда), показаны различия в их биологической активности для насекомых-хозяев. Вероятно, эти различия отчасти объясняются гетерогенностью генотипического состава вирусов [2]. Однако чувствительность насекомых из различных географических популяций к ВЯП является практически неисследованным вопросом. В то же время показано, что в популяциях насекомых распространено скрытое вирусоносительство [3], которое, возможно, оказывает влияние на чувствительность насекомых к экзогенному инфицированию вирусом.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для определения чувствительности к ВЯП использовали насекомых хабаровской и новосибирской географических популяций непарного шелкопряда. Сбор яиц непарного шелкопряда осуществляли в очагах массового размножения на территориях Новосибирской области и Хабаровского края. В обоих случаях популяции насекомых находились на пике численности.

Подготовку яиц и культивирование гусениц выполняли по методике, описанной ранее [4]. Во время эксперимента гусениц содержали на букетах листьев дуба монгольского *Quercus mongolica* (для хабаровской популяции) и березы *Betula pendula* (для новосибирской популяции). Инфицирование проводили во время второго возраста гусениц. Учет погибших от вироза насекомых начинали на шестые сутки эксперимента и выполняли каждые двое или трое суток. Причину гибели насекомых диагностировали с помощью светового микроскопа. Эксперименты продолжали до окукливания гусениц.

Для определения чувствительности гусениц к ВЯП применяли 2 штамма: “Алтайский” и “Новосибирский” из коллекции ИСиЭЖ СО РАН. Биологическую активность штаммов оценивали в четырех вариантах инфекционных нагрузок (ИН): 2×10^8 , 2×10^7 , 2×10^6 , 2×10^5 полиэдров/мл (п/мл). Титр вирусных суспензий определяли с помощью камеры Горяева. Каждый вариант испытаний выполняли в пяти повторностях и сопровождали контрольной группой насекомых. При оценке биологической активности штаммов ВЯП использовали следующие показатели: LC_{50} – концентрация вируса, при которой во время эксперимента гибнет половина насекомых; LT_{50} – время гибели половины насекомых. Величину LC_{50} определяли пробит-анализом с помощью компьютерной программы TSK. Для оценки достоверности различий выборочных средних применяли критерий Фишера.

Диагностику скрытого вируса у насекомых осуществляли с помощью метода ПЦР. Суммарную ДНК из образцов выделяли с помощью комплекта реагентов для выделения ДНК (“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 полногеномной последовательности ВЯП непарного шелкопряда, задепонированной в базе данных GenBank под номером NC_001973.

ПЦР проводили на амплификаторе “DNA Engine Dyad® Peltier Thermal Cycler” (“BIO-RAD”, США) в режиме: денатурация 30 сек. – 94 °С, отжиг 30 сек. – 68 °С и синтез 30 сек. – 72 °С – 37 циклов; синтез 7 мин. – 72 °С. Размер амплифицируемого фрагмента составлял 294 пн.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Начало гибели гусениц хабаровской популяции отмечено в большинстве случаев на седьмые-восьмые сутки с момента заражения, в то время как первая гибель гусениц новосибирской популяции при высоких концентрациях вируса (2×10^8 , 2×10^7 п/мл) отмечена на шестые, а при ИН = 2×10^6 , 2×10^5 п/мл – на десятые-тринадцатые сутки. Таким образом, значительные различия по этому показателю у гусениц хабаровской и новосибирской популяций наблюдались при высокой ИН. Суммарная смертность насекомых от вироза в экспериментах варьировала от 19% до 100%, в соответствии с концентрацией вируса, который применялся для инфицирования гусениц.

При заражении гусениц хабаровской и новосибирской популяций величины LT_{50} при высоких концентрациях вируса для обоих штаммов составляли от 9 до 11 дней и от 13 до 31 дней соответственно ($P < 0,01$). При более низких ИН = 2×10^6 , 2×10^5 п/мл величина LT_{50} при инфицировании гусениц хабаровской популяции штаммом “Алтайский” составляет 14-21 день, в большинстве других случаев смертность насекомых не достигала 50%.

Определение LC_{50} выявило, что этот показатель при заражении штаммом “Алтайский” гусениц хабаровской популяции на 1,5 порядка ниже, чем для новосибирской популяции. Что касается LC_{50} при инфицировании насекомых штаммом “Новосибирский”, то его значение для хабаровской популяции почти на порядок ниже, чем при тестировании гусениц новосибирской популяции ($P < 0,01$). Таким образом, проведенные эксперименты показали, что гусеницы хабаровской географической популяции непарного шелкопряда значительно более чувствительны к ВЯП, чем насекомые новосибирской популяции.

В лабораторных экспериментах для некоторых видов насекомых и их бакуловирусов показано, что чувствительность к ВЯП может снижаться при заражении вирусом ряда последовательных генераций насекомых [5]. То есть, происходит отбор особей с пониженной чувствительностью к вирусу. Если экстраполировать эти данные на полученные нами результаты, то следовало бы ожидать более низкой чувствительности к ВЯП гусениц хабаровской популяции. Дело в том, что в природных популяциях непарного шелкопряда на территории Дальнего Востока и Западной Сибири роль ВЯП в динамике численности насекомого принципиально различается. Если в дальневосточных популяциях ВЯП является одним из ключевых факторов динамики численности [4], то в западносибирской популяции смертность насекомых от вируса не превышает нескольких процентов [6]. Таким образом, различия в чувствительности хабаровской и новосибирской популяций гусениц к вирусу не могут быть объяснены с точки зрения отбора устойчивых к ВЯП особей.

Исследование вирусоносительства с помощью метода ПЦР выявило, что количество особей вирусоносителей в новосибирской и хабаровской популяциях составило соответственно 48% и 91% ($P < 0,01$). Если учесть вышеприведенные данные о различном вкладе ВЯП в популяционную динамику, то результаты, полученные с помощью ПЦР, выглядят вполне логично.

Вероятно, более высокая чувствительность насекомых хабаровской популяции к ВЯП может объясняться значительно большим количеством особей-вирусоносителей, чем среди насекомых новосибирской популяции. По-видимому, при инфицировании гусениц ВЯП происходит синергический эффект, вызванный активацией скрытого вируса. Соответственно, этот эффект проявляется в большей степени у насекомых с более высокими показателями вирусоносительства.

Литература

1. *Marshall E.* The summer of the gypsy moth // *Science*. 1981. Vol. 213. № 4511. P. 991-993.
2. *Cooper D., Cory J.S., Myers J.H.* Hierarchical spatial structure of genetically variable nucleopolyhedrovirus infecting cyclic populations of western tent caterpillars // *Mol. Ecol.* 2003. Vol. 12. P. 881-890.
3. *Burden J.P., Nixon C.P., Hodgkinson A.E., Rossee R.D., Sait S.M., King L.A., Hails R.S.* Covert infections as a mechanism for long-term persistence of baculoviruses // *Ecol. Letters*. 2003. Vol. 6. P. 524-531.
4. *Ильиных А.В., Куренищikov Д.К., Бабурин А.А., Имранова Е.Л.* К причинам затухания вспышек массового размножения непарного шелкопряда (*Lymantria dispar* L.) на территории Дальнего Востока // *Известия СПб ЛТА*. 2009. Вып. 187. - С. 131-139.
5. *Milks M.L., Myers J.H.* The development of larval resistance to a nucleopolyhedrovirus is not accompanied by an increased virulence in virus // *Evolutionary Ecology*. 2001. Vol. 14. P. 645-664.
6. *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. Vol. 49. № 4. P. 441-454.

SENSITIVITY OF THE GYPSY MOTH (LYMANTRIA DISPAR L.) LARVAE FROM DIFFERENT GEOGRAPHICAL POPULATIONS TO NUCLEOPOLYHEDROVIRUS

Ilyinykh A.V., Kurenschikov D.K., Ilyinykh Ph. A., Imranova E.L., Polenogova O.V.

Sensitivity of the gypsy moth larvae from different geographical populations to nucleopolyhedrovirus was explored. The level of occult virus in populations of phyllophagous is determined by means of method PCR. It was shown that insects from khabarovsk population are vastly more sensitive to virus, than insects from novosibirsk population. It was installed that high sensitivity insects to virus is connected with high level of occult virus.