

*На правах рукописи*

ПОЛЕНОВА

Ольга Викторовна

**ВИРУСНОСИТЕЛЬСТВО И ПРОЯВЛЕНИЕ ПОЛИЭДРОЗА У  
НЕПАРНОГО ШЕЛКОПРЯДА (*Lymantria dispar* L.)**

03.02.05. - энтомология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Новосибирск – 2013

Работа выполнена в лаборатории патологии насекомых Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института систематики и экологии животных СО РАН

Научный руководитель: доктор биологических наук Ильиных Александр Васильевич  
Официальные оппоненты: Пономарев Василий Иванович, доктор биологических наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Ботанический сад Уральского отделения Российской академии наук, заведующий лабораторией лесовосстановления, защиты леса и лесопользования  
Колосов Алексей Владимирович, кандидат биологических наук, Федеральное государственное учреждение науки «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, старший научный сотрудник  
Ведущее учреждение: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования Новосибирский государственный аграрный университет

Защита состоится 26 декабря 2013 г. в 10 часов на заседании диссертационного совета Д 003.033.01 при Институте систематики и экологии животных СО РАН

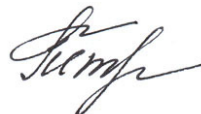
по адресу: 630091, г. Новосибирск, ул. Фрунзе, 11.

Факс: (383) 217-09-73, e-mail: [dis@eco.nsc.ru](mailto:dis@eco.nsc.ru)

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института систематики и экологии животных СО РАН.

Автореферат разослан «26» ноября 2013 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета,  
кандидат биологических наук



Петрожицкая  
Людмила  
Владимировна

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность темы.** Непарный шелкопряд *Lymantria dispar* L., (Lepidoptera: Lymantriidae), является одним из наиболее широко распространенных видов лесных насекомых-фитофагов. По характеру питания вид относится к хвое-листогрызущим полифагам, повреждающим свыше 600 видов растений (Бенкевич, 1984). Для непарного шелкопряда характерны резкие колебания численности в Евразии и Северной Америке (Росс, Росс, 1985; Berryman, 1995; Pyinykh et al., 2004).

В популяциях насекомых-фитофагов и, в частности, непарного шелкопряда, распространены болезни, возбудителями которых могут быть различные микроорганизмы. Одними из наиболее распространенных болезней являются вирозы (Гулий и др., 1981; Kukan, 1999; Cooper et al., 2003a; Katsuma et al., 2012). В настоящее время обнаружено свыше 1000 видов возбудителей вирусных заболеваний членистоногих, из них около четверти приходится на долю насекомых отряда Lepidoptera. Большая часть вирусов насекомых обладают высокой специфичностью по отношению к насекомым-хозяевам. Самыми распространенными для насекомых отряда Lepidoptera являются такие вирусы, как вирус цитоплазматического полиэдроза (Reoviridae), оспы насекомых (Entomoviridae), радужные вирусы (Iridoviridae). Однако большинство исследований вирусного патогенеза посвящено вирусам из семейства Baculoviridae (Young et al., 1990; Kukan, 1999; Burden et al., 2002; Khurad et al., 2004).

Достаточно хорошо известны пути горизонтальной передачи, когда вирус может попадать от больной особи к здоровым через лесную подстилку, поедание останков мертвых насекомых, при контакте с паразитическими насекомыми (Murray, 1992; Ильиных, 1998). Бакуловирусы способны в течение ряда поколений сохраняться в организме насекомых в скрытом состоянии (в виде латентной инфекции), обеспечивая, таким образом вертикальную передачу вируса. И если горизонтальная передача играет значительную роль в возникновении эпизоотий, то при вертикальной передаче вируса может происходить как спорадическая, так и массовая гибель популяции. При этом значительную роль могут играть факторы внешней среды, под влиянием которых может активироваться латентная инфекция в популяциях фитофага. В частности, показана вертикальная передача вируса гранулеза в череде поколений индийской мучной моли (*Plodia interpunctella*) (Burden et al., 2002). Однако

исследований по вертикальной передаче вируса ядерного полиэдроза в череде генераций непарного шелкопряда не проводилось.

Известно, что активация вируса происходит в результате воздействия на насекомых разнообразных факторов: экстремальных температур, снижение количества и/или качества корма, различных патогенов и других. Чаще всего активация латентной вирусной инфекции наблюдается у непарного шелкопряда при массовом размножении фитофага из-за недостатка пищевых ресурсов (Бахвалов, 2001). Остается открытым вопрос может ли недостаток корма индуцировать латентную инфекцию у насекомых из популяций с низким уровнем проявления спонтанного полиэдроза.

В природных популяциях насекомых скрытый вирус регистрируется с помощью метода ПЦР уже более пятнадцати лет (Eastwell et al., 1999; Burden et al., 2003), в том числе скрытые бакуловирусные инфекции отмечали в популяциях непарного шелкопряда на различных территориях (Бахвалов и др., 2012; Пулюкх et al., 2005). Кроме того, было установлено изменение уровня скрытого вирусносительства в зависимости от популяционной фазы непарного шелкопряда (Бахвалов и др., 2010). Однако все эти исследования проводились в местах, где постоянно отмечались вспышки массового размножения непарного шелкопряда и вполне закономерно предположить, что вирус мог сохраняться как в природных условиях, так и в организме насекомых. Остается открытым вопрос, может ли присутствовать вирус в латентном виде в популяциях непарного шелкопряда, где вспышки массового размножения никогда не регистрировались, а популяции разрежены. Кроме того, практически не изучен вопрос, в течение какого числа генераций вирус может передаваться вертикально и активироваться в дочерних поколениях. Также остается неизвестно, может ли различаться чувствительность гусениц к вирусу ядерного полиэдроза у насекомых из различных географических популяций с различным уровнем вирусносительства, в связи с вышеизложенным были поставлены следующие цель и задачи исследования.

**Цель исследования** – изучить вертикальную передачу вируса ядерного полиэдроза у непарного шелкопряда при высокой и низкой смертности насекомых родительского поколения.

### **Задачи исследования:**

1. Изучить вирусоносительство в природных популяциях непарного шелкопряда, где вспышки массового размножения не отмечались
2. Определить чувствительность к вирусу ядерного полиэдроза гусениц непарного шелкопряда из популяций с различным уровнем вирусоносительства
3. Исследовать вертикальную передачу вируса ядерного полиэдроза в череде поколений непарного шелкопряда при инфицировании гусениц родительского поколения высокой и низкой дозами вируса

**Научная новизна работы.** Впервые установлено, что в популяциях, где вспышки массового размножения не отмечались, присутствует скрытый вирус.

Показано, что чувствительность гусениц непарного шелкопряда из популяций с большим числом особей-вирусоносителей имеет большую чувствительность к вирусу ядерного полиэдроза.

Впервые показано, что при высокой дозе экзогенного инфицирования бакуловирусом родительского поколения непарного шелкопряда (смертность свыше 60%) вирус способен передаваться вертикально в скрытой форме на протяжении минимум шести поколений. Способность к активации скрытой инфекции сохраняется на протяжении трех последующих поколений.

Низкая доза инфицирования (смертность родительского поколения около 10%) также способствует формированию скрытой вирусной инфекции, которая может быть активирована на протяжении трех последующих поколений.

**Практическая значимость.** Полученные нами данные могут быть использованы при разработке программ интегрированных методов биологического контроля лесных насекомых-филлофагов, дающих вспышки массового размножения. Так, эффект от применения вируса ядерного полиэдроза может проявляться в течение трех последующих поколений непарного шелкопряда, а скрытый вирус способен сохраняться как минимум в течение шести поколений. Кроме того, инфицирование насекомых экзогенным вирусом активировал собственный скрытый вирус хозяина, что увеличивает количество погибших от полиэдроза насекомых. Этот

эффект может проявляться в большей степени среди насекомых с более высокой распространенностью латентного вируса.

**Личный вклад автора.** Участие в постановке задач, анализ литературных данных, проведение экспериментов, статистическая обработка полученных материалов.

**Апробация работы и публикации результатов исследований.** Результаты работы докладывались на международных и российских конференциях: II международная конференция «Биоразнообразие. Проблемы экологии Горного Алтая и сопредельных регионов: настоящее, прошлое, будущее» (Горно-Алтайск, 2010); Всероссийская конференция с международным участием и V ежегодные чтения памяти О.А. Катаева «Болезни и вредители в лесах России: век XXI» (Екатеринбург, 2011); «I международный биологический конгресс Кыргызстана» (Бишкек, Кыргызстан, 2012). **Публикации.** По результатам исследований опубликовано 8 научных работ, в том числе 3 статьи в изданиях, рекомендованных ВАК для публикации основных научных результатов диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук.

**Структура и объем диссертации.** Диссертация состоит из введения, 3 глав, заключения и выводов, изложена на 101 странице, содержит 6 таблиц, 9 рисунков. Список литературы включает 230 источников, из них 149 зарубежных авторов.

**Благодарности.** Автор выражает благодарность научному руководителю д.б.н. А.В.Ильиных (ИСиЭЖ СО РАН) за участие и всестороннюю поддержку, неоценимую помощь на всех этапах исследования; к.б.н. В.В. Мартемьянову за ценные замечания, сделанные при работе с рукописью; д.б.н., профессору В.В. Глупову и д.б.н. С.А. Бахвалову за помощь при обсуждении результатов и ценные критические замечания при подготовке диссертации; к.б.н. И.Д. Петровой и Ф.А. Ильиных за помощь в проведении ПЦР анализа; студентам НГАУ: Т. Пастуховой, Р. Мажара за помощь в проведении экспериментальных исследований.

## СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

**Глава 1. Обзор литературы.** В главе рассмотрена биология, экология и распространение непарного шелкопряда, дана характеристика вирусов, симптомы, патогенез, резистентность насекомых к вирусной инфекции, а также способы передачи и сохранения вирусной инфекции. Особое внимание уделено вертикальной передаче вируса ядерного полиэдроза, его проявлению в виде спонтанного или индуцированного полиэдроза, уровню скрытого вирусоносительства в природных популяциях и чувствительности непарного шелкопряда к вирусу.

**Глава 2. Методы исследования.** В работе использовали яйцекладки непарного шелкопряда, собранные в природных условиях на территориях Свердловской области (Свердловский район) (гл. 3.1. и 3.4.), Хабаровского края (Хабаровский район) (гл. 3.1. и 3.2.), Новосибирской области (Карасукский (гл. 3.1., 3.3, 3.4.), Краснозерский (гл. 3.1.), Тогучинский районы (гл. 3.1.). Для заражения насекомых вирусом использовали штаммы из музея энтомопатогенных вирусов ИСиЭЖ СО РАН, которые были выделены из природных популяций непарного шелкопряда во время вспышек массового размножения: «Алтайский» (Онгудайский р-н, 2005 (гл. 3.3.) и 2008 (гл. 3.2.) гг.), «Новосибирский» (Краснозерский р-н, 2008г.) (гл. 3.2.), «Джалал-Абадский» (Южный Кыргызстан, 2003 г.) (гл. 3.4.). В работе использовали методы культивирования насекомых на естественном и искусственном корме (Ильиных, 1996, 1997) (гл. 3.1.), а также методы дозированного заражения гусениц вирусом (гл. 3.2., 3.3., 3.4.). Суспензию вируса наносили на корм путем мелкодисперсного опрыскивания. В контроле корм обрабатывали дистиллированной водой. Для диагностики причин гибели насекомых применяли метод световой микроскопии. Часть яйцекладок контрольных и экспериментальных групп насекомых каждой генерации использовали для детекции скрытого вируса с помощью метода ПЦР (Ильиных и др., 2012). Для ПЦР использовали яйцекладки непарного шелкопряда, предварительно отбитые от грены. Поверхность яйцекладок стерилизовали в 0,25% растворе NaOH и 6% растворе H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, время экспозиции 10 минут в каждом случае. Другую часть яйцекладок, поверхность которых также

стерилизовали в течение 10 минут в 0,25% растворе NaOH, использовали для культивирования насекомых.

При изучении скрытого вирусоносительства в популяциях непарного шелкопряда (гл. 3.1.) использовали яйцекладки из 5 популяций непарного шелкопряда, которые находились на различных фазах градации численности. Эмбрионы из данных популяций диагностировали на наличие скрытой вирусной инфекции. При культивировании регистрировали гибель гусениц от спонтанного полиэдроза.

Для изучения чувствительности к ВЯП гусениц непарного шелкопряда использовали насекомых из двух географических популяций, находящихся на пике численности (гл. 3.2.). Для заражения гусениц применяли два штамма ВЯП-НШ: «Новосибирский» и «Алтайский» в концентрациях:  $2 \times 10^8$ ,  $2 \times 10^7$ ,  $2 \times 10^6$ ,  $2 \times 10^5$  полиэдров/мл. Насекомых культивировали на естественном корме, личинок Хабаровской популяции на ветвях дуба монгольского (*Quercus mongolica*), а личинок Новосибирской популяции на побегах березы повислой (*Betula pendula*).

При моделировании вертикальной передачи ВЯП гусениц родительского поколения заражали высокими ( $10^7$  полиэдров/мл) (гл. 3.3.) и низкими ( $5 \times 10^6$  полиэдров/мл) (гл. 3.4.) дозами ВЯП. У потомков выживших после заражения насекомых в череде поколений определяли уровень скрытого вирусоносительства и смертность от спонтанного (гл. 3.3.) и/или индуцированного (гл. 3.4.) полиэдроза. Для активации скрытой вирусной инфекции (гл. 3.4.) насекомых дочерних поколений контрольной и экспериментальной групп содержали при недостатке корма (50 % диеты по сравнению с контролем).

Полученные данные обрабатывали статистически, рассчитывая среднее арифметическое и его ошибку (SE). Статистическую значимость различий изучаемых параметров определяли с помощью t-критерия Стьюдента, а также использовали непараметрический критерий Манна-Уитни. Величины  $LC_{50}$  были оценены с помощью программы SPEARMAN.



## Глава 3. Результаты и обсуждение

### 3.1. Исследование уровня вирусоносительства в популяциях непарного шелкопряда на различных фазах динамики численности

Известно, что в популяциях непарного шелкопряда постоянно происходят вспышки массового размножения. Однако существуют популяции, где вспышки массового размножения никогда не отмечались. Известно и то, что в различные фазы динамики численности насекомые имеют различный уровень скрытого вирусоносительства.

Сбор яйцекладок непарного шелкопряда производили в различных популяциях, в том числе и с территорий, где вспышки массового размножения никогда не отмечались. Насекомые из исследуемых популяций находились на различных фазах динамики численности. В эксперименте мы определяли уровень скрытого вирусоносительства и смертность особей от спонтанного полиэдроза.

Результаты по уровню скрытого вирусоносительства и гибели насекомых от полиэдроза представлены в таблице 1. Диагностика эмбрионов, выделенных из яиц непарного шелкопряда с помощью метода ПЦР, показала, что во всех исследуемых популяциях присутствовал скрытый вирус. Наиболее высокий уровень скрытого вирусоносительства – 91% обнаружен у насекомых из Хабаровской популяции (фаза кризиса), минимальный уровень (28,3%) отмечен у насекомых, собранных на территории Тогучинского района Новосибирской области, где вспышки массового размножения непарного шелкопряда не отмечались.

В Свердловской, Краснозерской и Карасукской популяциях непарного шелкопряда уровень латентной инфекции колебался в пределах 42% - 56%. При культивировании насекомых в лабораторных условиях гибель от спонтанного полиэдроза обнаружена у особей Хабаровской и Свердловской популяций. У насекомых Краснозерской и Карасукской популяций смертности от полиэдроза не было выявлено. Возможно, отличия в уровнях вирусоносительства и частоте проявления спонтанного полиэдроза у насекомых вызваны тем, что исследуемые популяции находились на различных фазах динамики численности.

Таблица 1. Вирусоносительство и смертность от полиэдроза у непарного шелкопряда из различных природных популяций

Название популяции, географическое положение	Фаза градации численности	Количество насекомых-вирусоносителей, результат ПЦР, %	Гибель насекомых от ВЯП в лабораторных условиях, %
Свердловская (Свердловская обл., Каменский р-н)	Пик численности (2006)	46 В*	5,6 b*
	Фаза кризиса (2009)	56 В	3,8 b
Хабаровская (Хабаровский край, Хабаровский р-н)	Фаза кризиса (2006)	91 А	5 b
Краснозерская (Новосибирская обл., Краснозерский р-н)	Депрессия численности (2011)	48 В	0 а
Карасукская (Новосибирская обл., Карасукский р-н)	Нарастание численности (2006)	42 В	0а
Тогучинская (Новосибирская обл., Тогучинский р-н)	Вспышки массового размножения не отмечались (2011)	28,3 С	0а

\*Примечание: буквами обозначена достоверность различий выборочных средних по U-критерию Манна-Уитни

Таким образом, в исследованных популяциях непарного шелкопряда постоянно присутствует определенная часть особей-вирусоносителей – даже у насекомых, обитающих на территориях, где вспышки массового размножения не отмечались.

### 3.2. Изучение чувствительности к вирусу ядерного полиэдроза гусениц непарного шелкопряда из популяций с различным уровнем вирусоносительства

Ранее рядом исследователей (Shapiro et al., 1987) были исследованы штаммы ВЯП из различных популяций непарного шелкопряда. Было установлено, что для штаммов характерна различная вирулентность по отношению к насекомому-хозяину. Вероятно, данные различия по вирулентности могут быть объяснены разнородностью генотипического состава вирусов. Также было показано, что присутствие скрытого вируса (Burden et al., 2003; Pinykh et al., 2005; Kouassi et al., 2009), может влиять на чувствительность насекомых к экзогенному инфицированию. Однако исследований по изучению зависимости уровня скрытого вирусоносительства у непарного шелкопряда и его чувствительности к экзогенному вирусу не проводились.

Для определения уровня скрытого вирусоносительства яйцекладки непарного шелкопряда подвергали детекции с помощью метода ПЦР. Так, результат электрофореза продуктов ПЦР ДНК из эмбрионов Хабаровской популяции выявил, что 10 из 12 проб в данном случае оказались положительными на вирус (рис.1). У насекомых из Хабаровской и Новосибирской популяций (которых использовали для определения чувствительности к ВЯП) уровень скрытого вирусоносительства составил  $91\pm 7\%$  и  $48\pm 5\%$  соответственно (табл.2).

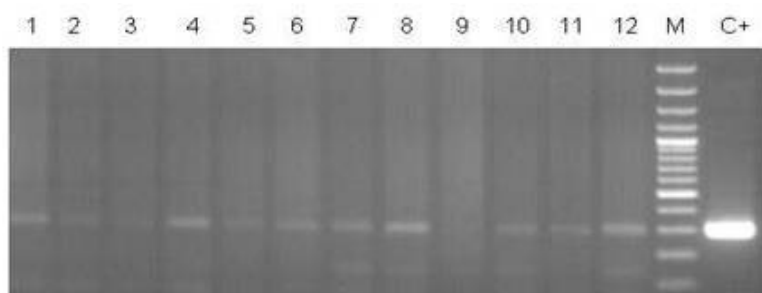


Рис. 1. Электрофореграмма продуктов ПЦР гена LD 130 ВЯП непарного шелкопряда Хабаровской популяции: 1-8, 10-12 – положительные пробы на ВЯП; 9 – отрицательная проба на ВЯП; М – маркер (фаг  $\lambda$ ); С+ – положительный контроль.

Исследования чувствительности непарного шелкопряда из различных географических зон к вирусу были проведены на Хабаровской и Новосибирской популяциях, результаты представлены в таблице 2.

Таблица 2. Чувствительность гусениц непарного шелкопряда из природных популяций к ВЯП

Популяция непарного шелкопряда	Уровень скрытого вирусоносительства, %	Штамм ВЯП	LgLC50
Хабаровская	91 ± 7	Алтайский	4.20 (3.61 - 4.83)*
		Новосибирский	5.77 (5.38 - 6.15)
Новосибирская	48 ± 5	Алтайский	5.80 (5.41 - 6.23)
		Новосибирский	6.58 (6.32 - 6.94)

Примечание: \* - (P≤0,01)

Уровень смертности насекомых от ВЯП в экспериментах варьировал от 19% до 100% в соответствии с концентрацией вируса, которую использовали для инфицирования личинок. Гибель интактных насекомых не отмечалась.

Определение I<sub>g</sub> LC<sub>50</sub> при инфицировании личинок ВЯП штаммом «Алтайский» показало, что этот показатель для Хабаровской популяции был примерно в 15 раз ниже, чем для Новосибирской популяции (табл. 2).

Значение I<sub>g</sub> LC<sub>50</sub> у насекомых, зараженных штаммом «Новосибирский», было приблизительно в 8 раз ниже для Хабаровской популяции по сравнению с гусеницами Новосибирской популяции (табл. 2).

Не исключено, что при заражении экзогенным вирусом происходит активация латентного вируса. Возможно, именно этим и можно объяснить большую гибель от полиэдроза насекомых Хабаровской популяции по сравнению с Новосибирской.

По-видимому, имеет место синергетический эффект, который происходит при заражении гусениц ВЯП, что может вызвать активацию латентного вируса. Этот эффект проявляется в большей степени среди насекомых с более высокой распространенностью латентного вируса.

### 3.3. Исследование вертикальной передачи вируса ядерного полиэдроза в череде генераций непарного шелкопряда при инфицировании гусениц родительского поколения высокими дозами вируса

В данном эксперименте мы исходили из ситуации, которая может наблюдаться в природных условиях, когда вирус способен играть значительную роль в популяционной динамике насекомого. Эксперимент проводили на гусеницах Новосибирской популяции, находящейся на пике численности. Уровень скрытого вирусоносительства в родительском поколении составил 42%. При моделировании эпизоотического процесса мы использовали для заражения концентрацию вируса, способную вызвать смертность более 60%. От выживших после заражения насекомых получили потомство. В дочерних генерациях насекомых фиксировали уровень скрытого вирусоносительства и смертность насекомых от спонтанного полиэдроза.

Данные по уровню вирусоносительства насекомых дочерних поколений представлены в таблице 3. Из таблицы видно, что уровень вирусоносительства у эмбрионов контрольной группы насекомых снижался от 42 % в поколении F<sub>1</sub> до 8 % в поколении F<sub>6</sub>, при этом смертность от спонтанного полиэдроза во всех случаях была во много раз ниже, чем уровень скрытого вирусоносительства (табл. 3 и 4). У насекомых, выживших после заражения родительского поколения, наблюдалось снижение уровня скрытой инфекции от 78 % в поколении F<sub>1</sub> до 10,4% в поколении F<sub>6</sub>, этот показатель также превышал значения гибели насекомых от спонтанного полиэдроза.

Таблица 3. Уровень скрытого вирусоносительства в череде генераций непарного шелкопряда

Зараженность особей, %	Поколение					
	F1	F2	F3	F4	F5	F6
Контроль	42 ± 4 A*	34 ± 7 <sup>A</sup>	24 ± 5 <sup>B</sup>	-	10 ± 2 <sup>C</sup>	8 ± 1 <sup>C</sup>
Зараженные	78 ± 9 <sup>A</sup>	46 ± 7 <sup>B</sup>	32 ± 5 <sup>B</sup>	11 ± 2 <sup>C</sup>	8 ± 1 <sup>C</sup>	10,4 ± 1 <sup>C</sup>

**Примечание:** \* буквами обозначена достоверность различий выборочных средних по U-критерию Манна-Уитни

Таблица 4. Смертность особей непарного шелкопряда от спонтанного полиэдроза в череде генераций

Смертность, %	Поколение					
	F1	F2	F3	F4	F5	F6
Контроль	0,3 ± 0,01 <sup>A*</sup>	1,5 ± 0 <sup>A</sup>	0	0	0	0
Зараженные	14 ± 1 <sup>A</sup>	10 ± 0,5 <sup>A</sup>	5 ± 0 <sup>A</sup>	0	0	0

**Примечание:** \* буквами обозначена достоверность различий выборочных средних по U-критерию Манна-Уитни

Максимальная смертность насекомых от ВЯП у выживших после заражения наблюдалась в поколении F<sub>1</sub> (табл.4).

В контрольной группе насекомых гибель особей от полиэдроза составляла менее 1,5 % в двух первых дочерних поколениях и отсутствовала в последующих генерациях (табл. 4).

Таким образом, нам впервые в прямом эксперименте удалось показать, что вирусная инфекция может не только активироваться у насекомых, выживших в результате воздействия бакуловируса, но также вызывать смертность особей-вирусоносителей на протяжении трех генераций. Возможно, именно экзогенное инфицирование служит источником скрытого вируса у выживших насекомых.

### **3.3.2. Вертикальная передача и активация латентной вирусной инфекции у непарного шелкопряда в череде генераций при заражении гусениц родительского поколения низкой дозой вируса**

В эксперименте при моделировании вертикальной передачи ВЯП мы исходили из ситуации, которая наблюдается в природных популяциях непарного шелкопряда на территории Западной Сибири, где полиэдроз, как правило, проявляется у небольшой части насекомых, не превышающей нескольких процентов (Ильиных, Петрова, 2008; Колтунов, 2008). Для осуществления поставленной задачи мы использовали насекомых из Свердловской популяции (Свердловская обл.), которая находилась на пике численности. Уровень скрытого вирусоносительства родительского поколения составил 46 ± 4%. Для заражения насекомых был использован ВЯП

штамм “Джалал-Абадский” в концентрации вирусной суспензии  $5 \times 10^6$  полиэдров/мл, которая вызвала смертность особей родительского поколения около 12%. В дочерних поколениях детектировали скрытую вирусную инфекцию (с использованием метода ПЦР), а также отмечали смертность насекомых от индуцированного полиэдроза. В качестве активатора вирусной инфекции у зараженных и контрольных насекомых использовали голодание (50% диеты контрольных особей). Использование индуктора было необходимым, поскольку заражение насекомых производили низкой дозой вируса, и вероятность спонтанной активации в последующих поколениях была невысокой. Воздействовать на гусениц начинали в IV возрасте. Данный фактор (недостаток корма) является естественным активатором скрытой вирусной инфекции, в значительной степени проявляющий себя в природных популяциях непарного шелкопряда во время вспышки массового размножения.

Таблица 5. Вертикальная передача ВЯП в череде поколений непарного шелкопряда в череде поколений при инфицировании насекомых в родительском поколении низкой дозой вируса

Поколения насекомых	Контроль			Индукция вирусной инфекции	
	Вирусоносительство, %	Смертность, %		Вирусоносительство, %	Смертность, % (50% диеты)
		Без воздействия	50% диеты		
F <sub>1</sub>	42 <sup>B*</sup>	0 <sup>a</sup>	1,2 <sup>a</sup>	92 <sup>A</sup>	6,0 ± 1,5 <sup>b</sup>
F <sub>2</sub>	34 <sup>B</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	78 <sup>A</sup>	4,5 ± 0,9 <sup>b</sup>
F <sub>3</sub>	20 <sup>C</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	54 <sup>B</sup>	0,8 <sup>a</sup>

**Примечание:** \* буквами обозначена достоверность различий выборочных средних по U-критерию Манна-Уитни

Результаты ПЦР показали, что у интактных насекомых поколения F<sub>1</sub> уровень скрытого вирусоносительства оставался практически на прежнем уровне (по сравнению с родительским поколением) и снизился почти в два раза к третьей дочерней

генерации до 20 % (контрольная группа насекомых). У эмбрионов полученных от выживших после заражения насекомых низкой дозой вируса, уровень скрытого вирусоносительства в поколении F<sub>1</sub> составил 92% и снизился почти в два раза к третьей дочерней генерации до 54%; различия статистически достоверны по сравнению с контрольными насекомыми.

Гибель насекомых от полиэдроза при частичном голодании наблюдалась в поколениях F<sub>1</sub>, F<sub>2</sub> и F<sub>3</sub>, в первых двух случаях значения смертности достоверно различались (P<0,01) от аналогичного показателя в контрольной группе.

Таким образом, нами показано, что вирусная инфекция может формироваться у потомков выживших насекомых даже при относительно низкой смертности от полиэдроза в родительском поколении, и может быть активирована таким фактором как недостаток корма в течение трех генераций. Уровень вирусоносительства у эмбрионов во всех группах превышал значения гибели насекомых от полиэдроза.

### **Заключение**

В популяциях насекомых-фитофагов довольно широко распространены болезни различной этиологии, в том числе и вирозы. Одним из самых распространенных заболеваний непарного шелкопряда является полиэдроз, вызываемый вирусом, который способен вызывать массовые эпизоотии в популяциях данного насекомого. Вирус способен существовать в организме насекомых в скрытом состоянии (в виде латентной инфекции), а также передаваться горизонтально и вертикально. Вероятно, скрытая вирусная инфекция является основным механизмом персистенции вируса в популяциях насекомых (Kukan, 1999), поскольку ее передача не зависит от плотности или способности патогена выживать во внешних условиях.

Изучение скрытого вирусоносительства в популяциях непарного шелкопряда показало, что во всех исследованных случаях постоянно обнаруживается определенная часть особей-вирусоносителей – даже у насекомых, населяющих территории, где вспышки массового размножения не отмечались. Возможно, отличия в уровнях вирусоносительства и частоте проявления спонтанного



полиэдроза у насекомых вызваны тем, что исследуемые популяции находились на различных фазах динамики численности.

Не исключено, что и при внесении экзогенного вируса происходит активация латентного вируса у насекомых. Так, особи с высоким уровнем вирусоносительства могут быть более чувствительны к воздействию экзогенного вируса. Мы инфицировали двумя штаммами ВЯП насекомых из Новосибирской и Хабаровской популяций, которые, в свою очередь, имели различный уровень вирусоносительства. Результаты показали, что насекомые, имевшие высокий уровень скрытого вирусоносительства, оказались более чувствительны к воздействию экзогенного вируса. По-видимому, имел место синергетический эффект, который происходит при заражении гусениц экзогенным ВЯП, что может вызвать активацию собственного латентного вируса.

Полученные нами результаты свидетельствуют о том, что при заражении насекомых родительского поколения высокой или низкой дозами вируса ядерного полиэдроза гибель особей непарного шелкопряда от спонтанного и/или индуцированного полиэдроза отмечается в первых трех дочерних генерациях и превышает аналогичные показатели, полученные в контроле. Наряду с этим наблюдалось снижение уровня скрытого вирусоносительства примерно в два раза к третьей дочерней генерации, как в контроле, так и в опыте. Эти данные дают основание полагать, что скрытые вирусы формируются в организме выживших после заражения насекомых-хозяев. Известно, что латентная вирусная инфекция может формироваться у насекомых, выживших в результате воздействия бакуловируса. Однако нам впервые удалось показать, что скрытый вирус может вызывать смертность особей-вирусоносителей на протяжении трех дочерних генераций.

При моделировании вертикальной передачи ВЯП заражением низкими дозами вируса мы исходили из ситуации, которая наблюдается в природных популяциях непарного шелкопряда на территории Западной Сибири, где полиэдроз, как правило, проявляется у небольшой части насекомых, не превышающей нескольких процентов. Наши результаты показывают, что при заражении низкими дозами ВЯП вирусная инфекция также может формироваться у потомков выживших насекомых и может быть активирована как минимум, в течение трех генераций насекомого.

Таким образом, полученные результаты наглядно демонстрируют широкое распространение скрытого вирусносительства в популяциях непарного шелкопряда. Однако, присутствие вирусной ДНК в организме хозяина вовсе не означает неизбежной его гибели. Возможно, вирусная ДНК может утратить свою инфекционность, хотя и выявляться в анализируемых образцах насекомых.

### **Выводы**

1. В природных популяциях непарного шелкопряда постоянно присутствует определенная часть особей-вирусносителей – даже у насекомых, где вспышки массового размножения не отмечались.
2. На чувствительность насекомых к экзогенному инфицированию влияет скрытый вирус.
3. При относительно высокой смертности непарного шелкопряда (>60%), вызванной заражением вирусом ядерного полиэдроза гусениц родительского поколения, гибель насекомых в результате вертикальной передачи отмечается в течение трех генераций, а особи-вирусносители выявляются как минимум в шести дочерних генерациях.
4. Вирусная инфекция формируется у потомков непарного шелкопряда даже при низкой смертности от полиэдроза в родительском поколении (<10%) и может быть активирована в течение трех генераций насекомого.
5. Во всех исследованных случаях уровень скрытой вирусной инфекции значительно выше, чем смертность насекомых от вируса ядерного полиэдроза.

**По теме диссертации опубликованы следующие работы:**

1. Ильиных А.В., Поленогова О.В. Демонстрация отдаленного эффекта вертикальной передачи бакуловируса на примере непарного шелкопряда *Lymantria dispar* L. (Lepidoptera, Lymantriidae) // Жур. Общ. Биол. 2012. № 5. С. 46-52.
2. Ильиных А.В., Поленогова О.В. Вертикальная передача бакуловируса у непарного шелкопряда (*Lymantria dispar* L.) при относительно низкой смертности в родительском поколении // Известия Санкт-Петербургской лесотехнической академии. 2012. Вып. 200. С. 23-32.
3. Pyinykh A., Kurenschikov D., Pyinykh Ph., Imranova E., Polenogova O., Baburin A. Sensitivity of gypsy moth *Lymantria dispar* (L., 1758) larvae from geographically removed populations to nucleopolyhedrovirus (Lepidoptera: Erebidae, Lymantriinae) // SHILAP Revta. Lepid. 2013. V. 41(163). P. 349-356.
4. Pyinykh A.V., Polenogova O.V. Formation of natural epizootics effected by nucleopolyhedroviruses in populations of forest phyllophagous insects // Recent developments in research and application of viruses in forest health protection. VNIILM: Puskinovo – Beijing. 2010. P. 51-59.
5. Ильиных А.В., Поленогова О.В. Исследование чувствительности особей дочернего поколения непарного шелкопряда (*Lymantria dispar* L.) к вирусу ядерного полиэдроза // Материалы III межрегиональной научной конференции паразитологов Сибири и Дальнего Востока. Новосибирск. 2009. С. 110-111.
6. Ильиных А.В., Куренщиков Д.К., Ильиных Ф.А., Имранова Е.Л., Поленогова О.В. Чувствительность гусениц непарного шелкопряда (*Lymantria dispar* L.) из различных географических популяций к вирусу ядерного полиэдроза // Материалы II международной конференции. РИО ГАГУ. 2010. С. 190-192.
7. Ильиных А.В., Поленогова О.В., Ульянова Е.Г. Исследование вертикальной передачи вируса ядерного полиэдроза у непарного шелкопряда (*Lymantria dispar* L.) // Материалы всероссийской конференции с международным участием и V ежегодные чтения памяти О.А. Катаева. Болезни и вредители в лесах России: век XXI. Екатеринбург. 2011. С. 154-156.
8. Поленогова О.В., Ильиных А.В. Моделирование скрытой вирусной инфекции у непарного шелкопряда (*Lymantria dispar* L.) // Материалы I биологического конгресса в Кыргызстане. Бишкек. 2012. С. 219-220.