

## ОБНАРУЖЕНИЕ МЕТОДОМ RAPD-PCR ДНК ВИРУСА ЯДЕРНОГО ПОЛИЭДРОЗА НЕПАРНОГО ШЕЛКОПРЯДА В ГУСЕНИЦАХ НЕПАРНОГО ШЕЛКОПРЯДА I-ГО ЛИЧИНОЧНОГО ВОЗРАСТА

Оберемок В.В.

При помощи метода RAPD-PCR и праймера ОРА-08 обнаружена ДНК вируса ядерного полиэдроза непарного шелкопряда в гусеницах непарного шелкопряда I-го личиночного возраста. Наличие вирусной ДНК в гусеницах непарного шелкопряда I-го личиночного возраста свидетельствует о возможности трансвариальной передачи вируса ядерного полиэдроза непарного шелкопряда.

Ключевые слова: вирус ядерного полиэдроза непарного шелкопряда, трансвариальная передача вируса, RAPD-маркеры.

### ВВЕДЕНИЕ

Повреждение лесных насаждений гусеницами непарного шелкопряда (*Lymantria dispar*) на Украине известны со второй половины XIX ст. [1]. Периодические вспышки массового размножения наблюдаются ежегодно в тех или иных частях ареала насекомого [2].

Широкому распространению непарного шелкопряда способствует легкость, с которой он адаптируется к различным экологическим условиям, большая биологическая пластичность, высокая плодовитость, возможность быстрого расселения гусениц I-го личиночного возраста и др. эколого-физиологические особенности [1] (рис. 1). Общеизвестно, что непарный шелкопряд – одно из важнейших звеньев в общей цепи причин массового усыхания дубрав [2].

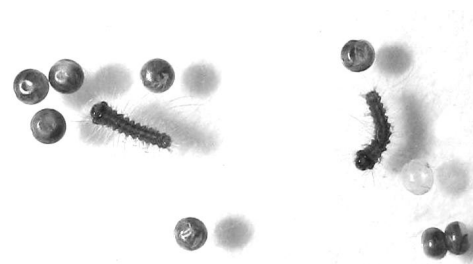


Рис. 1. Яйца непарного шелкопряда и гусеницы I-го личиночного возраста.

Вспышки численности непарного шелкопряда сопровождаются эпизоотиями вируса ядерного полиэдроза непарного шелкопряда (*Lymantria dispar* Nucleopolyhedrovirus), которые снижают численность личинок в популяциях до низких уровней [3]. Вирус ядерного полиэдроза непарного шелкопряда относится к сем. *Baculoviridae*. К этому семейству относится группа вирусов, паразитирующих на артроподах. Они распространены широко во всем мире. Вирусы паразитируют на 600 видах преимущественно из отр. *Lepidoptera* [4] (рис. 2).

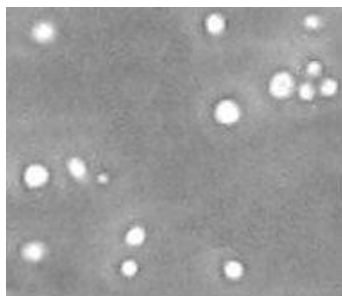


Рис. 2. Полиэдры вируса ядерного полиэдроза непарного шелкопряда (рисунок получен при помощи техники фазового контраста).

Согласно большинству накопленных в настоящее время данных, развитие эпизоотий среди насекомых стимулируется ростом плотности популяции, при котором инфект быстро распространяется. При переходе популяции филофага в фазу депрессии его чувствительность к патогенам снижается, достигая минимума в период нового роста численности [5]. Скрытая инфекция неопределенно долго сохраняется в латентной форме в популяциях хозяина, трансвариально передается из поколения в поколение, не проявляя симптомов болезни. Однако под воздействием стрессоров различной природы латентный вирус может перейти в активную форму и вызвать острый инфекционный процесс. В роли стрессоров могут выступать пессимальные условия температуры и влажности, голод, неблагоприятный корм, скученность, хронические болезни вирусного происхождения [6].

Трансвариальная передача вирусов в природе является одним из основных процессов распространения вирусной инфекции. Тем не менее, наличие трансвариальной передачи вирусов у многих видов насекомых (в том числе вируса ядерного полиэдроза у непарного шелкопряда) является спорным вопросом [7]. Обнаружение и изучение процесса трансвариальной передачи вируса ядерного полиэдроза непарного шелкопряда является актуальной проблемой, так как позволяет находить способы управления этим процессом для повышения эффективности борьбы с насекомым.

Исходя из сказанного выше, целью нашего исследования стало обнаружение возможности трансвариальной передачи вируса ядерного полиэдроза непарного шелкопряда.

#### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для изучения трансвариальной передачи вируса ядерного полиэдроза непарного шелкопряда использовали яйца непарного шелкопряда, собранные в Челябинской обл. (Россия) в 2006 г. Вылупившихся из яиц гусениц сразу заморозили. Для установления наличия ДНК вируса в гусеницах I-го личиночного возраста применили метод RAPD-PCR с использованием праймера ОРА-08.

В качестве маркеров вирусной ДНК использовали продукты амплификации ДНК методом RAPD-PCR с использованием праймера ОРА-08 вирусных полиэдров

препаратов из Киргизии, Китая, России и Украины (рис. 2).

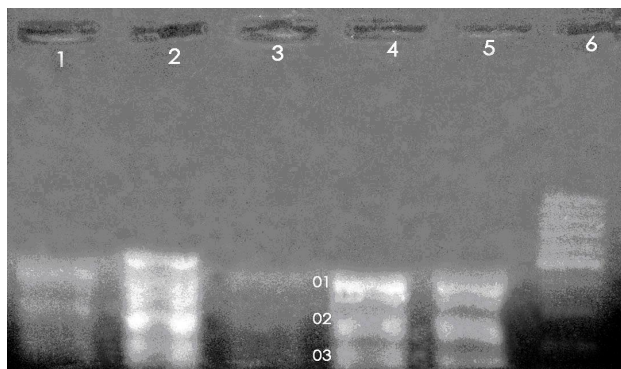


Рис.3. Электрофореграмма продуктов амплификации ДНК вируса ядерного полиэдроза непарного шелкопряда из разных вирусных препаратов: 1 – из Украины, 2 – из Китая (I); 3 – из России; 4 – из Китая (II), 5 – из Киргизии, 6 – маркер молекулярных весов ДНК от 200 до 1000 пар нуклеотидов с шагом в 100 пар нуклеотидов (снизу вверх); 01, 02, 03 – условные зоны продуктов амплификации ДНК вируса ядерного полиэдроза непарного шелкопряда.

RAPD-PCR проводили по следующей методике. Образцы ДНК вируса выделяли из гусениц непарного шелкопряда I-го личиночного возраста. Экстракцию тотальной ДНК проводили согласно стандартной методике [8]. Для RAPD-PCR использовали праймер ОРА-08 – GTGACGTAGG (Operon Technologies, USA).

Амплификацию ДНК проводили в реакционной смеси объемом 29 мкл на термоциклере «Терцик» (ДНК-Технология, Россия) с использованием реактивов для полимеразной цепной реакции «АмплиСенс-200-1» (АмплиСенс, Москва). Реакционная смесь объемом 29 мкл содержала: 5-х PCR-буфер – 5 мкл; MgSO<sub>4</sub>, 50 Мм – 1.5 мкл; H<sub>2</sub>O MilliQ – 3 мкл; dNTP-mix – 2.5 мкл, 2 Мм; T<sub>aq</sub>-полимераза, 5 ед/мкл – 0.5 мкл; минеральное масло - 10.5 мкл; праймер, A<sub>260</sub> 10 ОЕ/мл - 1 мкл; ТЕ-буфер с исследуемой ДНК – 5 мкл. Амплификацию ДНК проводили в течение 45 циклов. Первые 5 циклов шли по схеме: 93 °С – 1 мин, 35 °С – 1 мин, 72 °С – 1 мин. Последующие 40 циклов шли по схеме: 93 °С – 0.5 мин, 35 °С – 0.5 мин, 72 °С – 0.5 мин. Терминальную стадию синтеза проводили при 72 °С – 3 мин.

Продукты амплификации разделяли методом электрофореза в 1,8 %-ном агарозном геле [8] и после окрашивания бромистым этидием анализировали под ультрафиолетом. В качестве маркера использовали DNA-markers М 100 (ИзоГен, Москва) с длиной фрагментов 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 и 1000 пар нуклеотидов.

#### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Методом RAPD-PCR и праймера ОРА-08 было обнаружено, что вирус встречается в гусеницах I-го личиночного возраста с частотой 0.43 (три из семи) (рис. 4). Из рис. 4 видно, что условные зоны продуктов амплификации ДНК вируса ядерного полиэдроза непарного шелкопряда встречаются у особей № 3, 5 и 7.

Полученные результаты свидетельствуют о возможности трансвариальной передачи вируса ядерного полиэдрома непарного шелкопряда.

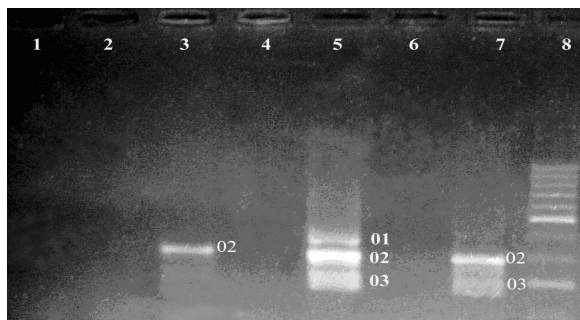


Рис. 4. Электрофореграмма продуктов амплификации ДНК вируса с использованием праймера ОРА-08, где 3, 5, 7 – продукты амплификации ДНК вируса ядерного полиэдрома непарного шелкопряда; 1, 2, 4, 6 – отсутствие продуктов амплификации ДНК; 8-маркер молекулярных весов ДНК от 100 до 1000 п. н. с шагом в 100 п. н. (снизу вверх); 01, 02, 03 – условные зоны продуктов амплификации ДНК вируса ядерного полиэдрома непарного шелкопряда

Попадание вируса к гусеницам могло быть обусловлено также присутствием вируса на поверхности яиц, так как для гусениц непарного шелкопряда характерно питание хорионом яйца во время вылупления и после него. Следует отметить, что вероятность такого попадания вируса на поверхность яйца из материнского организма существенно выше, чем из окружающей среды. Такой способ передачи вируса от матери к потомству (через внешнюю поверхность яйца) также следует отнести к трансвариальному пути.

#### ВЫВОД

У гусениц I-го личиночного возраста методом RAPD-PCR с использованием праймера ОРА-08 была обнаружена вирусная ДНК. Полученные результаты свидетельствуют о возможности трансвариальной передачи вируса ядерного полиэдрома непарного шелкопряда.

#### Список литературы

1. Киреева Н.М. Экология и физиология непарного шелкопряда. – К: «Наукова думка», 1983. – 128 с.
2. Воронцов А.И. Лесная энтомология. – М.: Высшая школа, 1982. – 384 с.
3. Doane C.C. Primary Pathogens and their Role in the Development of an Epizootic in the Gypsy Moth // *J. Invertebr. Pathol.* – 1970. – Vol. 15. – P. 21–33.
4. Herniou E.A., Olszewski J.A., O'Reilly D.R., Cory J.S. Ancient Coevolution of Baculoviruses and Their Insect Hosts // *Journal of Virology.* – 2004. – Vol. 7. – P. 3244–3251.
5. Бахвалов С.А., Башев А.Н., Кнор Н.Б. Динамика популяций шелкопряда монашенки *Lymantria monacha* L. (Lymantriidae: Lepidoptera) и поражающего его бакуловируса в Западной Сибири // *Лесоведение.* – 1998. – № 4. – С. 26–33.
6. Гулий В.В., Рыбина С.Ю. Вирусные болезни насекомых и их диагностика. – Кишинев, 1988. – 187 с.

- 
7. Ильиных А.В., Ульянова В. Г. Латентность бакуловирусов // Известия РАН. Серия биологическая – 2005. – № 5. – С. 599–606.
  8. Sambrook J., Fritisch E.F., Maniatis T. Molecular Cloning: Laboratory Manual. – New York: Cold Spring Harbour Univ. Press. – 1989. – 1626 p.

Оберемок В.В. Виявлення методом RAPD-PCR ДНК вірусу ядерного поліедрозу непарного шовкопряда у гусеницях непарного шовкопряда I-го личиночного віку // Вчені записки Таврійського національного університету ім. В.І. Вернадського. Серія „Біологія, хімія”. – 2008. – Т. 21 (60). – № 2. – С. 97-101.

Методом RAPD-PCR задопомоги праймеру ОРА-08 було виявлено ДНК вірусу ядерного поліедрозу непарного шовкопряда у гусінь непарного шовкопряда I-го личиночного віку. Наявність ДНК вірусу у гусінь непарного шовкопряда I-го личиночного віку свідчить про можливість трансваріальної передачі вірусу ядерного поліедрозу непарного шовкопряда.

Ключові слова: вірус ядерного поліедрозу непарного шовкопряда, трансваріальна передача вірусу, RAPD-маркери.

Oberemok V.V. Detection of DNA of *Lymantria dispar* Nucleopolyhedrovirus at 1<sup>st</sup> instar gypsy moth caterpillars with RAPD-PCR method // Uchenye zapiski Tavricheskogo Natsionalnogo Universiteta im. V. I. Vernadskogo. Series «Biology, chemistry». – 2008. – V.21 (60). – № 2. – P. 97-101.

With the help of RAPD-PCR method and primer OPA-08 DNA of *Lymantria dispar* Nucleopolyhedrovirus was detected. Presence of virus DNA at 1<sup>st</sup> instar gypsy moth caterpillars testifies the possibility of transovarial transmission of *Lymantria dispar* Nucleopolyhedrovirus.

Keywords: *Lymantria dispar* Nucleopolyhedrovirus, transovarial transmission of virus, RAPD-markers.

Пост упила в редакцію 20.03.2008 г.

---