УДК 575.17

ВИКОРИСТАННЯ ГЕНЕТИЧНИХ МАРКЕРІВ У СТРАТЕГІЇ ПРИЙНЯТТЯ РІШЕНЬ З БІОЛОГІЧНОГО КОНТРОЛЮ ЧИСЕЛЬНОСТІ НЕПАРНОГО ШОВКОПРЯДА

В. В. Оберемок

Таврійський національний університет ім. В. І. Вернадського

RAPD-PCR-аналіз та алозимний аналіз створили можливість виявити генетичну відмінність особин непарного шовкопряда, пов'язану із чутливостю комахи до вірусної та бактерійної інфекцій. Використання RAPD-PCR-аналізу із праймером OPA-14 дозволило відшукати генетичні маркери особин непарного шовкопряда, пов'язані із інтенсивністю розвитку вірусної інфекції в організмі хазяїна. RAPD-алелі довжиною приблизно 150, 430, 850 та 1000 п.н. є маркерами стійкості, а RAPD-алелі довжиною приблизно 330 та 560 п.н. — маркерами чутливості комахи до вірусу. За допомогою алозимного аналізу було встановлено, що особини непарного шовкопряду, гетерозиготні за локусом Est-5, є у середньому більш стійкими до бактерійної інфекції, ніж гомозиготні. На основі отриманих генетичних маркерів чутливості непарного шовкопряда до вірусного препарата «ВІРІН-НШ» та бактерійного препарата B3 було запропоновано варіант генетичного підходу у стратегії прийняття рішень з біологічного контролю чисельності непарного шовкопряда.

Ключові слова: НЕПАРНИЙ ШОВКОПРЯД, ВІРУС ЯДЕРНОГО ПОЛІЕДРОЗУ, ПОЛІМЕРАЗНА ЛАНЦЮГОВА РЕАКЦІЯ, АЛОЗИМНИЙ АНАЛІЗ, ГЕНЕТИЧНІ МАРКЕРИ, БІОПРЕПАРАТИ, БІОЛОГІЧНИЙ КОНТРОЛЬ ШКІДНИКА.

Непарний шовкопряд *Lymantria dispar* належить до числа серйозних шкідників деревних і чагарникових порід рослин [1]. Захист лісів від цієї листогризучої комахи має економічне значення. Мікробіологічні препарати володіють великим потенціалом у контролі чисельності листогризучих комах, але без знання не тільки екології, але й генетики шкідників та їх патогенів біологічні заходи боротьби зі шкідниками не можуть бути успішними [2]. У системі паразит–хазяїн жоден її член не може розглядатися ізольовано, незалежно один від одного, бо як паразит впливає на свого хазяїна, так і хазяїн впливає на свого паразита, прагнучи знешкодити його [3]. У зв'язку з цим дуже важливо знати генетичну структуру популяцій шкідника, яка є базисом протікаючих у популяції процесів і здатна пояснити зміни, що відбуваються з нею [4]. Добре відомо, що популяції непарного шовкопряда характеризуються значним розмахом генетичної мінливості [5]. Як було з'ясовано на прикладі інших комах-шкідників, різні їх генотипи вирізняються різною мірою чутливості до мікропатогену, а певні штами останнього мають різну ефективність при їхньому застосуванні проти різних генотипів комахи [6]. Певні перспективи у вирішенні таких завдань мають методи алозимного та PCR-аналізу (Polimerase Chain Reaction; ПЛР, полімеразна ланцюгова реакція). Алозимний аналіз вже давно використовується у практиці генетичних досліджень і перш за все у вивченні генетичної мінливості [7]. Практично у будь-якій групі тварин є чималий рівень білкового поліморфізму, хоча виявляються й істотні коливання рівня мінливості залежно від виду, що вивчається [8]. Аналіз випадково амплифікованої поліморфної ДНК методом полімеразної ланцюгової реакції (ДАПД-ПЛР; RAPD-PCR, Random Amplified Polymorphic DNA PCR) є найбільш доречною процедурою для дослідження внутрішньопопуляційної генетичної мінливості [9, 10]. Використання методу електрофореза створює можливість оцінити рівень білкового поліморфізму і виявити генетичні маркери різних процесів у багатьох тварин.

За використання цього методу можна знайти відповідні генетичні маркери стійкості та чутливості непарного шовкопряда до тих чи інших мікропатогенів [11] і тим самим зробити більш вдосконаленою процедуру його біологічного контролю. Доцільність такого пошуку підкріплюється висунутою Флором (1971) гіпотезою «ген–ген», яка говорить про існування генів вірулентності у патогена, комплементарних генам стійкості хазяїна, тобто кожному гену стійкості хазяїна протистоїть ген вірулентності паразита, здатний його подавити [12].

Таким чином, пошук генетичних маркерів стійкості та чутливості непарного шовкопряда до мікропатогенів є кроком на шляху оптимізації використання біопрепаратів.

Матеріали і методи

Методика проведення RAPD-PCR-аналізу. Екстракцію тотальної ДНК із матеріалу проводили згідно з стандартною методикою [13] з використанням за інструкцією комплекту «ДНК-сорб-А» варіант 100 (АмплиСенс, Москва).

Ампліфікацію ДНК із специфічними праймерами проводили в реакційній суміші об'ємом 30 мкл на термоциклері «Терцик» (ДНК-Технология, Росія) з використанням реактивів для полімеразної ланцюгової реакції «АмплиСенс-200-1» (АмплиСенс, Москва). Реакційна суміш об'ємом 30 мкл містила: 5-х PCR-буфер — 5 мкл; $MgSO_4$, 50 Mm — 1,5 мкл; H_2O MilliQ — 3 мкл; dNTP-mix — 2,5 мкл, 2 Mm; Taq-полімераза, 5 од/мкл — 0,5 мкл; мінеральне масло — 11,5 мкл; праймер, A_{260} 10 ОЕ/мл — 1 мкл; ТЕ-буфер з дослідною ДНК — 5 мкл. PCR проводили в режимі: денатурація 94 °С — 1хв, відпал 35 °С — 1 хв, синтез 72 °С — 1 хв — 5 циклів; денатурація 94 °С — 0,75 хв, відпал 35 °С — 0,75 хв, синтез 72 °С — 0,75 хв — 30 циклів. Термінальну стадію синтезу проводили при 72 °С — 5 хв. Пошук RAPD-маркерів, асоційованих з чутливостю і стійкістю гусениць непарного шовкопряда до вірусу ядерного поліедрозу, проводили за допомогою праймеру OPA-14 — TCTGTGCTGG (Operon Technologies, США). Зразки ДНК виділяли з головної капсули і залишків покривів гусениць непарного шовкопряда, що залишилися після виділення з гусениці вірусних поліедрів.

Продукти ампліфікації розділяли методом електрофорезу в 1,8 % агарозному гелі [11] і після обробки бромістим етидієм аналізували під ультрафіолетом. Як маркер використовували DNA markers M 100 (ИзоГен, Росія) з довжиною фрагментів 100 bp.

Методика зараження гусениць непарного шовкопряда вірусним препаратом «ВІРІН-НШ». Вірусний препарат «ВІРІН-НШ» надали співробітники Державного спеціалізованого лісозахисного об'єднання «Укрлісозахист» (смт. Покотилівка, Харківська обл.).

Для вивчення впливу вірусного препарату «ВІРІН-НШ» на розвиток гусениць непарного шовкопряда використали гусениць III личинкового віку з кримської яйцекладки. До III личинкового віку гусениць вирощували разом, а потім кожна гусениця була поміщена в окрему пробірку. Для вирощування всіх гусениць в лабораторії використовували одну і ту ж кормову суміш [14]. Доз дотримувалися шляхом внесення у кормову суміш вірусного препарату з відомим титром поліедрів, який визначали в розчині за допомогою фазово-контрастного мікроскопу. Кожній голодній гусениці давали невелике навішування корму (1 мг), яке вони з'їдали повністю, завдяки чому досягалося потрапляння достатньо точної кількості вірусних часток у кишечник кожної окремої гусениці. Кожна личинка одержала дозу вірусу в 10^4 поліедрів. Гусениць III личинкового віку заражали на 2–3 день після линяння. Зважування особин непарного шовкопряда проводили за допомогою торсіонних терезів типу ВТ до 500 мг.

Вивчення вірусних поліедрів проводили за допомогою техніки фазового контрасту на мікроскопі «Биолам». Підрахунок вірусних поліедрів проводили в камері Горяєва. Для визначення розміру вірусних поліедрів використали об'єкт-мікрометр ОМП (Ломо, Росія).

Вміст вірусних поліедрів у гусеницях непарного шовкопряда визначали за наступною методикою. Особин непарного шовкопряда гомогенізували залежно від розміру з різною кількістю води (зазвичай 10–11 мл) у ступці. Отриманий гомогенат центрифугували при

5000 оборотів/хв протягом 1 хв (радіус центрифуги — 6 см). Надосадову рідину відділяли для мікроскопування.

Методика проведення алозимного аналізу. Для розділення множинних молекулярних форм ферменту естерази був використаний метод диск-електрофорезу з використанням поліакріламідного гелю у якості розділяючого середовища. При проведенні досліджень використовувалась модифікація електрофорезу в пластинах поліакріламідного гелю, що створило можливість проводити одночасно аналіз великої кількості зразків. Система носія включала дві частини: нижній розділяючий і верхній концентруючий гелі. Застосовували пластини поліакріламідного гелю розміром 90 х 60 х 1 мм. Для формування блоку гелю використали пластикові прокладки товщиною 1 мм, поміщені між двома пластинами скла. Щілини між прокладками і пластинами скла ущільнювали 2 % розчином агар-агару. В отриману камеру на три чверті висоти заливали суміш для здобуття 7,5 % розділяючого поліакріламідного гелю (Маурер, 1971), приготованого з таких розчинів:

Розчин № 1:
Акриламід — 30,0 г
N–метіленбісакріламід — 0,8 г
Вода — до 100 мл
Розчин № 2:
1 н HCl — 48,0 мл
тріс-оксілметіл-амінометан — 5,96 г
N,N,N,N–тетраметілетілендіамін — 0,46 мл
Вода — до 100 мл
Розчин № 3:
Персульфат амонія – 0,14 г
Вода — до 100 мл

Для приготування блоку гелю витрачали 2 мл суміші, приготовленої з розрахунку дві частини розчину № 1, одна частина розчину № 2, чотири частини розчину № 3 і одна частина води. Над розчином розділеного гелю обережно напластовували воду. Полімеризація проходила протягом 30–45 хв. Потім воду видаляли і за допомогою фотополімеризації формували концентруючий гель [15]. До складу концентруючого гелю входили такі розчини.

Розчин № 4:
Акриламід — 10,0 г
N–метіленбісакріламід — 2,5 г
Вода — до 100 мл
Розчин № 5:
1 н HCl — 38,0 мл
тріс-оксілметіл-амінометан — 5,96 г
N,N,N,N–тетраметілетілендіамін — 0,46 мл
Вода — до 100 мл
Розчин № 6:
Рибофлавін — 0,04 г
Вода — до 100 мл
Розчин № 7:
Сахароза — 40,0 г
Вода — до 100 мл

Розчини змішували у співвідношенні 2 : 1 : 1 : 4. Стартові щілини для внесення зразків формували за допомогою шаблону-гребінки, виготовленої з пластика. Для електрофорезу використовували загальні тканинні екстракти з гусениць непарного шовкопряда. Для приготування екстракту гусениць поміщали в гомогенізатор типа Даунса і

гомогенізували у рівних кількостях дистильованої води [16]. Гомогенат центрифугували при 6000 об/хв. Зібраний супернатант змішували з рівним об'ємом розчину 60 % сахарози що містив 0,01 % бромфенолового синього. Зразки зберігали в морозильній камері при температурі — −5 °С. Електрофорез проводили в плексигласовій камері з вертикальним розташуванням блоків гелів (залежно від модифікації камери їх може бути від одного до чотирьох). В одному блоці гелю розміщувалося одночасно до 20 зразків. Електрофорез проводили з використанням стандартної буферної системи Девіса-Орнстейна [15]. pH електродного розчину варіювали залежно від якості розділення. В якості джерел живлення застосовували прилади УИП-2 та ИПЭ-500. Електрофорез починали при силі струму 10 mA і напрузі 20 В, поступово доводячи силу струму до 30 mA, а напругу до 150 В. Тривалість електрофорезу в пластинах розміром 90 х 60 х 1 мм складала 45–60 хв.

Після проведення електрофорезу виявляли приналежність особин непарного шовкопряда до генотипових класів за естеразним локусом (Est-5) [7]. Електрофореграми інкубували в розчині, що мав такий склад. Розчиняли 40 міліграм ά-нафтілацетату у 2 мл ацетону, додавали 100 мл 0,1 М Тріс-HCl буфера, pH 7,2; потім додавали 100 мл Fast blue BB salt. Якщо Fast blue BB salt повністю не розчинявся, розчин фільтрували. Гель швидко заливають цією сумішшю, поміщали у темряву та інкубували при кімнатній температурі протягом 15–30 хв до прояву зон активності ферменту [17]. Потім гель промивали водою і сушили в целофані для тривалого зберігання.

Методика обробки модельних дерев бактерійним препаратом В3. Ізолят *Bacillus thuringiensis*, В3, надано кафедрою мікробіології та екології Дніпропетровського національного університету. Дослідження впливу *Bacillus thuringiensis* на непарного шовкопряда проводили у природній популяції непарного шовкопряда, у лісовому масиві на Південному березі Криму біля с. Лаврове. Дев'ять дерев дубу пухнастого (*Quercus pubescens)* були обрані у якості модельних. Крона кожного дерева була умовно поділена на дві частини, одна з них була оброблена біопрепаратом (експеримент), а друга (не оброблена) частина слугувала в якості контролю. Обробку проводили ранцевим обприскувачем за вітром таким чином, щоб препарат не потрапив на контрольну частину. У момент обробки основна частина личинок непарного шовкопряда мала третій личинковий вік.

Робочий розчин наносили на поверхню листя у дозі 10^8 спор/мл. При цьому витрата на половину крони дерева дубу (заввишки 3–4 м) складала 1–1,5 л. Через сім днів після обробки проводили збір матеріалу — личинок непарного шовкопряду — та доставляли його у лабораторію для алозимного аналізу.

Статистична обробка експериментальних даних проводилася за Рокицьким (1973) [18] із використанням комп'ютерної програми Microsoft Excel 2003.

Результати й обговорення

Вивчення генетичного поліморфізму особин непарного шовкопряда, пов'язаного з відмінностями у стійкості до вірусу ядерного поліедрозу

Експеримент припинили через 65 діб, коли 61 % особин загинули. Для оцінки генетичного поліморфізму личинок непарного шовкопряда використали методику виявлення випадково ампліфікованої поліморфної ДНК (ДАПД, RAPD). Використання стандартного праймера OPA-14 (TCTGTGCTGG) (Operon Technologies, США) створило можливість отримати у сукупності 15 RAPD-фрагментів, що виявляються у вигляді окремих смуг при електрофорезі. Набір отриманих ДНК-фрагментів створює можливість специфічно характеризувати кожний з 23 генетичних спектрів непарного шовкопряда (рис. 1).

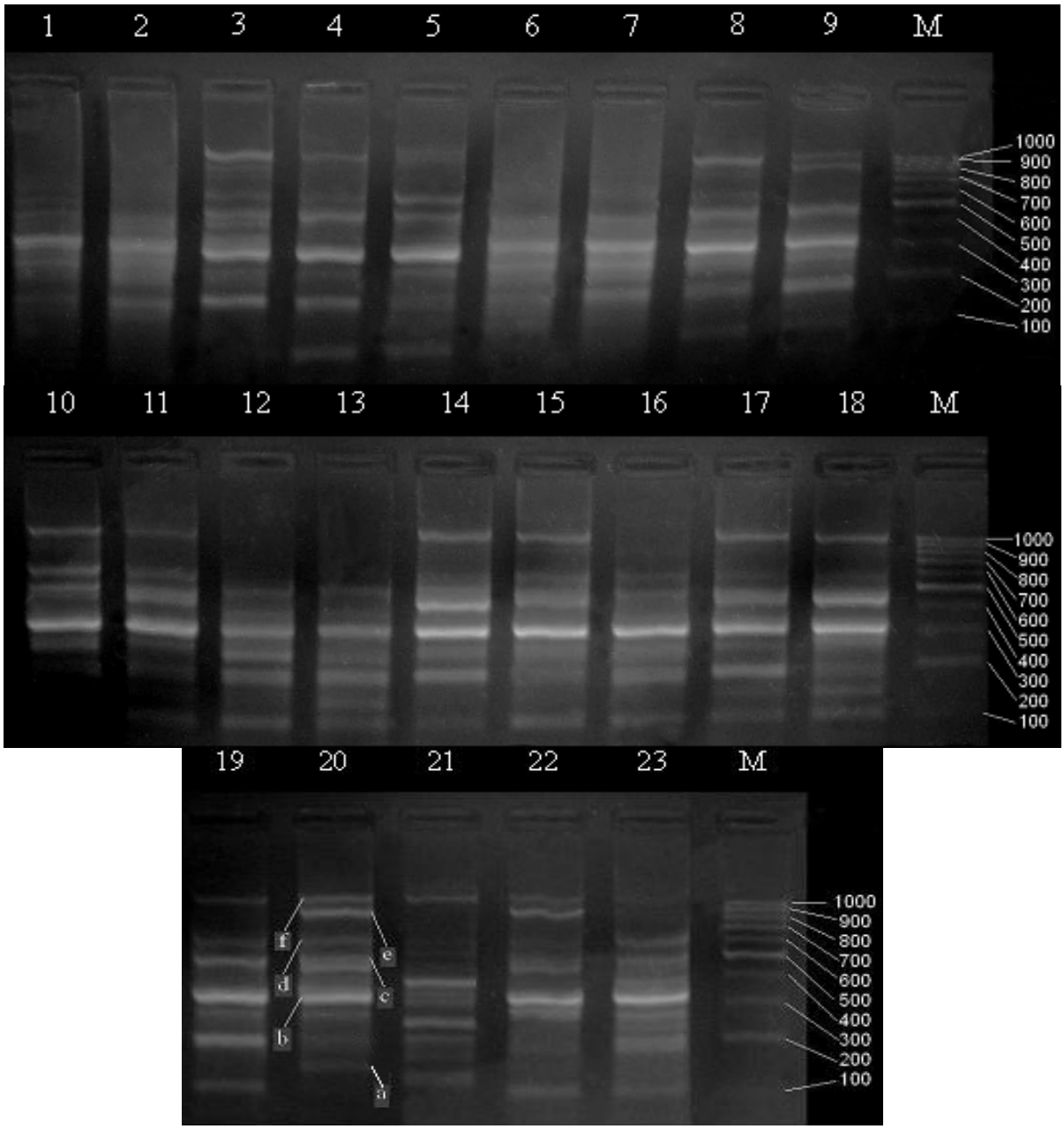

Рис. 1. Індивідуальні електрофоретичні спектри ампліфікованих фрагментів ДНК особин непарного шовкопряда (1–23) з праймером OPA–14: a, b, c, d, e, f — генетичні маркери довжиною приблизно 150, 330, 430, 560, 850 та 1000 п.н.; M — маркер молекулярних мас ДНК довжиною від 100 до 1000 п.н. з кроком в 100 п.н. (від низу до верху)

Проаналізовані особини виявили істотний генетичний поліморфізм за наборами отриманих RAPD-фрагментів. ДНК-спектри окремих особин комахи містили від п'яти до дев'яти ампліконів. Подальше дослідження полягало у пошуку RAPD-фрагментів ампліфікованої ДНК, що маркують деякі характеристики інфекційного процесу. Це наступні показники: кількість поліедрів на мг ваги гусениці та розміри поліедрів.

Наявність фрагмента довжиною приблизно 850 п.н у спектрі ампліфікованої ДНК співпадало з низькою швидкістю накопичення вірусу в організмі личинки непарного шовкопряда — в середньому $2{,}5*10^6$ поліедрів/гусеницю проти $17{,}8*10^6$ пол./гус. за відсутності цього фрагмента (t = 2,095; d. F =19; P = 0,049). Аналогічна картина характерна і для маркера довжиною приблизно 430 п.н. — $2{,}5*10^6$ пол./гус. у середньому за наявності та

$17,6*10^6$ пол./гус. у середньому за відсутності цього фрагмента в RAPD спектрі личинки (t = 2,225; d. f. = 14; P = 0,043).

Таким чином, фрагменти довжиною приблизно 850 та 430 пар нуклеотидів (праймер OPA-14) маркують стійкість личинок непарного шовкопряда до вірусу ядерного поліедрозу і в середньому позначають зменшення вмісту поліедрів у комасі в 8 разів.

Таблиця 1

Порівняльний аналіз розмірів поліедрів вірусу ядерного поліедрозу в личинках непарного шовкопряда, що генетично розрізняються по RAPD-маркерах довжиною приблизно 430 та 850 п.н. (праймер OPA-14)

RAPD-маркер	850 п.н.	430 п.н.
Параметр	d	d
Генотип	–	–
Середнє значення	3,232492	3,157996
Дисперсія вибірки	2,159793	2,707981
N	19	15
Генотип	+	+
Середнє значення	3,179283	3,345568
Дисперсія вибірки	0,173986	0,187471
N	4	8
F-критерій (дисперсії)	12,41359	14,4448

Примітка: «–» — відсутність RAPD-маркера; «+» — наявність RAPD-маркера; N — кількість особин з даним генотипом; F — значення критерію Фішера (в таблиці приведені тільки достовірні значення); d — діаметр вірусних поліедрів (мкм)

Подальший аналіз даних показав, що генетичні характеристики личинок непарного шовкопряда здатні впливати не тільки на швидкість накопичення поліедрів вірусу, але й на мінливість цього процесу. Порівняльний аналіз розмірів поліедрів вірусу ядерного поліедрозу в личинках непарного шовкопряда, що генетично розрізняються за RAPD-маркерами довжиною приблизно 430 і 850 п.н. (праймер OPA-14) показав, що наявність цих фрагментів у особин комахи обумовлює зменшення значення дисперсії у середньому в 13,4 раза (t = 10,62; d. f. = 1; P < 0,1). Отже, фрагменти ДНК довжиною приблизно 430 та 850 п.н. маркують зниження варіабельності розміру поліедрів (крива нормального розподілу ознаки вужче) і асоційовані з несприятливими для репродукції вірусу умовами у клітинах хазяїна. Також генетичними маркерами стійкості непарного шовкопряда до вірусу були RAPD-фрагменти довжиною приблизно 150, 430, 850 та 1000 п.н. Навпаки, фрагменти ДНК довжиною приблизно 330 та 560 п.н. були охарактеризовані як маркери чутливості непарного шовкопряда до вірусу (табл. 2).

Як видно з даних таблиці 2, різниця в рівні мінливості ознаки (накопичення поліедрів) може досягати декількох сотень. RAPD-фрагменти довжиною приблизно 150, 430, 850 та 1000 п.н. маркують низький рівень мінливості ознаки накопичення поліедрів (P < 0,05). ДНК-фрагменти довжиною приблизно 330 та 560 п.н., навпаки, виявилися генетичними маркерами, пов’язаними з високим рівнем мінливості показника накопичення вірусних поліедрів (P < 0,05). Разом з тим, низький рівень мінливості накопичення вірусних поліедрів (фрагменти ДНК довжиною приблизно 150, 430, 850 та 1000 п.н.) у всіх випадках збігався й з низькими середніми значеннями ознаки. Іншими словами, ДНК-фрагменти довжиною

приблизно 150, 430, 850 та 1000 п.н. маркують компактне розташування личинок непарного шовкопряда в лівій частині розподілу за ознаками накопичення вірусних поліедрів та їх розміру. У зв'язку із цим можна стверджувати, що ці ДНК-фрагменти є RAPD-маркерами стійкості непарного шовкопряда до вірусу ядерного поліедрозу, а фрагменти ДНК довжиною приблизно 330 і 560п.н. — RAPD-маркерами чутливості.

Таблиця 2

Порівняльний аналіз вмісту поліедрів вірусу ядерного поліедрозу на одиницю ваги личинок непарного шовкопряда, що генетично розрізняються по деяких RAPD-маркерах (праймер OPA-14)

RAPD-маркер	1000 п.н.	850 п.н.	560 п.н.	430 п.н.	330 п.н.	150 п.н.
Параметр	пол./мг	пол./мг	пол./мг	пол./мг	пол./мг	пол./мг
Генотип	–	–	–	–	–	–
Середнє значення	$8,9*10^{6}$	$5,1*10^{6}$	$1,6*10^{6}$	$6,2*10^{6}$	$2,8*10^{6}$	$5,5*10^{6}$
Дисперсія вибірки	$2,26*10^{14}$	$1,1*10^{14}$	$9,07*10^{12}$	$1,35*10^{14}$	$2,08*10^{13}$	$1,22*10^{14}$
N	8	19	9	15	18	17
Генотип	+	+	+	+	+	+
Середнє значення	$1,8*10^{6}$	$0,4*10^{6}$	$6*10^{6}$	$0,5*10^{6}$	$9,4*10^{6}$	$0,8*10^{6}$
Дисперсія вибірки	$1,57*10^{13}$	$1,69*10^{11}$	$1,45*10^{14}$	$2,91*10^{11}$	$3,84*10^{14}$	$1,21*10^{12}$
N	15	4	14	8	5	6
F	14,33153	652,084	15,95638	462 ,8844	18,42932	100,9375
P	$2,11*10^{-5}$	$8,63*10^{-5}$	$2,64*10^{-4}$	$5,56*10^{-9}$	$5,21*10^{-6}$	$3,53*10^{-5}$

Примітка: «–» — відсутність RAPD-маркера; «+» — наявність RAPD-маркера; F — значення критерію Фішера (в таблиці приведені тільки достовірні значення); N — кількість особин з даним генотипом; ($P < 0,05$)

Ми вважаємо, що гіпотеза Флора «ген–ген» (Flor, 1971) знайшла підтвердження у нашому дослідженні. При цьому треба відзначити важливу маркуючу роль некодуючих ділянок геному комахи взаємовідносин між вірусом та хазяїном. Виходячи з будови геномів еукаріотичних багатоклітинних організмів, більшу їх частину представляють некодуючі ділянки: межгенні спейсери (ділянки між генами) та інтрони. Екзони складають в середньому 1–5 %. Крім цього, відомо, що послідовності нуклеотидів в екзонах консервативні, а в інтронах — сильно варіюють, що впливає на поліморфізм генотипів комахи, який виявляється методом RAPD-PCR-аналізу. Вірогідність того, що усі 6 ДНК-маркерів з 15 виявлених ДНК-фрагментів належать до кодуючої частини геному комахи, низька ($\chi^2 = 12,18$; $df = 1$; $P < 0,01$). Можна говорити, що принаймні два RAPD-маркера відбивають некодуючу частину геному ($\chi^2 = 5,55$; $df = 1$; $P < 0,05$). Отже, результати дослідження показують важливу маркуючу функцію некодуючої частини геному, яка пов'язує генетику організму з його життєдіяльністю, зокрема, зі стійкістю та чутливістю комахи до вірусу.

Таким чином, розвиток вірусної інфекції залежить від генотипу комахи. RAPD-PCR-аналіз з праймером OPA-14 створює можливість знаходити генетичні маркери чутливості та стійкості непарного шовкопряда до вірусного препарату «ВІРІН-НШ». Генетичні маркери стійкості і чутливості непарного шовкопряда до вірусу ядерного поліедрозу можна використовувати у боротьбі зі шкідником. При високій частоті в популяції чутливих до вірусного препарату генотипів комахи ми рекомендуємо використання вірусного препарату «ВІРІН-НШ». Чутливими до вірусу генотипами комахи можна вважати такі, у яких сума відсутніх ДНК-маркерів стійкості та присутніх ДНК-маркерів чутливості більше, ніж сума

присутніх ДНК-маркерів стійкості та відсутніх ДНК-маркерів чутливості. Наявність в популяції непарного шовкопряда високої частоти стійких генотипів комахи до вірусного препарату є вагомою підставою для застосування іншого біопрепарату, наприклад бактерійного. Отриманні результати можуть бути використанні для поліпшення стратегії застосування біопрепаратів для контролю чисельності непарного шовкопряда.

Вплив бактерії Bacillus thuringiensis на генетичний склад (за естеразним локусом) природної популяції непарного шовкопряда

Для вивчення диференціального впливу бактерійного ізоляту В3 *Bacillus thuringiensis* на генетичний склад природної популяції непарного шовкопряда використали метод ензим-електрофорезу. За допомогою алозимного аналізу досліджували естеразний локус Est-5 комахи.

Як можна побачити з рисунку 2, у досліджуваній популяції непарного шовкопряда локус Est-5, що кодує неспецифічну естеразу, представлено двома алелями: F та S.

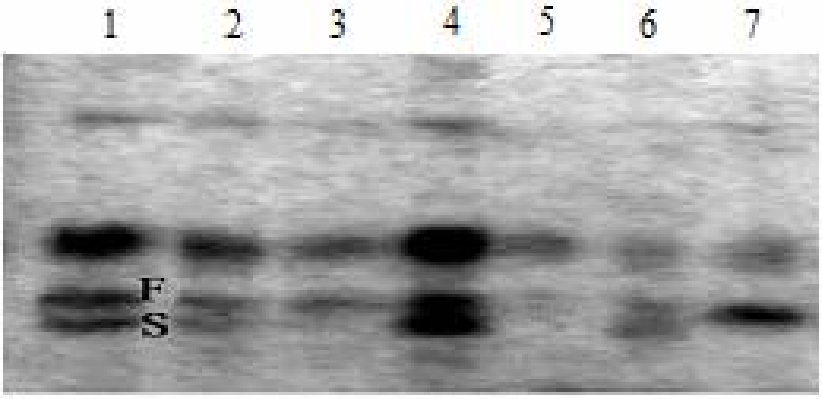

Рис. 2. Алелі естеразного локусу Est-5: F, S; 1–7 — індивідуальні електрофоретичні спектри комахи

В експерименті була використана суспензія бактерії у концентрації 10^8 спор/мл. Точну ж кількість суспензії, яка потрапила в личинки у природному експерименті визначити було практично неможливо. Однак, це не заважало отримати інформацію про вплив мікропатогену на мікропопуляцію шкідника у природних умовах.

У таблиці 3 наведено результати експерименту з виявлення впливу інфекції, яку викликала *B. thuringiensis,* на генетичний склад популяції непарного шовкопряда за локусом Est-5.

Після обробки у контрольній частині популяції частоти генотипичних класів відповідали очікуваним за рівнянням Харді-Вайнберга. Тобто популяція знаходилися у рівновазі (табл. 3). В обробленій частині зовсім інша картина — достовірні ($P < 0,05$) відхилення частот генотипових класів від очікуваних. Отримані результати вказують на те, що особини непарного шовкопряду, гетерозиготні за локусом Est-5, були у середньому більш стійкими до бактерійної інфекції. Найбільш чутливими до використаного бактерійного штаму виявилися личинки, гомозиготні за алелем F. Особини цього генотипового класу повністю зникли з експериментальної частини популяції. Одночасно з цим значно зменшилась частота особин генотипового класу SS. Таким чином, зараження *B. thuringiensis* непарного шовкопряду викликає переважне виживання гетерозигот за локусом Est-5.

Таблиця 3

Частоти алелів та генотипових класів (локус Est-5) непарного шовкопряда у контролі та досліді (обробка суспензією *B. thuringiensis*)

Алель	Контроль	H-W	Критерій χ^2	Дослід	H-W	Критерій χ^2
F	0,68			0,56		
S	0,32			0,44		
Генотип						
SS	0,52	0,46		0,13	0,31	
FS	0,32	0,44	3,21	0,88	0,49	4,88*
FF	0,16	0,1		0	0,19	

Примітка: H-W — частоти, що знайдені за рівнянням Харді-Вайнберга; χ^2-тест оцінює вірогідність відхилення частот генотипових класів від очікуваних за рівнянням Харді-Вайнберга; * — $P < 0,05$.

Використання генетичних маркерів у стратегії прийняття рішень з біологічного контроля непарного шовкопряда

На підставі отриманих вище результатів ми вважаємо, що рішення про застосування різноманітних препаратів повинно залежати від визначеної генетичної структури популяції шкідника. Стратегія прийняття цього рішення передбачає попередній популяційно-генетичний аналіз популяцій непарного шовкопряда методами RAPD-PCR-аналізу (праймер OPA-14) та ензим-електрофорезу (естеразний локус Est-5). За допомогою цих методів встановлюють частоту стійких та чутливих генотипів непарного шовкопряда до вірусного препарату «ВІРІН-НШ» та бактерійного препарату В3. У залежності від того, які генотипні класи переважно присутні у популяції, приймається відповідне рішення про застосування заходів із захисту рослин. Запропонований підхід дає досліднику можливість оцінити загальну картину ефективності дії препаратів на різні популяції комахи. Алгоритм прийняття відповідних рішень подано на рисунку 3.

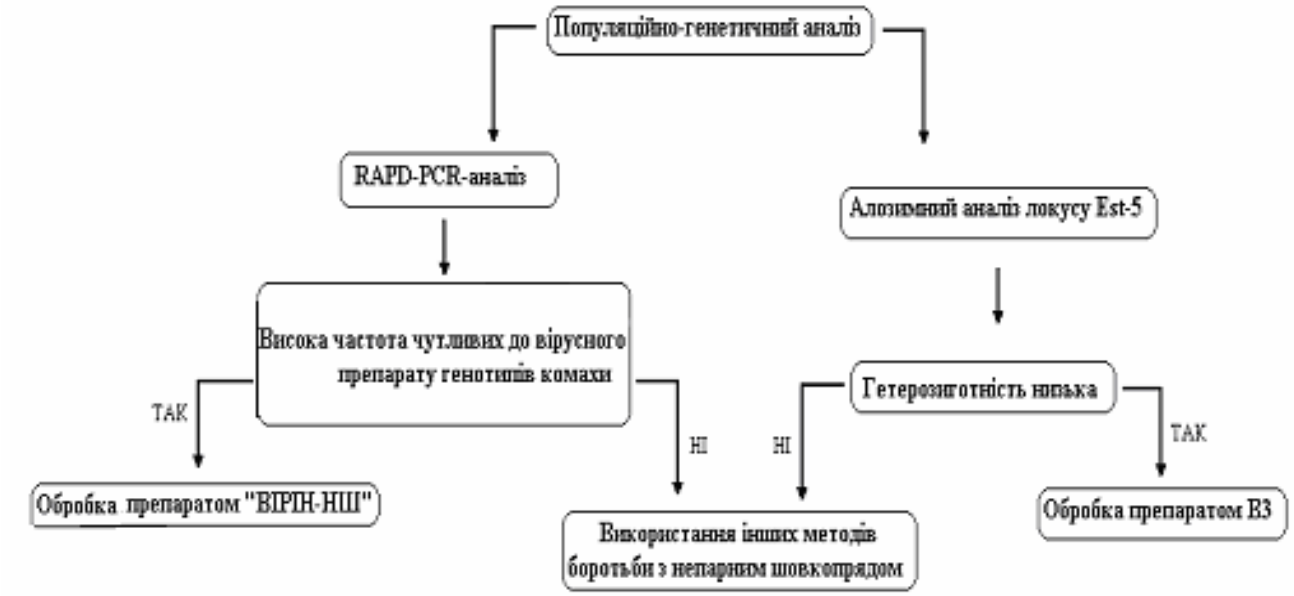

Рис. 3. Використання генетичних маркерів в стратегії прийняття рішень з біологічного контролю непарного шовкопряда.

Як видно зі схеми стратегії прийняття рішень з біологічного контролю непарного шовкопряда, на початковому етапі скринінгу проводиться аналіз мінливості популяції за RAPD-маркерами (праймер OPA-14) та естеразним локусом Est-5, що кодує неспецифічну

естеразу. Якщо у популяції висока частота чутливих генотипів комахи до вірусного препарату та висока частота гетерозигот за естеразним локусом Est-5, тоді в якості інфікуючого агенту бажано застосувати препарат «ВІРІН-НШ» на основі вірусу ядерного поліедрозу. Якщо ж у популяції переважають стійкі до вірусного препарату генотипи та висока частота гомозигот за естеразним локусом Est-5, тоді необхідно застосувати бактерійний препарат В3. У випадку помірної гетерозиготності за естеразним локусом Est-5 особин комахи та помірної частоти стійких до вірусного препарату генотипів можливе комбіноване застосування вірусного та бактерійного препаратів.У випадку високої частоти гетерозиготності серед особин непарного шовкопряда за локусом Est-5 та високої частоти стійких до вірусного препарату генотипів можливе обмежене застосування хімічного препарату. Запропонований алгоритм достатньо загальний і його можна пристосовувати під конкретний випадок регуляції чисельності непарного шовкопряда.

Висновки

Генетичні маркери відображають взаємовідносини між непарним шовкопрядом та мікропатогенами. RAPD-алелі довжиною приблизно 150, 430, 850 та 1000 п.н. є маркерами стійкості, а RAPD-алелі довжиною приблизно 330 та 560 п.н. — маркерами чутливості комахи до вірусу. Показано маркуючу здатність некодуючих ділянок геному комахи взаємовідносин між вірусом та хазяїном. Особини непарного шовкопряду, гетерозиготні за локусом Est-5, є у середньому більш стійкими до бактерійної інфекції, ніж гомозиготні. Отримані за допомогою RAPD-PCR-аналізу та ензим-електрофорезу генетичні маркери, асоційовані з чутливостю та стійкостю непарного шовкопряда до вірусного препарату «ВІРІН-НШ» та бактерійного препарату В3, можна використовувати для сканування популяцій непарного шовкопряда і прогнозування успіху використання біопрепаратів.

Перспективи подальших досліджень. Наступна робота полягатиме у поглиблинні отриманих знань та практичному використанні їх у лісовому господарстві.

V. V. Oberemok

USE OF GENETIC MARKERS IN STRATEGY OF COMING TO DECISION ABOUT BIOLOGICAL CONTROL OF GYPSY MOTH'S NUMBER

S u m m a r y

RAPD-PCR analysis and allozyme analysis created opportunity to reveal genetic difference between gypsy moth individuals correlated with susceptibility of insect to viral and bacterial infections. Use of RAPD-PCR analysis with primer OPA-14 led to find genetic markers of gypsy moth individuals related with intensity of development of viral infection in the host. RAPD alleles approximately 150, 430, 850 and 1000 b.p. long are the markers of resistance and RAPD alleles approximately 330 and 560 b.p. long are the markers of susceptibility of insect to virus. With the help of allozyme analysis it was found that gypsy moth individuals heterozygotic to Est-5 locus are in average more resistant to bacterial infection than homozygotic. On the basis of genetic markers of susceptibility of gypsy moth to viral preparation «VIRIN-NSH» and bacterial preparation B3 variant of genetic approach in strategy of coming to decision about biological control of gypsy moth's number was suggested.

В. В. Оберемок

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ В СТРАТЕГИИ ПРИНЯТИЯ РЕШЕНИЙ ПО БИОЛОГИЧЕСКОМУ КОНТРОЛЮ ЧИСЛЕННОСТИ НЕПАРНОГО ШЕЛКОПРЯДА

А н н о т а ц и я

RAPD-PCR-анализ и аллозимный анализ создали возможность выявить генетические отличия особей непарного шелкопряда, связанные с чувствительностью насекомого к вирусной и бактериальной инфекциям. Использование RAPD-PCR-анализа с праймером OPA-14 позволило отыскать генетиеские маркеры особей непарного шелкопряда, связанные с интенсивностью развития вирусной инфекции в организме хозяина. RAPD-аллели длиной приблизительно 150, 430, 850 и 1000 п.н. являются маркерами устойчивости, а RAPD-аллели длиной приблизительно 330 и 560 п.н. — маркерами чувствительности насекомого к вирусу. При помощи аллозимного анализа было установлено, что особи непарного шелкопряда, гетерозиготные по локусу Est-5, являются всреднем более стойкими к бактериальной инфекции, чем гомозиготные. На основе полученных генетических маркеров чувствительности и устойчивости непарного шелкопряда к вирусному препарату «ВИРИН-НШ» и бактериальному препарату В3 был предложен вариант генетического подхода в стратегии принятия решений по биологическому контролю численности непарного шелкопряда.

1. *Воронцов А. И.* Лесная энтомология. — М. : Высшая школа, 1982. — 384 с.

2. *Гулий В. В.,* Голосова М. В. Вирусы в защите леса от вредных насекомых. — М. : Лесная промышленность, 1975. — С. 77–81.

3. *Радкевич В. А.* Экология листогрызущих насекомых. — Минск : Наука и техника, 1980. — 240 с.

4. *Симчук А. П.* Генетические процессы в естественных популяциях зеленой дубовой листовертки (*Tortrix viridana* L.). : автореф. дис. … канд. биол. наук // ИОГен — Москва, 1994. — 24 с.

5. *Симчук А. П.*, Пелецкая И. Г., Оберемок В. А. Изоформы белков, эстераз и щелочной фосфатазы на личиночной стадии развития непарного шелкопряда (*Lymantria dispar* L.) // Экосистемы Крыма, их оптимизация и охрана : Тематический сб. науч. работ. — 2003. — Вып. 13. — С. 172–177.

6. *Ivashov A. V.*, Simchuk A. P., Grigoryev S. G., Gouli S. V. Genetic aspects of interaction between potato tube-worm and micro-pathogenes // 34-th Annual Meeting Society for Invertebrate Pathology, 25–30th August, Noordwijkerhout (Netherlands). — 2001. — P. 28–29.

7. *Корочкин Л. И.* Генетика изоферментов / Корочкин Л. И., Серов О. Л., Пудовкин А. И. — М. : Наука, 1977. — 278 с.

8. *Алтухов Ю. П.* Генетические процессы в популяциях. — М. : Наука, 1989. — 328 с. Изд. 2-е, перераб. и дополн.

9. *Hadrys H.* Applications of random amplified polymorphic DNA (RAPD) in molecular ecology / Hadrys H., Balick M., Schierwater B. // Mol. Ecol. — 1992. — Vol. 1. — P. 55–63.

10. *Volis S.* Tests for adaptive RAPD variation in population genetic structure of wild barley, *Hordeum spontaneum* Koch / Volis S., Yakubov B., Shulgina I. et al. // Biological Journal of the Linnean Society. — 2001. — V. 74. — P. 289–303.

11. *Ivashov A. V.* RAPD-PCR fragments marking resistance and susceptibility of Lymantria dispar to nuclear polyhedrosis virus : 38th Annual Meeting Society for Invertebrate Pathology, 7–11 August 2005, Anchorage (Alaska, USA) / Ivashov A. V., Simchuk A. P., Oberemok V. V., Gouli V. V. — P. 72.

12. *Flor H. H.* Current status of the gene-for-gene concept // Annu. Rev. Phytopathol. — 1971. — V. 9. — P. 275–276.

13. *Sambrook J.* Molecular Cloning : Laboratory Manual / Sambrook J., Fritisch E. F., Maniatis T. — New York, Cold Spring Harbour Univ. Press, 1989. — 1626 p.

14. *Зиновьева Л. А.* Биологические методы борьбы с вредителями растений / Зиновьева Л. А., Захарченко И. С — Рига : Зипатия, 1968. — С. 17–20.

15. *Маурер Р. Г.* Диск-электрофорез / Маурер Р. Г. — М. : Мир, 1971. — 231 с.

16. *Коровкин Б. Ф.* Определение изоферментов в тканях и сыворотке крови методом энзим-электрофореза / Коровкин Б. Ф. // Современные методы в биохимии. — М. : Медицина. — 1968. — С. 140–155.

17. *Левитес В. Е.* Генетика изоферментов растений / Левитес В. Е. — Новосибирск : Наука, 1986. — 144 с.

18. *Рокицкий П. Ф.* Биологическая статистика / Рокицкий П. Ф. — Минск : Вышейш. шк., 1973. — 320 с.

Рецензент: завідувач кафедри екології та раціонального природокористування Таврійського національного університету ім. В. І. Вернадського, доктор біологічних наук, професор А. В. Івашов.