

Сравнительная характеристика биологической активности вирусных препаратов Вирин-НШ и Джипчек (Gypchek)

Comparative biological activities of two nucleopolyhedrovirus preparations: Virin NSH and Gypchek

С.А. Бахвалов*, В.В. Мартемьянов*, Дж.Д. Подвайт**
S.A. Bakhvalov*, V.V. Martemyanov*, J.D. Podgwait**

* Институт систематики и экологии животных СО РАН, ул. Фрунзе 11, Новосибирск 630091 Россия.

* Institute of Systematics and Ecology of Animals SB RAS, Frunze str. 11, Novosibirsk 630091 Russia.

** Лесная служба США, Хамден США.

** US Forest Service, 51 Mill Pond Road, Hamden CT 06514 USA.

Ключевые слова: энтомопатогенные вирусные препараты, вирусы ядерного полиэдро́за, биологические методы защиты растений, Вирин-НШ, Джипчек.

Key words: entomopathogenic viral preparations, nucleopolyhedrovirus, biological pest control, Virin NSH, Gypchek.

Резюме. Выявлена гетерогенность вирусных препаратов Вирин-НШ и Джипчек по биологической активности для двух западносибирских (татарская и алтайская) и одной американской популяций непарного шелкопряда. При тестировании биологической активности вирусных препаратов на гусеницах татарской популяции не было установлено достоверных различий, в то время как для американской популяции было отмечено достоверное увеличение активности Джипчек по сравнению с Вирином-НШ. Показатель LD_{50} препарата Вирин-НШ для алтайской популяции шелкопряда был ниже, чем для насекомых татарской популяции. Биологическая активность обоих препаратов для насекомых, выращиваемых на искусственном корме, существенно превышала соответствующую активность по отношению к насекомым, развивающимся на естественном корме.

Abstract. The biological activities of the viral preparations Virin NSH and Gypchek were determined for two Western Siberia populations (Tatarsk and Altai) and for one American (New Jersey) population of gypsy moth, *Lymantria dispar* L. There were no significant differences in potency between the two preparations when tested against the Tatarsk population of *L. dispar*. Gypchek was significantly more active than Virin NSH against the New Jersey population of insects. The LD_{50} of Virin NSH for the Altai population of the herbivore was lower than the LD_{50} for the Tatarsk population. Both Virin NSH and Gypchek were more active against insects reared on artificial diet than those reared on foliage.

Введение

Вспышки массового размножения непарного шелкопряда, наблюдающиеся в последние четверть века в Европе, Азии и Северной Америке, существенно обострили внимание к вопросу управления численностью популяций этого фитофага [Heinrichs,

1982; Liebhold et al., 1992; Бахвалов и др., 2002]. Так, по нашим данным, только на территории Западной Сибири в течение последних двух десятилетий очаги массового размножения непарного шелкопряда ежегодно действовали в среднем на площади около 85 тыс. га. В некоторые годы их площадь составляла несколько сотен тысяч га. Средняя площадь очагов непарного шелкопряда на территории России в этот период ежегодно приближалась к одному миллиону га [Гниненко, Матусевич, 2001]. В 1982 г. только в штате Пенсильвания непарный шелкопряд вызвал полную дефолиацию лесных массивов на площади около 800 тысяч га [Heinrichs, 1982]. Дефолиация лесов шелкопрядом в США вызывает массовую гибель деревьев, приводит к огромным потерям древесины, снижает эстетическую роль насаждений, сокращает рекреационные площади, резко ухудшает условия обитания лесных животных, повышает опасность лесных пожаров и несёт ряд других последствий для лесной экосистемы [Gottschalk, 1990]. Естественно, что на огромных площадях применение только химических инсектицидов является весьма проблематичным из-за существенных отрицательных экологических последствий. Тем более, что очаги размножения насекомых часто возникают в насаждениях, имеющих большое рекреационное значение, где применение химических инсектицидов недопустимо [Бахвалов и др., 2002].

В настоящее время наиболее приемлемым и доступным является биологический метод контроля численности шелкопряда, в частности, применение вирусных препаратов [Podgwaite, Mazzone, 1981; Podgwaite, 1999; Гниненко, Матусевич, 2001]. В России это экспериментальный препарат Вирин-НШ, а в США и ряде стран Европы — Джипчек

(Gypchek) [Podgwaite, Mazzone, 1981; Ильиных и др., 2004]. Основой этих препаратов является вирус ядерного полиэдрома системного типа. Во многих случаях Вирин-НШ и Джипчек эффективно подавляли популяции непарного шелкопряда в России и за рубежом [Campbell, 1983; Podgwaite et al., 1992 а, б; Ahmed, Leather, 1994; Reardon, Podgwaite, 1994; Lacey et al., 2001; Ильиных и др., 2004].

Штаммы вируса ядерного полиэдрома (ВЯП), на основе которых производятся эти препараты, выделены из популяций насекомых в различных географических зонах [Podgwaite, Mazzone, 1981; Podgwaite, 1999; Ильиных и др., 2004]. Рядом исследователей показана гетерогенность бакуловирусов по вирулентности, обусловленная географической разобщенностью популяций насекомых, из которых они были выделены [Skatulla, 1987; Novotny, 1988; Somasekar et al., 1993; Горбунова и др., 1997]. Это обстоятельство служит основанием для постоянного поиска и введения в препараты новых штаммов вирусов. Можно предположить, что штаммы ВЯП, на основе которых производятся Вирин-НШ и Джипчек, отличаются по биологической активности в отношении насекомых-хозяев из различных популяций. Исходя из этого, мы провели сравнительное исследование биологической активности вирусных препаратов Вирин-НШ и Джипчек для гусениц непарного шелкопряда из двух западносибирских и одной североамериканской популяций.

Материалы и методы

Культивирование насекомых. Яйцекладки непарного шелкопряда западносибирских популяций собирали в эпидемической фазе численности насекомого в берёзовых насаждениях в окрестностях г. Татарска Новосибирской области (татарская популяция) и в лиственнично-берёзовых насаждениях в окрестностях с. Онгудай в Республике Алтай (алтайская популяция). Для исследований в США использовали лабораторную линию шелкопряда F_{56} , полученную из Северо-восточной экспериментальной лесной станции Центра биологического контроля США в г. Хамден (Northeastern Forest Experiment Station, Center for Biological Control, Hamden, CT 06514).

После поверхностной стерилизации 0,6% раствором перекиси водорода яйца помещали в чашки Петри и ставили на выведение при 26° С. После отрождения гусениц выдерживали 2 дня без корма, а затем наиболее активных особей пересаживали на естественный корм — побеги берёзы (*Betula pendula* Roth.). Через 2 дня после линьки гусениц пересаживали на инфицированные вирусным препаратом побеги берёзы. Первую смену корма проводили только после полного потребления гусеницами обработанных вирусом листьев. Далее смену корма и учёт погибших гусениц проводили через день. Тотальную смертность определяли на 11 сутки.

Для диагностики этиологии смертности из трупов насекомых готовили мазки-отпечатки и просматривали в световом микроскопе Carl Zeiss Axioscope 40. При наличии в мазке полиэдров вируса ядерного полиэдрома насекомых считали погибшими вследствие действия вирусного препарата независимо от количества полиэдров и наличия других патогенов.

При использовании гусениц лабораторной линии F_{56} , стерилизацию яиц насекомых проводили с использованием 10% формалина в течение 1 часа. В дальнейшем яйца подсушивали и помещали на выведение при 25° С. Наиболее активных, среди отродившихся особей, помещали на искусственную питательную среду (ИПС) на основе проростков пшеницы [Bell et al., 1981], а по достижении 2 возраста отбирали гусениц весом 5–8 мг для дальнейшего тестирования. Гусениц выращивали при 24±2° С и 16-часовом дне. Через 48 часов после инфицирования насекомым предлагали интактную среду, меняя её в последствии по мере необходимости. Учёт погибших гусениц проводили ежедневно с последующим определением этиологии смертности при помощи светового микроскопа. Тотальную смертность гусениц учитывали на 11 сутки.

Вирусные препараты и инфицирование насекомых. В опытах использовали экспериментальный вирусный препарат Вирин-НШ, произведённый в ИСиЭЖ СО РАН (Россия) и вирусный препарат Джипчек, произведённый в США [Podgwaite, Mazzone, 1981].

Для инфицирования насекомых татарской и алтайской популяций из Вирин-НШ и Джипчек готовили серию 10-кратных разведений с концентрациями: 5×10^3 ; 5×10^4 ; 5×10^5 ; 5×10^6 и 5×10^7 полиэдров/мл. Обработку корма проводили путём мелкодисперсного опрыскивания побегов берёзы из расчёта 50 мл суспензии вируса для каждой концентрации. Обработку корма контрольных групп насекомых проводили дистиллированной водой. Побеги берёзы раскладывали на квадратной рамке со стороны, равной 50 см (площадь 0,25 м²). Укладку побегов производили с таким расчётом, чтобы пространство рамки полностью было покрыто листьями в один слой. Затем побеги обрабатывали суспензией препарата с помощью мелкокапельного опрыскивателя и после подсушивания при комнатной температуре предлагали насекомым.

Для тестирования каждого разведения Вирин-НШ и Джипчек (включая контроль) использовали по 100 гусениц/вариант, которые содержались в стеклянных садках объёмом 3 дм³ по 25 особей.

Тестирование вирусных препаратов на американской линии насекомых F_{56} проводили путём внесения суспензии препарата в ИПС. Для этого в процессе приготовления среды при 52–53° С вносили суспензию каждого из препаратов в соответствующем разведении. Затем смесь энергично перемешивали и разливали на чашки Петри. После охлаждения среда нарезалась на пластинки

объёмом 1,25 см³. В эксперименте использовались следующие дозы: 10², 10³, 10⁴, 10⁵, 10⁶ полиэдров. Инфицирование проводили путём высаживания насекомых в чашки Петри (50 гусениц/вариант, по 10 шт./чашку Петри), содержащей по 2 пластинки заражённого корма объёмом 1,25 см³. Для контроля также использовались 50 гусениц, которые выращивались на интактной ИПС.

Обработка полученных данных. Расчет ЛД₅₀ вирусных препаратов производили по модифицированному методу Кербера [Ашмарин, Воробьёв, 1962].

Результаты и обсуждение

Данные, приведённые в табл. 1, свидетельствуют о различной активности каждого вирусного препарата по отношению к насекомым всех тестируемых популяций. Исключение составляет только активность Вирина-НШ и Джипчек в отношении татарской популяции шелкопряда ($P > 0,05$). Однако эти препараты показали различную активность при испытании на североамериканской популяции (линия F₅₆). Показатель ЛД₅₀ препарата Джипчек для этой популяции был существенно ниже ($P < 0,001$), по сравнению с показателем ЛД₅₀ для Вирина-НШ, что свидетельствует о более высокой вирулентности Джипчек для аборигенной популяции. Установлено, что чувствительность гусениц алтайской популяции достоверно выше ($P < 0,05$) к препарату Вирина-НШ по сравнению с чувствительностью насекомых из татарской популяции по отношению к этому же препарату (табл. 1). Особое внимание заслуживает тот факт, что насекомые линии F₅₆, выращиваемые на ИПС, почти на порядок чувствительнее к испытанным вирусным препаратам по сравнению с насекомыми татарской и алтайской популяций, развивающимися на естественном корме. Вероятно, данный эффект обусловлен более высокой резистентностью гусениц шелкопряда, питающихся на естественном корме, по сравнению с лабораторной линией насекомых. Группой американских авторов показано значительное влияние режима питания гусениц непарного шелкопряда на его чувствительность к вирусу ядерного полиэдроза

[Keating et al., 1989]. Выявлена также более высокая устойчивость к вирусу насекомых, выращиваемых на естественном корме, по сравнению с насекомыми, выращиваемыми на ИПС [Baugher, Yendol, 1981; Watanabe et al., 1989].

Полученные результаты свидетельствуют о том, что тестируемые вирусные препараты имеют гетерогенность по биологической активности по отношению к насекомым из всех трёх изученных популяций. Эти данные согласуются с данными других авторов, которые мы приводили выше, по гетерогенности биологической активности бакуловирусов в отношении насекомых из различных географических областей [Skatulla, 1987; Novotny, 1988; Somasekar et al., 1993; Горбунова и др., 1997].

Использованная нами методика инфицирования насекомых листьями, обработанными препаратом и размещёнными на фиксированной площади (для татарской и алтайской популяций), позволяет приблизительно оценить количество препарата, необходимое для подавления популяции шелкопряда в естественных условиях. Показатель ЛД₅₀ для Вирина-НШ, полученный нами на западносибирских популяциях, в пересчёте на 1 га, составляет для татарской популяции $2,0 \times 10^{10}$, а для алтайской популяции — $1,07 \times 10^{10}$ полиэдров. Поскольку в модельном инфицировании обрабатывали только один слой листьев, а глубина кроны берёзы в условиях Сибири составляет несколько метров, то для достижения смертности насекомых 50%, полученный показатель ЛД₅₀ необходимо увеличить не менее, чем в 50–70 раз. По нашим данным, для подавления популяции непарного шелкопряда вирусным препаратом необходимо достижение эффективности не менее чем 70%, поэтому количество вирусного препарата следует ещё увеличить на 30–40%. Таким образом, полученные в настоящем исследовании данные позволяют заключить, что для подавления очагов размножения шелкопряда необходимо вносить на 1 га насаждений не менее $1,5\text{--}2 \times 10^{12}$ полиэдров вируса, или 375–500 мл препарата Вирина-НШ с титром 4×10^9 полиэдров/мл. Исходя из того, что титр препарата Джипчек составляет $3,02 \times 10^{10}$ полиэдров/грамм, эти

Таблица 1. Биологическая активность вирусных препаратов для гусениц непарного шелкопряда из различных популяций.

Table 1. Biological activity of nucleopolyhedrovirus preparations for caterpillars of Gypsy moth from different populations.

№	Популяция (линия) насекомого	Препарат		lgЛД ₅₀	ЛД ₅₀ вируса (количество полиэдров)	Уровень достоверности
1	Татарская	а	Вирин - НШ	5,70 ± 0,09	5,02 × 10 ⁵	P > 0,05 (16) P < 0,05 (2a)
		б	Джипчек	5,73 ± 0,09	5,12 × 10 ⁵	P < 0,05 (2a)
2	Алтайская	а	Вирин - НШ	5,43 ± 0,09	2,69 × 10 ⁵	P < 0,05 (1a)
3	F-56	а	Вирин - НШ	4,74 ± 0,06	5,49 × 10 ⁴	P < 0,01 (36) P < 0,001 (1a) P < 0,001 (2a)
		б	Джипчек	4,38 ± 0,07	2,39 × 10 ⁴	P < 0,01 (3a) P < 0,001 (16)

показатели будут соответственно $1,72 \times 10^{12}$ полиэдров вируса, или 57 граммов вирусного препарата.

Исследования ряда авторов, как и наши работы, показывают, что примерно это же количество полиэдров бакуловирусов в различных препаратах с высокой вероятностью гарантирует необходимый защитный эффект для лесонасаждений [Forti, Joriatti, 1988; Cunningham et al., 1993; Podgwaite et al., 1992 а, б; Podgwaite et al., 1993; Бахвалов и др., 2005].

Заключение

Полученные результаты свидетельствуют о гетерогенности вирусного препарата Вирин-НШ по биологической активности для двух западносибирских и американской популяций, а Джипчек — для одной западносибирской и американской популяций непарного шелкопряда. Активность обоих препаратов для западносибирской популяции шелкопряда не имела достоверных отличий, а для американской популяции активность Джипчек оказалась выше. Выявлена различная активность препарата Вирин-НШ для двух западносибирских популяций шелкопряда: ЛД₅₀ для насекомых алтайской популяции в два раза ниже, чем для татарской. Чувствительность гусениц лабораторной линии к тестируемым препаратам была достоверно выше по сравнению с чувствительностью гусениц из естественных популяций, развивающихся на естественном корме. Показатели ЛД₅₀ вирусных препаратов, полученные по отношению к насекомым, выращиваемым на естественном корме, близки к эмпирически полученным количествам вирусного препарата, необходимым для подавления очагов массового размножения непарного шелкопряда.

Благодарности

Работа выполнялась при поддержке гранта РФФИ № 04-04-48547.

Литература

- Ашмарин И.А., Воробьев А.А. 1962. Статистические методы в микробиологических исследованиях. Л.: Государственное изд-во медицинской литературы. 180 с.
- Бахвалов С.А., Ильиных А.В., Жимерикин В.Н., Мартемьянов В.В. 2002. Динамика численности шелкопряда-монашенки *Lymantria monacha* L. и непарного шелкопряда *L. dispar* L. (Lymantriidae, Lepidoptera): роль кормового ресурса и вирусной инфекции // Евразийский энтомологический журнал. Т.1. Вып.1. С.101–108.
- Бахвалов С.А., Жимерикин В.Н., Мартемьянов В.В. 2005. Опыт и перспективы использования бакуловирусов в управлении численностью лесных насекомых в России // Eke I. ed.: 25th Jubilee assembly of East paleartic regional section. Budapest P.23–27.
- Гниненко Ю.И., Матусевич Л.С. 2001. Биологическая защита лесов России: проблемы и перспективы // Лесное хозяйство. No.4. С.42–43.
- Горбунова Е.Е., Колосов А.В., Борисова О.Д., Зайцев Н.А., Божко Н.А. 1997. Сравнительная характеристика изолятов вируса ядерного полиэдроза непарного шелкопряда *Lymantria dispar* L. // Вопросы вирусологии. No.1. С.41–43.
- Ильиных А.В., Бахвалов С.А., Кузьминов С.В., Ульянова Е.Г., Ильиных Ф.А. 2004. Биологическое подавление очагов массового размножения непарного шелкопряда (*Lymantria dispar* L., Lepidoptera: Lymantriidae) // Биотехнология. No.4. С.72–76.
- Ahmed S.L., Leather S.R. 1994. Suitability and potential of entomopathogenic microorganisms for forest pest management — some points for consideration // International Journal of Pest Manag. Vol.40. No.4. P.287–292.
- Baughner D.G., Yendol W.G. 1981. Virulence of *Autographa californica* baculovirus preparations fed with different food sources to cabbage loopers // Journal of Economic Entomology. Vol.74. No.3. P.309–313.
- Campbell R. 1983. Gypsy moth (Lepidoptera: Lymantriidae) control trials combining nucleopolyhedrosis virus, disparture and mechanical methods // Journal of Economic Entomology. Vol.76. No.3. P.610–614.
- Cunningham J.C., Kaup W.J., Fleming R.A., Brown K.W., Burns T. 1993. Development of nuclear polyhedrosis virus for control of gypsy moth (Lepidoptera: Lymantriidae) in Ontario. 2. Reduction in dosage and emitted volume (1989 and 1990) // Canadian Entomologist. Vol.125. No.3. P.489–498.
- Forti D., Joriatti C. 1988. Insecticidi di origine microbiologica: I virus // Inf. Fitopatol. Vol.38. No.12. P.21–24.
- Gottschalk K.W. 1990. Economic evaluation of gypsy moth damage in the United States of America // 19th World congress “Sci. Forest.: Iufro’s 2nd Century”. Montreal. P.235–246.
- Heinrichs J. 1982. A gypsy moth omnibus. A compendium of information on the forest’s most publicized pest // Journal of Forestry. Vol.80. No.9. P.573–578.
- Keating S.T., McCarthy W.J., Yendol W.C. 1989. Gypsy moth (*Lymantria dispar*) larval susceptibility to a baculovirus affected by selected nutrients, hydrogen ions (pH), and plant allelochemicals in artificial diets // Journal of Invertebrate Pathology. Vol.54. No.2. P.165–179.
- Lacey L.A., Frutos R., Kaya H.K., Vail P. 2001. Insect pathogens as biological control agents: do they have a future? // Biological Control. Vol.21. P.230–248.
- Liebold A.M., Halverson J.A., Elmes G.A. 1992. Gypsy-moth invasion in North-America — a quantitative analysis // Journal of Biogeography. Vol.19. No.5. P.513–520.
- Novotny J. 1988. The use of nucleopolyhedrosis virus (NPV) and microsporidia in the control of the gypsy moth (*Lymantria dispar* Linné) // Folia parasitologica. Vol.35. No.3. P.199–208.
- Podgwaite J.D. 1999. Gypchek, biological insecticide for the gypsy moth // Journal of Forestry. Vol.97. P.16–19.
- Podgwaite J.D., Reardon R.C., Walton G.S., Witcosky J. 1992a. Efficacy of aerially-applied Gypchek against gypsy moth (Lepidoptera: Lymantriidae) in the Appalachian Highlands // Journal of Entomological Science. Vol.27. P.337–344.
- Podgwaite J.D., Reardon R.C., Walton G.S., Venables L., Kolodny-Hirsch D.M. 1992b. Effects of aerially applied Gypchek on gypsy moth (Lepidoptera: Lymantriidae) populations in Maryland Woodlots // Journal of Economic Entomology. Vol.85. P.1136–1139.
- Podgwaite J.D., Mazzone H.M. 1981. Development of insect viruses as pesticides: the case of the gypsy moth (*Lymantria dispar* L.) in North America // Prot. Ecol. Vol.3. No.3. P.219–227.
- Reardon R.C., Podgwaite J.D. 1994. Summary of efficacy evaluations using aerial applied Gypchek (R) against gypsy moth in the U.S.A. // Journal of Environ Science Health B-Pestic. Vol.29. P.739–756.
- Skatulla U. 1987. Zur Disposition vor Raupenpopulationen verschiedener Herkunft des Schwammspinners (*Lymantria dispar*; Lep., Lymantriidae) gegenüber einem Kernpolyedrovirus // Anz. Schädling-sk., Pflanzenschutz, Umweltschutz. Bd.60. No.1. S.15–18.
- Somasekar S., Jayapragasam M., Rabindra R.J. 1993. Characterization of five Indian isolates of the nuclear polyhedrosis virus of *Helicoverpa armigera* // Phytoparasitica. Vol.21. No.4. P.333–337.
- Watanabe H., Wang Y., Nagata M. 1989. Сравнительная чувствительность к вирусу ядерного полиэдроза у линий *Bombyx mori*, разводимых на листьях шелковицы и искусственных диетах // Нихон сансигаку дзасси = J. Sericult. Sci. Jap. Vol.58. No.5. P.407–411.