

УДК: 578.841.2

Молекулярная диагностика бакуловирусов лугового мотылька из коллекции Всероссийского института защиты растений

Малыш Ю. М., Конончук А. Г., Фролов А. Н., Токарев Ю. С.

Два изолята бакуловирусов лугового мотылька *Loxostege sticticalis* (Lepidoptera: Pyraloidea), депонированных в коллекции энтомопатогенных микроорганизмов как вирусы гранулёза (GVLS-85), и ядерного полиэдроза (NPVLS-90) были подвергнуты генотипированию с использованием праймеров L8F2:L8R2, фланкирующих консервативный участок гена фактора поздней элонгации *lef8*. Оба изолята, протестированных независимо во избежание перекрёстной контаминации образцов, оказались принадлежащими к одному молекулярному гаплотипу. Данный гаплотип уникален и обладает максимальным сходством нуклеотидной последовательности на 73 % с *Pieris rapae granulovirus* (номер доступа в Генбанке JX968491) и с другими вирусами гранулёза. Существенного сходства данного гаплотипа с вирусами ядерного полиэдроза не обнаружено.

Ключевые слова: бакуловирусы, генотипирование, *lef8*, молекулярная филогения, луговой мотылёк

Molecular detection of baculoviruses of beet webworm from the collection of All-Russian Institute for Plant Protection

Malysh Yu. M., Kononchuk A. G., Frolov A. N., Tokarev Yu. S.

Two isolates of baculoviruses from beet webworm *Loxostege sticticalis* (Lepidoptera: Pyraloidea) deposited in the collection of entomopathogenic organisms as a granulovirus (GVLS-85) and a nucleopolyhedrovirus (NPVLS-90) have been subjected to genotyping using degenerate primers L8F2:L8R2 flanking a conservative region of late elongation factor gene *lef8*. Both isolates, tested independently to avoid sample cross-contamination, were found to belong to a single molecular haplotype. This haplotype is unique, showing maximum sequence similarity of 73 % to *Pieris rapae granulovirus* (Genbank accession number JX968491) and other granuloviruses. No significant similarity to available sequences of nucleopolyhedroviruses have been found.

Key words: baculoviruses, genotyping, lef8, molecular phylogeny, beet webworm

Бакуловирусы — широко распространённые в природе патогены насекомых, наиболее часто заражающие чешуекрылых фитофагов. Бакуловирусы — важный компонент природных экосистем и продуценты микробиологических препаратов, широко применяющихся во всем мире для борьбы с вредителями сельского и лесного хозяйства [1]. Кроме того, бакуловирусы используются в настоящее время как инструмент генной инженерии для гетерологичной экспрессии в клетках животных. Использование бакуловирусных изолятов в любых видах биологических исследований и испытаний требует идентификации вируса. Традиционно такая идентификация проводится на основе симптоматики вызываемого заболевания, гостальной специфичности, а точнее, видовой принадлежности первичного хозяина, и светомикроскопического анализа [2], что не удовлетворяет современным стандартам, поскольку при таком подходе практически невозможна дифференциация разных видов вирусов одной группы (ядерного полиэдроза или гранулёза), вызывающих заболевания сходной симптоматики у одного вида хозяина. Кроме того, сама по себе светооптическая диагностика вирусной инфекции у заражённых насекомых требует специальных методов окрашивания и достоверна только в отношении возбудителей ядерного полиэдроза, образующих достаточно крупные полиэдры. С другой стороны, широкое внедрение в практику биологических исследований методов молекулярно-генетического анализа позволяет проводить диагностику изучаемых объектов на основании определения первичной структуры нуклеиновых кислот, что обеспечивает гораздо более высокий уровень разрешающей способности, чем традиционные методы диагностики [5]. Высокая эволюционная лабильность геномов, свойственная, в частности, вирусам, требует использования вырожденных праймеров даже для консервативных участков ДНК [6, 8]. Данные о нуклеотидных последовательностях ДНК служат основой для разработки видоспецифичных праймеров, более эффективных для ПЦР-диагностики, чем вырожденные праймеры.

Луговой мотылёк *Loxostege sticticalis* (Lepidoptera: Pyraloidea) — особо опасный многоядный вредитель, которого отличают внезапные крупномасштабные вспышки массового размножения, чередующиеся с длительными периодами депрессий. Помимо широчайшего диапазона изменений численности, луговому мотыльку свойственны дальние миграции и кочевые пере-

мещения, сильная агрегированность пространственного распределения и фазовая изменчивость. Для лугового мотылька отмечен широкий круг паразитов, хищников и патогенных микроорганизмов, насчитывающий около 200 видов. Вирусные инфекции лугового мотылька, наряду с другими патогенами, предположительно способны оказывать существенное влияние на динамику численности насекомого [3], а вирус гранулёза лугового мотылька служит продуцентом микробиологического препарата для борьбы с вредителем [4].

Коллекция Всероссийского института защиты растений содержит природные изоляты бакуловирусов различного происхождения, как собранные сотрудниками института, так и депонированные другими организациями. Среди образцов коллекции имеются два изолята бакуловирусов лугового мотылька, поступившие на депонирование из Сибирского НИИ Земледелия и Химизации Сельского Хозяйства СО РАСХН (Новосибирская область) и обозначенные как вирус ядерного полиэдроза от 1990 г. (NPVLS-90) и вирус гранулёза от 1985 г. (GVLS-85). Для корректной идентификации вирусов на современном уровне нами проведён анализ нуклеотидных последовательностей консервативного участка гена фактора поздней элонгации *lef8*. Важно отметить, что каждый из охарактеризованных на молекулярно-генетическом уровне вирусов ядерного полиэдроза и гранулёза (для которых депонированы данные в Генбанке) обладает уникальным молекулярным гаплотипом гена *lef8*, то есть данный маркер идеально подходит для видовой идентификации бакуловирусов.

Для проведения экспериментальных процедур небольшие порции (объёмом около 20—40 мкл) лиофилизированного материала, содержащего вирусные частицы, были использованы для экстракции вирусной ДНК путём лизиса образцов в 2 %-ном растворе цетилтриметиламмоний бромидом с добавлением 0.2 % бета-меркаптоэтанола в течение 1 часа при 65° С с последующим удалением примесей хлороформом, преципитацией в изопропанол и отмывкой 70 %-ным этанолом. Отмытые и подсушенные осадки ресуспендировали в ультраочищенной воде. Амплификацию ДНК проводили методом стандартной ПЦР с вырожденными праймерами L8F2:L8R2 [6] с использованием Colored Taq-полимеразы («Силекс», Москва). ПЦР-продукты разделяли в 1 %-ном агарозном геле, полосы размером около 500 н.о., соответствующие специфическому положительному сигналу, вырезали скальпелем на трансиллюминаторе и замораживали до последующей очистки. Очистку ампликонов проводили методом сорбции ДНК на оксиде кремния после расплавления геля в 3 М растворе гуанидин изотиоцианата с последующей отмывкой смесью

спиртов на буферном растворе и элюцией в воде. Секвенирование проводили по методу Сэнгера на капиллярном секвенаторе ABI Prism 3500. Весь конвейер процедур от экстракции до секвенирования ДНК проводили два раза, при этом ДНК из образцов NPVLS-90 и GVLS-85 экстрагировали в разных сериях образцов и в разные дни с целью полностью исключить возможность перекрёстной контаминации этих образцов. Полученные сиквенсы сравнивали с таковыми, депонированными в Генбанке, с помощью встроенной утилиты BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) по алгоритмам megablast, discontinuous megablast и blastn, осуществляющих поиск и сравнение сиквенсов, обладающих высоким, средним и низким уровнями сходства, соответственно. Гомологичные сиквенсы использовали для элайнмента в приложении BioEdit [7] с последующей конверсией в файл формата NEXUS, на основании которого проводили филогенетическое построение методом байесовского заключения в программе MrBayes [9] с использованием стандартной модели GTR+I+G по алгоритму MCMC на протяжении 500000 генераций до достижения показателя average standard deviation of split frequencies значения ниже 0.01.

В результате проведённых экспериментов для обоих образцов и в двух повторениях получен идентичный сиквенс. Его анализ с помощью BLAST-утилиты по алгоритму megablast (используемому по умолчанию) не дал результатов из-за высокой вариабельности нуклеотидных последовательностей вирусной ДНК. Поиск по алгоритму discontinuous megablast показал максимальное сходство с последовательностями гена *lef8* *Pieris rapae granulovirus* (номер доступа в Генбанке JX968491) и других грануловирусов на уровне 70—73 % при перекрытии сравниваемых позиций (query cover) на 58—100 %. В одном случае обнаружено более высокое сходство (85 %) анализируемого сиквенса с таковым *Epinotia aporema granulovirus* (номер доступа JN408834), однако перекрытие области элайнмента составило лишь 47 % от анализируемой последовательности, то есть такой относительно высокий уровень гомологии наблюдался менее чем для половины сиквенса. Общий уровень сходства сравниваемых участков генома вируса лугового мотылька и *Epinotia aporema granulovirus* не превышал 60 %. В отношении вирусов ядерного полиэдроза (отображаемых в таблице результатов только в случае использования алгоритма blastn) выявленная область перекрытия сравниваемых позиций, где сходство нуклеотидных последовательностей с анализируемым сиквенсом составляло от 67 до 100 %, не превышала 26 %, то есть фактически гомологичные участки, достаточно протяжённые для достоверного сравнения, отсутствовали (Рисунок 1).

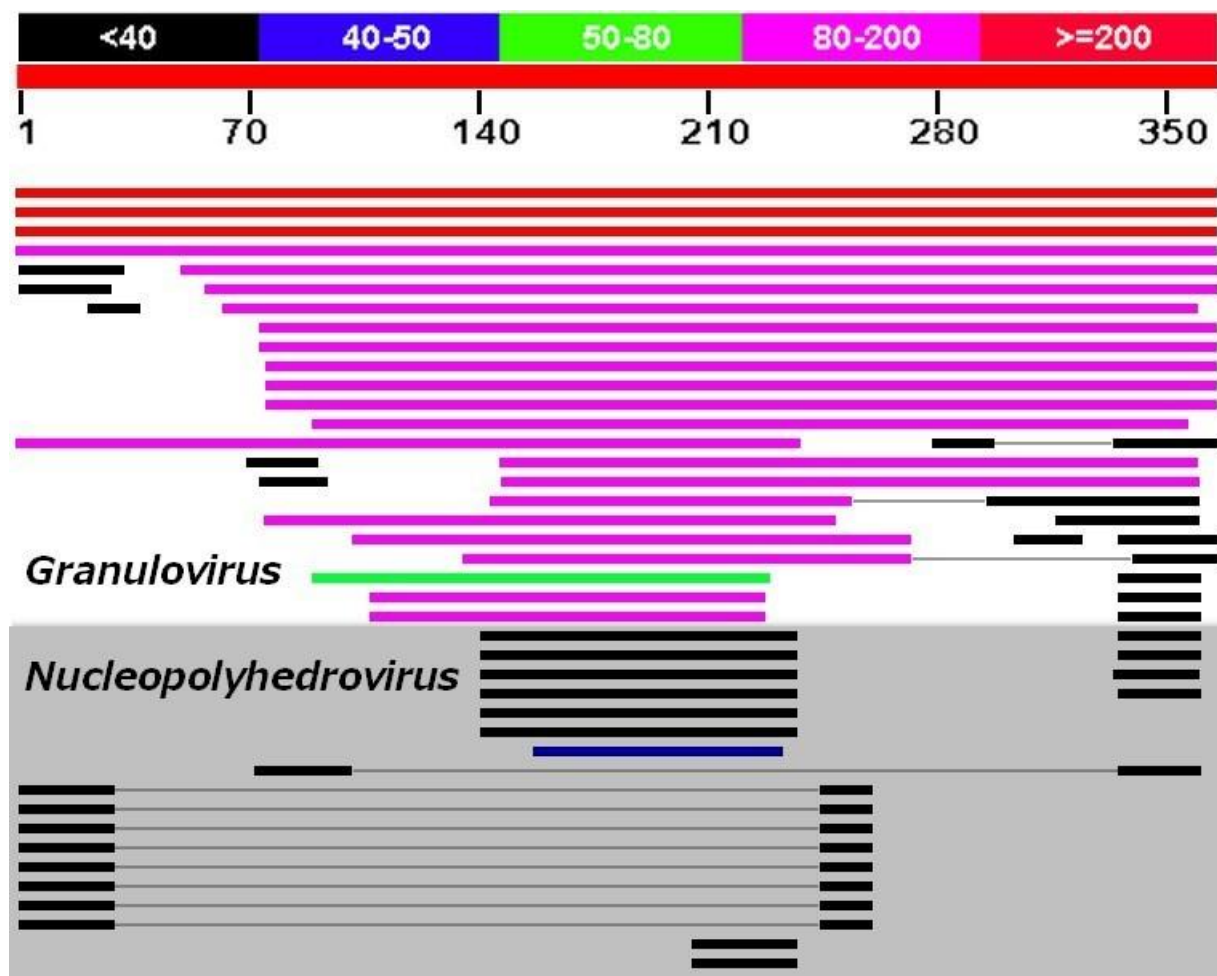


Рисунок 1 — Графическая схема распределения областей перекрытия сравниваемых позиций гомологичных последовательностей гена *lef8* вирусов гранулёза (*Granulovirus*, белый фон) и ядерного полиэдроза (*Nucleopolyhedrovirus*, серый фон) по отношению к анализируемому сиквенсу изолята GVLS-85, по результатам анализа с помощью утилиты BLAST на сервере Генбанка. На цветовой шкале указаны размеры гомологичных областей (н.о.)

На филограмме группа таксонов, обладающих наибольшим сходством нуклеотидной последовательности гена *lef8* с изолятом GVLS-85, образовала три кластера, два из которых имели высокую поддержку ветвей (значения постериорной вероятности составили 0.99 и 1.00, соответственно), а третий носил политомический характер, имея примерно равную вероятность для разных вариантов дихотомии составляющих его таксонов, среди которых находился и GVLS-85 (Рисунок 2). Альтернативные варианты филогенетических реконструкций с использованием разных наборов таксонов и внешних групп не привели к разрешению указанной политомии (не показано). Очевидно, локус *lef8* для данной группировки таксонов обладает низким филогенетическим сигналом; более чёткая филогенетическая реконструкция будет

возможна при привлечении дополнительных локусов и новых таксонов (по мере их обнаружения).

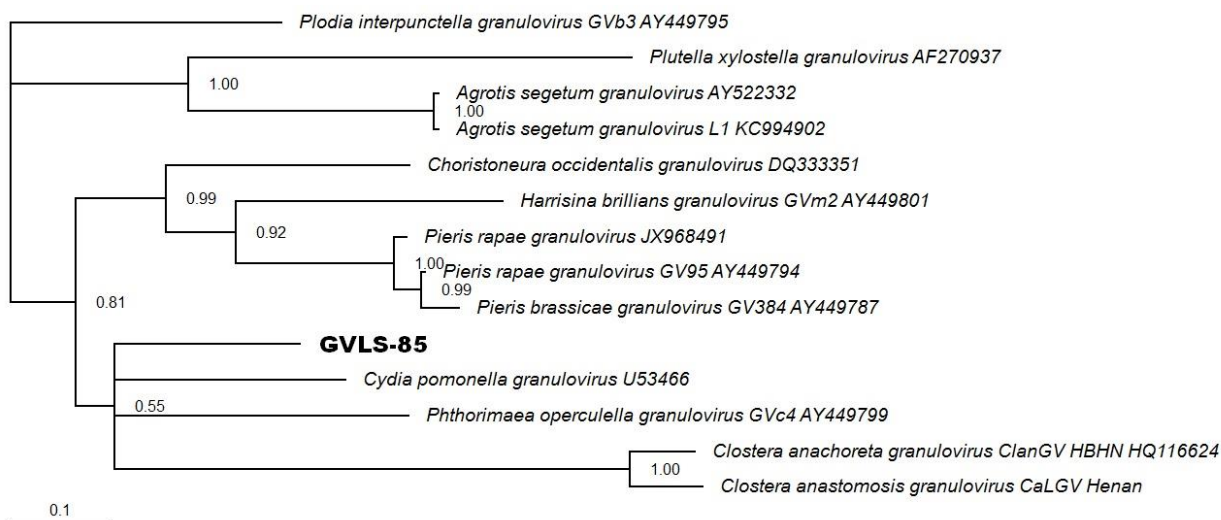


Рисунок 2 — Филограмма, построенная методом байесовского заключения в MrBayes 3.1.2 на основании элайнмента нуклеотидных последовательностей гена *lef8*, полученных в настоящей работе для изолята GVLS-85 (выделено полужирным шрифтом) и загруженных из Генбанка. Числа на развилках указывают значения постериорной вероятности. На масштабной линейке отмечено число ожидаемых замен на один нуклеотидный сайт. Аннотация таксонов включает вид вируса, название изолята (при наличии) и номер доступа к сиквенсу гена *lef8* (или полного генома), депонированному в Генбанке

Таким образом, на основании полученных данных можно сделать следующие выводы. Во-первых, оба проанализированных образца бакуловирусов лугового мотылька относятся к одному молекулярному гаплотипу. Во-вторых, данный гаплотип характеризует проанализированные образцы как изоляты одного, ранее не охарактеризованного вида *Granulovirus*, то есть первичная идентификация образца NPVLS-90 как вируса ядерного полиэдроза не соответствует данным молекулярно-генетического анализа. В-третьих, полученные данные об уникальной нуклеотидной последовательности вируса гранулёза лугового мотылька могут быть использованы для разработки видоспецифичных праймеров для экспресс-диагностики данного вируса в различных пробах.

Авторы благодарны бывшему куратору коллекции энтомопатогенных вирусов ВИЗР В.Б. Митрофанову за предоставленные образцы вирусов и сотруднику ИСиЭЖ СО РАН В.В. Мартемьянову за консультирование по вопросам работы с бакуловирусами. Работа поддержана грантами Совета по грантам Президента РФ (№ МК-1175.2013.4) и РФФИ (№ 12-04-00693-а).

Литература

1. Бахвалов, С. А. Вирозы насекомых // Патогены насекомых: структурные и функциональные аспекты / Глупов В.В., ред. М.: Круглый год, 2000. — С. 20—75.
2. Митрофанов, В. Б., Симонова, А. С., Смирнов, О. В. Методические указания по изучению и диагностике виrozов насекомых. Л.: ВИЗР, 1985. — 20 с.
3. Фролов, А. Н., Саулич, М. И., Малыш, Ю. М., Токарев, Ю. С. Луговой мотыльк: цикличность многолетней динамики численности // Защита и карантин растений. 2010. № 2. — С. 49—54.
4. Цветкова В.П. Вирус гранулёза лугового мотылька — основа препарата для борьбы с вредителем // Автореф. дисс. на соскание уч. ст. к.б.н. Новосибирск, 1993. — 18 с.
5. Harrison, R. L., Bonning, B. C. The nucleopolyhedroviruses of *Rachiplusia ou* and *Anagrapha falcifera* are isolates of the same virus // J. Gen. Virol., 80, 1999. — P. 2793—2798.
6. Herniou, E. A., Olezewski, J. A., O'Reilly, D. R., Cory, J. S. Ancient coevolution of baculoviruses and their insect hosts // J. Virol., 78, 2004. — P. 3244—3251.
7. Hall, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT // Nucleic Acids Symp. Ser., 41, 1999. — P. 95—98.
8. de Moraes, R. R., Maruniak, J. E. Detection and identification of multiple baculoviruses using polymerase chain reaction (PCR) and restriction endonuclease analysis // J. Virological Methods, 63, 1997. — P. 209—217.
9. Ronquist, F. Huelsenbeck, J. P. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models // Bioinformatics, 19, 2003. — P. 1572—1574.

Literature

1. Baxvalov, S. A. Virozy nasekomyx // Patogeny nasekomyx: strukturnye i funkcional'nye aspekty / Glupov V. V., red. M.: Kruglyj god, 2000. — S. 20—75.
2. Mitrofanov, V. B., Simonova, A. S., Smirnov, O. V. Metodicheskie ukazaniya po izucheniyu i diagnostike virozov nasekomyx. L.: VIZR, 1985. — 20 s.
3. Frolov, A. N., Saulich, M. I., Malysh, Ju. M., Tokarev, Yu. S. Lugovoj motylyok: ciklichnost' mnogoletnej dinamiki chislennosti // Zashhita i karantin rastenij. 2010. N 2. — S. 49—54.

4. Cvetkova V. P. Virus granulyoza lugovogo motyl'ka — osnova preparata dlya bor'by s vreditel'em // Avtoref. diss. na soiskanie uch. st. k.b.n. Novosibirsk, 1993. — 18 s.
5. Harrison, R. L., Bonning, B. C. The nucleopolyhedroviruses of *Rachiplusia ou* and *Anagrapha falcifera* are isolates of the same virus // J. Gen. Virol., 80, 1999. — P. 2793—2798.
6. Herniou, E. A., Olezewski, J. A., O'Reilly, D. R., Cory, J. S. Ancient coevolution of baculoviruses and their insect hosts // J. Virol., 78, 2004. — P. 3244—3251.
7. Hall, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT // Nucleic Acids Symp. Ser., 41, 1999. — P. 95—98.
8. de Moraes, R. R., Maruniak, J. E. Detection and identification of multiple baculoviruses using polymerase chain reaction (PCR) and restriction endonuclease analysis // J. Virological Methods, 63, 1997. — P. 209—217.
9. Ronquist, F. Huelsenbeck, J. P. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models // Bioinformatics, 19, 2003. — P. 1572—1574.