

УДК 638.2:[591.1+577.1]

©1998г. И.П. СУХАНОВА¹⁾

ГЕНЕТИЧЕСКИЕ РАЗЛИЧИЯ ПОКАЗАТЕЛЕЙ НЕСПЕЦИФИЧЕСКОЙ УСТОЙЧИВОСТИ И КЛЕТОЧНОГО ИММУНИТЕТА ПОРОД ТУТОВОГО ШЕЛКОПРЯДА (*BOMBYX MORI L.*) ПРИ ЗАРАЖЕНИИ ВИРУСОМ ЯДЕРНОГО ПОЛИЭДРОЗА

ВВЕДЕНИЕ

Одним из наиболее распространенных вирусных заболеваний тутового шелкопряда, которые наносят значительный ущерб шелководству, является ядерный полиэдроз (желтуха).

В ряде публикаций описаны генетические различия в устойчивости пород и линий шелкопряда к этому заболеванию (Головки и др., 1992; Мусаева, 1992). Генетическую природу устойчивости к желтухе объясняют как особыми ядерными генами, так и фактором, имеющим цитоплазматическую локализацию (Aruga, 1961; Aruga, Watanabe, 1964). А также – наследственными особенностями рецепторов клеток насекомого и капсида вируса, комплементарность которых определяет возможность заражения (Михайлов, 1984).

Вопрос о специфичности устойчивости к ядерному полиэдрозу остается открытым, поскольку она коррелирует с некоторыми проявлениями неспецифической устойчивости тутового шелкопряда (Черныш, Лухтанов, 1979; Watanabe, 1986). Известно, что одним из показателей неспецифической устойчивости изучаемого объекта являются эмбриональная терморезистентность (Шахбазов и др., 1996)²⁾ и фагоцитарная активность гемоцитов (Heimel, Harshbarger, 1965; Шаламова, 1997). Однако вопрос о взаимосвязи неспецифической устойчивости тутового шелкопряда и устойчивости к ядерному полиэдрозу, а также об участии клеточного иммунитета в противовирусной резистентности, недостаточно изучен.

Это определило цель настоящего исследования: провести сравнительное изучение показателей устойчивости к ядерному полиэдрозу, эмбриональной терморезистентности и фагоцитарной активности гемоцитов различных пород тутового шелкопряда; установить роль клеточного звена в противовирусной резистентности, исследуя изменения гемоцитарного состава гемолимфы и значений суммарного фагоцитоза у гусениц, выживших после инфицирования возбудителем ядерного полиэдроза.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Объектами исследований служили грена, гемолимфа гусениц и гусеницы тутового шелкопряда (*Bombyx mori L.*) пород Дайзо (выскоусойчивая к желтухе (Михайлов, 1984)), и Украинская новая (УН).

Эмбриональную терморезистентность определяли модифицированным методом термотеста В.Г. Шахбазова (1966, 1975), путем водного прогрева грены (+ 47 °С) в ультратермостате "МТА Kutesz LP201/1" при экспозиции 20 мин, как отношение процента выхода "мурашей" (оживление грены) в опыте к соответствующему контрольному варианту. Повторность десятикратная по 100 яиц в каждой.

Устойчивость пород к ядерному полиэдрозу оценивали по показателям жизнеспособности тутового шелкопряда, инфицированного на стадии гусеницы во 2-й день V

¹⁾ научные руководители: доктор биол. наук, профессор В.Г. Шахбазов; доктор вет. наук И.А. Кириченко

²⁾ автор статьи приносит извинения проф. В.Г. Шахбазову за ошибку, допущенную в статье «Биологические показатели семей тутового шелкопряда (*Bombyx mori L.*), различных по уровню эмбриональной терморезистентности» // Изв. Харьков. энтомол. о-ва.– 1997.– Т. 5.– Вып.2.– С. 110. Строку «...грены породы Б-2. Тестирование проводилось согласно методике при температуре + 47 °С на 3-и...», следует читать так: «...грены породы Б-2. Тестирование проводилось согласно методике термотеста В.Г. Шахбазова (1966, 1975), адаптированной для тутового шелкопряда (Шахбазов и др., 1996,) при температуре + 47 °С на 3-и...»

Устойчивость пород к ядерному полиэдрозу оценивали по показателям жизнеспособности тутового шелкопряда, инфицированного на стадии гусеницы во 2-й день V возраста вирусной суспензией, содержащей 25 тысяч полиэдров желтухи в 1 мм^3 . Повторность трехкратная по 50 гусениц в каждой.

При исследовании изменений фагоцитарной активности гемоцитов и их количественного соотношения в гемолимфе заражение гусениц проводили индивидуально во 2-ой день V возраста разработанным нами капельным методом. Метод заключается в скармливании гусеницам с кормом капли объемом 0,2 мл вирусной суспензии, содержащей 25 тысяч полиэдров в 1 мм^3 .

Изменения фагоцитарной активности всех типов гемоцитов (суммарного фагоцитоза) определяли на протяжении 4-х суток после заражения (опытные варианты). С этой целью у гусениц отбирали 0,1 мл гемолимфы, добавляли 0,1 мл микробной суспензии *Staphylococcus aureus* и перемешивали. Использовали суспензию с содержанием 1 млрд микробных клеток в 1 мл, приготовленную с помощью оптических стандартов мутности. Пробирки с указанными компонентами помещали на 30 минут в термостат при температуре 25 °С. Содержимое пробирок встряхивали каждые 5 минут. Готовили мазки, которые сушили на воздухе, фиксировали на протяжении 3-х минут 1 %-ным раствором сульфата цинка и красили по Романовскому–Гимза. Мазки микроскопировали на микроскопе "Биолам" при увеличении 15×90 (масляная иммерсия). Определяли соотношение профагоцитированных и непрофагоцитированных гемоцитов на 100 зрелых дифференцированных клеток (пролейкоцитов, макронуклеоцитов, микронуклеоцитов, эозинофилов, фагоцитов, эноцитозидов). Параллельно оценивали гемограмму (соотношение форменных элементов гемолимфы). Повторность десятикратная. В контрольных вариантах (незараженные гусеницы) гемолимфу для исследований отбирали в соответствующий возрастной период.

С целью выявления выживших после инфицирования особей выкормка опытных гусениц велась индивидуально до стадии имаго.

При математической обработке экспериментальных данных использовали общепринятые в биологии статистические методы (Лакин, 1990).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

При сравнительном изучении эмбриональной терморезистентности тутового шелкопряда пород Дайзо и УН и его жизнеспособности при инфицировании на стадии гусеницы возбудителем ядерного полиэдроза (табл.) установлено, что у породы Дайзо оба показателя превышают соответствующие для УН ($P < 0,05$).

Таблица

Эмбриональная терморезистентность тутового шелкопряда разных пород и его жизнеспособность при заражении на стадии гусеницы вирусом ядерного полиэдроза ($M \pm m$)

Порода	Эмбриональная терморезистентность, %	Жизнеспособность, %
Дайзо	$27,26 \pm 1,47$	$84,00 \pm 0,82$
УН	$23,66 \pm 0,67$	$62,00 \pm 1,16$

Показатель суммарного фагоцитоза (рис.1) у контрольных гусениц породы Дайзо на протяжении 1 – 2 суток исследования достоверно выше, чем у породы УН.

Следовательно, имеется положительная взаимосвязь между данным показателем, эмбриональной терморезистентностью и жизнеспособностью шелкопряда при заражении вирусом ядерного полиэдроза.

В опытных вариантах межпородные различия по показателю суммарного фагоцитоза более контрастны и наблюдаются на протяжении первых 3-х суток после заражения.

Возрастание степени различий обусловлено достоверным (в большинстве случаев) повышением значений изучаемого показателя у инфицированных, по сравнению с контрольными, гусениц породы Дайзо (рис.1). Очевидно, у Дайзо попадание в гемоцель вируса ядерного полиэдроза приводит к реализации механизмов активирования клеток гемолимфы, как это имеет место при бактериальном инфицировании насекомых (Brehelin, Voemare, 1988). Нивелирование различий между опытными и контрольными вариантами по показателю суммарной фагоцитарной активности гемоцитов у Дайзо, которое наблюдалось на 4-е сутки исследования, может свидетельствовать как об инактивации вируса, так и о возможном его переходе в патентное состояние (Гершензон, 1961).

У породы УН (рис. 1), в отличие от Дайзо, суммарный фагоцитоз после заражения не превышает контрольных значений.

Приведенные результаты свидетельствуют о глубоких различиях в реактивности иммунной системы пород при заражении вирусом полиэдроза.

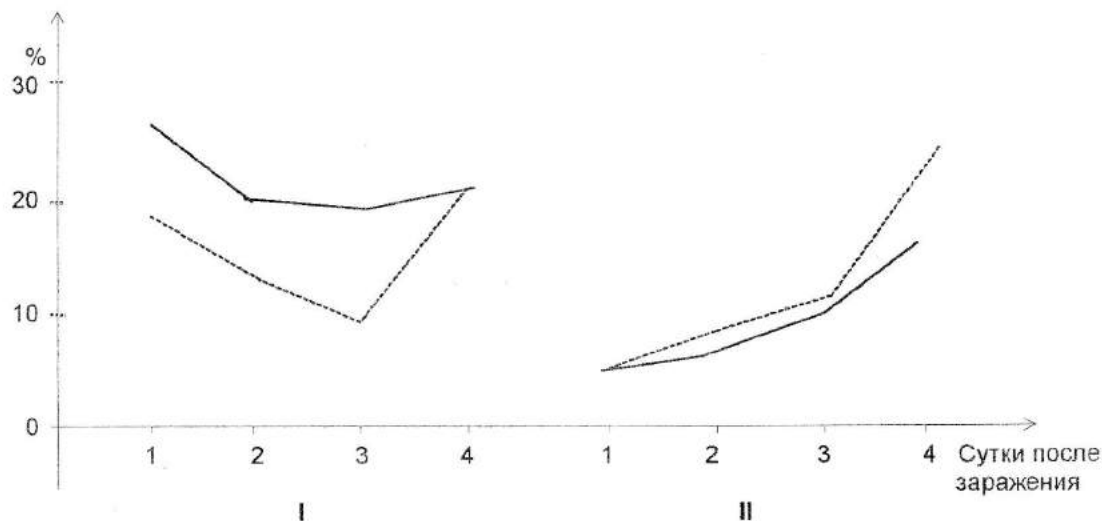


Рис. 1. Изменение показателя суммарного фагоцитоза у гусениц пород Дайзо (I) и УН (II) — опыт (зараженные гусеницы), — контроль (незараженные гусеницы)

Как видно из рис.1, межпородные различия по показателям суммарной фагоцитарной активности гемоцитов исчезают на 3-и (контрольные варианты) и 4-е (опытные) сутки исследования. Следовательно, дифференциацию генотипов по данному признаку целесообразно проводить в соответствующие возрастные периоды тутового шелкопряда — 2 — 4 дни V возраста. Это может иметь значение для практического шелководства, поскольку суммарный фагоцитоз является одним из показателей неспецифической устойчивости тутового шелкопряда.

При исследовании изменений соотношения форменных элементов гемолимфы установлено, что у породы Дайзо (рис. 2) в 1 — 2 сутки после заражения достоверно уменьшается количество молодых форм гемоцитов (пролейкоцитов, макронуклеоцитов) и имеет место приток зрелых клеток (фагоцитов), уровень которых на протяжении 2 — 3 суток исследования остается выше контрольного в 3,7 — 5,1 раз.

Полученные данные свидетельствуют об усилении процессов дифференциации молодых клеток в направлении образования фагоцитов, что, по-видимому, вызвано вирусной инфекцией. Очевидно, фагоциты в данном случае выполняют защитную функцию и являются основой клеточного звена противовирусной резистентности у Дайзо.

Наблюдаемое к 4-ым суткам снижение количества данных клеток может свидетельствовать об их гибели в процессах фагоцитоза. В тот же период отмечено возрастание численности молодых гемоцитов, дальнейшая дифференциация которых может привести к восстановлению пула фагоцитов. Подобные изменения соотношения форменных элементов гемолимфы гусениц, выживших после инфицирования вирусом ядерного полиэдроза, описаны для кольчатого шелкопряда, соснового шелкопряда и соснового пилильщика (Ильинский, Тропин, 1965). При этом авторы отмечают возможность выживания насекомых либо за счет гибели возбудителя болезни, либо за счет его перехода в латентное состояние. Не исключено наличие аналогичных процессов у тутового шелкопряда.

У породы УН (рис. 2), как и у Дайзо, в 1-е сутки исследования установлено достоверное, по сравнению с контролем, уменьшение количества макронуклеоцитов. Однако повышается уровень пролейкоцитов, а численность фагоцитов на протяжении всего исследования остается в пределах контроля. Следует отметить достоверное повышение уровня микронуклеоцитов у породы УН во 2 — 3 сутки после заражения, что по тенденции сходно с изменениями количества фагоцитов у инфицированных гусениц породы Дайзо.

Микронуклеоциты, как и фагоциты, являются зрелыми высокодифференцированными формами гемоцитов. Однако эти форменные элементы гемолимфы — конечный продукт иного,

функцию. Возможно, что у породы УН именно эти клетки обеспечивают процессы инактивации вируса. Вместе с тем, повышение уровня микронуклеоцитов не приводит к усилению реактивности клеточного иммунитета у породы УН при заражении, что видно из значений суммарного фагоцитоза (рис. 1).

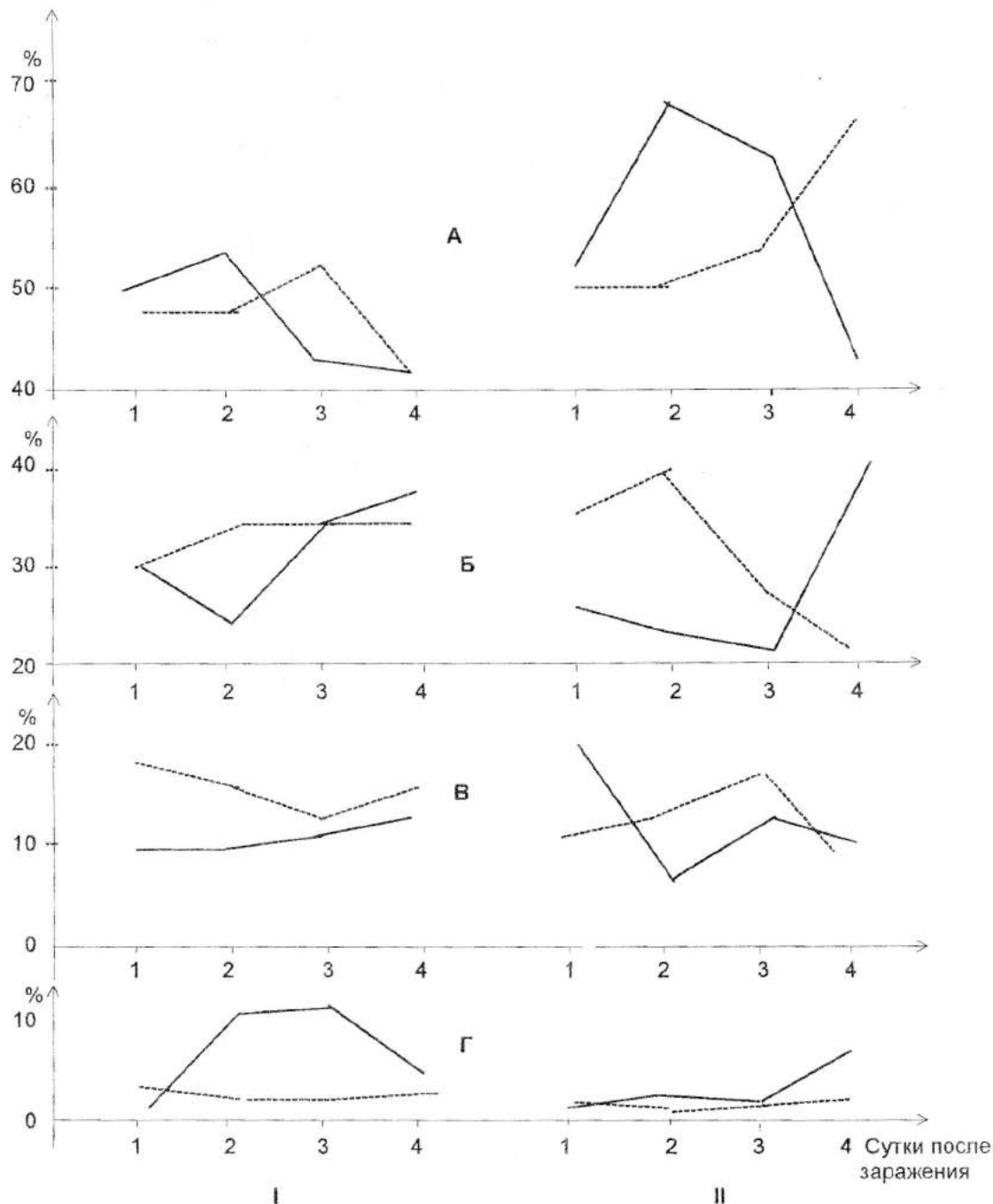


Рис. 2. Динамика изменений соотношения форменных элементов гемолимфы у пород Дайзо (I) и УН (II)

— опыт (зараженные гусеницы), — контроль (незараженные гусеницы)
 А — микронуклеоциты, Б — макронуклеоциты, В — пролейкоциты, Г — фагоциты¹⁾

¹⁾ количество эозинофилов и эоциитоидов на протяжении исследования достоверно не отличалось от контроля и находилось в пределах 0 – 0,1 % для Дайзо и 0 – 0,3 % для УН

ВЫВОДЫ

1. Генетические различия в неспецифической устойчивости тутового шелкопряда, которые определены методом термотеста, соответствуют различиям в фагоцитарной активности гемоцитов и устойчивости к ядерному полиэдрозу.
2. Высокая устойчивость к ядерному полиэдрозу тутового шелкопряда породы Дайзо связана с повышенной реактивностью системы фагоцитоза.
3. Межпородные различия в системе клеточного иммунитета заключаются в том, что у Дайзо защитные функции выполняют в основном фагоциты, у УН-микронуклеоциты. Однако при общем понижении фагоцитарной активности гемоцитов у инфицированных гусениц УН, микронуклеоциты не обеспечивают высокий уровень устойчивости к желтухе.
4. Для практического шелководства можно рекомендовать проведение прогнозирования неспецифической устойчивости тутового шелкопряда по показателю суммарной фагоцитарной активности во 2 – 4 дни V возраста, когда межпородные различия наиболее ярко выражены.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Гершензон С.М. Явление латентности у полиэдрных вирусов насекомых // Журн.общ.биол.– 1961.–Т. 22.– N1.– С. 32–41.
- Головко В.О., Кириченко І.О.,Дмитрієва О.В., Клименко В.В. Шляхи виведення гібридів шовковичного шовкопряда, стійких до вірусу ядерного поліедрозу// Тези доповідей IV з'їзду Українського ентомологічного товариства.– Харків.– 1992.– С. 45.
- Лакин Г.Ф. Биометрия.– М.: Высшая школа, 1990. – 344с.
- Михайлов Е.М. Инфекционные болезни тутового шелкопряда.– Ташкент: Укитувчи, 1984.– 296 с.
- Мусаева М.Р. Изыскание способа повышения устойчивости гибридов тутового шелкопряда (F1) к ядерному полиэдрозу: Автореф.дис. ...канд. с.-хоз. наук. – Гянджа., 1992.– 20 с.
- Ильинский А.И., Тропин И.В. Надзор, учет и прогнозирование массовых размножений хвое- и листогрызущих насекомых в лесах СССР. – М.: Лесная промышленность, 1965.– 525 с.
- Оцінка життєздатності та неспецифічної стійкості порід і гібридів шовковичного шовкопряда методом термотестування / В.Г. Шахбазов, В.О.Головко, О.О. Шаламова та ін. // Шовківництво.– 1996 – Вип. 21.– С. 3–6.
- Сиротина М.И. Генезис форменных элементов крови у здоровых и больных гусениц и бабочек дубового шелкопряда // Докл. ВАСХНИЛ.– 1949.– Вып. 4.– С. 22 – 28.
- Черныш С.И., Лухтанов В.А. Корреляция устойчивости к ядерному полиэдрозу и интоксикации формальдегидом у тутового шелкопряда // Шелк.– 1979.– N4. –С. 13–14.
- Шаламова О.А. Генетичні відмінності порід і гібридів шовковичного шовкопряда в реакції на термічні впливи: Автореф.дис. ... канд.биол.наук. – Харків., 1997, –19 с.
- Шахбазов В.Г. Гетерозис и теплоустойчивость // Бюл.Моск. о-ва испыт. природы. Отд. биол. – 1966.– Т. 71. – N6. – С. 120–127.
- Шахбазов В.Г. Прогнозирование эффекта гетерозиса семян сельскохозяйственных растений методом термотестирования // Гетерозис сельскохозяйственных растений, его физико-биохимические и биофизические основы. – М., 1975.– С. 224–229.
- Aruga H. The induction and resistance to nuclear and cytoplasmic polyedrosis virus in the silkworm // Indian J. Sericult.– 1961.– V. 13.– P. 71–82.
- Aruga H., Watanabe H. Resistance to per os infection with cytoplasmic polyedrosis virus in the silkworm, Bombyx mori // J. Insect Pathol.– 1964.– V. 6.– P. 387–394.
- Brehelin M., Voemare N. // J. Compar.Physiol.– 1988.– V. 157.– P. 759.
- Heimel A.M., Harshbarger J.S. Immuniti in insect // Bakteriол. rev.– 1965.– V. 29.– N3.– P. 397–405
- Watanabe H. Resistance of silkworm, Bombyx mori, to viral infectionth // Agr. Ecosyst. Environ.– 1986.– V. 15.– N2. – P. 131–139.

Институт Шелководства УААН, г. Мерефа

I.P. SUKHANOVA

**THE GENETIC DIFFERENCES OF INDICATORS OF NONSPECIFIC RESISTANCE AND
CELLULAR IMMUNITY OF SILKWORM RACES (BOMBYX MORI L.) WHEN INFECTED WITH
NUCLEAR POLYEDROSIS VIRUS**

Sericultural Institute, Merefa

S U M M A R Y

A comparative investigation of indicators of nonspecific resistance to nuclear polyedrosis and cellular immunity of Diyzo silkworm race (more resistant to virus) and Ukrainian New race (less resistant to virus) has been carried out.

A positive correlation between indicators of nonspecific resistance and resistance to nuclear polyedrosis and genetic differences in cellular immunity reaction and changes of haemocytic composition of blood when infected with nuclear polyedrosis virus has been found.