

Практична робота 1

ТЕМА: «ВІРУСИ ЯК БІОЛОГІЧНІ АГЕНТИ РЕГУЛЮВАННЯ ЧИСЕЛЬНОСТІ ШКІДЛИВИХ ОРГАНІЗМІВ В ОРГАНІЧНОМУ ВИРОБНИЦТВІ»

Мета роботи: Ознайомитися з основними групами ентомопатогенних вірусів, які використовують або розглядають як перспективні біологічні агенти регулювання чисельності шкідливих комах; вивчити особливості їхньої будови, біології та механізму патогенної дії; з'ясувати значення вірусних біопрепаратів у системах захисту рослин за органічного виробництва.

Матеріали та обладнання: Мікроскопи; постійні та тимчасові мікропрепарати тканин комах, уражених ентомопатогенними вірусами; демонстраційні матеріали із зображеннями вірусних частинок і тіл включення; предметні та покривні скельця; піпетки або крапельниці; дистильована вода; серветки для оптики; атласи та визначники шкідливих комах; інформаційні матеріали щодо біологічних засобів захисту рослин.

ТЕОРЕТИЧНІ ВІДОМОСТІ

Віруси — неклітинні інфекційні агенти, генетичний матеріал яких представлений ДНК або РНК. Вони не мають власного повноцінного апарату синтезу білка та здатні розмножуватися лише всередині живих клітин організму-хазяїна, тому є облігатними внутрішньоклітинними паразитами.

Повноцінна інфекційна вірусна частинка, яка перебуває поза клітиною та здатна інфікувати чутливі клітини, називається **віріоном**. Віріон складається з нуклеїнової кислоти та білкової оболонки — капсиду; у деяких вірусів наявні додаткові оболонки.

У захисті рослин особливе значення мають **ентомопатогенні віруси**, природними хазяями яких є комахи. Вони здатні спричиняти вірусні захворювання шкідників, знижувати їхню життєздатність і чисельність та завдяки високій специфічності можуть використовуватися як компоненти біологічного захисту рослин.

Особливе практичне значення мають **бакуловіруси (Baculoviridae)**, насамперед віруси ядерного поліедрозу та гранульозу. Вони уражують переважно личинок комах ряду Лускокрилі (Lepidoptera), серед яких є значна кількість небезпечних шкідників сільськогосподарських культур.

Для багатьох бакуловірусів характерне формування **тіл включення**, які захищають вірусні частинки від несприятливих чинників навколишнього середовища та сприяють їхньому поширенню. Зараження комах здебільшого відбувається аліментарним шляхом — під час споживання личинками корму, на поверхні якого містяться вірусні включення.

Після потрапляння до травного тракту комахи тіла включення руйнуються, вивільнені вірусні частинки інфікують клітини кишечника, а надалі інфекційний процес може поширюватися на інші тканини. У хворих личинок спостерігаються зниження рухової та живильної активності, порушення фізіологічних процесів, зміна забарвлення і структури тканин та, зрештою, загибель.

Використання ентомопатогенних вірусів у системах захисту рослин має низку важливих особливостей. Насамперед це висока специфічність щодо організму-господаря, завдяки чому їх застосування дає змогу цілеспрямовано впливати на певні види або групи шкідників, мінімально порушуючи функціонування корисної ентомофауни агроценозу.

Вірусні біологічні агенти не слід ототожнювати з фітопатогенними вірусами. Фітопатогенні віруси спричиняють захворювання рослин і є об'єктами фітосанітарного контролю, тоді як ентомопатогенні віруси уражують комах і можуть бути використані для біологічного регулювання чисельності шкідників.

У системі захисту рослин за органічного виробництва застосування біологічних агентів ґрунтується на максимальному використанні природних механізмів регуляції чисельності шкідливих організмів. Ентомопатогенні віруси є одним із таких природних регуляторів і можуть бути складовою інтегрованих біологічних заходів разом з ентомопатогенними бактеріями, грибами, нематодами, паразитоїдами та хижими членистоногими.

Основні групи вірусів, пов'язаних із біологічним регулюванням комах.

Найбільше значення для біологічного захисту рослин мають бакуловіруси. Серед них виділяють віруси, що утворюють поліедральні тіла включення, та віруси, для яких характерні гранулярні включення. Їхня господарська цінність визначається патогенністю щодо цільового шкідника, специфічністю дії, здатністю поширюватися в популяції комах і можливістю використання як основи біологічних препаратів.

Під час вивчення ентомопатогенних вірусів необхідно звертати увагу на такі ознаки:

1. систематичне положення вірусу;
2. вид або групу комах-хазяїв;
3. форму та особливості тіл включення;
4. спосіб проникнення вірусу до організму комах;
5. характерні симптоми вірусної інфекції;
6. тривалість розвитку інфекційного процесу;
7. особливості поширення вірусу в популяції шкідника;
8. можливості практичного використання в біологічному захисті рослин.

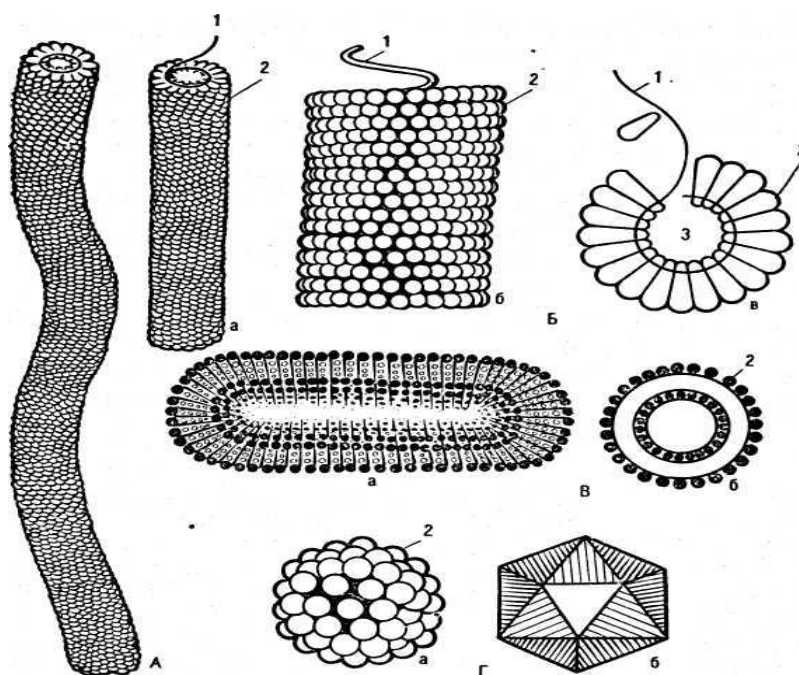


Рис. 1. Форма і будова вірусних частинок:

А – ниткоподібна частинка; **Б** – паличкоподібна частинка: **а** – фрагмент, **б** – розташування білкових субодиниць по спіралі нуклеїнової кислоти, **в** – поперечний розріз; **В** – бацилоподібна частинка: **а** – загальний вигляд, **б** – поперечний розріз; **Г** – ізометрична частинка: **а** – загальний вигляд, **б** – модель-двадцятигранник; 1 – нуклеїнова кислота; 2 – білкові субодиниці; 3 – внутрішній канал.

Відомі сьогодні віруси ділять на два типи (табл. 1): перший включає віруси, що містять ДНК, і другий – що містять РНК. Кожний тип представлений класами, родами і родами.

Таблиця 1

Систематика вірусів

Типи	Класи	Родина	Роди
Віруси, що містять, ДНК Deoxyvira	ДНК- дволанцюжкові	Baculoviridae Poxviridae Iridoviridae Papovaviridae	Baculovirus Entomopoxvirus Iridovirus Chloriridovirus
Віруси, що містять РНК Ribovira	ДНК- одноланцюжкові РНК- дволанцюжкові РНК- одноланцюжкові	Parvoviridae Reoviridae Rhabdoviridae Picornaviridae	Densovirus Cypovirus Enterovirus Leporipoxvirus

Коротка характеристика основних видів вірусів

Родина *Baculoviridae* (бакуловіруси) – паличкоподібні віруси (від латинського *baculum* – паличка). Поділяється на дві підгрупи: А – поліедрози, Б – гранульози. До підгрупи А належать віруси ядерного поліедрозу (ВЯП). Вірусні часточки мають паличкоподібну форму. ДНК двонитчаста, часто згорнута у вигляді кільця. Молекулярна маса $58 \cdot 10^6$ – $10 \cdot 10^6$ дальтонів. Віріони містяться у білкових кристалічних включеннях, різних за формою і розмірами (1–20 мкм). Добре помітні в оптичний мікроскоп, називаються поліедрами. Типовий вірус цієї групи - *вірус ядерного поліедрозу тutowого шовкопряда*.

Представники підгрупи Б утворюють тільця - включення менших розмірів (300–500 нм) у вигляді гранул. Іноді трапляються гранули кубічної форми. В оптичний мікроскоп ледве помітні.

Останнім часом у жука носорога *Oryctes rhinoceros* L. виявлена третя підгрупа вірусів, яка не має тілець-включень.

Віруси родини репродукуються в ядрах уражених клітин жирового тіла, гіподерми, оболонки трахей та гемолімфи багатьох представників різних рядів і родин комах.

Уражені гусениці в перші 2–3 доби зовні майже не відрізняються від здорових. Характерною ознакою хвороби є утворення в ядрі хроматинових глибок та розбухання ядер, які збільшуються в розмірах у декілька разів порівняно з ядрами здорових клітин.

Потім у ядрі з'являються дуже дрібні поліедри, які збільшуються у розмірах і заповнюють все ядро. Оболонка ядер руйнується, і велика кількість поліедрів надходить у гемолімфу комах. Інкубаційний період становить 5–12 днів залежно від вірусу, віку гусениць, температури та інших факторів. Хворі гусениці розбухають, тіло їх заповнюється рідиною білуватого кольору, без запаху.

Ця родина не має аналогів серед вірусів рослин і тварин.

Родина *Poxviridae* (поксвіруси або віруси віспи). Для біологічного захисту рослин мають значення представники роду *Entomopoxvirus*, серед яких типовим є вірус *віспи травневого жука* *Entomopoxvirus melolonthae* Weis. До родини також належать віруси людини і теплокровних тварин. Віруси віспи комах уражують лускокрилих (п'ядунів, совок, капустянок, листовійок), твердокрилих (пластинчастовусих, двокрилих комарів).

Це найкрупніші віруси, що за формою нагадують цеглинки. Трапляються і яйцеподібні віруси. Крім капсиду мають складну зовнішню оболонку з округлими або трубчастими виростами. Молекулярна маса ДНК $85 \cdot 10^6$ – $24 \cdot 10^6$. Найбільш вивчений вірус віспи травневого жука. Симптомами захворювання

є кволість личинок, їх побіління; затримка заляльковування. Тривалість захворювання 70–80 днів. У цитоплазмі клітини жирового тіла хворої комахи з'являються великі тільця - включення, в яких містяться віріони розміром до 20 мкм.

Родина Iridoviridae характерна райдужним світінням, від блакитного до синьо-зеленого і темно-фіолетового відтінків. Світіння зумовлюється дисперсією світла великою кількістю вірусних часточок, розташованих у вигляді правильних кристалічних упаковок, які заповнюють тканини хворих комах. Віруси комах належать до роду Iridovirus. Типовий представник – *райдужний вірус болотної довгоніжки* Iridovirus tipula Xeros, який уражує клітини жирового тіла. Форма віріонів - ікосаедрична, розмір 20–120 нм в діаметрі. Розмножується у цитоплазмі уражених клітин жирової, м'язової тканини та гіподерми. Молекулярна маса ДНК $100-10^6$ – $150-10^6$ дальтонів. У більшості видів зовнішня мембрана відсутня.

В останні роки райдужні віруси виявлені у мошок, комарів Aedes, Culex та ін., серед лускокрилих (совки, вогнівки), твердокрилих (пластинчастовусі, чорниші), клопів та перетинчастокрилих.

Віруси цієї родини у біологічному захисті проти комах не застосовуються, тому що мають аналогів серед збудників вірусних хвороб хребетних тварин і людини.

Родина Parvoviridae або парвовіруси (parvus – маленький). До родини належить рід Densovirus, представники якого спричиняють *дензонуклеози комах, або хворобу "щільних ядер"*. Типовий представник роду Densovirus galliarve Meunadier, тобто вірус *дензонуклеозу вошинної молі*, має молекулярну масу 4–5 млн дальтонів гексагональної форми. В уражених комах викликає параліч, внаслідок чого вони гинуть через 4–5 годин після появи перших ознак захворювання. Зовні такі комахи відрізняються від здорових білуватим забарвленням. В них уражуються ядра клітини жирового тіла, гіподерми, гемоцитів, епітелію трахей, з'єднувальної і нервової тканин, гонад. Уражують лускокрилих, проте виявлені у двокрилих і прямокрилих.

Родина Picornaviridae або пікорнавіруси. Ентомопатогенні віруси належать до роду Enterovirus, який спричинює *параліч комах*. До цього роду належить вірус гострого *паралічу медоносної бджоли*. Його молекулярна маса 2,6 млн дальтонів. Локалізуються у цитоплазмі клітин епітелію трахей, перикарда та м'язів. Вивчені недостатньо, уражують цвіркунів, дрозофілу, блакитного краба.

Родина Reoviridae або реовіруси. До цієї родини належать віруси, які розвиваються у тваринах і рослинах, зокрема *віруси цитоплазматичного поліедрозу комах*, які розвиваються у цитоплазмі епітелію середньої кишки.

Добре вивчений вірус цитоплазматичного поліедрозу тутового шовкопряда. Вірусні часточки 60–70 нм складної будови, утворюють білкові кристалічні тільця різної форми (куба, октаедра та ін.). Захворювання, спричинювані реовірусами, мають хронічний характер. Уражені вірусом комахи відстають у рості, стають кволими, погано живляться, з черевного боку з'являється білувате забарвлення внаслідок утворення великої кількості поліедрів у кишечнику. Уражують понад 150 видів комах – лускокрилих, двокрилих, перетинчастокрилих та ін. Поліедри виходять із тіла комахи крізь зруйновані покриви тіла або з екскрементами.

Основні ознаки вірусних захворювань комах

Ядерний поліедроз непарного шовкопряда – збудник *Baculovirus reprimens*. Уражує гусениць непарного шовкопряда, золотогозу. Хворі гусениці стають в'ялими, малорухливими, погано живляться, часто залазять на верхівки дерев і там гинуть, звисаючи головою вниз.

Тіло їх заповнене білуватою каламутною рідиною без різкого запаху. У поліедрі міститься 20–40 пучків віріонів. Інкубаційний період хвороби 3–8 діб, хвороба триває два тижні, після чого гине 90–100 % уражених особин.

Ядерний поліедроз яблуневої молі – збудник *Baculovirus malinella* Lescova. Уражує гусениць яблуневої молі та інших представників цієї родини. Патоген концентрується в ядрах клітин гемолімфи і гіподерми. Інкубаційний період 3–8 діб, хвороба триває два тижні, гине 90–100 % уражених особин.

Ядерний поліедроз кільчастого шовкопряда – збудник *Baculovirus neustriiae*. Уражує гусениць кільчастого, соснового шовкопрядів, кропивниці. Віруси концентруються у клітинах жирового тіла, гіподерми, епітелію трахей. Інкубаційний період 3–5 діб, хвороба триває 15 діб і спричинює епізоотії, внаслідок яких гине 80–90 % популяції шкідника.

Ядерний поліедроз капустяної совки – збудник *Baculovirus brassicae* Sirco. Уражує гусениць капустяної совки, допоміжний живитель – городня совка. Віруси розвиваються в ядрах клітин жирового тіла. Відомі також поліедрози озимої совки, американського білого метелика та ін. лускокрилих.

Гранульози комах. Під час свого розвитку утворюють вірусні часточки в формі гранул. Віруси розвиваються в ядрі або цитоплазмі жирових, трахейних та епідермальних клітин.

Гранульоз яблуневої плодожерки – збудник *Baculovirus (Granulovirus) carpocapsae* Tanadla, допоміжний живитель – грушева, сливова та східна плодожерки. Віруси концентруються у клітинах жирового тіла, гіподерми, епітелію трахей, гемолімфи. Віріони розміром 313–51 нм, гранули 394–208 нм.

Інкубаційний період 5–12 діб, хворі гусениці мають більш світле забарвлення, ніж здорові.

Гранульоз капустяного білана – збудник *Baculovirus (Granulovirus) brassicae*. Уражує гусениць капустяного та ріпного біланів. Збудник розмножується в клітинах жирового тіла, гіподерми, епітелію трахей, гемолімфи. Гранули овальної форми 0,12x0,30 мкм, вірусні часточки паличкоподібні, 200–80 нм. У хворих комах збільшуються ядра клітин, руйнується хроматин, оболонка розкладається. Уражені гусениці набувають білуватого забарвлення, малорухливі, гемолімфа має молочно-біле забарвлення. Залежно від температури комах гинуть через 2–4 тижні після зараження. Вірус заражає гусениць молодших віків. При заляльковуванні хворих гусениць шкіряний покрив лялечки утворюється неповністю. Іноді з хворих лялечок вилітають імаго, вони мають слаборозвинуті статеві органи, а потомство гине.

Крім вищезгаданих, відомі також гранульози озимої совки, сірої та зернової совки (збудник *B. anseps* Baranov), білого американського метелика (збудник *B. cunea*).

На непарному шовкопряді розвивається вірус цитоплазматичного поліедрозу, який уражує також гусениць золотогогуза та американського білого метелика.

Значення ентомопатогенних вірусів в органічному виробництві

Використання вірусних біологічних агентів спрямоване не на повне знищення всіх організмів у агроценозі, а на **регулювання чисельності цільових шкідників до рівня, за якого вони не спричиняють істотних господарських втрат**. Такий підхід відповідає екологічній спрямованості органічного виробництва та принципам збереження біорізноманіття.

Перевагами ентомопатогенних вірусів є висока вибірковість дії, можливість включення до біологізованих систем захисту рослин, сумісність із природними механізмами регуляції агроценозів та відсутність характерної для багатьох хімічних інсектицидів широкої токсичної дії на нецільові групи членистоногих.

Водночас ефективність вірусних засобів значною мірою залежить від виду та віку шкідника, температури, сонячної радіації, вологості, строків застосування та інших чинників. Тому їх використання має ґрунтуватися на результатах фітосанітарного моніторингу та точному визначенні цільового виду шкідника.

- Завдання:**
1. Засвоїти систематику вірусів та основну характеристику їх видів;
 2. Розглянути в мікроскоп, вивчити та замалювати основні ознаки вірусних захворювань комах.

Зміст звіту: результати виконання завдання.

Контрольні питання

1. Що таке віруси та які особливості їхньої будови і життєдіяльності?
2. Які віруси називають ентомопатогенними та яке їх значення у захисті рослин?
3. Які особливості бакуловірусів визначають можливість їх використання для регулювання чисельності шкідливих комах?
4. Яким шляхом відбувається зараження комах ентомопатогенними вірусами?
5. Які основні ознаки розвитку вірусної інфекції у шкідливих комах?
6. У чому полягає механізм дії ентомопатогенних вірусів на організм комах?
7. Які переваги використання ентомопатогенних вірусів у системах захисту рослин за органічного виробництва?
8. Які чинники навколишнього середовища впливають на ефективність вірусних біологічних агентів?
9. Чому висока специфічність ентомопатогенних вірусів є важливою для збереження корисної ентомофауни та біорізноманіття агроценозів?
10. Яке місце посідають ентомопатогенні віруси в комплексній системі біологічного регулювання чисельності шкідливих організмів в органічному виробництві?