

# 低盐胁迫对刺参非特异性免疫酶活性及抗菌活力的影响

董晓亮<sup>1,2</sup> 李成林<sup>2\*</sup> 赵斌<sup>2</sup> 胡炜<sup>2</sup> 韩莎<sup>2</sup> 李琪<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>中国海洋大学, 青岛 266003)

(<sup>2</sup>山东省海水养殖研究所, 青岛 266002)

**摘要** 以养殖刺参为研究对象, 测定了不同强度盐度胁迫对刺参生存、生长及体腔液中超氧化物歧化酶(SOD)、溶菌酶(LZM)活性及抗菌活力的影响。结果表明, 1) 盐度 16 实验组刺参存活率最低, 为 66.7%, 与其他各实验组及对对照组差异显著 ( $P < 0.05$ ); 盐度 18、20 实验组存活率分别为 88.9%、92.6%, 无显著差异 ( $P > 0.05$ ); 盐度  $\geq 22$  时, 刺参能够全部存活, 实验组刺参生长与对照组相比差异显著 ( $P < 0.05$ )。盐度  $\leq 20$  时, 刺参生长表现为负增长。2) 刺参体腔液中 SOD、LZM 活性及抗菌活力随时间变化呈现总体降低的趋势。实验开始时, 各实验组 SOD、LZM 活性及抗菌活力均为最高值, 30 d 时, 各实验组 SOD、LZM 活性及抗菌活力降至最低。低盐胁迫会显著影响刺参正常生存、生长, 并导致刺参免疫力降低, 增加对病原菌的易感性, 从而诱导疾病发生并造成死亡。

**关键词** 刺参 低盐胁迫 超氧化物歧化酶 溶菌酶 抗菌活力

**中图分类号** S968.9 **文献标识码** A **文章编号** 1000-7075(2013)03-0082-06

## Effects of low salinity stress on the activities of non-specific immune enzymes and antibacterial activity of sea cucumber *Apostichopus japonicus*

DONG Xiao-liang<sup>1,2</sup> LI Cheng-lin<sup>2\*</sup> ZHAO Bin<sup>2</sup>

HU Wei<sup>2</sup> HAN Sha<sup>2</sup> LI Qi<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>Ocean University of China, Qingdao 266003)

(<sup>2</sup>Mariculture Institute of Shandong Province, Qingdao 266002)

**ABSTRACT** Experiments were conducted to evaluate the effects of different salinity on growth, non-specific immunity and antibacterial activities of sea cucumber *Apostichopus japonicus*. The results showed that: (1) The survival rate of treatment A (salinity 16) was reduced to 66.7% ( $P < 0.05$ ), which was significantly different with other treatments and the control ( $P > 0.05$ ). During the experiment, no mortality of sea cucumber was observed among the treat-

国家“863”计划(2012AA10A412)、山东省现代农业产业技术体系刺参产业创新团队建设项目(2012-2014)、山东省农业良种工程重点项目(2005-2015)、山东省农业重大应用技术创新课题(2009-2015)、山东省科技发展计划(2008GG10005004)、山东省农业科技成果转化资金项目(2010-2013)、江苏省省级科技创新与成果转化专项引导资金项目(BN2012013)和青岛市科技计划项目(11-2-4-9-(5)-jch)共同资助

\* 通讯作者。E-mail: lcl\_xh@hotmail.com, Tel: (0532)82657692

收稿日期: 2013-01-23; 接受日期: 2013-03-19

作者简介: 董晓亮(1985-), 男, 硕士, 主要从事水产动物遗传育种和生理生态学研究。E-mail: dygrdxl05@163.com

ments at salinity of 22 and above. The specific growth rate of sea cucumber showed significant difference between treatments and control ( $P < 0.05$ ). At salinity of 20 and below, sea cucumber showed a negative growth. (2) The activities of superoxide dismutase (SOD), lysozyme (LZM) and antibacterial activity decreased with time, that is, from the maximum values at the beginning of the experiment to the minimum values at 30 d. We conclude that low salinity stress can significantly affect the survival and growth of sea cucumbers by reducing the immunity and increasing the susceptibility to pathogens, resulting in disease and mortality.

**KEY WORDS** Sea cucumber *Apostichopus japonicus* Low salinity stress  
Superoxide dismutase Lysozyme Antibacterial activity

刺参 *Apostichopus japonicus* 属于棘皮动物门 Echinodermata、海参纲 Holothroidea, 是一种具有重要营养和生理功能价值的棘皮动物, 刺参的人工养殖具有极高的经济效益(王国利等 2007)。随着人民生活水平的提高和保健意识的增强, 刺参的医疗保健作用得到了越来越广泛的认同, 刺参的需求量急剧增长, 引发了刺参的过度捕捞和资源短缺, 刺激了养殖业的蓬勃发展(唐黎等 2007)。目前刺参养殖在我国黄、渤海海域特别是山东沿海的海水养殖产业中所占比重日益增大, 山东省刺参养殖总产量约占全国刺参养殖总产量的 60%, 已成为山东省渔业经济的支柱产业, 代表我国海水养殖的第五次浪潮产业(李成林等 2010)。

目前, 刺参的养殖生产易受诸多环境条件制约, 其中盐度是影响海洋无脊椎动物生理生态学最重要的环境因子之一(马月钗等 2010)。关于盐度对刺参生存、生长和代谢的影响已有不少报道(胡炜等 2012; 王吉桥等 2009; 袁秀堂等 2006; 薛素燕等 2009), 但涉及低盐环境对刺参免疫相关酶活性影响的研究报道尚不多见。本研究进行了低盐胁迫对刺参生存、生长及体腔液中超氧化物歧化酶(SOD)、溶菌酶(LZM)活性及抗菌活力的影响等方面的研究, 旨在探明刺参耐受低盐的应激反应规律, 为实际生产中更好地进行养殖水体盐度环境调控提供参考, 同时也为棘皮动物非特异性免疫研究提供基础数据和理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验刺参

实验于 2012 年 5 月在山东省海水养殖研究所遗传育种中心鳌山实验室进行。实验用刺参个体采自山东省莱阳市生态养殖池塘, 选取表观正常、伸展自如、活力强、肉刺完整挺直的刺参个体, 体重  $28.6 \pm 3.0$  g。

### 1.2 分组设计

按不同强度的胁迫盐度进行实验分组, 以盐度 33 的自然海水为对照组(M), 5 个不同的低盐度梯度 16、18、20、22、24 为实验组, 分别标记为 A、B、C、D、E 组。每个盐度梯度设 3 个平行组。

### 1.3 暂养

将实验用刺参运回实验室后放入塑料整理箱(80 cm×60 cm×48 cm)中暂养, 每箱放 30 头, 24 h 充气, 日换水 1 次, 水温范围 12~18 °C。采用刺参专用配合饲料进行投喂, 日投饵量为刺参体重的 5%~8%。暂养 5 d 后开始进行盐度驯化, 实验组采用自然暴晒的自然水和自然海水混合的方式降低盐度, 每天降低两个盐度单位, 达到实验盐度后开始实验, 并按暂养期管理方式进行日常管理。实验为期 30 d。

### 1.4 指标测定

#### 1.4.1 刺参存活率、特定生长率的测定

刺参成活率(%) =  $S/S_0 \times 100$ , 式中,  $S_0$  为实验开始时刺参数量,  $S$  为结束时刺参数量。

刺参特定生长率(SGR)采用以下公式计算:

$$SGR(\%) = 100 \times (\ln W_t - \ln W_0) / t$$

式中,  $W_0$  为体重初始值(g),  $W_t$  为测定值(g),  $t$  为实验时间(d)。

#### 1.4.2 刺参免疫指标的测定

实验测定低盐胁迫条件下刺参体腔液中的免疫指标。刺参体腔液的采集参考江晓路等(2009)的方法并做改进, 方法为: 随机选取实验刺参, 置于灭菌玻璃培养皿中, 用解剖刀在刺参腹部切口 1cm, 立即用无菌注射器收集刺参体腔液 1 ml, 1 000 r/min 离心 10 min, 取上清液置于 Eppendorf 管中, 放置于  $-80^{\circ}\text{C}$  冰箱内, 保存待测。

超氧化物歧化酶(SOD)活性采用改进的连苯三酚自氧化测定法。溶菌酶活性和抗菌活力分别以溶壁微球菌 *Micrococcus lysodeikticus* 冻干粉和灿烂弧菌 *Vibrio splendius* 的菌悬液为底物, 参照 Hultmark 等改进的方法进行测定。

### 1.5 数据处理

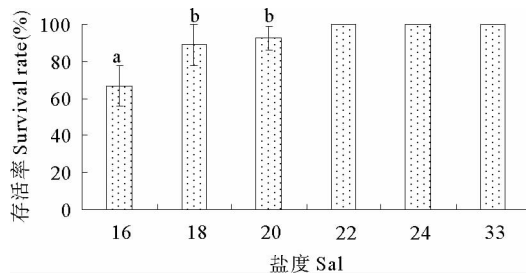
实验数据利用 SPSS 17.0 软件进行单因素方差分析和多重比较, 结果用平均值士标准差表示;  $P < 0.05$  表示差异显著。

## 2 结果

### 2.1 不同盐度胁迫条件对刺参生存、生长的影响

实验期间, 除盐度 A、B、C 实验组, 其他各组均没有出现刺参死亡现象。由图 1 可知, A 组刺参存活率最低, 为 66.7%, 与其他各组差异显著 ( $P < 0.05$ )。B、C 组存活率分别为 88.9%、92.6%, 两组间无显著差异 ( $P > 0.05$ )。

实验期间, 不同盐度胁迫对刺参特定生长率的影响见表 1。对照组刺参体重特定生长率最高, 为 0.843%/d, 与各实验组相比差异显著 ( $P < 0.05$ ), 刺参身体能够自然伸展, 肉刺尖突, 活动能力较强, 摄食量大, 至实验结束刺参体重明显增加。实验结果表明, 低盐对刺参生长影响显著, 具体表现为 A、B 组刺参体重均表现为负增长, A、B 组间差异不显著 ( $P > 0.05$ ), 刺参个体表现为身体不能自然伸展、肉刺逐渐变圆滑, 多数在水槽底部匍匐、基本不摄食。C 实验组刺参体重特定生长率为  $-0.091\%/d$ , 与其他各实验组及对照组差异显著 ( $P < 0.05$ ), 实验期间刺参活动力弱、个



注: 不同字母表示组间差异显著 ( $P < 0.05$ )

Note: Different letters represent significant differences at the 0.05 probability level

图 1 不同盐度对刺参成活率的影响

Fig. 1 Effect of different salinity on the survival rate

表 1 不同盐度处理对刺参特定生长率的影响

Table 1 Effect of different salinity on SGR of sea cucumber

组别 Treatment	盐度 Salinity	初体重 Initial body weight (g)	末体重 Final body weight (g)	特定生长率 SGR(%/d)
A	16	28.72 ± 1.521 <sup>a</sup>	23.34 ± 1.312 <sup>a</sup>	-0.652 ± 0.083 <sup>a</sup>
B	18	28.10 ± 1.735 <sup>a</sup>	26.22 ± 1.073 <sup>b</sup>	-0.237 ± 0.032 <sup>a</sup>
C	20	28.17 ± 1.627 <sup>a</sup>	29.02 ± 1.658 <sup>c</sup>	-0.091 ± 0.027 <sup>b</sup>
D	22	28.99 ± 1.671 <sup>a</sup>	30.27 ± 1.783 <sup>c</sup>	0.144 ± 0.025 <sup>c</sup>
E	24	29.18 ± 1.025 <sup>a</sup>	30.96 ± 1.117 <sup>c</sup>	0.209 ± 0.141 <sup>c</sup>
M	33	27.41 ± 1.073 <sup>a</sup>	29.17 ± 1.324 <sup>c</sup>	0.843 ± 0.472 <sup>d</sup>

注: 同列中不同字母表示组间差异显著 ( $P < 0.05$ )

Note: Data within the same column with different superscripts are significantly different at the 0.05 probability level

体摄食量较小、排泄物较少。D、E 实验组至实验结束时体重略有增加,组间差异不显著( $P>0.05$ ),与盐度低于 20 的实验组比较,刺参活动能力增强,能够自由爬行、附着在槽壁上,身体伸展自然,与自然海水盐度条件下的状态相比未见明显异常。

### 2.2 不同盐度胁迫条件对刺参 SOD 活性的影响

由图 2 可知,各实验组刺参体腔液中的 SOD 活性在实验起始时与对照组相比处于较高水平,并随盐度胁迫时间延长呈下降趋势。10 d 时,各实验组 SOD 活性与对照组相比差异不显著( $P>0.05$ );20 d 时,A、B 实验组 SOD 活性大幅降低,与 C、D、E 组出现显著差异( $P<0.05$ ),且均显著低于对照组 M ( $P<0.05$ );30 d 时,A、B、C 实验组 SOD 活性均降到较低水平,其中 A 实验组 SOD 活性降到最低,为  $9\pm 5.8$  U/mg,D、E 实验组的 SOD 活性也有所降低,所有实验组 SOD 活性均显著低于对照组( $P<0.05$ )。

### 2.3 不同盐度胁迫条件对刺参 LZM 活性的影响

除对照组外,各实验组刺参体腔液中 LZM 活性随盐度胁迫时间延长呈下降趋势(图 3)。0、10 d 时,盐度 24 实验组 LZM 活性一直处在较高水平,且显著高于其他各实验组及对照组( $P<0.05$ ),该时间段中,不同实验组 LZM 活性随胁迫盐度的降低而下降;20 d 时,除 A、B 组 LZM 活性较低外,其余实验组与对照组水平接近;30 d 时,A、B、C 实验组的 LZM 活性均显著低于对照组( $P<0.05$ )。

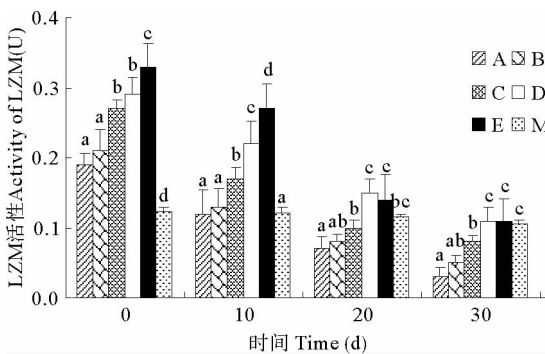
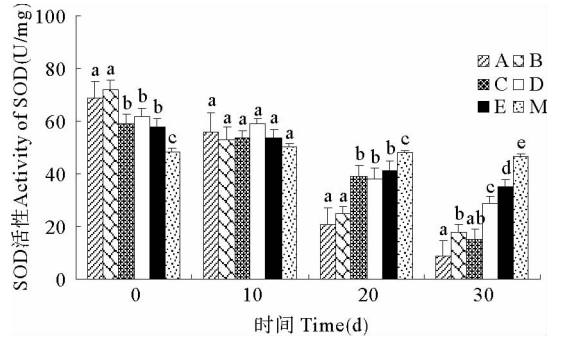


图 3 不同盐度对刺参 LZM 活性的影响

Fig. 3 Effect of different salinity on the activity of LZM

### 2.4 不同盐度胁迫条件对刺参抗菌活力的影响

由图 4 可知,各实验组抗菌活力随盐度胁迫时间延长而下降。10 d 时,各实验组抗菌活力均显著高于对照组( $P<0.05$ ),但组间差异不显著( $P>0.05$ );20 d 时,各实验组抗菌活力下降至对照组水平,其中 A、B、C 实验组与对照组相比已无显著差异( $P>0.05$ );30 d 时,各实验组抗菌活力较之前仍有所降低,盐度 16 实验组抗菌活力最低,为 1.04 U,显著低于对照组( $P<0.05$ ),C、D、E 实验组抗菌活力与对照组之间差异不显著( $P>0.05$ )。



注:A:盐度 16, B:盐度 18, C:盐度 20, D:盐度 22, E:盐度 24, M:盐度 33; 图柱上同一时间内不同字母表示组间差异显著( $P<0.05$ )

Note: A, B, C, D, E, and M represent treatments at salinities 16, 18, 20, 22, 24, and 33 respectively. Different letters in the same group represent significant differences at the 0.05 probability level. Same in the follows

图 2 不同盐度对刺参 SOD 活性的影响

Fig. 2 Effect of different salinity on the activity of SOD

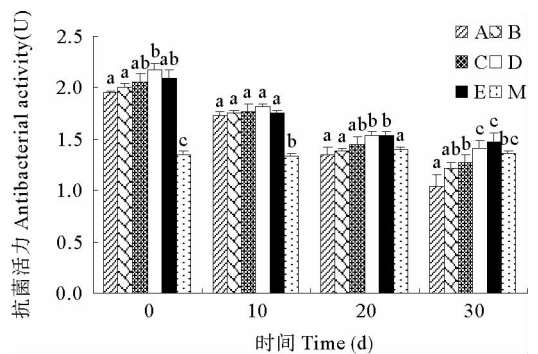


图 4 不同盐度对刺参抗菌活力的影响

Fig. 4 Effect of different salinity on the antibacterial activity of *A. japonicus*

### 3 讨论

#### 3.1 低盐胁迫对刺参生存、生长的影响

盐度是反映水中无机离子含量的指标,水生动物对环境的适应一般围绕其等渗点进行渗透压调节,而渗透压调节是一个需要耗费能量的生理过程(陈勇等 2007)。当水生动物处于等渗点时,用于渗透压调节的耗能最少。在自然海区,刺参生活于正常海水中,盐度适应范围为 26~36,最适盐度为 28~34。本研究中,盐度 33 左右的对照组刺参表现出较高生长率,此时刺参即处在调节渗透压所需能量最少的等渗点附近。当盐度为 20~24 时,刺参仍能缓慢生长,但生长速度受到了一定程度的抑制;当盐度为 20 或低于 20 时,刺参体重均表现为负增长,并出现个体死亡。这是由于此时刺参用于调节低渗透压的能耗呈梯度增加,且已超出了自身调节渗透压能力范围。因此,作者认为盐度 20 应为刺参调节渗透能力的下限。

#### 3.2 低盐胁迫对刺参 SOD、LZM 活性的影响

刺参同其他棘皮动物一样,进化地位较低,其特异性免疫机制还很不完善(陈效儒等 2010)。因此,刺参的非特异性免疫在刺参免疫防御系统中起着至关重要的作用。刺参体腔细胞既是细胞免疫的承担者,又是体液免疫因子的提供者(Kudriavtsev *et al.* 2004)。激活后的体腔细胞可以产生多种免疫因子以及各种免疫活性的酶类(如超氧化物歧化酶、溶菌酶、酸性磷酸酶等),提高机体的免疫力(Coteur *et al.* 2002)。SOD 作为一种重要的抗氧化酶,可以清除体内自由基,保持细胞免受损害,使细胞能正常合成各种酶类,对增强吞噬细胞活性和整个机体的免疫功能具有重要的作用(刘志鸿等 2003)。已有众多研究报道,SOD 对于增强吞噬细胞的防御能力和整个机体的免疫功能有重要的作用(江晓路等 2009;李丹彤等 2011;樊英等 2012;陈效儒等 2010;李华等 2007;沈丽琼等 2007)。溶菌酶 LZM 是体液中的一种碱性蛋白,能水解革兰氏阳性细菌细胞壁中黏肽的乙酰氨基多糖并使之裂解释放,形成一个水解酶体系,破坏和消除侵入体内的异物及其他抗菌因子作用后残余的细菌细胞壁,增强免疫因子的抗菌性(樊英等 2012)。在本研究中,不同低盐处理组刺参 SOD、LZM 的起始活性均显著高于对照,这是由于刺参对于实验初期盐度的大幅降低产生了应激和自我保护反应,通过提高 SOD、LZM 活性来增强机体免疫力和抗病力。随着盐度胁迫时间的延长,SOD、LZM 活性逐渐降低,直至 30 d 实验结束时,SOD、LZM 活性降至整个实验过程中的最低水平,尤其是盐度低于 20 的 A、B、C 实验组,SOD、LZM 活性水平已影响到刺参的正常生存,致使 3 个实验组的刺参均出现不同程度的体表溃疡和死亡,而盐度高于 20,尤其是盐度高于 22 时,刺参均可正常存活,保持较好的活动、摄食和生长状态。实验结果显示,盐度低于 20 或长期较强的低盐胁迫,均会导致刺参体内 SOD、LZM 活性的降低,刺参机体免疫力和抗病力也随之下降,究其原因可能是由于较强的盐度胁迫已经超出了刺参自身调节渗透压的能力,消耗能量过度,已无足够能量保持 SOD、LZM 的较高活性。

#### 3.3 低盐胁迫对刺参抗菌活力的影响

自然界中的刺参生存于细菌分布较广的岩礁底和泥沙底质环境中,在摄食时将众多细菌等微生物同时摄入体内,通过体腔液中具有吞噬能力的细胞对这些外来物质进行吞噬(Chance *et al.* 1995),继而依靠细胞内的非特异性免疫酶进行裂解和消化。当外界环境因子发生突变时,可能造成影响的对象首先是体腔细胞,在环境胁迫下,机体正常产生吞噬细胞的功能受到抑制,导致抗菌活力的下降。在本研究中,不同强度盐度胁迫下刺参的抗菌活力无一例外的随胁迫时间的延长而下降,推测是由于机体渗透压调节失衡,体腔细胞在长期受到盐度胁迫后,抗菌功能逐渐衰弱所致。

本研究结果为研究刺参对低盐环境的适应能力以及进一步探讨刺参对低盐环境的适应机理等相关研究提供了依据。此外,本研究也表明,在刺参养殖过程中,盐度不可长时间低于 20,尤其不能长时间低于 18,低盐环境会造成刺参个体长期处于应激状态,增加刺参对病原菌的易感性风险,进而诱发疾病或出现死亡。

## 参 考 文 献

- 马月钗, 杨玉娇, 王国良. 2010. 盐度变化对锯缘青蟹 *Scylla serrata* 免疫因子的胁迫影响. 浙江农业学报, 22(4): 479-484
- 马悦欣, 许珂, 王银华, 王斌, 宋坚, 常亚青. 2010.  $\kappa$ -卡拉胶寡糖对仿刺参溶菌酶、碱性磷酸酶和超氧化物歧化酶活性的影响. 大连海洋大学学报, 25(3): 224-227
- 王方雨, 杨红生, 高菲, 刘广斌. 2009. 刺参体腔液几种免疫指标的周年变化. 海洋科学, 33(7): 75-80
- 王吉桥, 张筱暉, 姜玉声, 张剑诚, 柳圭泽. 2009. 盐度骤降对不同发育阶段仿刺参存活和生长的影响. 大连水产学院学报, 24(增刊): 139-146
- 王国利, 祝文兴, 李兆智, 付荣恕. 2007. 温度与盐度对刺参(*Apostichopus japonicus*)生长的影响. 山东科学, 20(3): 6-9
- 王淑娴, 樊英, 许拉, 于晓清, 刁菁, 李天保, 叶海斌, 杨秀生, 王勇强. 2012. 小肽对刺参免疫酶活性及抗病力的影响. 中国饲料, (9): 22-24
- 刘云, 孔伟丽, 姜国良, 吴志强. 2008. 2种免疫多糖对刺参组织主要免疫酶活性的影响. 中国水产科学, 15(5): 787-793
- 刘志鸿, 牟海津, 王清印. 2003. 软体动物免疫相关酶研究进展. 海洋水产研究, 24(3): 86-90
- 刘洪展, 郑风荣, 孙修勤, 唐学玺, 董双林. 2012. 氨氮胁迫对刺参几种免疫酶活性的影响. 海洋科学, 36(8): 47-52
- 江晓路, 杜以帅, 王鹏, 刘瑞志, 杨学宋, 吕青. 2009. 褐藻寡糖对刺参体腔液和体壁免疫相关酶活性变化的影响. 中国海洋大学学报, 39(6): 1188-1192
- 李丹彤, 谢广成, 李洪福, 邢殿楼, 王斌, 刘远, 姜峰, 胡昕江. 2011. 裙带菜和萱藻凝集素对刺参组织主要免疫酶活性的影响. 水产学报, 35(4): 524-530
- 李华, 李强, 曲健凤, 陈静, 王吉桥. 2007. 不同盐度下凡纳滨对虾血淋巴免疫生理指标比较. 中国海洋大学学报, 37(6): 927-930
- 李成林, 宋爱环, 胡炜, 赵斌, 李翘楚, 麻丹萍. 2010. 山东省刺参养殖产业现状分析与可持续发展对策. 渔业科学进展, 31(4): 126-132
- 李继业. 2007. 养殖刺参免疫学特征与病害研究. 见: 中国海洋大学博士学位论文
- 沈丽琼, 陈政强, 陈昌生, 何先明. 2007. 盐度对凡纳滨对虾生长与免疫功能的影响. 集美大学学报, 12(2): 108-113.
- 陈勇, 高峰, 刘国山, 邵丽萍, 石国锋. 2007. 温度、盐度和光照周期对刺参生长及行为的影响. 水产学报, 31(5): 687-691
- 陈效儒, 张文兵, 麦康森, 谭北平, 艾庆辉, 徐玮, 马洪明, 王小洁, 刘付志国. 2010. 饲料中添加甘草酸对刺参生长、免疫及抗病力的影响. 水生生物学报, 34(4): 731-738
- 胡炜, 李成林, 赵斌, 邹安革, 董晓亮, 赵洪友, 邹土方, 尉淑辉. 2012. 低盐胁迫对刺参存活、摄食和生长的影响. 渔业科学进展, 33(2): 92-96
- 唐黎, 王吉桥, 许重, 程骏驰. 2007. 不同发育期的幼体和不同规格刺参消化道中四种消化酶的活性. 水产科学, 26(5): 275-277
- 聂竹兰, 李霞, 辛涛. 2007. 仿刺参体壁的组织学和组织化学. 大连水产学院学报, 22(3): 184-187
- 袁秀堂, 杨红生, 周毅, 毛玉泽, 张涛, 刘鹰. 2006. 盐度对刺参(*Apostichopus japonicus*)呼吸和排泄的影响. 海洋与湖沼, 37(4): 348-354
- 樊英, 于晓清, 王淑娴, 许拉, 李天保, 叶海斌, 杨秀生, 王勇强. 2012. 不同剂型的黄芪多糖在刺参养殖中的应用研究. 水产科学, 31(11): 663-667
- 薛素燕, 方建光, 毛玉泽, 张继红, 张媛. 2009. 高温下不同盐度对刺参幼参和1龄参呼吸排泄的影响. 中国水产科学, 16(6): 975-980
- Chance B, Machly AC. 1995. Assay of catalase and peroxidases. Colowick S P. Methods in Enzymology (2). New York: Academic Press 764-777
- Coteur G, Warnau M, Jangoux M, Dubois P. 2002. Reactive oxygen species (ROS) production by amoebocytes of *Asterias rubens* (Echinodermata). Fish Shellfish Immunol 12(3): 187-200
- Kudriavtsev I, Polevshchikov A. 2004. Comparative immunological analysis of echinoderm cellular and humoral defense factors. Zh Obshch Biol 65(3): 218-231