



## Bakulowirusy i ich rekombinanty jako naturalne bioinsektycydy

Joanna Michalik

Instytut Biochemii i Biofizyki  
Polska Akademia Nauk, Warszawa  
Wyższa Szkoła Pedagogiczna, Kielce

### Baculoviruses and their recombinants as natural bioinsecticides

#### Summary

Baculoviruses form a largest and most diverse group of insect-pathogenic viruses. They are safe for plants, vertebrates and – what is particularly important – for mammals and humans. It was established that these insect specific viruses are widespread in nature among economically important insect pests and they may be applied in pest control programs. Numerous field trials demonstrated usefulness of baculoviruses as viral insecticides, however numerous chemical pesticides with broad spectrum and low cost of production made the natural, viral insecticides economically unprofitable on the market. Only later, at the beginning of the 1980s and 1990s it became apparent that numerous agricultural, environmental and human health problems were a consequence of a widespread use and accumulation of chemical pesticides in the environment. The necessity to develop biologically safe insecticides again focused the attention on the natural, very specific enemies of pest insect. Currently, the research concentrates on lowering the costs of growing baculoviruses on a large scale. In addition, attempts have been made to improve the virulence of pesticidal baculoviruses and to expand their host range. These experiments are now in progress in several laboratories. We may expect that in the future a baculovirus genome will be modified by way of changing or deleting its important parts rather than by the expression of additional genes coding for important regulators of insect metabolism.

#### Adres do korespondencji

Joanna Michalik,  
Instytut Biochemii  
i Biofizyki PAN,  
ul. Pawińskiego 5A,  
02-106 Warszawa;  
e-mail:  
joannami@ibb.waw.pl

---

#### biotechnologia

3 (50) 93–99 2000

Key words:  
bioinsecticides, baculoviruses.

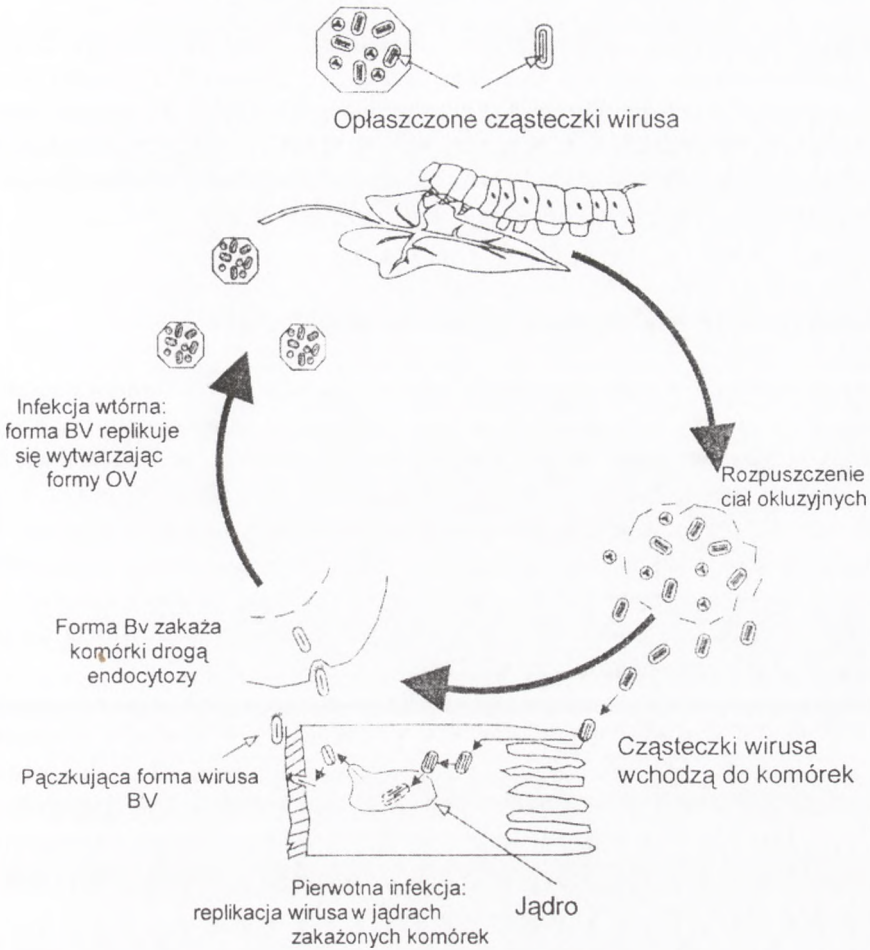
## 1. Biologia bakulowirusów

Bakulowirusy są naturalnymi patogenami wirusowymi bezkręgowców, głównie owadów, bowiem infekcje skorupiaków są sporadyczne i marginalne. Obok bakterii, pierwotniaków, grzybów czy nicieni będących naturalnymi patogenami owadów stwierdzono setki oddziaływań owad-bakulowirus. Wśród różnych rodzin owadów, podlegających infekcjom bakulowirusowym najbardziej podatna jest grupa należąca do *Lepidoptera*, z której pochodzi zresztą najwięcej groźnych szkodników roślin zarówno rolnych jak i leśnych. Bakulowirusy, bezpieczne zarówno dla roślin jak i kręgowców, w tym ssaków, stanowią niezwykle cenne źródło naturalnych bioinsektycydów (1,2). Stanowią one bogatą i zróżnicowaną grupę wirusów z dwuniciowym kolistym genomowym DNA wielkości 88-160 tysiąca par zasad. Podzielono je na dwie podgrupy, z których pierwsza (I) grupuje wirusy jądrowej poliedrozy (*Nucleopolyhedrovirus*, NPV), tworzące liczne wiriony otoczone krystalicznym białkiem wielkości około 30 kD. Utworzone opłaszczone struktury o charakterystycznym kształcie noszą nazwę poliedrów wielkości 1-10  $\mu\text{m}$ . Podgrupa druga (II) obejmuje wirusy granulozy (*Granulovirus*, GV) o mniejszych (0,1-1  $\mu\text{m}$ ) pojedynczych nukleokapsydach, otoczonych białkiem granuliny, wielkości 29 kD. W przeciwieństwie do poprzedniej grupy wirusów replikujących się w jądrze, wirusy granulozy mogą się namnażać zarówno w jądrze jak i cytoplazmie zainfekowanych komórek owadzych (3,4).

Większość bakulowirusów ma zdolność infekowania niewielkiej, ściśle określonej liczby gatunków pochodzących z tej samej rodziny. Bakulowirusem o największej liczbie gospodarzy jest wirus sówki *Autographa californica* (AcMNPV) namnażający się u ponad 43 gatunków owadów oraz w kilku permissyjnych liniach komórkowych (4). Jest to jednocześnie wirus, którego genom został całkowicie zsekwencjonowany i który jest powszechnie wykorzystywany w układach ekspresyjnych *in vitro* do syntezy białek heterologicznych (2). Infekcje owadów bakulowirusami zachodzą wyłącznie drogą pokarmową.

Poliedry, stabilne przez szereg lat, obecne w glebie, ściółce na powierzchni liści mogą przedostać się przez komórki epitelialne jelita środkowego owada do wnętrza ciała gąsienic (rys. 1). Wiriony pozbawione płaszczki białkowego docierają do jądra komórkowego rozpoczynając proces replikacji. Charakterystyczne dla bakulowirusa jest istnienie dwóch odrębnych form morfologicznych. Forma pączkująca (*budded virus*, BV) obecna w hemolimfie, bierze udział w zakażeniu różnych tkanek w organizmie. Druga forma (*polihedra derived virus*, PDV) uczestniczy w infekcjach międzygatunkowych oraz infekcjach komórek epitelialnych i penetracji z jelita do wnętrza ciała owada. Kolejne cykle replikacji wyrażają się w tworzeniu w jądrach komórkowych większości tkanek owada dużej liczby poliedrów, dochodzącej do  $10^9$ . Okres od zainfekowania gąsienicy do jej śmierci może wynosić nawet 10-14 dni, zależnie od rodzaju wirusa i gatunku owada, jest zatem stosunkowo długi. Przez większość tego okresu gąsienica żeruje, niszcząc rośliny, którymi się odżywia.





Rys. 1. Cykl rozwojowy bakulowirusa w organizmie owada wg (1).

Zatem zmiany cech bakulowirusów w celu pozyskania korzystniejszych cech z punktu widzenia stosowania ich jako insektycydów polegałyby na podniesieniu ich wirulencji i skróceniu czasu letalnego zainfekowanego owada. Próby poszukiwania genu odpowiedzialnego za wirulencję wskazywały na istnienie czynnika białkowego wielkości 74 kD wpływającego na ten proces, jednak ani mechanizm reakcji ani funkcja konkretnego białka nie zostały dotychczas opisane.

Obecny stan wiedzy dostarcza informacji na temat całkowitej sekwencji genomowej następujących bakulowirusów: *Autographa californica* (AcMNPV), *Bombyx mori* (BmNPV), *Orgyia pseudotsugata* (OpNPV) i *Spodoptera exigua* (SeMNPV), których genomy są podobnej wielkości i wynoszą odpowiednio: 133894 (5), 128413 (6), 131990 (7), 135611 (8) par zasad, kodujących około 150 białek. Genom *Lymantria dispar*

(LdMNPV) jest wyraźnie większy i wynosi 161046 par zasad (9). Pierwsze dwa bakulowirusy są bardzo podobne pod kątem organizacji genomu i obecności konkretnych genów, chociaż genom OpMNPV wyróżnia się brakiem 28 genów występujących w AcMNPV i obecnością 26 innych niż w AcMNPV (7). Ponadto organizacja genów w genomie LdMNPV jest inna aniżeli pozostałych czterech bakulowirusów i pozwala zakwalifikować go do odrębnej filogenetycznie grupy.

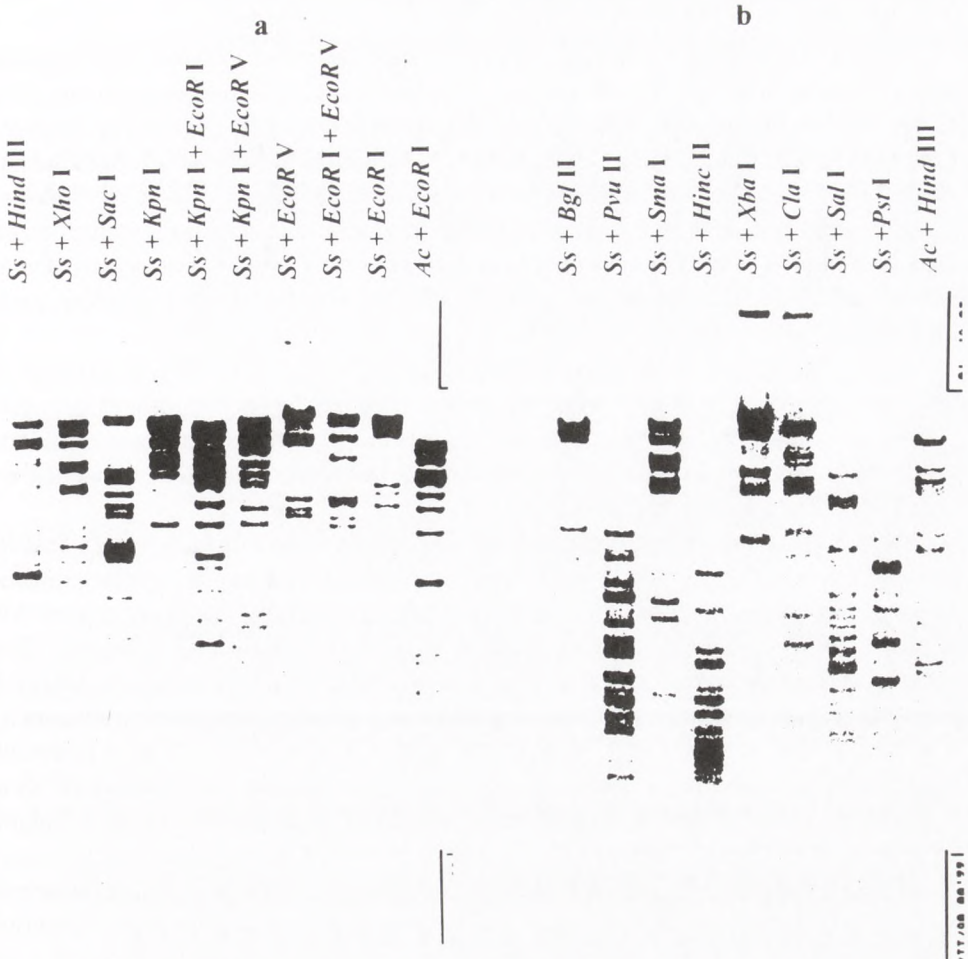
## 2. Wykorzystanie bakulowirusów jako bioinsektycydów

Istniejące preparaty bakulowirusów używane są w Stanach Zjednoczonych i Kanadzie, jak również zachodniej Europie, przede wszystkim do ochrony roślin leśnych. W Rosji zarejestrowano osiem wirusowych insektycydów, ale skala ich stosowania nie jest znana. W Chinach opracowano preparat niszczący szkodnika bawełny *Heliothis zea*. Do tej pory największym sukcesem komercyjnym stał się preparat bakulowirusa niszczący szkodnika soi *Anticarsia gemmatilis* stosowany w Brazylii początkowo na powierzchni 200 hektarów na początku lat osiemdziesiątych z perspektywą zwiększenia obszarów upraw objętych kontrolą bakulowirusa do ponad miliona hektarów w kolejnych latach (10).

Jakkolwiek preparaty bakulowirusów stosowane są w celach komercyjnych, to udział ich w puli stosowanych powszechnie pestycydów jest niewielki i stanowi niecały 1%, podczas gdy chemiczne insektycydy stanowią ponad 30% puli sprzedawanych na świecie pestycydów. Wiele bakulowirusów naturalnie występujących, poddawanych jest testom polowym w celu wyeliminowania przyczyn hamujących ich użycie w skali handlowej. Do przyczyn tych należą: niska wirulencja, zbyt wąski krąg gospodarzy, stabilność oraz koszty produkcji.

Istniejące obecnie tendencje badawcze opierają się raczej na modyfikacji genomów znanych bakulowirusów polegających na eliminacji pewnych sekwencji, czy genów i poszukiwania pozytywnych cech wykształconych w wyniku tych delecji (np. poszerzenie kręgu gospodarzy). Tendencja przeciwna, polega na insercji do genomu bakulowirusa dodatkowych genów kodujących ważne regulatory metabolizmu owadów jak enzymy, hormony peptydowe, receptory hormonów, toksyny (11-14). W intensywnie prowadzonych badaniach w ciągu ostatniej dekady wykazano, że metoda ta jest niezbyt efektywna, a ponadto trudna do zaakceptowania z punktu widzenia bezpieczeństwa i ochrony środowiska. Mimo szerokiej wiedzy na temat efektów infekcji bakulowirusowych, dokładna charakterystyka DNA genomowego tych wirusów poza pięcioma przypadkami, podobnie jak podstawy ich selektywnej infekcyjności nie są znane.





Rys. 2. Analiza restrykcyjna DNA bakulowirusa *SsMNPV*. 1  $\mu$ g DNA trawiono enzymem restrykcyjnym, a następnie produkty trawienia rozdzielano w 0,7% żelu agarozowym. Na zdjęciu pokazano przykładowy żel, w którym rozdzielano produkty powstałe po trawieniu podanymi enzymami restrykcyjnymi. Żel barwiono bromkiem etydyny, a jako standardu używano DNA bakulowirusa *AcMNPV* trawionego *Eco* R I (a) oraz DNA bakulowirusa *AcMNPV* trawionego *Hind* III (b).

### 3. Badania nad bakulowirusem *SsMNPV*

Wykorzystanie nowo wyizolowanego bakulowirusa jako bioinsektycydu wymaga bezwzględnie jego wstępnej charakterystyki genetycznej, funkcjonalnej i wreszcie określenie specyficzności gatunkowej. Przedstawiono charakterystykę genomu bakulowirusa infekującego gąsienice białki wierzbowki (*Stilpnotia salicis*), szkodnika wierzby i topoli z rodziny *Lymatriidae* (15). Bakulowirus ten, nazwany *SsMNPV*, wyizolowany został z zainfekowanych i obumarłych owadów na terenie kilku woje-

wództw zachodniej Polski. W przeprowadzonej analizie restrykcyjnej DNA genomowego tych izolatów wykazano znaczące różnice w zależności od geograficznej lokalizacji ich występowania. Wielkość genomu określono na 128-134 tysięcy nukleotydów (16) na podstawie analizy restrykcyjnej produktów trawienia endonukleazami *Hind* III i *Sac* I, co czyni go podobnym do najlepiej zbadanego i całkowicie zsekwenconowanego bakulowirusa sówki *Autographa californica*, a także pozostałych trzech bakulowirusów zaklasyfikowanych taksonomicznie do grupy I *Baculoviridae*. Wydaje się, że *SsMNPV* jest monospecyficzny – infekuje jeden tylko gatunek owadów, gąsienice białki wierzbowki.

Mapę restrykcyjną bakulowirusa *SsMNPV* namnożonego w permissywnej owadziej linii komórkowej IPL-LD 65Y wyprowadzonej z gąsienic *Lymantria dispar* przedstawiono na rysunku 2. Otrzymanie właściwego profilu trawienia enzymami nukleolitycznymi pozwala na otrzymanie fragmentów służących do ustalenia sekwencji ważnych fragmentów genomu.

Najważniejszym genem mapy genomu każdego bakulowirusa, również *SsMNPV* jest gen poliedryny – białka otoczkowego, powlekającego wirion i syntetyzowanego z bardzo dużą wydajnością. Wydzielenie genu poliedryny bakulowirusa *SsMNPV* uzyskano w wyniku jego lokalizacji sondą w postaci znakowanej sekwencji genu poliedryny innego bakulowirusa *Orgyia pseudotsugata* wklonowanego do plazmidu pOMS-Q (17). W wyniku hybrydyzacji tej sekwencji uzyskano fragment wielkości 3,1 tysiąca par nukleotydów, wycięty restryktazą *Sal* I. Użycie enzymu *Hinc* II pozwoliło wyizolować dwa fragmenty wielkości 2,4 oraz 0,75 tysiąca par zasad, które po wklonowaniu do pUC19 zsekwenconowano. Wielkość genu poliedryny różnych bakulowirusów jest bardzo podobna, silnie zakonserwowana i koduje białka zbudowane z 243-246 aminokwasów. Interesujące nas zatem fragmenty zawierają również sekwencje otaczające gen poliedryny. Ustalenie sekwencji genu poliedryny bakulowirusa *SsMNPV* pozwala na jego porównanie z genami poliedryny zbliżonych i odległych filogenetycznie grup bakulowirusów rodziny *Baculoviridae*. Wysoka homologia (ponad 95%) sekwencji nukleotydowej analizowanych fragmentów genomu sugeruje, że nasz izolat może być wariantem bakulowirusa *OpMNPV*, mimo iż oba bakulowirusy występują na innych kontynentach i mają innych gospodarzy. Jednocześnie mapa restrykcyjna obu genomów wykonana przy użyciu enzymu restrykcyjnego *Eco* RI wykazuje znaczące różnice wśród uzyskanych produktów trawienia. Badania infekcyjności pięciu izolatów bakulowirusa *SsMNPV*, pochodzących z różnych regionów Polski pozwoliły określić najbardziej aktywny pod względem infekcyjności i czasu działania. Różnice w wartości średniej koncentracji śmiertelnej  $LC_{50}$  różnią się nawet o trzy rzędy wielkości i wynoszą od  $2,0 \times 10^{10}$  do  $2,1 \times 10^6$  poliedrów/ml, również wartości średniego czasu zamierania  $LT_{50}$  są zróżnicowane i wynoszą od 8,0 do 23,7 dni (18).

Praca częściowo finansowana przez Komitet Badań Naukowych, projekt 6 PO 4B 011 13.



**Literatura**

1. Hunter-Fujita F. R., Entwistle P. F., Evans H. F., Crook N. E., (1998), *Insect Viruses and Pest Management*, 1-186, Wiley&Sons.
2. Christian P. D., Hanzlik T. N., Dall D. J., Gordon K. H., (1993), *Molecular Approaches to Fundamental and Applied Entomology*, 128-163, Springer-Verlag.
3. Vlak J. M., (1993), *Molecular Approaches to Fundamental and Applied Entomology*, 90-127, Springer-Verlag.
4. Hunter-Fujita F. R., Entwistle P. F., Evans H. F., Crook N. E., (1998), *Insect Viruses and Pest Management*, 313-331, Wiley&Sons.
5. Ayres M. D., Howard S. C., Kuzio J., Lopez-Ferber M., Possee R., (1994), *Virology*, 902, 586-605.
6. Gomi S., Majima K., Maeda S., (1999), *J. Gen. Virol.*, 80, 1323-1337.
7. Ahrens C. H., Russell R. L. Q., Funk C. J., Evans J. T., Harwood S. H., Rohrmann G. F., (1997), *Virology*, 229, 381-399.
8. Ukel W. F. J., van Strien E. A., Heldens J. G. M., Broer R., Zuidema D., Goldbach R. W., Vlak J. M., (1999), *J. Gen. Virol.*, 80, 3289-3304.
9. Kuzio J., Pearson M. N., Harwood S. H., Funk C. J., Evans J. T., Slavicek J. M., Rohrmann G. F., (1999), *Virology*, 253, 17-34.
10. Hunter-Fujita F. R., Entwistle P. F., Evans H. F., Crook N. E. (1998), *Insect Viruses and Pest Management*, 339-355, Wiley&Sons.
11. Stewart L. M. D., Hirst M., Ferber M. L., Merryweather A. T., Cayley P. J., Possee R. D., (1991), *Nature*, 352, 85-88.
12. Zlotkin E., (1999), *Annu. Rev. Entomol.*, 44, 429-455.
13. Zlotkin E., Devonshire A. L., Warmke J. W., (1999), *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 29(10), 849-853.
14. Possani L. D., Becerril B., Delepierre M., Tytgat J., (1999), *Eur. J. Biochem.*, 264, 287-300.
15. Lameris A. M. C., Ziemnicka J., Peters D., Grijpma P., Vlak J. M., (1985), *Med. Fac. Land. Rijk. Gent.*, 50/2a, 431-439.
16. Strokovskaya L., Ziemnicka J., Michalik J., (1996), *Acta Biochimica Polon.*, 43, 633-638.
17. Rohrman G. F., Leisy D. J., Chow K-C., Pearson G. D., Beaudreau G. S., (1982), *Virology*, 121, 51-60.
18. Szolajska E., Ziemnicka J., Michalik J., (1999), I Krajowy Kongres Biotechnologii, Wrocław, (20-25 września).