

Dariusz Łukaszyński, Anna Olejnik

Katedra Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności Akademii Rolniczej w Poznaniu

Biologiczne zwalczanie owadów – zastosowanie bakulowirusów jako bioinsektycydów

Cel stosowania biopreparatów wirusowych

W ostatnich latach nastąpił gwałtowny wzrost zainteresowania kulturami komórkowymi i tkankowymi. Do decydujących czynników stymulujących rozwój tej dziedziny biotechnologii należy zaliczyć:

- ogromny wzrost zapotrzebowania na szczepionki, przeciwciała, hormony i inne białka wykorzystywane dla celów medycznych, weterynaryjnych i diagnostycznych,
- opanowanie technik hodowlanych na dużą skalę,
- uzyskanie efektywnych linii komórkowych,
- stworzenie zdefiniowanych pożywek hodowlanych [5].

Wśród stosowanych kultur tkankowych duże zainteresowanie wzbudzają kultury komórkowe owadów. Dzięki dokładnym pracom, m.in. Granadosa i Doerflera [3,6], opisującym cykl życiowy specyficznych dla komórek owadzich bakulowirusów, wiele zachodnioeuropejskich i amerykańskich instytutów oraz firm prowadzi znacznie już zaawansowane badania nad systemem hodowlanym: komórka owadzia – bakulowirus [11].

Bakulowirusy zostały wzięte pod uwagę jako odpowiednie entomopatogeny ze względu na posiadanie przez nie wielu korzystnych biotechnologicznie cech. Postęp technologiczny umożliwia włączanie obcych genów do genomu bakulowirusa. Geny te są ekspresjonowane pod kontrolą wirusowych promotorów bez wpływu na infekcyjność i replikację wirusa. Przy użyciu nowych technologii możliwe jest wprowadzenie obcych genów do bakulowirusa w celu wyprodukowania szybko działających wirusowych insektycydów.

Dotychczasowe używanie insektycydów chemicznych stawia nas przed dwoma problemami. Pierwszy dotyczy potencjalnego wpływu chemicznych insektycydów na ludzkie życie i zdrowie. Drugi odnosi się do zdolności uodparniania się większości owadzich szkodników na główne grupy insektycydów [15].

Z tego powodu prace nad użyciem entomopatogenów: wirusów i bakterii, które mogą być użyte w podobny sposób jak insektycydy chemiczne, mają szczególnie istotne znaczenie dla ochrony upraw rolniczych, sadów, lasów, upraw szklarniowych itp.

Zaletą biologicznego zwalczania szkodliwych owadów za pomocą bakulowirusów jest przede wszystkim to, że wirusy te wykazują wybitną selektywność, to znaczy działają tylko na zwalczanego szkodnika, czego nie można powiedzieć o chemicznych środkach owadobójczych. Dzięki temu, stosując wirusy, udaje się obniżyć liczebność szkodników poniżej progu szkodliwości bez poważniejszego naruszenia równowagi w biocenozie. Taka selektywna metoda zwalczania szkodników ma duże znaczenie również dlatego, że można w ten sposób chronić owady pożyteczne. Jak wiadomo, wirusy działają podobnie jak mikroorganizmy – jako czynniki ograniczające liczebność populacji owadów. Całkowite zniszczenie danej grupy owadów, jako niezamierzony skutek intensywnego stosowania pestycydów, może doprowadzić do trudnych do przewidzenia następstw z istotnym zaburzeniem równowagi w biocenozie włącznie [9].

Idealną metodą zwalczania szkodników jest stosowanie takich wirusów, które działają regulująco już poniżej progu szkodliwości, a więc przy względnie małej gęstości populacji żywiciela. Regulujący wpływ wirusów na populacje szkodników ma także miejsce, gdy populacja przybiera rozmiary gradacyjne. W celu skutecznego zwalczania trzeba w takim wypadku najpierw namnożyć wirusy w skali technicznej, a potem uwolnić je w terenie we właściwym czasie i w dużych ilościach. Tylko w ten sposób można zapobiec namnażaniu się szkodnika przed osiągnięciem maksimum gradacji i obniżyć jego liczebność do niegroźnego poziomu. Przykładem może być zwalczanie borecznika *Neodiprion sertifer* w Ameryce Północnej. Sprowadzone z Europy wirusy poliedrozy jądrowej borecznika rudego namnażano najpierw w warunkach laboratoryjnych, a następnie rozpylano z samolotów w formie zawiesiny poliedrów na terenie występowania szkodnika. Przy ilości 4 l/ha i koncentracji 10^6 – 10^7 poliedrów/ml, uzyskano prawie 100% śmiertelności larw [9].

Stosowanie wirusów do zwalczania szkodników stwarza duże zapotrzebowanie na nadające się do dłuższego przechowywania preparaty wirusowe. Potrzebne ilości wynoszą najczęściej 10^8 – 10^{12} poliedrów na hektar. Ponieważ wydajność produkcji wirusów wynosi najczęściej 10^2 – 10^5 poliedrów z jednej gąsienicy, bezwzględnym warunkiem produkcji wirusów jest prowadzenie masowej hodowli żywicieli [9].

Poprzez wyprowadzenie wielu nowych, ustabilizowanych linii komórkowych systemy hodowli bakulowirusów uzyskały nowy, biotechnologiczny wymiar. W 1989 roku dysponowano 1 linią komórkową *Hemiptera*, 3 *Coleoptera*, 11 *Hymenoptera*, 16 *Orthoptera*, 25 *Homoptera*, 155 *Lepidoptera* i 209 *Diptera* [11]. Występujące u wirusów entomopatogennych zjawisko swoistości żywiciela powoduje, że są bezpieczne dla ludzi i zwierząt wyższych.

Polskie lasy osłabione niekorzystnymi warunkami siedliskowymi są szczególnie narażone na inwazje wszelkich szkodników. Drzewa atakowane są przez wiele gatunków owadów oraz grzybów pasożytniczych. Kiedy dochodzi do połączenia wpływu szkodników owadzych i chorób infekcyjnych z osłabieniem lasu przez czynniki abiotyczne, może dojść do masowego zamierania drzew. Drzewa o osłabionej

Tabela 1. Zastosowanie owadzych kultur komórkowych w biotechnologii

| Źródło linii komórkowej (gatunek owada) | Zastosowanie |
|---|---|
| Lepidoptera | |
| <i>Spodoptera frugiperda</i> | zrekombinowane białka |
| <i>Trichoplusia ni</i> | zrekombinowane białka |
| <i>Bombyx mori</i> | zrekombinowane białka bioinsektycydy |
| <i>Autographa californica</i> | bioinsektycydy |
| <i>Heliothis zea</i> | bioinsektycydy |
| <i>Heliothis virescens</i> | bioinsektycydy |
| <i>Lymantria dispar</i> | bioinsektycydy |
| <i>Orgyia pseudotsugata</i> | bioinsektycydy |
| <i>Neodiprion sertifer</i> | bioinsektycydy |
| Diptera | |
| <i>Aedes albopictus</i> | antygeny arbowirusów |
| <i>Aedes aegypti</i> | szczepionki |
| <i>Drosophila melanogaster</i> | zrekombinowane białka |
| <i>Sarcophaga peregrina</i> | inhibitory wzrostu |

odporności atakowane są przez nowe, mało jeszcze znane gatunki owadów i grzybów, które nie atakują drzew w pełni zdrowych.

Brudnica mniszka, najgroźniejszy szkodnik drzewostanów iglastych, wystąpiła w 1992 roku na powierzchni 160 tys. ha, w rok potem już na 472 tys. ha, a w 1994 roku trzeba było ją zwalczać już na 757 tys. ha. Podobnie rozwijały się inwazje innych szkodników lasów: barczatki sosnówki, strzygoni choinówki, osnui gwieździstej, brudnicy nieparki [13].

Przykład ten ilustruje potrzebę wdrażania i udoskonalania technik hodowli na dużą skalę w celu otrzymania wysoce skutecznych rekombinantów bakulowirusów, potrzebnych w zwalczaniu szkodliwych owadów, jak również mających zastosowanie w innych gałęziach biotechnologii. Możliwości aplikacyjne owadzych kultur komórkowych przedstawiono w tabeli 1.

Charakterystyka bakulowirusów

Na rodzinę *Baculoviridae* składają się dwie podrodziny – *Eubaculovirinae* (okluzyjne, czyli wiriony są zatopione w białkowym ciele okluzyjnym, znanym jako poliedryna) oraz *Nudibaculovirinae* (nieokluzyjne). Wirusy okluzyjne dzielą się na dwa rodzaje. Podział oparty jest na różnicach w morfologii białek ich ciał okluzyjnych. Rodzaj NPV (Nuclear Polyhedrosis Virus) charakteryzuje się ciałem okluzyjnym

(poliedryna), natomiast rodzaj GV (Granulosis Virus) ma dużo mniejsze, elipsoidalne granule [1]. DNA bakulowirusa jest skondensowane wewnątrz kapsydu (pałeczkowaty kształt kapsydu określa termin "bakulo") w strukturze nukleoproteinowego rdzenia. DNA dwóch najpopularniejszych bakulowirusów powszechnie używanych do ekspresji obcych genów – *Autographa californica* (AcMNPV) oraz *Bombyx mori* (BmNPV) – ma długość około 130kb [10]. Bakulowirusy namnażają się w larwach owadów wielu rzędów, głównie motyli (*Lepidoptera*) i muchówek (*Diptera*). Podczas infekcji produkowane są dwie różne biochemicznie i morfologicznie formy wirusa: tzw. forma okluzyjna OV, od której zaczyna się zakażenie, i tzw. forma pączkująca BV. Forma OV tworzy ciała okluzyjne w jądrach zakażonych komórek. W białku ciał okluzyjnych, poliedrynie, rozmieszczone są cząstki wirusowe. W jelicie gąsienic otoczka poliedrynowa ulega rozpuszczeniu i po replikacji uwolnionych wirusów powstają formy BV [4, 8].

Charakterystyka linii komórkowej

W większości laboratoriów do replikacji wirusa AcMNPV stosuje się linie komórkowe pochodzące z hodowli komórek jajników *Spodoptera frugiperda* (Sf9). Komórki Sf9 mogą rosnąć zarówno w monowarstwie, jak i w zawieszynie. Dla zapewnienia optymalnego wzrostu należy pamiętać o stworzeniu właściwych warunków hodowli. Temperatura hodowli waha się pomiędzy 25 a 30°C, pH 6,2–6,6, ciśnienie osmotyczne 300–380 mOsm. Aktualnie na rynku dostępnych jest wiele płynów hodowlanych, różniących się kompozycją składników. Przykładowo medium TC100 zawiera w swym składzie jedynie glukozę, natomiast medium Grace, oprócz glukozy, zawiera także fruktozę i sacharozę. Hodowle prowadzi się z 5–10-procentowym dodatkiem surowicy lub wykorzystuje się media bez surowicy (IPL-41, Sf900, EX-CELL 400, HyQ). Skład płynów odżywczych może być inny w okresie wzrostu komórek, gdy ich wymagania żywieniowe są zwiększone, a inny po zakażeniu hodowli wirusem, gdy potrzebne jest tylko utrzymanie komórek przy życiu. Komórki Sf9 podwajają swój wzrost w ciągu 18–24 godzin, stąd powinny być pasażowane 2–3 razy w tygodniu [2, 11].

W celu zapewnienia rentowności produkcji konieczne jest uzyskanie możliwie dużej gęstości komórek. Jednym z najistotniejszych czynników wpływających na gęstość komórek są warunki ich hodowli. Głównymi czynnikami limitującymi wzrost populacji komórek jest ograniczona szybkość transferu tlenu do pożywki, co przy znacznym zapotrzebowaniu na tlen komórek Sf9 może istotnie wpływać na ich wzrost, a tym samym pogarszać kolejne etapy produkcji wirusów [5]. W hodowlach na dużą skalę czynnikiem limitującym wzrost komórek jest także sposób ich mieszania. Ze względu na wysoką wrażliwość komórek owadzich na stres mechaniczny konieczne jest stosowanie specjalnych typów bioreaktorów z systemem mieszania typu air-lift lub dodawanie do medium czynników osłaniających, np. Pluronic F-68 [14]. W ho-

dowlach o kilkunastolitrowej skali otrzymano maksymalną gęstość komórek Sf9 rzędu $5 \cdot 10^6$ komórek/ml [11]. Wciąż rozrastający się rynek produktów otrzymywanych z hodowli komórkowych jest szczególnie zainteresowany nowymi technologiami, których zastosowanie pozwoliłoby znacznie zwiększyć gęstość hodowanych w bioreaktorze komórek. Jedną z takich technologii jest wykorzystanie mikronośników w celu powiększenia powierzchni, na której mogą wzrastać komórki. Inną metodą zwiększania gęstości hodowli jest mikrokapsułkowanie komórek za pomocą półprzepuszczalnej membrany. Otrzymano w ten sposób hodowle o gęstości $8 \cdot 10^7$ komórek/ml. Minusem zarówno hodowli na mikronośnikach, jak i mikrokapsułkowania jest wzrost kosztów całej hodowli i w efekcie wyższa cena otrzymanego produktu [4].

Z ekonomicznego punktu widzenia, aby produkcja biopestycydów była opłacalna, koszt medium hodowlanego nie może być większy niż 2–5 \$ za litr, obecnie wynosi 20–30 \$/litr [11]. Stworzenie taniego i pozbawionego surowicy medium jest jednym z priorytetowych zadań na najbliższe lata.

Rozwój i strategia działań związanych z użyciem bakulowirusów jako biopestycydu

Już w latach siedemdziesiątych w USA i Europie Zachodniej coraz silniej zaznaczały się tendencje proekologiczne i związane z tym poszukiwanie nowych niechemicznych technologii dla rozmaitych działów gospodarki, w tym także zamiana pestycydów chemicznych na biologiczne. Wraz z rozwojem w latach osiemdziesiątych technik inżynierii genetycznej i biologii molekularnej bakulowirusy zyskały na znaczeniu. Okazało się, że duża część obcych genów może być łatwo wprowadzana do genomu bakulowirusa, gdzie następnie ulega ekspresji.

Jest to szczególnie interesujące w zastosowaniu ich jako systemu ekspresji genów białek, posiadających właściwości terapeutyczne. W bakulowirusowym systemie ekspresji funkcjonują m.in. takie białka, jak: α , β -interferon, tkankowy aktywator plazminogenu, receptor estrogenu, insuliny, a także białka roślinne, np. fazelina, rycyna [10].

Pierwszym zarejestrowanym (w 1975 roku) wirusowym insektycydem był wytworzony w firmie Sandoz preparat Elcar, oparty na *Heliothis* NPV. Kolejnym szeroko stosowanym środkiem był bioinsektycyd oparty na wirusie *Anticarsia gemmatalis* NPV. Koszty poniesione przy jego zastosowaniu w sezonie 1989/90 wyniosły 2 \$/ha, co okazało się bardzo korzystne w porównaniu z wykorzystaniem środka chemicznego, którego koszt oszacowano na 5 \$/ha [11].

Rozwój technologii bioreaktorowych i syntetycznych mediów zintensyfikował pracę nad biopestycydami, wcześniej limitowanymi opartym na hodowli larw systemem produkcji wirusów.

Zastosowanie technik inżynierii genetycznej w tworzeniu skutecznych bioinsektycydów

Istotnym ograniczeniem związanym z rozwojem skutecznego biopestycydu była szybkość jego działania, wynosząca 5–15 dni od momentu infekcji do śmierci owada. Rozwój technik inżynierii genetycznej pozwolił przekroczyć tą niedogodność. Obecnie system BEV (Baculovirus Expression Vector) jest używany do wprowadzania licznych obcych genów do genomu wirusów takich owadów, jak: *Autographa californica* (Ac), *Helicoverpa zea* (Hz), *Lymantria dispar* (Ld) i *Bombyx mori* (Bm) [11].

W 1988 opisano zwiększenie się efektywności bakulowirusowego pestycydu po wprowadzeniu do genomu AcMNPV genu toksyny BeIT ze skorpiona *Buthus eupeus*. Ostatecznie jednak w wyniku niedostatecznej translacji biologiczna aktywność toksyny była znikoma [11]. W badaniach używano także innych toksyn. Wprowadzono gen AsIT ze skorpiona *Androctonus australis*, uzyskując 30-procentową redukcję wskaźnika ST (czas przeżycia po infekcji, podczas którego 50% larw ginie) w porównaniu z dzikim wirusem. O 40% przyspieszoną śmiertelność larw uzyskano po wprowadzeniu do genomu bakulowirusa genu toksyny TxP-I z roztocza *Pyemotes tritici*. Pracuje się także nad wklonowaniem genu delta-endotoksyny z *Bacillus thuringiensis*. W 1989 roku zanotowano ciekawe rezultaty po wprowadzeniu genu hormonu diuretycznego (DH) z *Manduca sexta*. Larwy zainfekowane tak zmienionym wirusem charakteryzowały się zmniejszoną objętością hemolimfy, co w ostateczności prowadziło do redukcji LD₅₀ o 10–20%. Bazując na odkryciu funkcji ekdysteroidu – hormonu zapewniającego właściwy cykl przemian metamorficznych owada – próbowano wyłączać gen kodujący enzym EGT, co w ostateczności prowadziło do inaktywacji hormonu. Genetyczne modyfikacje bakulowirusowego pestycydu obejmują oprócz toksyn, hormonów, enzymów również inne od niedawna badane związki. Keeley i Hayes zaproponowali ekspresję tzw. antypeptydów, które – wiążąc się do neurohormonów – blokowałyby ich fizjologiczne funkcje [7].

Testy polowe ze zmienionymi genetycznie wirusami AcMNPV zostały zapoczątkowane w 1986 roku. Rekombinowane wirusy nie zawierały jednak genów, które mogłyby wzmocnić ich pestycydową aktywność. Badania miały określić strategię na przyszłość, związaną z ograniczeniem przeżywalności zmienionych genetycznie wirusów w naturalnym środowisku. Inne testy przeprowadzone w 1987 roku przez NERC wykazały, że poprzez usunięcie genu poliedryny z rekombinowanego wirusa AcMNPV infekcyjność jego zanikła w tydzień po śmierci zakażonych larw. W 1989 r. podobne badania przeprowadzono w Boyce Thompson Institute for Plant Research, a w latach 1990–1991 w pracowniach Cornell University także testowano przeżywalność genetycznych rekombinantów pozbawionych genu poliedryny. Wszystkie dotychczasowe badania miały na celu dogłębne zbadanie relacji ekologicznych, możliwości migracji, jak też ryzyka potencjalnego zastąpienia wirusa dzikiego przez wirusy zmodyfikowane [11].

Czynniki oddziaływające na infekcyjność wirusów

Prace nad stworzeniem skutecznego bioinsektycydu muszą zakładać możliwość uodpornienia się owada na wirusowy insektycyd. Wyizolowano antywirusowe substancje z przewodu pokarmowego i hemolimfy *Bombyx mori*, co może sugerować ewentualną potrzebę zwiększania dawki insektycydu, a co za tym idzie – wzrost kosztów ochrony [15].

Innym czynnikiem oddziaływającym na proces infekcji jest wiek owada. Dla stadium larwalnego w celu otrzymania wartości LD_{50} potrzeba 10 ciał okluzyjnych (OB), natomiast dla dojrzałych form wartość ta wzrasta do ponad 100 000 OB. Wiele czynników natury geograficznej (temperatura, naświetlenie) także wpływa na proces infekcji. Zróżnicowanie w genotypie atakowanych przez owady roślin również powoduje zmiany we wrażliwości owada na infekcje wirusem [12, 15].

Podsumowanie

Rynek wirusowych pestycydów stanowi małą część olbrzymiego rynku insektycydów. W 1985 roku zaledwie 0,2% zysków ze sprzedaży insektycydów przypadało na bioinsektycydy, z tego prawie 90% dotyczyło preparatów opartych na *Bacillus thuringiensis* [15].

Relacje pomiędzy kosztami ekonomicznymi a kosztami środowiskowymi stawia jednak preparaty wirusowe w korzystniejszym położeniu w porównaniu z typowymi chemicznymi środkami. Środki chemiczne w porównaniu z bioinsektycydami działają szybciej i bardziej kompleksowo. Funkcjonowanie bioinsektycydów należy więc rozpatrywać przede wszystkim w kategoriach ekologicznych, jako środków nietoksycznych, których działanie jest limitowane do konkretnego szkodnika.

Literatura

- [1] Agathos S. 1991. Production Scale Insect Cell Culture. *Biotech. Adv.* 9: 51–68.
- [2] Cameron I., Possee R., Bishop D. 1989. Insect Cell Culture Technology in Baculovirus Expression System. *TIBTECH*, March 7: 66–70.
- [3] Doerfler W., Bohm P. 1986. The Molecular Biology of Baculoviruses. Current Topics in Microbiology and Immunology. Vol. 13, Springer Verlag Berlin.
- [4] Goosen M., Daugulis A., Faulkner P. 1993. Insect Cell Culture Engineering, Marcel Dekker Inc. New York.
- [5] Grajek W., Łukaszyński D. 1993. Doświadczalne i przemysłowe systemy hodowli komórek zwierzęcych. *Biotechnologia* 2(21): 8–21.
- [6] Granados R., Federici B. 1986. Biology of Baculoviruses, CRC Press, Boca Raton.
- [7] Keeley L., Hayes T. 1987. *Insect Biochem.* 17: 639–651.

- [8] Kochan G., Szewczyk B. 1993. Zastosowanie wirusa owadziego-bakulowirusa AcNPV do ekspresji obcych genów. *Biotechnologia* 2(21): 69–75.
- [9] Krieg A. 1978. Wirusy stawonogów, PWN Warszawa.
- [10] O'Reilly D., Miller L., Luckow V. 1994. Baculovirus Expression Vectors. A Laboratory Manual, Oxford University Press.
- [11] Shuler M., Wood A., Granados R., Hammer D. 1995. Baculovirus Expression Systems and Biopesticides, Wiley-Liss, Inc. New York.
- [12] Sosa-Gomez D., Alves S., Marchini L. 1991. Variation in the Susceptibility of *Bombyx mori* to Nuclear Polyherdrosis Virus when Reared on Different Mulberry Genotypes. *J. of Applied Entomology* 111(3): 318–320.
- [13] Szot E. 1995. Zasychające dobro ogólnonarodowe. *Rzeczpospolita* nr 139 (4092).
- [14] Tramper J., Lier F., Kool M., de Gooijer C., Vlaskov J. 1992. Production of Recombinant Baculoviruses in Insect-Cell Bioreactors, *Rec. Adv. in Biotechnology*: 263–284.
- [15] Winstanley D., Rovesti L. 1993. Insect Viruses as Biocontrol Agents, Exploitation of Microorganism, Chapman & Hall, London: 105–131.

Biological insect control – application of baculovirus as a bioinsecticide

Summary

The development of insect cell culture techniques for the production of insect pathogenic viruses has been reviewed, with emphasis on process scale-up and genetic enhancement of viral pesticides.

Insect cells in culture are currently the subject of great interest as superior hosts for the efficient production of biologicals with applications in health care, in agriculture and forestry. The very prominent system used both in research and in commercial scale application involves insect cells transfected with baculovirus expression vectors for abundant formation of recombinant proteins, vaccines and biopesticides.