

Wyselekcjonowany szczep bakulowirusa LdMNPV, gen kodujący polihedrynę szczepu bakulowirusa LdMNPV i zastosowanie sekwencji w otrzymywaniu produktów ochrony roślin przed brudnicą nieparką lub środka do badania *Lymantria dispar*

Przedmiotem wynalazku jest wyselekcjonowany szczep bakulowirusa LdMNPV, oznaczany według wynalazku jako LdMNPV-P01 do zastosowań w produktach ochrony roślin przed brudnicą nieparką *Lymantria dispar* i/lub opracowanie produktów wykorzystywanych w biologii molekularnej takich jak: wektory plazmidowe, przeciwciała, enzymy w zakresie badania *Lymantria dispar*. Wynalazek obejmuje również gen kodujący polihedrynę szczepu szczep bakulowirusa LdMNPV.

Wynalazek dotyczy również zastosowania bakulowirusa (wirusa polihedrozy jądrowej) szczepu „P01” *Lymantria dispar* multinukleopolihedrowirus (LdMNPV-P01) jako aktywnego środka ochrony roślin, który w naturalnych warunkach infekuje groźnego szkodnika, brudnicę nieparkę (*Lymantria dispar* L.).

Szczep ten został wyselekcjonowany na terenie Polski w województwie pomorskim, charakteryzuje się zwiększoną zjadliwością oraz odmienną sekwencją nukleotydową, które odróżniają go od pozostałych znanych szczepów polskich i zagranicznych.

Wynalazek znajduje zastosowanie w postaci fragmentu lub całości sekwencji nukleotydowej seq 1LdMNPV-P01 w celach produkcji środków ochrony roślin przed brudnicą nieparką.

Brudnica nieparka jest polifagicznym motylem z rodziny Erebidae (mrocznicowatych), podrodziny Lymantriinae (brudnicowatych) i jednym z najgroźniejszych szkodników o zasięgu globalnym. Występuje w ogrodach, szkółkach, parkach, skupiskach leśnych atakując głównie drzewa liściaste, a w czasie masowego występowania może niszczyć także drzewostany iglaste. Największe straty powoduje stadium larwalne brudnicy nieparki, czyli gąsienice, które żerują w koronach drzew. W czasie gradacji powodują defoliację dużych połaci roślin, które w następstwie powodują ich obumieranie, wywołując tym samym ogromne straty ekonomiczne. Niezbędne i konieczne jest stosowanie środków ochrony roślin, aby chronić ekosystem i zachować jego naturalną integralność.

Kontrola biologiczna może być zdefiniowana jako regulacja występowania gatunku, który osiągnął poziom określany jako szkodliwy dla środowiska poprzez inny gatunek dodany do środowiska w celu ograniczenia gatunku szkodliwego. W światowej

gospodarce rolniczej i leśnej biologiczne środki ochrony roślin zyskują na coraz większej popularności. Największą zaletę tego typu ochrony stanowi ograniczenie stosowania chemicznych pestycydów wciąż stosowanych w nadmiarze, które są mało selektywne i niespecyficzne, co powoduje niszczenie środowiska.

Znane jest zastosowanie w biologicznym ograniczaniu liczebności owadów mikroorganizmów entomopatogenicznych takich jak bakterie, grzyby i wirusy. Znany jest biopestycyd, w którym głównym składnikiem aktywnym jest bakteria *Bacillus thuringiensis* (Bt) produkująca toksynę kodowaną przez gen *cry*, szkodliwą dla niektórych owadów. Pomimo faktu że jest powszechnie stosowany nie stanowi idealnego preparatu, przede wszystkim ze względu na niską odporność form przetrwalnikowych i kryształów na liściach na promieniowanie słoneczne UV oraz to, że działa mało selektywnie na inne owady z danej rodziny (np. *Bacillus thuringiensis* serotyp kurstaki - Lepidoptera).

Znany jest insektycyd oparty na bakulowirusie o nazwie ElcarTM, który został wprowadzony na rynek w Stanach Zjednoczonych w 1975 roku do ochrony upraw bawełny i w swoim składzie zawiera *Heliothis zea* NPV (HzNPV). Według doniesień to jedne z gatunków najszybciej nabywających oporność na pestycydy, wliczając w to oporność na transgeniczną bawełnę produkującą białko kodowane przez gen *cry* pochodzący z bakterii Bt. Historycznie, największym sukcesem na świecie cieszyło się zastosowanie bakulowirusa *Anticarsia gemmatalis* MNPV (AgMNPV), gdzie w szczycie zastosowania na ogromną skalę używano go do ochrony 2mln hektarów upraw soi na terenie Brazylii. Powszechnie stosowanym na całym świecie jest biopestycyd i opiera się na bakulowirusie infekującym szkodnika sadów owocowych, głównie jabłoni i gruszy – owocówkę jabłkóveczkę, *Cydia pomonella*. Znane są biologiczne środki ochrony roślin, które zawierają w składzie jako aktywny składnik - *Cydia pomonella* granulowirus (CpGV), granulowirus (AdorGV) atakującego szkodnika zwójkę siatkóveczkę *Adoxophyes orana*. Działają bardzo specyficznie i skutecznie. W Ameryce Północnej z powodzeniem stosowany jest biopestycyd Gypchek, którego aktywnym składnikiem jest bakulowirus LdMNPV. Jego odpowiedniki pod inną nazwą handlową dostępne są również w Rosji i Kanadzie oraz od niedawna produkowane także w Szwajcarii. Nie został on jednak zarejestrowany w Polsce i jego stosowanie na terenie naszego kraju jest zabronione. wprowadzony obowiązek stosowania zintegrowanej ochrony roślin przez wszystkich profesjonalnych użytkowników środków ochrony roślin wynika z postanowień dyrektywy 2009/128/WE z 21 października 2009r. ustanawiającej ramy wspólnotowego działania

rzecz zrównoważonego stosowania pestycydów oraz rozporządzenia nr 1107/2009 dotyczącego wprowadzania do obrotu środków ochrony roślin. W myśl tych przepisów środki ochrony roślin muszą być stosowane zgodnie z ogólnymi zasadami integrowanej ochrony roślin, co oznacza, że pierwszeństwo przed chemicznymi metodami zwalczania organizmów szkodliwych będą miały metody biologiczne, fizyczne i inne metody nie chemiczne, o ile będą skuteczne. Stwarza to potencjalną szansę na wykorzystanie biopestycydów zwłaszcza opartych na bakulowirusie w tym LdMNPV na polskim i międzynarodowym rynku.

Poznanie kolejnych całych genomów potwierdza fakt, że wirusy z rodziny Baculoviridae ewoluowały wraz z owadami. Znane są cztery ich rodzaje: Alphabaculovirus - nukleopolihedrowirusy (NPV) infekujące motyle Lepidoptera; Betabaculovirus – granulowirusy infekujące motyle Lepidoptera, Deltabaculovirus – z dotychczas jedynym poznanym przedstawicielem *Culex nigripalpus* NPV (CuniNPV), którego gospodarzem jest komar z rzędu Diptera oraz Gammabaculovirus – NPV zakazające błonkówek Hymenoptera. Do rodziny Baculoviridae należą duże cylindryczne wirusy, których ciała okluzyjne (ang. occlusion bodies, OBs) mogą być widoczne w mikroskopie świetlnym. Ich materiał genetyczny stanowi kolisty, superzwinięty dwuniciowy DNA, związany z małym zasadowym białkiem o masie cząsteczkowej ok. 7kDa. Genom ma długość od 80-180kbp i koduje od 90-180 genów, z których 38 jest silnie konserwowanych i obecnych u każdego gatunku bakulowirusa. Materiał genetyczny otoczony jest białkowym kapsydem, na powierzchni którego znajdują się białka otoczkowe. W trakcie cyklu życiowego bakulowirusa występują dwa fenotypy form infekcyjnych: ODV (ang. occlusion derived virus) – wiriony wywodzące się z okluzji, które wydostają się na zewnątrz gąsienicy i BV (ang. budding virus) – powstające w trakcie infekcji wewnątrz gospodarza. Pierwsza odpowiada za rozprzestrzenianie się infekcji pomiędzy owadami, druga natomiast za infekowanie tkanek gąsienicy. W przypadku formy okluzyjnej wirusa, cząstki wirusów otoczone są grubą warstwą białka granuliny (u betabakulowirusów) oraz polihedryny (dla pozostałych), dzięki którym bakulowirusy wykształciły umiejętność przetrwania w środowisku, od kilku do nawet kilkudziesięciu lat, o ile nie są wystawione na działanie wysokiej temperatury lub promieniowania UV.

Ze względu na fakt, że wirusy z rodziny Baculoviridae są ściśle ewolucyjnie związane z gospodarzem, którego infekują, w nazewnictwie obowiązują proste zasady.

Nazwa wirusa pochodzi od nazwy gatunkowej gospodarza, z którego po raz pierwszy został wyizolowany wirus, z dodatkiem granulowirus (GV) lub nukleopolihedrowirus (NPV). W przypadku NPV, gdy mamy do czynienia z nukleokapsydami połączonymi w skupiska w otoczkach zatopionych w ciało okluzyjne dodajemy przedrostek – ang. multi (MNPV), a gdy nukleokapsydy występują pojedynczo w otoczkach – ang. single (SNPV). Oznaczenie gatunkowe wirusa tworzy akronim złożony z pierwszych liter łacińskiej nazwy gospodarza zakończony GV (ang. Granulovirus) np. CpGV dla wirusa granulozy motyla *Cydia pomonella*.

Generalnie bakulowirusy mają bardzo wąski zakres gospodarzy, co znaczy, że jeden wirus infekuje tylko jeden lub kilka bardzo blisko ze sobą spokrewnionych gatunków owadów. Do zakażenia dochodzi drogą pokarmową. Cykl życiowy rozpoczyna się w momencie, gdy ciała okluzyjne (polihedra lub granule) znajdujące się na liściu zostaną zjedzone przez gąsienicę podatną na zakażenie i trafiają do układu pokarmowego. Tam w silnie zasadowym środowisku ciała okluzyjne ulegają rozpuszczeniu i dochodzi do infekcji komórek nabłonka gąsienic formą ODV uwolnioną z okluzji. Następnie wirus rozprzestrzenia się w ciele gąsienicy, aby na końcu infekcji spowodować rozpad tkanek i uwolnienie wirusa do środowiska. Nowopowstałe ciała okluzyjne trafiają np. na liść, dzięki czemu możliwe jest zakażenie innych podatnych gąsienic lub przeniesienie infekcyjnych cząstek wirusowych z wiatrem, przez drapieżniki np. ptaki lub z deszczem do gleby.

Bakulowirusy są stosowaną grupą wirusów w ochronie biologicznej roślin. Aktualnie stanowią najlepiej poznaną pod względem biologii, ekologii i patologii grupę wirusów infekujących owady. Są szczególnie przydatne, ponieważ ze względu na swoją specyficzność nie wywierają negatywnego wpływu na inne gatunki motyli, jak również na pasożytniki czy inne pożyteczne gatunki, jak np. pszczoły. Kolejną zaletą biopestycydów opartych na bakulowirusie jest fakt, że nie namnażają się w komórkach ssących – są zatem bezpieczne dla ludzi i zwierząt. Bakulowirus jest w stanie w warunkach laboratoryjnych wejść do komórki ssacej, ale nie może się w niej namnożyć. Dodatkowym aspektem przemawiającym za ich stosowaniem jest zdolność utrzymywania się w środowisku, czyli zakażenia kolejnych pokoleń bez ponownej aplikacji. Mogą być produkowane na dużą skalę, poddane formulacji, pakowane, przechowywane i sprzedawane w identyczny sposób jak chemiczne pestycydy. Natomiast w trakcie wykonywania zabiegów ochronnych, jeśli zachodzi taka potrzeba bakulowirusy mogą być

mieszane z chemicznymi insektycydami, co pozwala na zmniejszenie dawki chemicznego pestycydu przy zachowaniu jego pełnej skuteczności.

Z opisu patentowego PL 228 449 B1 7 znany jest wyselekcjonowany szczep bakulowirusa LdMNPV-PL do zastosowań w produktach ochrony roślin. Ujawniono pełne sekwencje genów polh, lef-8, lef-9, lef-1, chitynaza, egt, efp, sod, v-ubi, pif-2, bakulowirusa LdMNPV-PL, z zastosowaniem całych lub częściowych sekwencji nukleotydowych lub ich aminokwasowych odpowiedników w celach produkcji aktywnego składnika środków ochrony roślin, wykorzystanego w biologii molekularnej, takich zwłaszcza jak wektory plazmidowe, przeciwciała i enzymy. Ujawniono zastosowanie szczepu w celach ochrony przed szkodnikiem brudnicą nieparką do ochrony roślin.

Wciąż poszukuje się wirusów mogących mieć zastosowanie jako biopestycydy o lepszej skuteczności, co było przedmiotem wynalazku w temacie brudnicy nieparki.

Brudnica nieparka (*Lymantria dispar* L.) jest jednym z owadów wyrządzających gospodarcze szkody w lasach i sadach. Jest gatunkiem polifagicznym mogącym żerować na około 500 gatunkach drzew, krzewów i runa. Spośród różnych gatunków roślin żywicielskich preferuje dęby (*Quercus* spp.), a następnie graby (*Carpinus* spp.), brzozy (*Betula* spp.), lipy (*Tilia* spp.), topole (*Populus* spp.), klony (*Acer* spp.) i czeremchy (*Padus* spp.). W okresach masowego pojawu, brudnica nieparka żeruje również na drzewach iglastych, najczęściej na sośnie (*Pinus* spp.), a także na świerku (*Picea* spp.) i modrzewiu (*Larix* spp.).

Gradacje brudnicy nieparki obserwuje się w różnych częściach Świata. W Europie powoduje znaczne szkody przede wszystkim w drzewostanach dębowych. We Francji w latach 80-tych zanotowano masowe występowanie brudnicy nieparki na dębach *Quercus ilex*, *Quercus pubescens* oraz na wiązach (*Ulmus* spp.) i gruszach (*Pyrus* spp.). Ponownie we Francji w latach 90-tych stwierdzono masowy pojaw brudnicy nieparki, której żery spowodowały zamarcie i w konsekwencji usunięcie około 1 mln m³ drewna dębowego *Q. ruber* i *Q. rubra*. Na Półwyspie Bałkańskim szczególnie zagrożone są drzewostany dębowe i sady, gdzie szkodnik występuje co 7–8 lat w gradacjach trwających około 3–4 lata. Dotkliwie straty wyrządza brudnica nieparka na wschodzie i północy Rosji, gdzie żeruje na dębach, brzozach i topolach. W Japonii brudnica nieparka jest szkodnikiem plantacji modrzewia *Larix leptolepis* i brzozy *Betula platyphylla*. Wzmózone pojawy brudnicy nieparki notuje się w Afryce Północnej, także w Maroku i Algierii, gdzie żeruje na dębie korkowym *Quercus suber* i dębie kasztanolistnym *Quercus castaneifolia*.

Największe gospodarcze szkody brudnica nieparka wyrządziła w USA, gdzie została zawleczona w końcu XIX wieku i wobec braku wrogów naturalnych rozmnożyła się na wschodnim wybrzeżu niszcząc lasy dębowe na około 20 milionach hektarów.

W Polsce brudnica nieparka powoduje szkody we wschodniej części kraju atakując sady i lasy liściaste, głównie dębowe. Zgodnie z informacjami Instytutu Badawczego Leśnictwa w Sękocinie Starym w ciągu kilkudziesięciu lat nieparka wystąpiła na łącznej powierzchni ponad 20 tys. ha, przy czym zabiegi ochronne wykonano na powierzchni około 4 tys. ha. Szacuje się, że w ciągu najbliższych lat ponownie pojawi się masowe występowanie. Mimo tego, że w Polsce aktualnie brudnicy nieparki nie zalicza się do groźnych szkodników, to jej żery powtarzające się przez kilka lat mogą spowodować m.in. straty w przyroście drzew. Poza tym pogarszanie się kondycji drzewostanów dębowych, chociażby ze względu na panującą od kilkunastu lat suszę w polskich lasach, oraz planowana przebudowa gatunkowa lasów, mająca na celu zwiększenie udziału drzew liściastych, mogą przyczynić się do zaliczenia w przyszłości brudnicy nieparki do grupy niebezpiecznych szkodników leśnych. Obecnie w wielu krajach prowadzi się badania nad rolą patogenów brudnicy nieparki i możliwościami ich wykorzystania w biologicznych metodach ochrony roślin. Spośród mikroorganizmów wywołujących choroby brudnicy nieparki najlepiej poznany jest wspomniany wcześniej wirus polihedrozy jądrowej – *Lymantria dispar multinukleopolihedrowirus* (LdMNPV) zaliczany do rodziny bakulowirusów (Baculoviridae).

Wciąż brakuje biopestycydu, którego zastosowanie nie spowodowałoby rozprzestrzenienia się wirusa obcego pochodzenia – z innego kraju. Dodatkowo, użycie już poznanych i scharakteryzowanych szczepów LdMNPV nie gwarantuje wysokiej śmiertelności szkodników w stosunkowo krótkim czasie.

Konieczne wydaje się więc, wprowadzenie nowego środka ochrony roślin z terenu Polski, który będzie bezpieczny dla środowiska naturalnego i człowieka, nie będzie wprowadzać obcych mikroorganizmów do europejskich ekosystemów i jednocześnie będzie charakteryzować się krótszym czasem unieszkodliwiania szkodników niż miejscowe izolaty wirusów.

Ze względu na fakt, że wirus LdMNPV często wywołuje epizootcje powodujące załamanie się gradacji szkodnika, wirus polihedrozy jądrowej stanowi przedmiot zainteresowania według wynalazku.

Celem wynalazku jest dostarczenie wyselekcjonowanego szczepu bakulowirusa LdMNPV-P01, który może zostać wykorzystany do produkcji nowego, biologicznie środka ochrony roślin przed brudnicą nieparką – zwłaszcza bezpiecznego biopestycydu.

Wynalazek obejmuje nowy szczep wirusa infekującego brudnicę nieparkę. Szczep różni się znacząco od znanych i wykazuje podwyższoną aktywność względem tego szkodnika, namnaża się w nim i może zostać zastosowany do ochrony przed brudnicą.

Wynalazek dotyczy również zastosowania wyselekcjonowanego szczepu bakulowirusa LdMNPV-P01 – pełnej sekwencji oraz wybranego genu kodującego polihedrynę, do zastosowań do ochrony roślin przed brudnicą nieparką, w produktach ochrony roślin *Lymantria dispar*, zwłaszcza biopestycydach.

Wynalazek pokazano na sekwencjach.

Sekwencja DNA szczepu LdMNPV-P01 czyli pełna sekwencja genomu LdMNPV-P01 pokazano jako seq. 1 zaś wybrana sekwencja kodująca polihedrynę pokazano jako seq.2.

Na Fig. 1 pokazano porównanie pokrewieństwa filogenetycznego pomiędzy charakterystycznym szczepem LdMNPV-P01, a innymi przedstawicielami rodziny Baculoviridae - graficzne przedstawienie pokrewieństwa filogenetycznego LdMNPV-P01 z innymi bakulowirusami na podstawie pełnej sekwencji genu polihedryny; figura 2 przedstawia aktywność biologiczną wirusa LdMNPV-P01 wobec gąsienic brudnicy nieparki (*Lymantria dispar*) przy zastosowaniu dawki 10^7 OBs/ na gąsienicę), fig. 3- przedstawia aktywność biologiczną wirusa LdMNPV-P01 wobec gąsienic brudnicy nieparki (*Lymantria dispar*) przy zastosowaniu dawki 10^6 OBs/ na gąsienicę przy zastosowaniu dawki 10^7 OBs/ na gąsienicę. Fig. 4 przedstawia aktywność biologiczną wirusa LdMNPV-P01 wobec gąsienic brudnicy nieparki (*Lymantria dispar*) przy zastosowaniu dawki - 10^5 OBs/ na gąsienicę. 10^6 OBs/ na gąsienicę, Fig. 5 - elektroforeza w 1% żelu agarozowym produktu reakcji PCR pozwalającą powielić gen kodujący polihedrynę bakulowirusa LdMNPV-P01, fig. 6 - analiza restrykcyjna przy użyciu enzymu restrykcyjnego BglII plazmidów pJet1.2 z klonowanym genem kodującym polihedrynę bakulowirusa LdMNPV-P01 (2 klonów) (elektroforeza w 1% żelu agarozowym) - prążki na wysokości ok. 750pz wskazują na zajęcie klonowania.

Na Fig. 2 - badanie aktywności wirusa LdMNPV-01 względem brudnicy nieparki w dawce 10^7 OBs/gąsienicę zastosowano oznaczenia: LdMNPV-P01 – wirus infekujący brudnicę

nieparkę będący przedmiotem wynalazku; LdMNPV-RR – inny polski szczep wirusa LdMNPV; OBs – ciała okluzyjne (ang. occlusion bodies, inaczej polihedra).

Na fig. 3 - badanie aktywności wirusa LdMNPV-01 względem brudnicy nieparki w dawce 10^6 OBs/gąsienicę użyto oznaczenia: LdMNPV-P01 – wirus infekujący brudnicę nieparkę będący przedmiotem wynalazku; LdMNPV-RR – inny polski szczep wirusa LdMNPV; OBs – ciała okluzyjne (ang. occlusion bodies, inaczej polihedra).

Na fig. 4 - badanie aktywności wirusa LdMNPV-01 względem brudnicy nieparki w dawce 10^5 OBs/gąsienicę użyto oznaczenia: LdMNPV-P01 – wirus infekujący brudnicę nieparkę będący przedmiotem wynalazku; LdMNPV-RR – inny polski szczep wirusa LdMNPV; OBs – ciała okluzyjne (ang. occlusion bodies, inaczej polihedra). Na fig. 5 pokazano elektroforezę w 1% żelu agarozowym produktu reakcji PCR pozwalającą powielić gen kodujący polihedrynę bakulowirusa LdMNPV-P01, a na fig. 6 pokazano analizę restrykcyjną przy użyciu enzymu restrykcyjnego BglII plazmidów pJet1.2 z klonowanym genem kodującym polihedrynę bakulowirusa LdMNPV-P01 (2 klonów) (elektroforeza w 1% żelu agarozowym). Prążki na wysokości ok. 750pz wskazują na zajście klonowania.

Według wynalazku istnieje możliwość wykorzystania części lub całości sekwencji nukleotydowych lub ich aminokwasowych transkryptów genów LdMNPV-P01 w celu stworzenia składnika preparatu do zwalczania szkodnika roślin *Lymantria dispar* lub/i stworzenia produktów wykorzystywanych w biologii molekularnej takich jak: wektory plazmidowe, przeciwciała, enzymy w zakresie badania *Lymantria dispar*.

Celem potwierdzenia wykorzystania wynalazku pokazano wykorzystanie bakulowirusa (wirusa polihedrozy) szczepu „P01” *Lymantria dispar* nukelopolihedrowirus (LdMNPV-P01) jako aktywnego składnika środka ochrony roślin w celach produkcji środków ochrony roślin i/lub produktów wykorzystywanych w biologii molekularnej. Dzięki zastosowaniu wynalazku możliwe jest stworzenie biopestycydu, który wykazywać się będzie bezpieczeństwem biologicznym oraz zwiększoną aktywnością wobec szkodników upraw i lasów w porównaniu do środków opartych na lokalnych izolatach LdMNPV.

P r z y k ł a d 1.

Potwierdzenie wykorzystania całej sekwencji LdMNPV-P01 – czyli opracowanego wirusa infekującego brudnicę nieparkę.

Gąsienice zakażone wirusem LdMNPV-P01 homogenizowano w niewielkiej ilości wody destylowanej w celu maceracji tkanek i uwolnienia ciał wtrętowych. Po 1-tygodniowej maceracji zawiesinę przesączano trzykrotnie przez gazę młyńską, a uzyskany filtrat poddawano wirowaniu przez 1 min przy obrotach 500 rpm. w celu oddzielenia zanieczyszczeń, np. fragmentów tkanek. Powstały nad osadem zanieczyszczeń płyn zawierający polihedra zlewano i zawieszano w wodzie destylowanej, a następnie wirowano przez 15 min przy obrotach 3500 rpm. Po trzykrotnym płukaniu w wodzie destylowanej i wirowaniu osad z ciałami okluzyjnymi ponownie zawieszano w wodzie destylowanej i przechowywano w temperaturze 4°C do momentu wykorzystania w doświadczeniach.

W doświadczeniach sprawdzających możliwość ochrony drzew przed brudnicą nieparką wykonano badanie aktywności wirusa w badaniach eksperymentalnych. Wykorzystano gąsienice brudnicy nieparki w stadium L3 pochodzące ze złożeń jaj standardowego szczepu brudnicy nieparki (New Jersey Standard Strain - NJSS). Zdrowe gąsienice 24h przed infekcją umieszczano pojedynczo w dołku na płytkach 12-dołkowych, w celu ich przegłodzenia. Po upływie ok. 24h dokładano do dołka drobny kawałek pożywki syntetycznej o wielkości 3x3x3mm z odpowiednią ilością ciał okluzyjnych (w 3 układach) wirusa LdMNPV-P01 przypadających na ten kawałek – 1×10^7 (Fig. 2), 1×10^6 (Fig. 3), 1×10^5 polihedrów (Fig.4). Negatywną grupą kontrolną dostawała pożywienie bez wirusa. Pozytywną grupę kontrolną stanowiły gąsienice infekowane innym polskim szczepem LdMNPV-RR01 wg powyższego schematu z taką samą ilością polihedrów na fragment pożywienia. W każdym wariantcie doświadczenia hodowano po 24 gąsienice przez okres 3tygodni, każdego dnia zliczając ilość martwych gąsienic. Zależność śmiertelności gąsienic od dnia eksperymentu przedstawiono na wykresach (Fig.2-4).

Figury 2-4 przedstawiają proces zamierania gąsienic infekowanych standardowym izolatem bakulowirusa gatunku LdMNPV (czyli LdMNPV-RR) w porównaniu do zamierania gąsienic po infekcji szczepem LdMNPV-P01. Na fig. 2 przedstawiono układ doświadczalny z dawką wirusa 10^7 ciał okluzyjnych na gąsienicę. Na fig. 3 przedstawiono układ doświadczalny z dawką wirusa 10^6 ciał okluzyjnych na gąsienicę. Na fig. 4 przedstawiono układ doświadczalny z dawką wirusa 10^5 ciał okluzyjnych na gąsienicę. Wyniki świadczą o tym, że po zastosowaniu izolatu LdMNPV-P01 gąsienice zainfekowane wirusem zamierają szybciej. Szybsze zamarcie gąsienic powoduje zmniejszenie powierzchni zjedzonych liści po zastosowaniu preparatu, a to oznacza

wyższą skuteczność pestycydu zawierającego w swym składzie bakulowirusy posiadające seq. 1.

Objaśnienia do figur, ze stosowanymi skrótami.

Fig. 2. Badanie aktywności wirusa LdMNPV-P01 względem brudnicy nieparki w dawce 10^7 OBs/gąsienicę. LdMNPV-P01 – wirus infekujący brudnice nieparkę będący przedmiotem wynalazku; LdMNPV-RR – inny polski szczep wirusa LdMNPV; OBs – ciała okluzyjne (ang. occlusion bodies, inaczej polihedra).

Fig. 3. Badanie aktywności wirusa LdMNPV-01 względem brudnicy nieparki w dawce 10^6 OBs/gąsienicę. LdMNPV-P01 – wirus infekujący brudnice nieparkę będący przedmiotem wynalazku; LdMNPV-RR – inny polski szczep wirusa LdMNPV; OBs – ciała okluzyjne (ang. occlusion bodies, inaczej polihedra).

Fig. 4. Badanie aktywności wirusa LdMNPV-01 względem brudnicy nieparki w dawce 10^5 OBs/gąsienicę. LdMNPV-P01 – wirus infekujący brudnice nieparkę będący przedmiotem wynalazku; LdMNPV-RR – inny polski szczep wirusa LdMNPV; OBs – ciała okluzyjne (ang. occlusion bodies, inaczej polihedra).

P r z y k ł a d 2. Wybrany gen polh wirusa LdMNPV-P01, odpowiadający seq. 2. został powielony przy pomocy reakcji łańcuchowej polimerazy (PCR) przy pomocy starterów:

P1 : ATGCACGGTAGACTTTATAAC oraz

P2: CAAGGACCCGCCTATTGA

Reakcja PCR prowadzona była w następujących warunkach:

x 1 x 95°C 3 min

x 27 x 95 °C 20 sek

53 °C 30 sek

72 °C 75 sek

Po przeprowadzeniu reakcji PCR, produkt reakcji był analizowany metodą elektroforezy agarozowej, prążki po wybarwieniu barwnikiem SimplySafe (interkalującym do dwuniciowego DNA) były oświetlane promieniowaniem nadfioletowym w zakresie około 360 nm i analizowane wizualnie na transiluminatorze. Prążek DNA odpowiadał wielkością temu, który powinien powstawać w reakcji PCR: około 750 nt (Fig. 5). W celu potwierdzenia powielenia sekwencji całego genu polh w reakcji PCR, prążek

odpowiadający właściwej masie cząsteczkowej był izolowany z żelu agarozowego 1%. Oczyszczony fragment ligowano z wektorem pJET 1.2 (Fermentas), który służy do klonowania produktów po reakcji PCR. Mieszaniną reakcyjną transformowano komórki *Escherichia coli* Mach1, a następnie wysiewano na płytki z podłożem selekcyjnym zawierającym w końcowym stężeniu ampicylinę 100 µg/ml. Kolonie namnażano w hodowli płynnej z dodatkiem ampicyliny w stężeniu końcowym 100 µg/ml i izolowano DNA plazmidowy za pomocą kolumniek firmy A&A BIOTECHNOLOGY. Każdy z plazmidów poddawano dokładnej analizie restrykcyjnej enzymem restrykcyjnym enzymem BglII, umożliwiającym wycięcie klonowanego fragmentu, w celu potwierdzenia zajścia klonowania (Fig.6). Plazmidy zawierające wklonowane fragmenty i niezmieniony plazmid wyjściowy były w końcowym etapie sekwencjonowane przy użyciu uniwersalnych starterów pJET 1,2F i pJET 1,2R w celu potwierdzenia, że plazmid posiada sekwencję nukleotydową całkowicie zgodną z przewidywaniami teoretycznymi.

Wyniki świadczą o tym, że izolat LdMNPV-P01 należy do gatunku LdMNPV przez co może być stosowany wspólnie z / lub niezależnie od innych izolatów tego samego gatunku. Świadczy to o tym, że preparat zawierający aktywny składnik posiadający sekwencję nukleotydową odpowiadająca seq. 1 może być stosowany do ochrony roślin identycznie jak preparaty wykorzystujące inne izolaty gatunku LdMNPV.

Objaśnienia do figur.

Fig. 5. Elektroforeza w 1% żelu agarozowym produktu reakcji PCR pozwalającą powielić gen kodujący polihedrynę bakulowirusa LdMNPV-P01.

Fig. 6. Analiza restrykcyjna przy użyciu enzymu restrykcyjnego BglII plazmidów pJet1.2 z klonowanym genem kodującym polihedrynę bakulowirusa LdMNPV-P01 (2 klonów) (elektroforeza w 1% żelu agarozowym). Prążki na wysokości ok. 750pz wskazują na zajście klonowania.