

Biologické přípravků na bázi entomopatogenních virů

Přehled a praktické aspekty jejich záměrného využívání v ekologickém zemědělství

Entomopatogenní viry tvoří velmi významnou, nicméně poměrně málo známou a v praktické biologické ochraně doposud jen sporadicky využívanou skupinu hmyzích patogenů. V současnosti je evidováno více než 1600 druhů virů přímo asociovaných s hmyzími hostiteli. Primární infekce způsobené viry byly zaznamenány již na více než 1000 druzích hmyzích hostitelů. Taxonomie entomopatogenních virů je poměrně složitá a doposud ne zcela ustálená. Zastoupení druhů schopných vyvolat primární onemocnění hmyzích hostitelů bylo prokázáno ve více než 15 čeledích virů. V některých čeledích jsou entomopatogenní viry zastoupeny jen zcela ojediněle (např. čeleď *Birnaviridae* s jediným známým zástupcem – *Drosophila X virus*), v jiných čeledích jsou entomopatogenní viry přítomny zcela běžně (např. *Entomopoxviridae*, *Rhabdoviridae*, *Iridoviridae* a *Parvoviridae*). Z hlediska zastoupení entomopatogenních druhů je však jednoznačně nejvýznamnějším taxonem čeleď *Baculoviridae* (tzv. bakuloviry), sestávající téměř výhradně z druhů asociovaných s hmyzem a jen zcela výjimečně zahrnuje viry vykazující patogenní vazbu i na jiné druhy členovců (např. roztoče).

***Baculoviridae* – nejvýznamnější čeleď entomopatogenních virů**

Entomopatogenní viry čeledi *Baculoviridae* jsou velké, tyčinkovité DNA viry, které jsou typické tím, že jejich virion (= infekční DNA, tzv. extracelulární virus, DNA o velikosti 100-200 kbp kódujících až 70 proteinů průměrné velikosti) je zpravidla samostatně nebo ve skupinkách obalen primární bílkovinnou membránou (tzv. nucleocapsida), která je navíc zapouzdřena v sekundární proteinové matici. Pouze výjimečně jsou mezi bakuloviry přítomny i druhy, které tvoří partikule nezapouzdřené v ochranné bílkovinné matici (tzv. *NOV* – *none occluded viruses*). Viriony jsou charakterizovány velikostí a mají „zakódovanou“ schopnost produkce. Většina opouzdřených druhů bakulovirů je zařazována do dvou rodů, které se morfologicky poměrně výrazně liší:

1. *Nucleopolyhedrus* – tento rod reprezentují druhy souhrnně nazývané *NPV* (*Nuclear Polyhedrosis Viruses*) tzv. „viry jaderné polyedrie“ nebo též „polyedrické viry“. *NPV* mají infekční viriony uloženy ve skupinkách v matici z krystalické bílkoviny (*polyhedrin*). V jednom polyedru je vždy více membránových obalů opouzdřujících jednu nebo více DNA-obsahujících virových částic. Polyedry jsou formovány v jádře buněk napadených tkání a v jednom polyedru může být až několik set virionů. Velikost polyedrů kolísá v rozmezí 0,5 – 15 μm . *NPV* vyvolávají onemocnění běžně označovaná jako „polyedrózy“ nebo „jaderné polyedrie“.
2. *Granulovirus* – druhy zastoupené v tomto rodu jsou označovány jako *GV* (*Granulosis Virus*), tj. „granulózní viry“. *GV* mají vždy pouze jeden infekční virion opouzdřený bílkovinným obalem uloženým v sekundární ochranné matici (bílkovina *granulin*). *GV* zprvu replikují v jádře napadené buňky, nicméně jejich replikace probíhá i v cytoplasmě. Granule *GV* dosahují velikosti pouhých 0,3-0,5 μm . *GV* vyvolávají onemocnění souhrnně označovaná jako granulózy.

Průběh virové infekce

Bakuloviry jsou zpravidla přísně selektivní a jednotlivé druhy mohou vyvolávat nákazu pouze u jediného druhu hostitele. Bakuloviry vyvolávají onemocnění převážně u larev hmyzu a ostatní vývojová stadia buď nenapadají vůbec (vajíčko) nebo jen zcela výjimečně (kukla, dospělci). Virové onemocnění iniciují granule (GV) nebo polyedry (NPV), které se do těla hostitele dostávají pasivně s potravou. V alkalickém prostředí zažívacího traktu hostitele se rychle rozpouští ochranný bílkovinný obal polyedrů (*polyhedrin*) resp. granulí (*granulin*) a uvolněné infekční viriony napadají buňky epitelu středního střeva – tzv. *primární infekce*. Po replikaci v jádru buněk jsou produkovány nové viriony. Nové viriony se nezapouzdřují a atakují okolní buňky nebo pronikají do tělní tekutiny, kde spolu s hemolymfou cirkulují a způsobují systemické onemocnění tělních orgánů a tkání – tzv. *sekundární infekce*. K opětovné tvorbě kompletních granulí nebo polyedrů nové generace dochází až v konečné fázi vývoje nákazy. Průběh infekce uvnitř hostitele je provázen typickými vnějšími symptomy (snížený až zastavený příjem potravy, omezená pohyblivost, disfunkce tkání a orgánů, barevné změny... apod.). Letálně se nákaza zpravidla projeví 5.-14. den po proniknutí bakuloviru do zažívacího traktu hostitele. Tkáně usmrčeného hostitele jsou zcela dezintegrovány a tělní dutina je vyplněna masou granulí nebo polyedrů. Finálním stádiem virového onemocnění je zpravidla úplné ztekucení tělního obsahu usmrčeného hostitele, praskání kutikuly a kapénková kontaminace okolí larvy uvolňující se tělní tekutinou obsahující nové granule nebo polyedry (viz obr. 5. a 6.). Spontánní epizootie (nákazy mající epidemický charakter) způsobené přirozeně se vyskytujícími GV a NPV jsou v přírodě zcela běžné a jsou častou příčinou přirozeného kolapsu populací některých druhů hmyzu, včetně významných fytofágních druhů. K nejběžnějším patří virové epizootie v populacích různých druhů motýlů. Virovou nákazu je však možné indukovat i uměle, záměrnou introdukcí příslušného druhu viru pomocí aplikace standardního biologického preparátu.

Biopreparáty na bázi virů

Aktivní složku biopreparátů na bázi bakulovirů tvoří granule nebo polyedry vyprodukované ve velkokapacitních produkčních systémech. Všechny současné technologie výroby biopreparátů na bázi entomopatogenních virů jsou založeny na „*in vivo*“ systémech. Homogenní masa granulí nebo polyedrů je produkována v řízených masových chovech přirozených hostitelů. Základní schéma výroby biopreparátů na bázi entomopatogenních virů lze zjednodušeně charakterizovat takto:

- Produkce hostitele - masový chov přirozeného hostitele (např. housenky obaleče jablečného chované individuálně ve sterilních plastických kontejnerech s využitím umělé živné půdy)
- Infestace hostitel – kontaminace potravy, kterou je hostitel vyživován matečnou kulturou viru – iniciace virové infekce
- Homogenizace a purifikace virových granulí resp. polyedrů – homogenizace usmrčených larev, ve kterých došlo k namnožení viru a oddělení virových částic od zbytků tkání larev (např. - oddělení čisté biomasy částic viru pomocí gradientní centrifugace)

- Finalizace biopreparátu – standardní úprava biopreparátu (adjustace, dodání ochranných aditiv a inertních nosičů...), standardní množství granulí resp. polyedrá v 1g biopreparátu

Z rámcového popisu je zřejmé, že výroba biopreparátu na bázi entomopatogenních virů je v porovnání s technologiemi produkce biopreparátů na bázi entomopatogenních bakterií (např. *Bacillus thuringiensis*), entomopatogenních hub (např. *Beauveria bassiana*, *Paecilomyces fumosoroseus*) nebo mykoparazitických hub (*Trichoderma* spp., *Gliocladium virens*, *Pythium oligandrum* aj.) mnohem složitější. V případě *B. thuringiensis* a vláknitých hub jsou standardně využívány „*in vitro*“ systémy kultivací (umělá živná média, velkokapacitní fermentory), bez potřeby masové produkce populací přirozených hostitelů. V současnosti jsou „*in vitro*“ systémy produkcí používány dokonce i při velkokapacitních produkcích entomoparazitických hlístic (dvoufázová fermentace – 1. symbiotické bakterie, 2. entomoparazitické hlístice). Laboratorně již byly ověřeny možnosti produkce některých druhů entomopatogenních virů prostřednictvím tkáňových kultur, nicméně tyto formy produkce jsou prozatím velmi drahé a z hlediska velkokapacitních produkcí nepoužitelné. Přes uvedené problémy je současný světový trh charakterizován sortimentem sestávajícím z více než 50 standardních přípravky na bázi entomopatogenních virů (původní i generické produkty) a každý rok se objevují nové virové insekticidy. K nejvýznamnějším producentů biopreparátů na bázi virů patří americká firma CERTIS, v jejímž komerčním portfoliu je zastoupeno 6 standardních biopreparátů na bázi různých druhů virů.

Biopreparáty na bázi bakulovirů jsou nejčastěji formulovány jako smáčlivé prášky (WP) nebo jako suspenzní koncentráty, což umožňuje aplikace ve formě suspenzí (voda + granule/polyedry). Obsah účinného agens (počet virových partikulí na 1g resp. 1 ml standardního biopreparátu) se pohybuje v rozpětí 5×10^8 – 8×10^9 , při obvyklé aplikační dávce $1-5 \times 10^{12}$ partikulí na 1 ha. Inertní složku biopreparátu tvoří zejména různá ochranná aditiva (např. UV protektanty, antioxidanty), případně látky pozitivně stimulující příjem potravy (fagostimulanty), přísady zvyšující přilnavost virových částic na povrch rostlin. Z hlediska formulací sehrává klíčovou úlohu kvalita a účinnost přísad bránících virové partikule proti negativnímu vlivu UV záření, které může virové polyedry nebo granule inaktivovat již během několika hodin. K aplikaci virových biopreparátů lze používat běžné aplikátory. K nejběžnějším patří LV a MV aplikace vodních suspenzí, nicméně při využití v ochraně lesních porostů jsou běžně využívány i letecké aplikace v ULV dávkách. Společným prvkem predeterminujícím úspěšnost zásahu je aplikace způsobem a v dávce, zajišťujícím příjem dostatečného množství virových částic spolu s potravou. Z tohoto důvodu jsou buď přímo do virových biopreparátů přidávána aditiva stimulující žír larev nebo jsou fagostimulační přísady přidávány do aplikační jíchy (např. 0,5% přídavek melasy do postřikové jíchy resp. 5-25% obsah melasy v suspenzním koncentrátu). V současnosti jsou virové biopreparáty využívány zejména v ochraně lesních dřevin a různých druhů rychlených i polních zelenin, nicméně stále častěji se uplatňují i v ochraně kukuřice, bavlníku a mnoha dalších případech..

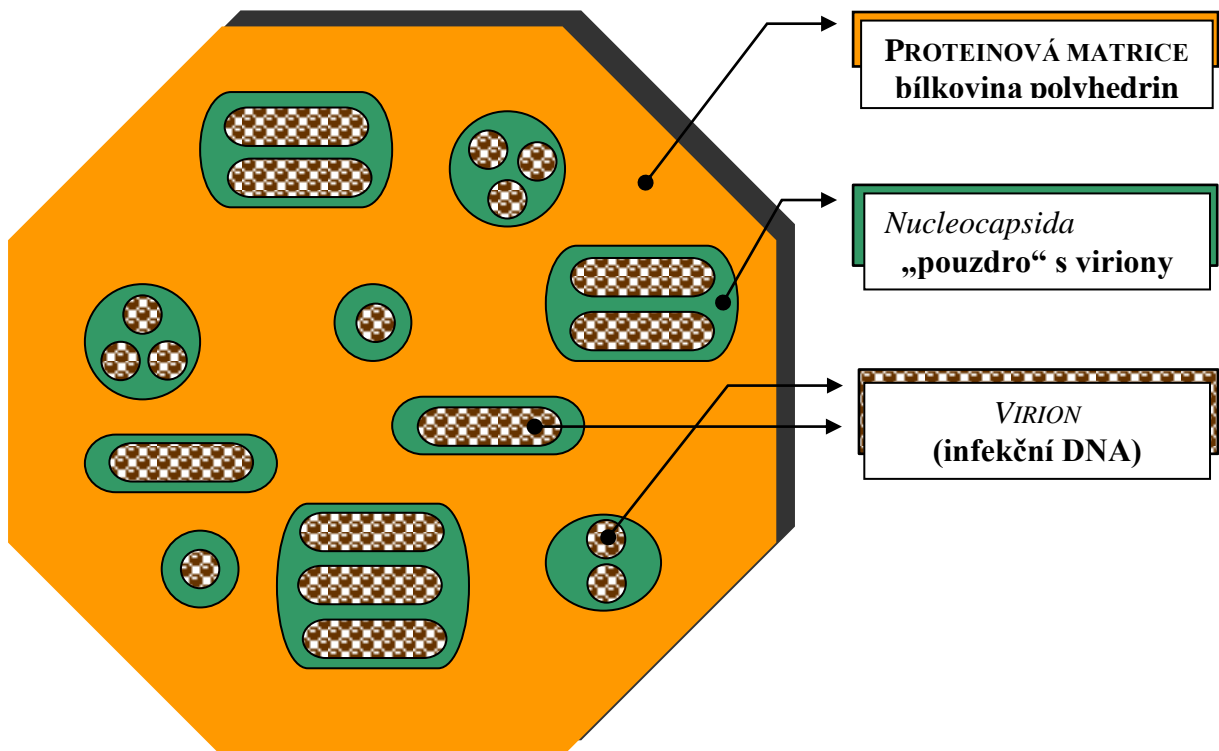
Praktické využití biopreparátů na bázi entomopatogenních virů

Možnosti praktického využití biopreparátů na bázi virů korelují s přirozenou strukturou hostitelů vnímavých vůči jednotlivým druhům GV resp. NPV. Přestože jsou virové infekce známy na mnoha druzích hmyzu (obecný přehled viz tabulka 1), nejčastěji jsou přípravky na bázi virů používány proti larvám motýlů, méně pak proti larvám některých blanokřídlých, brouků a dvoukřídlého hmyzu a zcela výjimečně i proti jiným skupinám fytofágního hmyzu. K neznámějším případům úspěšného využívání entomopatogenních virů patří využívání biopreparátů na bázi polyedrických virů bekyně velkohlavé *Lymantria dispar* (LdNPV), hřebenulím *Neodiprion sertifer* (NsNPV) a *N. lecontei* (NINPV) a viru granulózy obaleče jablečného *Cydia pomonella* (CpGV). S úspěchem a na komerční úrovni jsou využívány standardní virové preparáty i proti dalším druhům fytofágního hmyzu, zejména motýlům rodů *Heliothis* (*H. zea*, *H. armigera*, *H. virescens*), *Spodoptera* (*S. exigua*, *S. littoralis*), *Autographa* (*A. californica*), *Anticarsia* (*A. gemmatilis*), *Trichoplusia* (*T. ni*), *Mamestra* (*M. brassicae*), *Hyphantria* (*H. cunea*) a dalším. V České republice jsou v současnosti registrovány dva virové biopreparáty na bázi NPV, oba produkované a distribuované ZD Chelčice – provozovna BIOLA (BIOLAVIRUS NS určený proti hřebenuli *Neodiprion sertifer* a BIOLAVIRUS LD určený proti bekyni velkohlavé *Lymantria dispar*) (viz. tabulka 3).

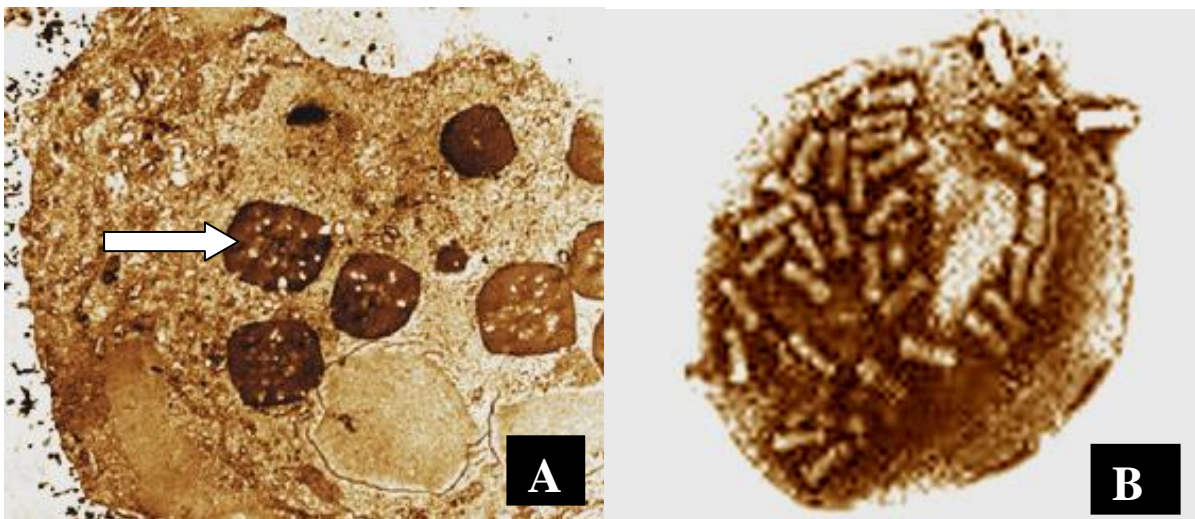
Podrobný a průběžně aktualizovaný přehled o současném sortimentu biopreparátů na bázi entomopatogenních virů (ale i jiných biologických prostředků a přípravků) lze získat na internetové adrese <http://www.agrobiologicals.com>

Perspektivy biopreparátů na bázi entomopatogenních virů

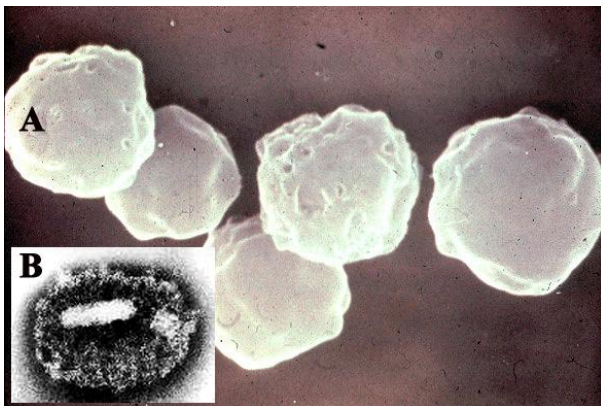
Praktické využívání biopreparátů na bázi virů v biologické a integrované ochraně je doposud poměrně malé a ve vztahu k výhodám, které jsou s jejich využíváním spojeny neúměrně nízké. Hlavním přínosem preparátů na bázi virů je jejich vysoce selektivní účinek a s tím logicky spojený i minimální vedlejší účinek na necílové druhy. V selektivitě se virovým přípravkům nemůže rovnat žádný jiný druh biopreparátu, včetně přípravků na bázi *B. thuringiensis*. Vysoká selektivita je však (v jistém slova smyslu paradoxně) i hlavní příčinou určité stagnace ve vývoji a využívání nových virových přípravků. Na jedné straně poměrně složitá technologie produkce, na straně druhé trh omezený zpravidla jedním druhem cílového druhu škůdce. Rozpor, jehož kořeny jsou v převládajícím ekonomickém pohledu a požadavcích, které jsou na přípravky (včetně biologických) kladeny. Lze předpokládat, že při zavádění nových biopreparátů na bázi entomopatogenních virů sehraje hlavní úlohu změny v technologiích jejich produkce, zejména pak vyřešení produkce virových částí v nekompletních *in vivo* systémech (např. technologie replikace využívající specifické tkáňové kultury). Pokroky v technologiích produkcí bakulovirů jistě přispějí k zavádění dalších biopreparátů na bázi této skupiny hmyzích patogenů. Vzhledem k prokazatelně nejmenšímu negativnímu vlivu na degradaci agrobiocenóz by využívání biopreparátů na bázi bakulovirů v praktické biologické ochraně rostlin pěstovaných v systémech ekologického zemědělství bylo jednoznačným přínosem.



Obecné schéma viru jaderné polyedrie (NPV) - v matrici z krystalické bílkoviny jsou v ochranných pouzdrech zapouzdřeny virové partikule obsahující infekční DNA (velikost polyedru 0,5-15 μ m). Vir granulozy (GV) má v bílkovinné matrici zapouzdřen vždy pouze jeden virion (velikost granule 0,3 – 0,5 μ m)



Viry jaderné polyedrie (NPV) – polyedry v roztěru tkáně infikované larvy (A) a detail polyedru se zapouzdřenými infekčními viriony (B).



Entomopatogenní granulózní bakuloviry (GV)

– virové granule dokumentované pomocí skanovací (A) a transmisní (B) elektronové mikroskopie



Larva bourovce prsténčivého

Malacosoma neustria L. usmrčená virem jaderné polyedrie MnNPV (orig. RNDr. Oldřich Pultar, Biola-Chelčice).



Typické symptomy virové infekce

infikovaná housenka se přichycuje předním párem pravých končetin na listu (A), v průběhu infekce postupně dezintegrují až ztekucují tělní tkáň a po prasknutí kutikuly se uvolňují nově zformované virové granule (B), které kontaminují okolí usmrčené larvy.

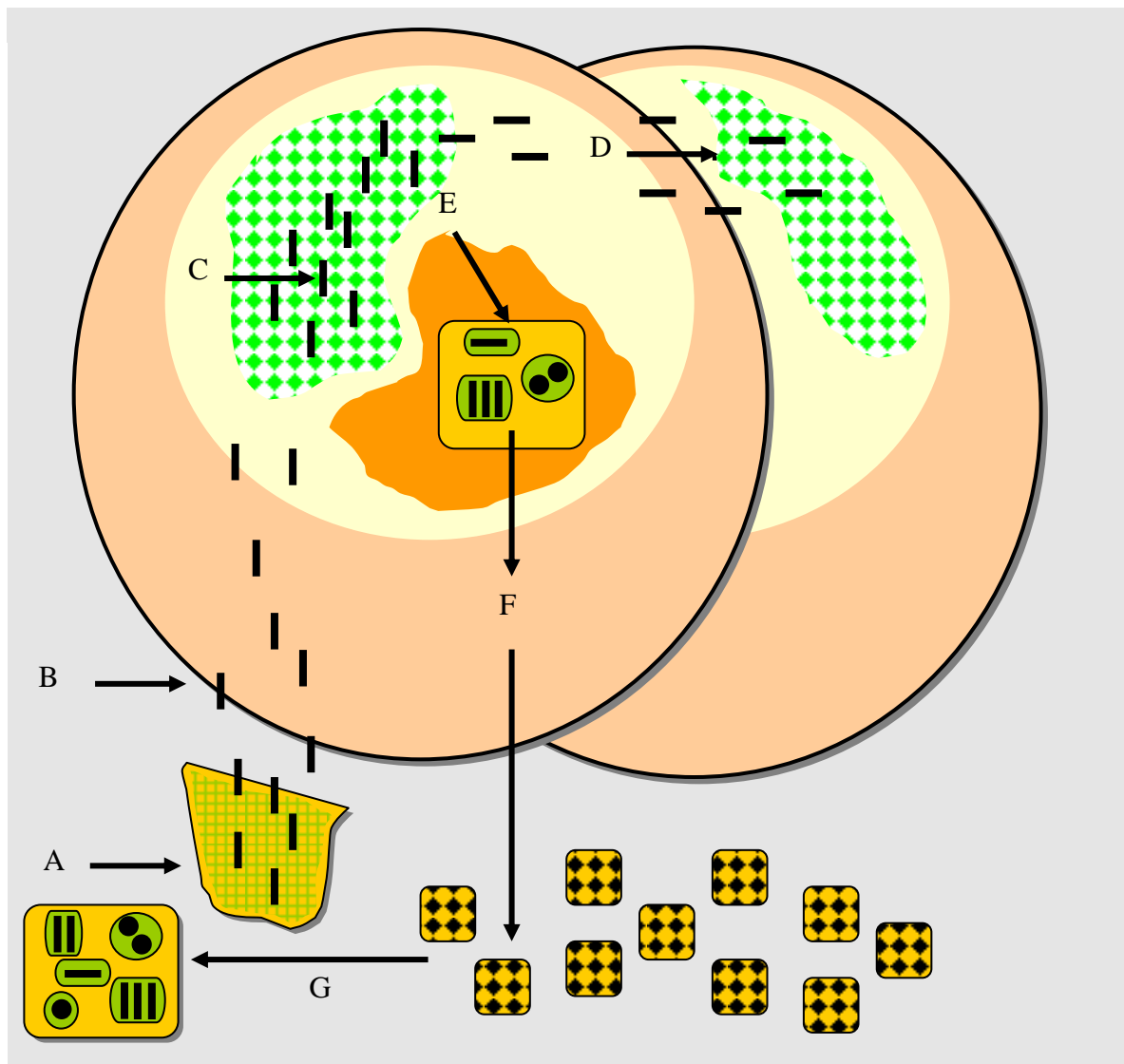


Schéma infekčního cyklu viru jaderné polyedrie. Z rozpuštěné proteinové matrice jsou uvolňovány viriony (A), které pronikají do buněk epitelu středního střeva (B) a po proniknutí do jádra buňky replikují (C). Nově vzniklé viriony buď jako nezapouzdřené pronikají do okolních buněk (D – sekundární infekční cyklus) nebo dozrávají do kompletních polyedrů nové generace (E), které po uvolnění z těla usmrceného hostitele (F) mohou kontaminovat prostředí a iniciovat nový infekční cyklus (G) v případě, že spolu s potravou proniknou do zažívacího traktu vhodného hostitele.

Přehled nejvýznamnějších skupin entomopatogenních virů a jejich hostitelů

ČELEĎ VIRŮ	TYP	ŘÁD HMYZU – VNÍMAVÍ HOSTITELÉ	STÁDIUM
<i>Baculoviridae</i>	dsDNA	brouci, dvoukřídlí, motýli, síťokřídlí, blechy, chrostíci, šupinušky	larva, kukla, dospělec
<i>Reoviridae</i>	dsRNA	dvoukřídlí, blanokřídlí, motýli	larva, kukla, dospělec
<i>Entomopoxviridae</i>	dsDNA	brouci, dvoukřídlí, blanokřídlí, motýli, rovnokřídlí	larva, dospělec
<i>Iridoviridae</i>	dsDNA	široký sortiment – hmyz i jiní bezobratlí	larva
<i>Ascoviridae</i>	dsDNA	motýli, výhradně čeleď můrovití	larva
<i>Birnaviridae</i>	dsRNA	dvoukřídlí	dospělec
<i>Caliciviridae</i>	ssRNA	motýli, výhradně čeleď můrovití	larva
<i>Nodaviridae</i>	ssRNA	dvoukřídlí, brouci, motýli	larva, dospělec
<i>Parvoviridae</i>	ssRNA	dvoukřídlí, motýli, švábi, vážky, rovnokřídlí	larva, kukla, dospělec
<i>Picornaviridae</i>	ssRNA	dvoukřídlí, motýli, rovnokřídlí ..a mnoho dalších řádů hmyzu	larva, dospělec
<i>Polydnaviridae</i>	dsDNA	blanokřídlí (parazité)	dospělec
<i>Rhabdoviridae</i>	ssRNA	dvoukřídlí	dospělec
<i>Tetraviridae</i>	ssRNA	motýli	larva

Výtěžnosti polyedrů NPV nebo granulí GV z infikovaných larev ve vztahu k průměrné dávce potřebné k ošetření 1 ha

Virus	Množství polyedrů / granulí		Počet larev na biopreparát / 1 ha
	Výtěžnost / 1 larva	Dávka na 1 ha	
<i>Cydia pomonella</i> - GV	1×10^{11}	2×10^{13}	200
<i>Helicoverpa zea</i> - NPV	6×10^9	2×10^{11}	33
<i>Lymantria dispar</i> - NPV	2×10^9	5×10^{11}	250
<i>Orgyia pseudotsugata</i> - NPV	2×10^9	3×10^{11}	125
<i>Spodoptera exigua</i> - NPV	2×10^9	1×10^{12}	500
<i>Neodiprion sertifer</i> - NPV	3×10^7	7×10^9	200