

STRESZCZENIE

Aktywność owadobójcza białek Vip3A *Bacillus thuringiensis* w stosunku do szkodników z rzędu Lepidoptera żerujących na roślinach

Bakterie *Bacillus thuringiensis* są chorobotwórcze dla różnych grup bezkręgowców: pierwotniaków, roztoczy, nicieni oraz owadów. Patogeniczność tych drobnoustrojów dla owadów związana jest z działaniem czynników wirulencji, z których najważniejsze to krystaliczne białka Cry i Cyt oraz wegetatywne toksyny insektycydowe (Vip). Białka Cry wykorzystuje się jako środki ochrony roślin. Wykazują one wysoką skuteczność w walce ze szkodnikami upraw roślinnych i nie są toksyczne dla organizmów niebędących celem zabiegu, w tym dla ludzi. Z tego powodu bioinsektycydy są wartościową alternatywą dla syntetycznych środków ochrony roślin. Jednak pomimo przewagi nad środkami chemicznymi większość preparatów opartych na białkach Cry wykazuje wąski zakres działania, tylko wobec niektórych szkodników upraw.

W celu zwiększenia skuteczności bioinsektycydów poszukuje się nowych czynników owadobójczych o wyższej aktywności owadobójczej i toksyczności względem większej liczby gatunków szkodników. Duże nadzieje związane są z grupą białek Vip odkrytych pod koniec XX wieku. Wykazano ich dużą insektycydową aktywność wobec niektórych owadów niewrażliwych na toksyny Cry. Jednak pomimo określenia sekwencji już ponad 100 rodzajów toksyn Vip, wyznaczono aktywność owadobójczą tylko niektórych z nich i wobec niewielkiej liczby gatunków owadów. Oszacowanie przydatności tej grupy do użycia w charakterze insektycydu wymaga określenia aktywności owadobójczej większej liczby różnych toksyn Vip dla szerszej grupy gatunków owadów.

W niniejszej pracy zidentyfikowano techniką PCR izolaty *B. thuringiensis* mające geny z grupy *vip3A*. Następnie wytypowano w przesiewowych testach izolaty bakteryjne wykazujące najwyższą toksyczność względem larw *S. exigua*. Geny *vip3A* wyselekcjonowanych szczepów zostały wyizolowane i sklonowane, a następnie ustalono ich sekwencję nukleotydową. Wyniki analiz wykazały polimorfizm genów *vip3A*, które na podstawie baz NCBI i „*B. thuringiensis* Toxin Nomenclature” zostały zidentyfikowane jako *vip3Aa1* i *vip3Aa35*. Następnie przeprowadzono ekspresję ww. genów w komórkach *E. coli*, a po wyizolowaniu białek określono ich toksyczność dla owadów z rzędu Lepidoptera, będących szkodnikami lasów (*Dendrolimus pini*), sadów owocowych (*Cydia pomonella*) i

upraw rolnych (*Spodoptera exigua*). Białka Vip3Aa1 i Vip3Aa35 wykazały wysoką aktywność względem ww. owadów, przewyższającą działanie wielu toksyn Cry będących składnikami bioinsektycydów. Białko Vip3Aa35 wykazuje wyższą skuteczność owadobójczą niż Vip3Aa1 w stosunku do *D. pini* i *S. exigua* pomimo podobieństwa sekwencji aminokwasowej obu protein wynoszącego powyżej 98%. Enzymatyczna aktywacja białek Vip3Aa35 i Vip3Aa1 trypsyną powoduje wzrost ich insektycydowej skuteczności.

Wyizolowano kryształy białkowe szczepu *B. thuringiensis* MPU B9 i metodą spektrometrii mas określono, że w ich skład wchodzi toksyny Cry1A, B, C, D i 9E. Tą techniką potwierdzono także przynależność białek, produkowanych przez *B. thuringiensis* w wegetatywnej fazie wzrostu, do Vip3Aa35 i Vip3Aa1. Ponadto metodą spektrometrii mas określono masę Vip3Aa35, wynosi ona 89,4 kDa.

Następnie wyznaczono wartość LC_{50} mieszaniny białek Vip3Aa35 oraz toksyn Cry szczepu MPU B9. Wykazano, że toksyna Vip3Aa35 i kryształy białkowe *B. thuringiensis* zawierające toksyny Cry1A, B, C, D i 9E wykazują synergizm w działaniu owadobójczym względem *D. pini* i *S. exigua*.

Uzyskane w niniejszej pracy wyniki świadczą, że białka Vip3Aa35 i Vip3Aa1 oraz mieszanina Vip3Aa35 i toksyn krystalicznych Cry1A, B, C, D i 9E, wykazują potencjalną przydatność do opracowania i produkcji nowych biologicznych środków ochrony roślin o wysokiej skuteczności insektycydowej i szerokim spektrum działania.