



## Wykorzystanie *Bacillus thuringiensis* w ochronie roślin: perspektywy i ograniczenia

Henryk Malinowski

Instytut Badawczy Leśnictwa, Warszawa

### The use of *Bacillus thuringiensis* in plant protection: prospects and limitations

#### Summary

Taking into account the protection of natural environment, it may be expected that the use of *Bacillus thuringiensis* toxins to control pest insects will be increased. It results from the discovery of novel toxins with different activity spectra and from the creation of more active toxins with the use of genetic engineering techniques. Besides, the introduction of transgenic plants such as cotton, potato, tomato, tobacco and others producing bacterial toxins against more important species of pest insects will significantly reduce the application of chemical insecticides.

The possibility of resistance development in insects poses a great threat to the above strategy. A better recognition of biochemical, physiological and genetic mechanisms of resistance to *B. thuringiensis* toxins will allow to devise a strategy for delaying insects resistance. The general principles of this strategy are similar to those used in the case of chemical insecticides and involve the rational application of *B. thuringiensis* toxins and their rotation with other insecticides.

#### Key words:

*Bacillus thuringiensis* toxins, insect resistance, insect control, deltaendotoxins, transgenic plants, insecticidal activity.

#### Adres do korespondencji

Henryk Malinowski,  
Instytut Badawczy  
Leśnictwa,  
ul. Bitwy Warszawskiej 3,  
00-973 Warszawa

### 1. Wprowadzenie

Chemiczne środki ochrony roślin, stosowane na szerszą skalę już blisko pół wieku, wywołują szereg niekorzystnych zmian w środowisku, jak np. szybkie powstawanie odporności u szkodliwych

organizmów (do roku 1994 odporne na insektycydy chemiczne populacje występowały u ponad 500 gatunków owadów) (1), czy wyniszczanie ich wrogów naturalnych przyczyniających się do utrzymania populacji na niskim, niegroźnym poziomie. Ponadto pozostałości środków chemicznych mogą skażać środowisko oraz występować w produktach roślinnych przeznaczonych do konsumpcji lub na paszę powyżej dopuszczalnego poziomu, co zagraża bezpośrednio zdrowiu i życiu ludzi i zwierząt. Wymienione przyczyny, a także nacisk różnych grup ekologicznych spowodowały szersze zainteresowanie się insektycydami biologicznymi (bioinsektycydami), czyli środkami owadobójczymi opartymi na żywych organizmach. Spośród insektycydów biologicznych największe zastosowanie znalazły środki oparte na bakterii *Bacillus thuringiensis* Berliner. Celem opracowania jest przedstawienie perspektyw wykorzystania tych bioinsektycydów w ochronie roślin oraz zagrożeń wynikających głównie z możliwości wykształcania odporności na te środki u owadów. Wprowadzając w te zagadnienia opisano najpierw znaczenie bioinsektycydów *B. thuringiensis* dla ochrony roślin, a następnie mechanizm ich działania na owady wrażliwe oraz klasyfikację genów toksyn białkowych, produkowanych przez tę bakterię.

### 1.1. Znaczenie bioinsektycydów *B. thuringiensis* dla ochrony roślin

Wymieniona bakteria odkryta na początku dwudziestego wieku, najpierw opisana w 1901 r. przez bakteriologa japońskiego (2) z chorych gąsienic jedwabnika morwowego (*Bombyx mori*), a następnie dekadę później przez Berlinera (3,4) w Niemczech z chorych gąsienic mkiłki mącznego (*Anagasta kuehniella*), jak się okazało, stała się ważną alternatywą w stosunku do konwencjonalnych insektycydów. Bioinsektycydy oparte na *B. thuringiensis* zalicza się do najbardziej selektywnych spośród znanych obecnie środków owadobójczych i jednocześnie bezpiecznych dla człowieka i zwierząt. Nie przewiduje się dla nich okresu karencji (okres między zabiegiem a zbiorem), mogą być zatem stosowane do dnia zbioru plonów. W związku z tymi właściwościami, bioinsektycydy *B. thuringiensis* są zalecane do kontroli owadów na terenach rekreacyjnych, w pobliżu zbiorników wodnych, w parkach narodowych. Wymienione insektycydy są również szeroko stosowane do zwalczania wektorów chorób człowieka i zwierząt.

W ciągu ostatnich dwudziestu pięciu lat nastąpił wyraźny postęp w stosowaniu omawianych bioinsektycydów w ochronie upraw rolniczych, warzywniczych, sadowniczych, w higienie sanitarnej i weterynaryjnej, a zwłaszcza w ochronie lasów, gdzie zużywa się obecnie 60-70% światowej produkcji (5). Analizując wartość sprzedawanych każdego roku na świecie biopestycydów (głównie bioinsektycydów, w których udział środków opartych na *B. thuringiensis* wynosi około 80%) oszacowano, że w latach 1990-1994 nastąpił około 3-krotny wzrost wartości sprzedaży tych środków, chociaż w dalszym ciągu stanowiło to około 1% ogólnej wartości środków ochrony roślin (6,7). Faktyczny wzrost udziału bioinsektycydów w ochronie roślin jest nieco



większy niż to wynika z podanych wartości, gdyż w ostatnich latach wprowadzono do stosowania na znaczną skalę tańsze biopreparaty, np. Foray.

Przewiduje się dalszy, znaczący wzrost udziału bioinsektycydów, zwłaszcza zawierających toksyny *B. thuringiensis*, na rynku światowym (7). Wynika to m. in. ze stopniowego ograniczania stosowania insektycydów chemicznych. Zgodnie z przyjętą na początku lat 90. w wielu krajach (w tym również i w Polsce) procedurą (opracowaną przez OECD – Organizację Współpracy Gospodarczej i Rozwoju), dotychczas stosowane środki chemiczne starszej generacji powinny być od nowa przebadane pod kątem oceny ryzyka zagrożenia dla środowiska i ponownie rejestrowane. Jednocześnie zwiększono wymagania rejestracyjne i zakres badań również w stosunku do nowo wprowadzanych środków chemicznych. Przewiduje się, że te zwiększone wymagania spowodują zmniejszenie się rynku tych środków. W związku z przyjęciem procedury ponownej rejestracji środków już stosowanych, część z nich została wycofana, gdyż nie sprostała nowym wymaganiom. Ponadto prace poszukiwawcze, rozwojowe i wdrożeniowe nowych insektycydów są droższe, ponieważ zwiększenie wymagań rejestracyjnych pociąga za sobą zwiększenie wydatków na odpowiednie badania. W rezultacie mniej nowych środków chemicznych wprowadza się na rynek pestycydowy, a ich miejsce wypełniają biopestycydy. Do rozwoju biopestycydów przyczyniło się również wdrażanie integrowanych programów ochrony roślin, w których przewiduje się stosowanie wzajemnie się uzupełniających chemicznych, biologicznych i innych metod ochrony.

Wzrost udziału bioinsektycydów *B. thuringiensis* w ochronie roślin wiąże się przede wszystkim z postępowaniem, prowadzonym na skalę światową, interdyscyplinarnych prac badawczych nad toksynami białkowymi produkowanymi przez tę bakterię. Badania te mają na celu zarówno aspekt teoretyczny, jak i praktyczny, polegający na opracowaniu i wdrożeniu nowych strategii kontroli owadów. Zastosowanie w latach osiemdziesiątych naszego stulecia nowych technik badawczych, zwłaszcza inżynierii genetycznej, doprowadziło do istotnego rozszerzenia wiedzy w zakresie struktury i mechanizmu działania toksyn *B. thuringiensis* (choć wiele zagadnień wymaga dalszych badań), natomiast badania w latach dziewięćdziesiątych pozwoliły na zrozumienie oddziaływania wymienionych toksyn na naturalne środowisko, co stworzyło podstawy do opracowania strategii kontroli owadów, które są efektywne i jednocześnie bezpieczne dla środowiska.

## 1.2. Mechanizm działania *B. thuringiensis* na owady

Bakteria *B. thuringiensis* syntetyzuje podczas sporulacji krystaliczne inkluzje składające się z jednego lub wielu białek. W większości przypadków białka te charakteryzują się aktywnością w stosunku do niektórych gatunków owadów. Specyficzność działania kryształów białkowych wynika z występowania odpowiednich receptorów wiążących te toksyny tylko u niektórych gatunków owadów. Po zjedzeniu przez wra-



żliwego owada kryształów białkowych *B. thuringiensis* następuje ich rozpuszczenie w alkalicznej treści jelita środkowego i uwolnienie toksyn owadobójczych o charakterze białek, tzw. deltaendotoksyn o masie cząsteczkowej od 27 do 400 kilodaltonów (kDa). Najczęściej tych toksyn jest kilka i w miarę postępu prac badawczych wykrywa się coraz to inne, nowe toksyny. Wiele z tych substancji ma charakter protoksyn. Uwolnione toksyny białkowe i protoksyny ulegają następnie, w jelicie środkowym owadów, proteolitycznej przemianie do mniejszych jednostek białkowych – polipeptydów. Te uaktywnione toksyny wchodzi następnie w nieodwracalną interakcję z odpowiednimi receptorami białkowymi, występującymi w błonach komórek nabłonka jelita środkowego owadów wrażliwych, co wywołuje paraliż jelita i zaprzestanie żerowania (8,9). Połączone z odpowiednimi receptorami, uaktywnione toksyny powodują powstanie otworów (por) w błonie komórek nabłonka jelita środkowego (10). Następuje zakłócenie równowagi osmotycznej i zaburzenie w przewodzeniu pierwiastków, co prowadzi do pęcznienia komórek i ich zanikania. W przypadku łącznego oddziaływania na owady spor i kryształów białkowych, pewną rolę odgrywają również spory, które namnażając się w organizmie larw powodują śmiertelną dla nich septicemię.

Przyjmuje się, że kluczem określającym wysoką specyficzność toksyn białkowych *B. thuringiensis* jest ich wiązanie do odpowiednich receptorów błon komórek nabłonka jelita środkowego owadów. Owady poszczególnych rzędów, a nawet gatunków, mają specyficzne receptory dla odpowiednich toksyn *B. thuringiensis*. Stąd wynika wysoka selektywność ich działania.

### 1.3. Klasyfikacja genów toksyn białkowych *B. thuringiensis*

W badaniach wykonanych w ostatnich dwudziestu latach wykazano, że gatunek *B. thuringiensis* obejmuje szerokie i różnorodne rodziny białek o działaniu owadobójczym. Ukazały się liczne publikacje dotyczące identyfikacji toksyn białkowych i ich genów. Powstał problem ujednolicenia nazewnictwa, gdyż autorzy używali różnych oznaczeń w odniesieniu do tych samych genów. Propozycję nazewnictwa i schemat klasyfikacji kryształów białkowych i ich genów na bazie struktury wydedukowanej z sekwencji DNA, z uwzględnieniem zakresu gospodarzy opracowali Höfte i Whiteley (11), wykorzystując opisane w literaturze sekwencje nukleotydowe dla ponad 40 genów kryształów białkowych *B. thuringiensis*. Wiele z tych sekwencji jest identycznych, lub prawie identycznych i reprezentuje ten sam gen, lub warianty tego samego genu. Biorąc to pod uwagę wyodrębniono 14 typów genów kryształów białkowych *B. thuringiensis* na podstawie danych dotyczących szczepów bakterii aktywnych wobec komarów. Wiele danych wskazuje, że 13 z nich, tzw. geny „Cry” (*Crystal proteins*) charakteryzują rodziny białek owadobójczych. Te 13 typów genów kryształów białkowych obejmuje 4 główne klasy: Cry I, Cry II, Cry III, Cry IV i wiele podklas utworzonych na podstawie zarówno strukturalnego podobieństwa, jak i spektrum aktywności owadobójczej. Wymienione 4 główne klasy genów kryształów białkowych są odpo-



wiedzialne za specyficzne działanie w odniesieniu do owadów z następujących rzędów: Cry I – *Lepidoptera*, Cry II – *Lepidoptera* i *Diptera*, Cry III – *Coleoptera*, Cry IV – *Diptera*. Zaproponowano (12) dodanie V klasy genów – Cry V dla toksyn o masie cząsteczkowej 81 kDa, aktywnych wobec *Lepidoptera* i *Coleoptera* oraz Cry VI, Cry VII – dla genów toksyn białkowych, które nie są jeszcze wykryte. Tak zatem zaproponowany system nazewnictwa może być uzupełniany w miarę wykrywania nowych szczepów, produkujących podobne toksyny białkowe. Czternasty typ genów kryształów białkowych *B. thuringiensis* nie został nazwany „Cry”, lecz „Cyt”, gdyż obejmuje on kryształy nie wykazujące działania owadobójczego. Sekwencje DNA genów kodujących nietoksyczne dla owadów białka oraz ich relacje z genami kryształów białkowych już opisanych nie są dotychczas znane. Znany jest natomiast jeden gen kryształów białkowych *B. thuringiensis* subsp. *israelensis*, kodujący białko o masie cząsteczkowej 27 kDa, które wykazuje cytolityczną aktywność wobec komórek bezkręgowców i kręgowców. Gen ten różni się całkowicie od genów „Cry”. Na tej podstawie zaproponowano (11) oznaczenie „Cyt A” dla genów kodujących białko 27 kDa.

## 2. Perspektywy

Wspomniano już, że prowadzone w szerokim zakresie badania doprowadziły do opracowania nowych strategii kontroli owadów za pomocą toksyn produkowanych przez bakterię *B. thuringiensis*. Te nowe strategie polegają na stosowaniu bioinsektycydów o zwiększonej aktywności owadobójczej oraz na uprawie roślin transgenicznych produkujących toksyczne białka tzw. endotoksyny *B. thuringiensis*.

### 2.1. Stosowanie bioinsektycydów o zwiększonej aktywności owadobójczej

Bioinsektycydy o zwiększonej aktywności owadobójczej uzyskuje się przez poszukiwanie w naturze metodami tradycyjnymi nowych, bardziej aktywnych szczepów bakterii, specyficznie działających na różne gatunki owadów szkodliwych, przez ulepszanie znanych szczepów technikami nierekombinacyjnymi (koniugacja), przez ulepszanie znanych szczepów technikami inżynierii genetycznej (technologia rekombinacji DNA), lub przez stosowanie specjalnych formułacji o wysokiej zawartości składnika biologicznie czynnego.

#### 2.1.1. Poszukiwanie w naturze nowych szczepów bakterii specyficznie działających na różne gatunki owadów szkodliwych

Znane obecnie szczepy *B. thuringiensis*, należące do ponad 30 podgatunków, są aktywne wobec owadów z rzędów: *Lepidoptera*, *Diptera* i *Coleoptera*. Aktywność bio-



preparatów zależy nie tylko od podgatunku bakterii użytej do produkcji, ale również od poszczególnych szczepów, czy izolatów. W związku z tym poszukuje się nieustannie nowych, bardziej aktywnych szczepów *B. thuringiensis* w stosunku do różnych gatunków owadów. W latach siedemdziesiątych wykryto, np. szczep HD-1 var. *kurstaki*, charakteryzujący się wyższą aktywnością owadobójczą od znanych w tym czasie izolatów. Jest on powszechnie wykorzystywany do chwili obecnej w biopreparatach handlowych typu Dipel, Thuricide i przeznaczonych do ograniczania liczebności gąsienic motyli. W 1981 r. wyodrębniono z gąsienic wyłogówki *Choristoneura fumiferana* Clem. nowy izolat NRD-12 var. *kurstaki*, który został wprowadzony do USDA kolekcji kultur *B. thuringiensis* pod numerem HD-945 (13). Posiada on charakterystykę serologiczną identyczną jak szczep HD-1. Jego aktywność przeciwko gąsienicom sówki kapuścianej (*Trichoplusia ni* Hbn) jest zbliżona do HD-1, ale jest on bardziej aktywny przeciwko gąsienicom słonecznicy tytoniowej (*Heliothis virescens* F.), wyłogówki *Ch. fumiferana* i brudnicy nieparki (*Lymantria dispar* L.). Szczep ten miał zastąpić izolat HD-1, stosowany dotychczas w preparatach handlowych przeciwko gąsienicom motyli, ale nie we wszystkich przypadkach jego lepsza aktywność potwierdziła się w warunkach terenowych.

Poszukuje się również nowych szczepów *B. thuringiensis* aktywnych wobec gatunków owadów i innych szkodliwych organizmów, które nie były dotychczas kontrolowane za ich pomocą. W ostatnich latach w USA i Japonii wykryto wiele nowych izolatów, które będą wykorzystane do ograniczania liczebności owadów z rzędów *Hymenoptera* (zwłaszcza mrówek), *Homoptera* (mszyc), *Orthoptera* (karaczanów) i in. (14). Wykryto również szczepy aktywne wobec nicieni (*Nematoda*) pasożytujących na roślinach i zwierzętach, patogenicznych pierwotniaków (*Protozoa*), pasożytniczej motylicy wątrobowej (*Trematoda*) zwierząt oraz przeciwko roztoczom (*Acarina*).

W firmie Mycogen Corporation, np. w ostatnich latach sklonowano i zsekwencjonowano ponad 40 genów kodujących szeroką gamę toksyn *B. thuringiensis* (14); będą one wykorzystane do produkcji nowych bioinsektycydów. Wykryto także nowe szczepy *B. thuringiensis* aktywne wobec larw *Coleoptera* (groźnych szkodników systemów korzeniowych roślin), włączając larwy *Diabrotica* sp., popilii japońskiej (*Popilia japonica* Newman) i innych gatunków. W Japonii wyizolowano także nowy szczep *B. thuringiensis* nazwany Buibui, działający na larwy żukowatych (*Coleoptera*; *Scarabaeidae*) różnych gatunków uszkadzających systemy korzeniowe, jak *Anomala cuprea* Hope, *A. albopilosa* Hope, *A. rufocuprea* Motschulsky, *A. daimiana* Harold, *A. schonfeldti* Ohaus, popilia japońska, *Mimela splendens* Gyllenhal, *Blitopertha orientalis* Waterhous, ale nieaktywny wobec stonkowatych (*Coleoptera*; *Chrysomelidae*), jak stonka ziemniaczana (*Leptinotarsa decemlineata* Say) i *Chrysolina aurichalcea* Mannerheim (15). Szczep ten nie jest aktywny wobec pędraków chrabąszcza majowego (*Melolontha melolontha* L.) i chrabąszcza kasztanowca (*Melolontha hippocastani* F.) występujących w Polsce i innych krajach europejskich.



### 2.1.2. Ulepszanie znanych szczepów metodami nierekombinacyjnymi (koniugacja) i rekombinacyjnymi technikami inżynierii genetycznej (rekombinacja DNA)

Ważną cechą ograniczającą stosowanie bioinsektycydów *B. thuringiensis* jest stosunkowo wąski zakres ich działania, czyli zakres gospodarzy, dla których są one toksyczne. Prowadzi się zatem badania nad rozszerzeniem zakresu aktywności szczepów, na których oparte są handlowe biopreparaty, wprowadzając do nich nowe, dodatkowe geny krysztalów białkowych o innej specyficzności działania. Osiąga się to przez koniugację plazmidów z innych szczepów (zjawisko polegające na przekazywaniu materiału genetycznego z komórki dawcy do komórki biorcy), lub bezpośrednią transformację genów krysztalów białkowych, klonowanych w replikonie (16). Stosując wymienione nierekombinacyjne techniki wytworzono nie istniejące w przyrodzie szczepy *B. thuringiensis* kodujące toksyny białkowe, które są aktywne wobec różnych gatunków owadów. W ten sposób powstały bioinsektycydy firmy Ecogen (USA), stosowane w praktyce (niektóre również w Polsce), takie jak Condor, zawierający specyficznie działające toksyny białkowe wobec wyłogówki *Ch. fumiferana* i brudnicy nieparki, Ecotech będący transkoniugantem *B. thuringiensis aizawai* x *B. thuringiensis kurstaki* i Foil, który jest toksyczny wobec gąsienic motyli i larw chrząszczy.

Innym problemem, związanym z biopreparatami *B. thuringiensis*, jest ich ograniczona stabilność i krótkotrwałość działania w warunkach terenowych. Wykorzystując technologię rekombinacji DNA z zastosowaniem tzw. systemu „Cell cap” firma Mycogen (USA) opracowała i wprowadziła na rynek bioinsektycydy o większej trwałości działania. System ten polega na wszczepieniu genów białek krystalicznych *B. thuringiensis* do komórek niepatogenicznej bakterii *Pseudomonas fluorescens* (17). Podczas sporulacji bakterie te produkują toksyczne białko *B. thuringiensis* wewnątrz własnych komórek. Następnie komórki bakterii są zabijane za pomocą czynników termicznych i chemicznych w taki sposób, by nie naruszyć znajdującej się w komórce biotoksyny. Proces ten utwardza jednocześnie i usztywnia błonę komórkową zabitych bakterii *P. fluorescens*, która służy jako ochronna, biologiczna mikrokapsuła dla deltaendotoksyny. Na rynku znajdują się trzy biopreparaty o przedłużonym okresie działania, opracowane według opisanego systemu: M-TRAK – przeciwko larwom chrząszczy, MVP – przeciwko gąsienicom motyli i M-PERIL – przeciwko omacnicy prosowiance (*Ostinia nubilalis* L.).

Rekombinacyjne techniki zostały również zastosowane do wprowadzenia genów krysztalów białkowych *B. thuringiensis* do mikroorganizmów związanych z roślinami, które chcemy chronić przed owadami. Na uwagę zasługuje zarejestrowanie w 1993 r. w USA przez firmę Crop Genetic International nowego bioinsektycydu Incide. Bioinsektycyd ten jest oparty na bakterii *Clavibacter xyli* var. *cynodontis*, będącej endofitem kukurydzy. Do bakterii tej wprowadzono gen endotoksyny *B. thuringiensis* specyficznie działający na najgroźniejszego szkodnika kukurydzy – omacnicę prosowiankę. Wymieniony endofit szybko zasiedla korzenie, łodygi i liście kukurydzy, gdzie pozostaje przez całe życie rośliny chroniąc ją przed omacnicą.



### 2.1.3. Stosowanie formulacji o wysokiej koncentracji toksyn białkowych

Stosowanie formulacji o wysokiej koncentracji toksyn białkowych bez rozcieńczenia, przy użyciu aparatury dającej krople o średnicy 50 µm powoduje, że owady zaprzestają żerowania już po pobraniu pierwszego „kęsa” traktowanych roślin. Stosowanie wymienionych formulacji zmniejsza istotnie żery powodowane przez owady w porównaniu do formulacji o niższej koncentracji. W tym ostatnim przypadku owady muszą żerować przez pewien czas, by pobrać odpowiednią dawkę toksyn. Przykładem biopreparatu *B. thuringiensis* o podwyższonej aktywności owadobójczej jest stosowany w leśnictwie Foray 02.2 UL o aktywności minimum 11,3 BIU/l (bilionów jednostek międzynarodowych/l), co przy stosowaniu 2-4 l/ha daje 22,6-45,2 BIU/ha. Drugim takim bioinsektycydem, stosowanym również w Polsce jest Ecotech Pro 07.5 OF, którego aktywność wynosi 24 BIU/l, co przy stosowaniu 1,6 l/ha daje aktywność 36 BIU/ha. Wcześniej stosowane w ochronie lasu biopreparaty *B. thuringiensis*, jak np. Bactospeine, zawierały 6-8,5 BIU/l, co przy stosowaniu, np. 2 l/ha (w 50 l wody) dawało 12-17 BIU/ha.

## 2.2. Uprawa roślin transgenicznych produkujących endotoksyny *B. thuringiensis*

Nowym, dynamicznie rozwijającym się kierunkiem kontroli owadów jest wprowadzenie do uprawy roślin transgenicznych, produkujących toksyny białkowe *B. thuringiensis*. Osiągnięcia inżynierii genetycznej pozwalają na wyhodowanie odmian roślin mających jeden, lub kilka genów odporności na jeden lub kilka czynników. Obecnie są już w uprawie w niektórych krajach rośliny transgeniczne tzw. pierwszej generacji, mające pojedyncze geny odporności. Na przykład firma Monsanto wprowadziła w 1996 r. w USA do obrotu handlowego odmianę ziemniaka Newleaf, odporną na stonkę ziemniaczaną oraz odmiany bawełny Bollgard i kukurydzy Yieldgard, odporne na gąsienice motyli i larwy chrząszczy. Wprowadza się do uprawy dalsze gatunki roślin transgenicznych produkujących toksyczne białko *B. thuringiensis*, w tym rośliny drzewiaste, jak jabłoń, śliwa, brzoza, toполя i in.

Powierzchnia uprawy roślin transgenicznych zawierających nie tylko geny odporności na owady, ale również geny odpowiedzialne za wysokie plony i inne korzystne cechy użytkowe wzrasta na świecie w szybkim tempie: w 1996 r. wynosiła 2,8 mln ha, w 1997 r. – 12,8 mln ha, a w 1998 r. – 30,5 mln ha (18). W 1998 r. rośliny transgeniczne uprawiano na największych powierzchniach w USA (24,8 mln ha), Argentynie (4 mln ha) i Kanadzie (1,46 mln ha), natomiast w krajach europejskich uprawiano je na łącznej powierzchni 25 tys. ha, w tym w Hiszpanii – 22 tys. ha, Francji – na 2 tys. ha oraz w Niemczech (łącznie z innymi krajami) – na 1 tys. ha (18).



Transgeniczne rośliny wytwarzające toksyczne dla owadów białko *B. thuringiensis*, stosowane na szerszą skalę, spowodują ograniczenie zużycia chemicznych insektycydów o szerokim spektrum działania.

### 3. Ograniczenia

Głównymi czynnikami ograniczającymi szerokie wykorzystanie biopreparatów *B. thuringiensis* w ochronie roślin były: zbyt krótkotrwałe działanie na liściach opryskanych roślin (ulegały one szybkiej degradacji pod wpływem promieni UV, wilgoci, temperatury i innych czynników środowiska), brak odpowiednich szczepów działających na szkodliwe owady z innych rzędów niż *Lepidoptera*, *Diptera* i *Coleoptera*. Obecnie, dzięki rozwojowi biotechnologii, wytworzono bioinsektycydy o większej trwałości działania (M-Trak, M-Peril), znaleziono również wiele szczepów *B. thuringiensis*, które charakteryzują się aktywnością w odniesieniu do owadów należących do różnych rzędów, a także w odniesieniu do roztoczy i innych organizmów szkodliwych z gospodarczego punktu widzenia.

Mając na uwadze racjonalne stosowanie nowej generacji bioinsektycydów *B. thuringiensis* oraz długotrwałe użytkowanie roślin transgenicznych wytwarzających endotoksyny należy zdawać sobie sprawę z możliwości wykształcenia odporności u owadów na omawiane biotoksyny, podobnie jak na insektycydy chemiczne. W ciągu około trzydziestu lat stosowania bioinsektycydów *B. thuringiensis* nie notowano przypadków wykształcenia odporności u owadów w warunkach terenowych. Wydawało się zatem, że nie jest możliwe wykształcenie odporności na te bioinsektycydy ze względu na złożony mechanizm ich działania i małą trwałość na liściach traktowanych roślin. Na przełomie lat osiemdziesiątych i dziewięćdziesiątych wykryto jednak odporność na *B. thuringiensis* w warunkach terenowych. Dotyczyła ona szkodnika magazynowego – omacnicy spichrzanki (*Plodia interpunctella* Hbn.) w USA (19,20) i szkodnika upraw polowych – tantnisia krzyżowiaczka (*Plutella xylostella* L.), początkowo na jednej farmie na Hawajach, a następnie na innych farmach na Filipinach, Tajlandii, Malezji, Florydzie i w Japonii (21). Potencjał genetyczny do rozwoju odporności stwierdzono także u liściożernych szkodników leśnych, jak brudnica nieparka (*Lymantria dispar* L.) w USA i wyłogówka *Ch. fumiferana* w Kanadzie.

W badaniach prowadzonych w USA (22) zaobserwowano istotne różnice w odporności na *B. thuringiensis* wśród naturalnych populacji brudnicy nieparki. Na podstawie uzyskanych wyników badań przypuszcza się, że było to spowodowane różną żywotnością (wigorem), czyli różnymi możliwościami wzrostu i rozwoju. Autorzy tłumaczą tę zmienność we wrażliwości różnicami w zaopatrzeniu jaj (z których wylęgały się larwy) w substancje zapasowe. Jaja składane jako pierwsze zawierały więcej substancji zapasowych, a wylęgające się z nich larwy szybciej się rozwijały, były bardziej żywotne i mniej wrażliwe na *B. thuringiensis*. Na podstawie przeprowadzonych badań wskazuje się na możliwość wyselekcjonowania, przy dostatecznie dużej



presji selekcyjnej, odpornych populacji brudnicy nieparki. Autorzy dochodzą do wniosku, że odporniejsze genotypy będą faworyzowane, gdyż one są również bardziej żywotne.

Z badań przeprowadzonych w Kanadzie (23) wynika, że populacje naturalne wyłogówki *Ch. fumiferana* mają również potencjał genetyczny do wykształcenia odporności na *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*. W wymienionych badaniach stwierdzono duże zróżnicowanie wrażliwości larw (nawet 10-krotne) pochodzących od poszczególnych samic w ramach jednej populacji. Wyniki sugerują, że ta zróżnicowana wrażliwość jest w dużym stopniu uwarunkowana genetycznie.

Należy podkreślić, że stwierdzone przypadki odporności na bioinsektycydy bakteryjne u owadów w warunkach terenowych były związane z silną presją selekcyjną, wywieraną na populacje znajdujące się w izolacji i o krótkim okresie rozwoju. Z silną presją selekcyjną mamy do czynienia w przypadku roślin transgenicznych, produkujących określone, pojedyncze toksyny białkowe. Taka permanentna presja selekcyjna prowadzi do szybkiego rozwoju odporności. Toteż zaobserwowano już w USA odporność owadów z rzędu *Lepidoptera* na transgeniczne rośliny bawełny produkujące toksyczne białko *B. thuringiensis* (24). W warunkach selekcji laboratoryjnej uzyskano do roku 1994 odporne populacje co najmniej u dziesięciu gatunków owadów z następujących rzędów: *Lepidoptera*, *Coleoptera*, i *Diptera*, w tym u stonki ziemniaczanej.

#### 4. Podsumowanie

Można przewidywać, że stosowanie toksyn *B. thuringiensis* będzie wzrastać, zwłaszcza w ochronie lasów. Wynika to z faktu wykrywania coraz to nowych, aktywniejszych toksyn o innym spektrum działania, jak i ulepszania znanych bioinsektycydów za pomocą metod inżynierii genetycznej oraz opracowania lepszych, o zwiększonej aktywności, form użytkowych. Ponadto opracowanie transgenicznych roślin uprawnych najważniejszych z ekonomicznego punktu widzenia gatunków, jak soja, bawełna, kukurydza i in., wytwarzających toksyczne dla owadów białko ograniczy, a w niektórych przypadkach wyeliminuje stosowanie środków chemicznych.

Powstawanie odporności u owadów na omawiane bioinsektycydy jest możliwe, podobnie jak na insektycydy chemiczne. Niebezpieczeństwo szybkiego powstawania odporności u owadów dotyczy w pierwszej kolejności roślin transgenicznych, które mają pojedyncze geny kodujące toksyczne białko *B. thuringiensis*. Wprowadza się zatem rośliny transgeniczne tzw. drugiej generacji, zawierające dwa lub więcej genów kodujących toksyczne białka o różnej specyficzności działania.

Poznanie biochemicznych, fizjologicznych i genetycznych mechanizmów odporności na toksyny *B. thuringiensis* pozwala na opracowanie strategii przeciwdziałania lub opóźnienia powstawania odporności. Ogólne zasady tej strategii są podobne do tych, jakie obowiązują przy insektycydach chemicznych i polegają na racjonalnym



stosowaniu tych środków, m.in. w rotacji z innymi środkami biologicznymi, lub chemicznymi. Przestrzeganie tych zasad zadecyduje o okresie stosowania omawianych strategii kontroli owadów szkodliwych z gospodarczego punktu widzenia.

Można sądzić, że dalsze intensywne badania nad mechanizmami działania toksyn *B. thuringiensis*, jak i mechanizmami odporności u owadów przyczynią się do znalezienia skutecznego rozwiązania, zapobiegającego rozwojowi odpornych populacji owadów.

## Literatura

- Georghiou G. P., (1994), *Mechanism of microbial characteristics of invertebrate resistance to bacterial toxins*, Proc. XXVII Annual Meeting of the Society for Invertebrate Pathology, Montpellier, France, 28 Aug.-2 Sept. 1994, 48-50.
- Ishawata S., (1901), *On a kind of severe flacherie (sotto disease)*, Dainihon Sanshi Kaiho, 114, 1-5.
- Berliner E., (1911), *Z. Gesamte Getreidewesen* (Berlin), 3, 63-70.
- Berliner E., (1915), *Z. Ang. Entomol.*, 2, 29-56.
- van Frankenhuyzen K., (1993), *The challenge of Bacillus thuringiensis*, in: *Bacillus thuringiensis an environmental biopesticide: theory and practice*, Eds. Ph. F. Entwistle, J. S. Cory, M. J. Bailey, S. Higgs, John Wiley and Sons, Chichester, 1-36.
- Marrone P. G., MacIntosh S. C., (1993), *Resistance to Bacillus thuringiensis*, in: *Bacillus thuringiensis an environmental biopesticide: theory and practice*, Eds. Ph. F. Entwistle, J. S. Cory, M. J. Bailey, S. D. Higgs, John Wiley and Sons, Chichester, 221-235.
- Lisansky S. G., Coombs J., (1994), *Development in the market for biopesticides*, Brighton Crop Protection Conference – Pests and Diseases, 1 (4C-1), 1049-1054.
- Hofmann C., Luthy P., Hutter R., Pliska V., (1988), *Eur. J. Biochem.*, 173, 85-91.
- Hofmann C., Vanderbruggen H., Hutter R., van Rie J., Jansen S., van Mellaert H., (1988), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85, 7844-7848.
- Knowles B. H., Ellar D. J., (1987), *Biochim. Biophys. Acta*, 924, 509-518.
- Höfte H., Whiteley H. R., (1989), *Microbiological Reviews*, 53(2), 242-255.
- Lereclus D., Delecluse A., Lecadet M.-M., (1993), *Diversity of Bacillus thuringiensis strains and toxins*, in: *Bacillus thuringiensis an environmental biopesticide: theory and practice*, Eds. Ph. F. Entwistle, J. S. Cory, M. J. Bailey, S. Higgs, John Wiley and Sons, Chichester, 1-36.
- Dubois N. R., Reardon R. C., Kolodny-Hirsch D. M., (1988), *J. Econ. Entomol.*, 81(6), 1672-1677.
- Felteison J. S., (1994), *Novel pesticidal delta-endotoxins from Bacillus thuringiensis*, Proc. XXVII Annual Meeting of the Society for Invertebrate Pathology, Montpellier, France, 28 Aug.-2 Sept. 1994, v. 1, 184.
- Sato R., Sugimura M., Tani R., Takeuchi K., Ogiwara K., Minami M., Suzuki N., Kaji Y., Hori H., Asano S., Ohba M., Iwahana H., (1994), *A novel scarabaeid delta-endotoxin from Bacillus thuringiensis serovar japonensis strain Buibui*, Proc. XXVII Annual Meeting of the Society for Invertebrate Pathology, Montpellier, France, 28 Aug.-2 Sept. 1994, v.1, 177-179.
- Heierson A., Landen R., Lovgren A., Dalhammar G., Bowman H. G., (1987), *J. Bacteriol.*, 169, 1147-1152.
- Feitelson J. S., (1994b), *The cellcap delivery system: genetically engineered Bt-based bioinsecticides*, Proc. XXVII Annual Meeting of the Society for Invertebrate Pathology, Montpellier, France, 28 Aug.-2 Sept. 1994, v. 1, 249-250.
- Adamczewski K., Praczyk T., Bubniewicz P., Pietryga J., (1999), *Progress in Plant Protection/Postępy w Ochronie Roślin*, 39, 1, 231-237.
- Kinsinger R. A., McGaughey W. H., (1979), *J. Econ. Entomol.*, 72, 346-349.
- McGaughey W. H., (1985), *J. Econ. Entomol.*, 78, 1089-1094.



21. Tabashnik B. E., Cushing N. L., Finson N., Johnson M. W., (1990), *J. Econ. Entomol.*, 83, 1671-1676.
22. Rossiter M., Yendol W. G., Dubois N. R., (1990), *J. Econ. Entomol.*, 83(6), 2211-2218.
23. van Frankenhuyzen K., Nystrom C. W., Tabashnik B. E., (1995), *J. Econ. Entomol.*, 88(1), 97-105.
24. Kaiser J., (1996), *Science*, 273, 423-424.