

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Přírodovědecká fakulta



Bakalářská diplomová práce

*Vliv rekombinantního toxinu Cry3Aa
na vývoj *Spodoptera littoralis**

Jana Husáková

Vedoucí práce: RNDr. Petr Doležal, Ph.D.

České Budějovice 2008

BAKALÁŘSKÁ DIPLOMOVÁ PRÁCE

HUSÁKOVÁ J. (2008): Vliv rekombinantního toxinu Cry3Aa na vývoj *Spodoptera littoralis* [Effect of recombinant toxin Cry3Aa on development of *Spodoptera littoralis*, Bc. thesis in Czech] - 44 pp, Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

ANNOTATION

This bachelor thesis compares the effect of recombinant and natural *Bacillus thuringiensis* Cry3Aa toxin upon the development of non-target insect *Spodoptera littoralis* (Lepidoptera, Noctuidae). Caterpillars of *Spodoptera littoralis* were fed with Premix artificial diet containing both toxins in 8 ppm concentration. Following characteristics were monitored: weight of larval increments, pupal weight, duration of the 5th, the 6th, prepupal and pupal instar, number of laid eggs and number of hatched larvae. The efficiency of conversion of ingested food (ECI) was calculated and growth curves were constructed. No significant effect of both toxins was recorded.

ANOTACE

Tato bakalářská práce je zaměřená na srovnání účinku rekombinantního a přírodního *Bacillus thuringiensis* Cry3Aa toxinu na vývoj necílového hmyzu *Spodoptera littoralis* (Lepidoptera, Noctuidae). Housenky *Spodoptera littoralis* byly chovány na umělé potravě Premix s přísady toxinů o koncentraci 8 ppm. Byly zaznamenávány následující parametry: hmotnostní přírůstky larev, hmotnost kukel, délka 5. a 6. larválního instaru, délka stádia předkukly a kukly, počet nakladených vajíček a počet vylíhnutých larev. Ze získaných dat byla vypočtena využitelnost potravy (ECI) a sestaveny růstové křivky. Významný účinek žádného z toxinů nebyl prokázán.

Tato bakalářská práce byla financována grantem **GA ČR 522/06/1591**

Prohlašuji, že jsem svou bakalářskou práci vypracovala samostatně, pouze s použitím vlastních dat a citované literatury.

Dále prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejich internetových stránkách.

V Českých Budějovicích, dne 18. 4. 2008

.....

PODĚKOVÁNÍ:

V těchto pár řádcích bych ráda poděkovala všem, kteří jakkoliv přispěli ke vzniku této práce. Především děkuji svému školiteli RNDr. Petru Doležalovi Ph.D. a Ing. Oxaň Habuštové Ph.D. za vřelý přístup a cenné rady během realizace experimentů a při tvorbě této práce. Velké díky rovněž patří Zdeňce Svobodové a Ing. Radce Fabiánové za vytrvalou spolupráci. Dále děkuji Prof. RNDr. Františku Sehnalovi CSc., díky němuž mohl výzkum vůbec proběhnout, a Mgr. Michaele Procházkové za poskytnutí výsledků z biotestu s mandelinkou bramborovou. Za pomoc při statistickém zpracování dat bych také ráda poděkovala RNDr. Ivě Dostálkové Ph.D.. V neposlední řadě děkuji své rodině za usilovnou podporu během mého studia.

OBSAH

1. Úvod	7
2. Literární přehled	9
2.1. <i>Bacillus thuringiensis</i>	9
2.2. Historie <i>B.thuringiensis</i> a jeho využití.....	9
2.3. Cry proteiny a jejich geny.....	11
2.3.1. Mechanismus toxického působení Cry proteinů	12
2.3.2. Cry3Aa protein	13
2.4. Další významné toxiny <i>B. thuringiensis</i>	14
2.5. Tradiční <i>Bt</i> -postřikové preparáty vs. transgenní <i>Bt</i> -rostliny.....	14
2.6. Hodnocení vlivu rostlinných pesticidů na necílové organismy	15
2.7. Pokusný hmyz - <i>Spodoptera littoralis</i> (Boisduval, 1833)	16
3. Cíle práce a hypotézy	18
3.1. Cíle.....	18
3.2. Hypotézy	18
4. Materiál a metody	19
4.1. Testované přípravky	19
4.2. Pufry pro přípravu toxinů.....	19
4.2.1. 0,1 M draselný bikarbonátový pufr	19
4.2.2. 0,05 M draselný bikarbonátový pufr s přídavkem 1mM EDTA.....	19
4.3. Uchovávání toxinů a příprava jejich zásobních roztoků.....	20
4.3.1. Přírodní Cry3Aa toxin	20
4.3.2. Rekombinantní Cry3Aa toxin.....	20
4.4. Umělá potrava.....	21
4.4.1. Příprava potravy pro <i>Spodoptera littoralis</i>	21

4.4.2.	Příprava potravy pro <i>Leptinotarsa decemlineata</i>	21
4.5.	Biotest se <i>Spodoptera littoralis</i>	22
4.5.1.	Pokusný hmyz.....	22
4.5.2.	Biotest.....	23
4.5.3.	Statistické vyhodnocení dat.....	24
4.6.	Biotest s <i>Leptinotarsa decemlineata</i>	25
4.6.1.	Pokusný hmyz.....	25
4.6.2.	Biotest.....	25
4.6.3.	Statistické vyhodnocení dat.....	25
5.	Výsledky.....	26
5.1.	<i>Spodoptera littoralis</i>	26
5.1.1.	Hmotnosti larev na počátku experimentu.....	26
5.1.2.	Hmotnostní přírůstky.....	27
5.1.3.	Hmotnost kukel.....	28
5.1.4.	Délka 5. instaru.....	29
5.1.5.	Délka 6. instaru.....	30
5.1.6.	Délka stádia předkukly.....	30
5.1.7.	Délka stádia kukly.....	31
5.1.8.	Počet nakladených vajíček a vylíhnutých larev.....	32
5.1.9.	Využitelnost potravy (ECI).....	32
5.1.10.	Růstové křivky.....	33
5.1.11.	Mortalita.....	33
5.1.11.1.	Mortalita larev.....	33
5.1.11.2.	Mortalita kukel.....	34
5.2.	<i>Leptinotarsa decemlineata</i>	35
5.2.1.	Působení rekombinantního toxinu.....	35

5.2.2.	Působení přírodního toxinu	36
6.	Diskuze	37
6.1.	Vliv rekombinantního a přírodního toxinu Cry3Aa na vývoj <i>Spodoptera littoralis</i>	37
6.1.1.	Vliv na hmotnostní přírůstek larev a hmotnost kukel	37
6.1.2.	Vliv na délku 5. a 6. instaru larev a délku stádia předkukly a kukly	39
6.1.3.	Vliv na množství nakladených vajíček a množství vylíhnutých larev	39
6.1.4.	Vliv na využitelnost potravy (ECI)	39
6.1.5.	Mortalita larev a kukel <i>Spodoptera littoralis</i> v průběhu experimentů	40
6.2.	Závěr	40
7.	Použitá literatura	41
	PŘÍLOHA	45

1. Úvod

Člověk pro své potřeby pěstuje rostliny již po několik tisíc let. Prakticky od počátku kontinuálně probíhala umělá selekce za účelem zvyšování výnosů, urychlení růstu, zvýšení odolnosti vůči patogenům ale i vytváření nových užitečných vlastností (**Grossblatt, 2000**). Vše probíhalo formou pokusů a omylů až do objevu zákonů dědičnosti J. G. Mendelem (1865). Prudký rozvoj molekulární genetiky nastává začátkem druhé poloviny 20. století. Za stěžejní dílo je považována slavná publikace J. D. Watsona a F. Cricka z roku 1953 popisující strukturu deoxyribonukleové kyseliny (DNA) a její význam jako nositelky genetické informace (**Pačes, 2004**). Základem pro přípravu transgenních organismů se stala práce P. Berga demonstrující možnosti přenosu DNA do bakterií (**Damborský, 2006**).

Objev transformace rostlin umožnil získat zcela nových odrůd plodin naplňujících rostoucí požadavky současné společnosti. Genetické modifikace využívají možnost přenosu genů z libovolného organismu do kulturních rostlin. Hnací silou aplikovaného výzkumu nadále zůstává zvýšení úrody a odolnosti vůči chorobám a škůdcům (**Grossblatt, 2000**). Současně roste i pozornost směřovaná ke speciálním vlastnostem plodin, jako je odolnost vůči abiotickým stresům (např. suchu, extrémním teplotám, zaplavování a zvýšenému obsahu solí v půdě) (**Drobník, 2006**). Některé vkládané transgeny mají za následek zvýšení odolnosti rostliny vůči herbicidům, jiné ovlivňují složení zásobních látek rostliny, zvyšují produkci vitamínů či minerálních prvků nebo oddalují zrání ovoce a zeleniny. Můžeme se setkat i s transgenními rostlinami jako zdroji farmaceuticky významných látek, produkujícími vzácné lidské nebo živočišné proteiny. Existuje i velká řada transgenů se schopností působit proti některým přirozeným rostlinným genům (např. genům pro produkci některých toxických látek či škodlivých sekundárních metabolitů) (**Pačes, 2004**).

Pokroky v biotechnologiích založených na transgenních organismech vedou k odůvodněnému optimismu, ale zároveň jsou i příčinou mnohých obav vědecké komunity a veřejnosti. V důsledku toho již v roce 1975 na konferenci v Asilomaru stovka předních vědců diskutovala o bezpečnostních a etických otázkách technologie rekombinantní DNA (**Damborský, 2006**). Byla stanovena příslušná legislativa povolování experimentů a kontroly jejich bezpečnosti. Transgenní rostliny před uznáním a uvedením na trh musí projít pokusy v několika fázích, přičemž každá etapa je sledována a vyhodnocována z hlediska možných nepříznivých vlivů.

Prvotní jsou pokusy s tkáňovými kulturami v laboratořích a experimenty s modifikovanými rostlinami v uzavřeném systému nakládání, finální fází jsou zkoušky transgenních rostlin na pokusných polích (Pačes, 2004).

S rostoucím podílem transgenních plodin na světovém trhu začalo mnoho skupin vyjadřovat své znepokojení nad možnými ekologickými problémy a riziky pro lidské zdraví. (Grossblatt, 2000). Tyto obavy se předně týkají: ohrožení biodiverzity v důsledku invazního charakteru či zvýšené konkurenční schopnosti, potencionálního dopadu na necílové organismy a půdní ekosystém, nedostatku informací o toxicitě a alergenitě produktů transgenních rostlin a předně nevratnosti škodlivých změn na životním prostředí (Pačes, 2004). Nedůvěra k transgenním plodinám vychází ze širší spektra genetické informace, jež je k dispozici (prakticky z jakéhokoliv živého organismu či dokonce syntetická DNA) (Grossblatt, 2000). Technologie genetických modifikací je mnohdy považována za opovážlivou hru na Boha, jindy zase za pouze logické pokračování úsilí našich předků započaté již domestikací planě rostoucích rostlin (Petr, 2003). Mnoho lidí věří, že tradiční konvenční šlechtění je již na hranicích svých možností a genetické modifikace jsou nevyhnutelné, chceme-li utišit naléhavou potřebu potravin v rozvojových zemích (Grossblatt, 2000).

Z obou výše zmiňovaných krajních názorů je zřejmé, jak důležitou roli zastávají experimenty o účincích transgenních toxinů na necílové organismy a celé životní prostředí. Výsledky předkládané bakalářské práce jsou součástí komplexního procesu v hodnocení rizika Cry3Aa toxinu pro životní prostředí. Vzhledem k rychlosti s jakou se objevují nové poznatky o účincích daného toxinu na další zástupce necílových organismů, je však nutné výsledky této studie dále doplňovat a rozvíjet. Práce ověřuje vliv dvou forem Cry3Aa toxinu, přírodní (užívané v insekticidních postřikových preparátech) a rekombinantní (užívané v transgenozí rostlin, zejm. bramboru *Solanum tuberosum*), na vývoj necílového druhu hmyzu *Spodoptera littoralis* (Boisduval) (Lepidoptera; Noctuidae). Biologická aktivita obou toxinů byla ověřována zároveň probíhajícím biotestem na cílovém hmyzu *Leptinotarsa decemlineata* (Say) (Coleoptera; Chrysomelidae) (Michaela Procházková (ENTÚ, BC AVČR, České Budějovice)).

2. Literární přehled

2.1. *Bacillus thuringiensis*

Bacillus thuringiensis (řád Eubacteriales; čeleď Bacillaceae) je už několik desítek let předmětem mnoha vědeckých výzkumů po celém světě a současně má i důležité postavení v oblasti agronomie. Jednotlivé poddruhy této gram-pozitivní tyčinkovité bakterie jsou významným prostředkem k potlačení širokého spektra hmyzích škůdců.

Bacillus thuringiensis (dále jen *Bt*) je přirozeným patogenem hmyzu a běžně se vyskytuje v nejrůznějších přírodních prostředích (Martin & Travers, 1989; Chaufaux *et al.*, 1997). Jednotlivé kmeny jsou izolovány např. z půdy (Martin & Travers, 1989; Bernhard *et al.*, 1997), hmyzu (Carrozi *et al.*, 1991) a rostlin (Smith & Couche, 1991; Kaelin *et al.*, 1994). V současnosti je známo více jak 60 tisíc kmenů *Bt* (Sharma, 2005), které se dále člení do desítek serotypů odlišných vlastností.

Bakterie má dvě fáze životního cyklu: během vegetativní fáze se *Bt* normálně množí buněčným dělením a při nedostatku živin přechází do fáze sporulace. Spory jsou velice odolné proti teplu a suchu, a umožňují tak bakterii přežít období stresu. Za vhodných podmínek dojde k vyklíčení spor a návratu k vegetativní fázi (Lambert & Peferoen, 1992).

Typickým znakem odlišujícím *Bt* od jiných sporulujících bakterií je výskyt světlolomného krystalu, který má v sobě uložen protein (protoxin) umožňující mikrobu vniknout do těla hostitele (Vaňková, 1990). Tyto parasporální krystaly mohou představovat dokonce i více než 30% suché váhy sporangia (Lambert & Peferoen, 1992).

2.2. Historie *B.thruringiensis* a jeho využití

První zprávy o *Bt* pochází z Japonska z počátku 20. století, kdy mikrobiolog S. Ishiwata ve svých pracích (1901, 1902) pojednával o neznámém mikrobu, který byl příčinou rychlého hynutí housenek bource morušového (*Bombyx mori*). O téměř patnáct let později německý mikrobiolog

Berliner popisoval obdobné bakteriální onemocnění u zavíječe moučného (*Ephesia kuehniella*) a dal mikrobu jméno, pod jakým jej známe dnes (Beegle & Yamamoto, 1992; Lambert & Peferoen, 1992).

Slibné výsledky pokusů srovnávajících *Bt* s dalšími druhy bakterií, zejména v účinnosti proti zavíječi kukuřičnému (Vaňková, 1990), vedly k vzestupu jeho významu a již v roce 1938 se ve Francii objevil první komerčně dostupný *Bt*-insekticidní prostředek (Hilbeck & Schmidt, 2006). Po následujících téměř patnácti letech rozvoje chemických insekticidů se *Bt* opět dostal do popředí zájmu. Stěžejní byly v tomto období práce Steinhouse (1951), Hannaye (1953) a Hannaye a Fitz-Jamese (1955), díky nimž vyšla najevo souvislost mezi krystaly, které *Bt* produkuje při sporulaci, a jeho patogenitou pro hmyz (Vaňková, 1990). Navíc se vzrůstem povědomí o škodlivosti syntetických pesticidů pro životní prostředí byl kladen stále větší důraz na nalezení jejich vhodné alternativy.

V roce 1961 byl v USA registrován první moderní *Bt*-insekticid (Rechcigl & Rechcigl, 1998). Brzy poté začaly společnosti jako Abbott, Biochem. Products (Solvay), Sandoz a mnohé další na trh dodávat stále novější varianty *Bt*-insekticidů účinné zejména proti zástupcům řádu *Lepidoptera*, později *Diptera* a *Coleoptera*. V Československu se již v roce 1959 Vaňkové a Weiserovi podařilo vyrobit *Bt*-insekticidní přípravek pod názvem Bathurin (Vaňková, 1990), jenž se ovšem v praxi uplatnil až o několik let později. Vysoce efektivní, přísně specifické a environmentálně neškodné *Bt*-insekticidy se zanedlouho staly dominantní skupinou (kolem 90%) v celosvětovém obchodu s bio-insekticidy (Sharma, 2005).

Od 80. let se řada vědců (např. Obukowicz *et al.*, 1986; Adang *et al.*, 1987 a Vaeck *et al.*, 1987) zabývala problémem, jak pomocí *Bt* vytvořit rostlinu permanentně odolnou vůči hmyzím škůdcům, a již v polovině 90. let se na trhu objevily první geneticky modifikované rostliny s touto schopností (Sharma, 2005). Do dědičné informace těchto tzv. rostlinných pesticidů se podařilo metodami genového inženýrství vnést gen pro *Bt*-toxin, následkem čehož škůdce požírající pletiva modifikované rostliny přijímá zároveň s potravou i *Bt*-toxin, který je pak v jeho střevě aktivován a škůdce zahubí. (Petr, 2003). V současnosti se používají i laboratorně upravené geny pro *Bt*-toxiny, které mají v rostlině až 500násobně vyšší expresi než jejich přírodní formy (Ondřej *et al.*, 1999). Za účelem získat kultivary odolné vůči hmyzím škůdcům bylo doposud genetickou modifikací upraveno velké množství kulturních rostlin jako např. kukuřice, brambor, rýže, bavlník, sója a mnohé další. Celá problematika geneticky modifikovaných organismů, včetně těchto moderních

bio-insekticidů, je z mnoha úhlů pohledu ostře diskutována odbornou i laickou veřejností již řadu let.

2.3. Cry proteiny a jejich geny

Cry proteiny (δ -endotoxiny) jsou termolabilní toxiny, k jejichž aktivaci dochází hydrolýzou protoxinů střevními protézami v těle hostitele (Vaňková, 1990). Jednou z předních výhod Cry proteinů je velmi specifická toxicita pro několik málo druhů hmyzu (obvykle stejného taxonomického řádu), přičemž jeden kmen *Bt* může vytvořit až 5 různých krystalových proteinů (de Maagd, 2002).

Každý Cry protein je kódován vlastním genem a koncem roku 2005 bylo známo již na 314 rozlišných cry genů (OECD, 2007). V roce 1989 Höfte a Whiteley navrhli klasifikační schéma a systematickou nomenklaturu známých cry genů založené zejména na toxinové specifitě k určitému hmyzímu řádu. Vznikly tak 4 hlavní skupiny genů kódujících proteiny toxické jen pro některé řády hmyzu:

CryI - *Lepidoptera*

CryII - *Lepidoptera* a *Diptera*

CryIII - *Coleoptera*

CryIV - *Diptera*

Později přibýly ještě další dvě skupiny: CryV a CryVI, obě účinné proti hlísticím (Bravo, 1997). S objevováním dalších cry genů se tradiční klasifikace stala nepostačující a bylo nutné ji přepracovat. Proto Crickmore se svými kolegy v roce 1998 vypracoval nový systém, jehož hlavním kritériem je podobnost v aminokyselinových sekvencích celého genového produktu. V současnosti je již známo na 55 tříd Cry toxinů (***Bt* Toxin Nomenclature - full toxin list** [Online] http://www.lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil_Crickmore/Bt/toxins2.html)

2.3.1. Mechanismus toxického působení Cry proteinů

Pro porozumění přísné specifitě Cry proteinů je velmi důležité se seznámit s mechanismem vzniku toxického působení u cílové skupiny hmyzu (**obr. 1**).

V krystalu se nachází protoxin, prekurzor aktivního δ -endotoxinu, v nerozpustné formě (**de Maagd, 2002**). Po pozření jsou protoxiny rozpouštěny v závislosti na charakteru střevního prostředí. Mnoho toxinů účinných proti řádu Lepidoptera se rozpouští pouze ve vysoce alkalickém pH (>9,5), které představuje typické vnitřní prostředí středního střeva larev tohoto řádu (**Koller et al., 1992**). Rozpustnost protoxinu je tedy podstatná pro determinaci toho, jaký druh hmyzu bude pro daný toxin citlivý. Střevní proteázy natráví částí proteinu, čímž se zformuje aktivovaný δ -endotoxin, který již jejich aktivitě odolává (**de Maagd, 2002**).

δ -endotoxin se následně naváže na specifické receptory na povrchu buněk střevního epitelu. Jejich přítomnost je dalším klíčovým předpokladem toxicity proteinu. Přísná specifita Cry toxinů spočívá v tom, že různé toxiny jsou rozeznávány specifickými receptory, které se vyskytují pouze u některých druhů hmyzu (**Hoffman et al., 1988**). Jediným úskalím tohoto výkladu může být skutečnost, že některé toxiny jsou schopné se vázat k více receptorům, a stejně tak jeden receptor může být rozeznáván více toxiny (**Escrive et al., 1997**). Ve většině případů však změna v receptoru způsobí ztrátu aktivity danou neschopností protein rozeznat. Tento jev je považován za nejrozšířenější mechanismus, jímž cílový hmyz získává odolnost vůči Cry toxinům, což bylo potvrzeno v laboratorních i polních experimentech (**Schnepf et al., 1998**).

Po navázání na specifický receptor proniká toxin membránou cílové buňky, v níž vzniká velké množství pórů. Jimi začne ven vytékat buněčný obsah a do buňky volně vtéká voda z vnějšího prostředí. Celý proces končí zánikem buňky. Jestliže toxin takto vyřadí dostatečné množství buněk, hmyz není schopen je regenerovat a hyne. Účinky toxinu jsou obvykle patrné již po několika hodinách a projevují se celkovou paralýzou a zastavením příjmu potravy (**de Maagd, 2002**).



Obr. 1: Schéma aktivace *Bt*-krystalového proteinu ve střevě cílového hmyzu (vytvořeno dle **de Maagd, 2002**)

2.3.2. Cry3Aa protein

Cry 3Aa protein patří do rodiny δ -endotoxinů. Jeho gen *cry3Aa* byl izolován z *B. thuringiensis* podtř. *tenebrionis* (**Protein knowledgebase – UniProtKB [Online]** <http://beta.uniprot.org/uniprot/P0A379>) a vnesen do transgenních brambor (odrůda NewLeaf vytvořená společností Monsanto), které tímto získávají odolnost vůči mandelince bramborové (*Leptinotarsa decemlineata* (Say) (Coleoptera; Chrysomelidae))

2.4. Další významné toxiny *B. thuringiensis*

B. thuringiensis rovněž produkuje jiný typ δ -endotoxinů, **tzv. Cyt proteiny** se specifickou cytolytickou aktivitou proti řádu *Diptera* založenou na obdobném mechanismu jako Cry proteiny (OECD, 2007). Některé podtřídy *Bt* navíc mohou vytvářet další typy toxinů jako např. vegetativní insekticidní protein **Vip3A**, toxický pro řád *Lepidoptera* (Estruch *et al.*, 1996). Tento protein postrádá formu parasporálního krystalu a bakterie jej zřejmě uvolňuje rovnou do média (Schnepf *et al.*, 1998). Obdobně je tomu u **Vip1A** a **Vip2A**, které jsou aktivní proti zástupcům řádu *Coleoptera* (de Maagd, 2002). Další významnou skupinou toxinů reprezentují **β -exotoxiny**, které mají mnohem širší spektrum citlivých organismů zahrnující jak bezobratlé živočichy, tak obratlovce - ryby, myši apod. (Beegle & Yamamoto, 1992).

2.5. Tradiční *Bt*-postříkové preparáty vs. transgenní *Bt*-rostliny

V současnosti se *Bt*-postříkové preparáty užívají zejména ve třech oblastech: v lesnictví - proti škůdcům lesních dřevin (zvláště v Severní Americe), v boji proti moskytům jako hlavním přenašečům malárie (Střední Východ, Afrika ale i Evropa) a v neposlední řadě v organickém zemědělství, neboť *Bt*-postříky jsou coby přírodní insekticidy povolené jako jedny z mála v tomto odvětví (de Maagd, 2002)

S aplikací *Bt*-postříkových preparátů jsou však spojeny následující problémy:

- Nízká perzistence (přibližně 1 týden) - spory bakterie jsou inaktivovány UV zářením (Šifner *et al.*, 1998), během vegetační sezóny je tedy nutné opakování postřiku.
- Mnoho škůdců si již vyvinulo rezistenci k *Bt*-postříkům (de Maagd, 2002).
- Aplikace je omezena podmínkami vnějšího prostředí - suché počasí (děšť postřík smyje), určitá teplota (teplotní vývojové prahy škůdce) (Šifner *et al.*, 1998).
- Malá účinnost proti škůdcům, kteří se zahrabávají do půdy nebo žijí uvnitř rostlinné tkáně (OECD, 2007).
- Vysoké náklady na přípravu bakteriálních kultur a na technické zařízení při realizaci postříků.

Většinu výše popsaných záležitostí řeší pěstování geneticky modifikovaných *Bt*-rostlin. *Bt*-toxiny působí proti škůdcům po celé období růstu rostliny a zasáhnou každého jedince, který se na rostlině živí (OECD, 2007). Mutace způsobující rezistenci hmyzu k *Bt*-toxinům jsou většinou recesivní, tudíž je důležité zajistit křížení případných rezistentních a citlivých jedinců metodou **tzv. refugí** – pěstováním určitého množství tradičních (nemodifikovaných) rostlin v blízkosti rostlin transgenních (Ondřej *et al.*, 1999).

Na rozdíl od *Bt*-postřiků obsahujících bakteriální buňky, spory a inaktivní protoxiny, které pro plnou funkčnost musí projít komplexem biochemických procesů ve střevě hostitele, rostlinné pesticidy produkují *Bt*-toxiny již v aktivnější (rozpuštěné) formě (Hilbeck, 2001), aniž by ztratily něco ze své specifity. Navíc transgenní rostliny oproti *Bt*-postřikům zpravidla obsahují jen jeden *Bt*-toxin, což specifitu dále zvyšuje (de Maagd, 2002).

2.6. Hodnocení vlivu rostlinných pesticidů na necílové organismy

V naprosté většině se jednou z nejdiskutovanějších otázek *Bt*-transgenních rostlin stal jejich vliv na necílové organismy. Řada studií se již po několik let snaží potvrdit či vyvrátit předpoklad založený na zkušenostech s *Bt*-postřikovými preparáty a to, že by rostlinné *Bt*-pesticidy neměly mít žádný nepříznivý účinek na organismy stojící mimo řád cílového hmyzu (Hilbeck & Schmidt, 2006).

Zde je třeba si uvědomit existenci dvou rozdílných typů účinků *Bt*-transgenních rostlin. Je to jednak **přímý účinek** způsobený biologicky aktivními složkami *Bt*-toxinů, jenž je výsledkem toho, zda v hostitelském organismu dojde k specifické aktivaci toxinu či nikoliv, a jednak **účinek nepřímý**, jenž je způsoben změnami v dostupnosti a v nutriční kvalitě cílových organismů pro jejich predátory a parazitoidy (Sanvido *et al.*, 2006).

Studie zabývající se vlivem rostlinných *Bt*-pesticidů na necílové organismy uplatňují dva základní přístupy, podle nichž je můžeme rozdělit na experimenty laboratorní a experimenty polní. Speciálním případem polních experimentů jsou pak pokusná pole s transgenními rostlinami pokrytá sítěmi zabraňujícími migraci hmyzu z cílové oblasti do okolí a naopak.

Předmětem **laboratorních experimentů** je obvykle ověření účinků čistých toxinů přidaných do umělé či přírodní potravy nebo dokonce *Bt*-toxinů vylučovaných samotnými

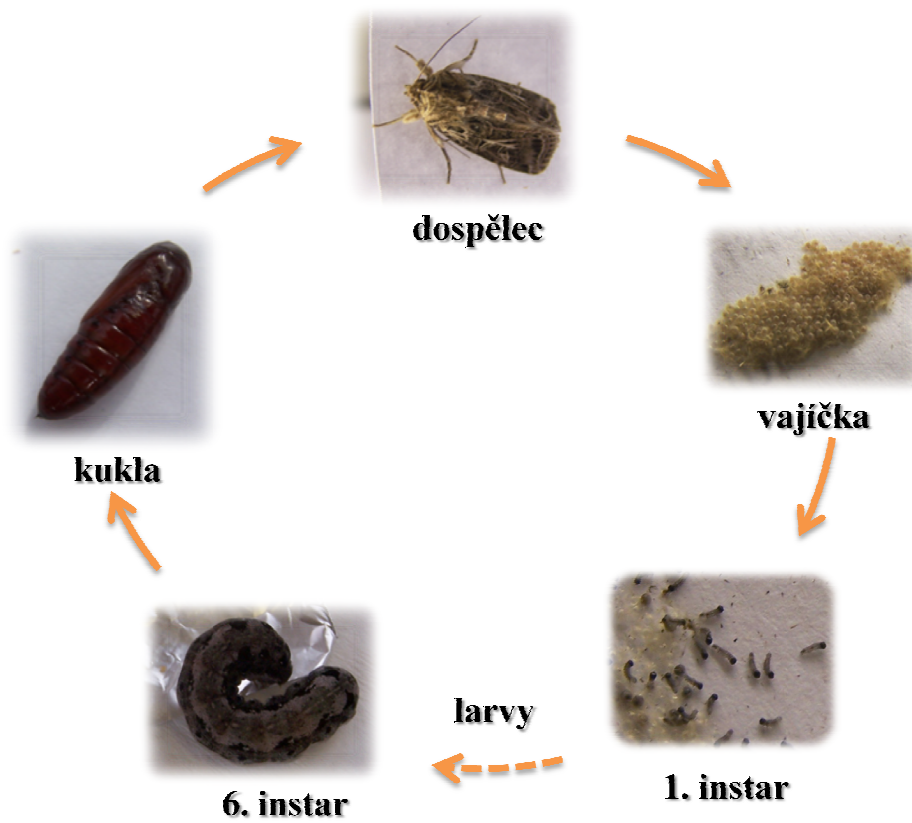
transgenními rostlinami. Takto navržené studie poskytují informace o významu toxinu v jednoduchých interakcích mezi organismy z různých trofických úrovní za kontrolovaných podmínek, ale obvykle už nic nevyprávějí o složitějších interakcích v přírodním či agrikulturním prostředí, nezabývají se migrací hmyzu, přítomností dalších organismů ani možnostmi výběru potravního zdroje (de Maagd, 2002). To vše se promítá v **experimentech polních**, které ovšem na rozdíl od laboratorních pokusů nejsou pro svou komplikovanost otázkou několika měsíců ale minimálně několika let. Vzhledem ke své finanční náročnosti jsou obvykle prováděny až v návaznosti na laboratorní pokusy, nejčastěji před uvedením transgenních rostlin do oběhu.

2.7. Pokusný hmyz - *Spodoptera littoralis* (Boisduval, 1833)

Spodoptera littoralis (Lepidoptera, Noctuidae) patří ve světovém měřítku k nejvýznamnějším polyfágním škůdcům kulturních rostlin. Hostitelské spektrum je široké, zahrnuje zástupce 40 čeledí včetně nejméně 87 druhů ekonomicky významných plodin (Salama et al., 1970). Více než 50 % známých hostitelů patří do následujících čeledí: *Leguminosae*, *Solanaceae*, *Malvaceae*, *Moraceae*, *Compositae*, *Gramineae*, *Chenopodiaceae* a *Cruciferae* (Ellis, 2005). Výskyt druhu je alosterický s hlavními oblastmi v jižních částech Evropy, téměř celé Africe a na Středním východě. V závislosti na sezónních teplotách se šíří i do severnějších oblastí (EPPO/CABI, 1997).

Zástupci rodu *Spodoptera* jsou příkladem hmyzu s proměnou dokonalou. Během ontogeneze prochází 4 vývojovými stádii: vajíčko, larva (6 instarů), kukla a dospělec (obr. 2).

Samičky kladou vajíčka ve snůškách čítajících řádově desítky až stovky vajíček pokrytých vrstvou chlupů. (Ellis, 2005). Larvy počátečních instarů žijí ve skupinách na listech, později (ve 4. - 6. instaru) se rozptýlí a vykazují převážně noční aktivitu. Vývoj kukly probíhá v půdě v zámostku zeminy a po 11 až 13 dnech (při 25°C) vyletuje dospělec. Celý životní cyklus obvykle trvá kolem 5 týdnů (EPPO/CABI, 1997).



Obr. 2: Schéma životního cyklu *Spodoptera littoralis*

3. Cíle práce a hypotézy

3.1. Cíle:

- Provéřit, zda chemicky čistý toxin Cry3Aa působí na zástupce Lepidoptera.
- Zjistit, zda se toxin Cry3Aa využívaný v transgenozí rostlin ve svých účincích na necílový organismus liší od přírodního Cry3Aa toxinu.

3.2. Hypotézy:

- Toxiny Cry3Aa jsou dle současných poznatků pro řád Lepidoptera neúčinné, tudíž nebyly očekávány žádné negativní projevy u pokusného hmyzu.
- Podle předpokladu by se rekombinantní toxin neměl v účincích na necílový organismus lišit od toxinu přírodního.
- Případný účinek rekombinantního či přírodního toxinu by se měl předně projevit u citlivých skupin testovaného hmyzu.

4. Materiál a metody

4.1. Testované přípravky

- roztok s přírodními Cry3Aa krystaly *B. thuringiensis* podtř. *tenebrionis* o koncentraci 5 mg/ml byl připraven I. A. Zaluninem (Scientific Research Institute for Genetics and Selection of Industrial Microorganisms, Moskva, Rusko)
- roztok rekombinantního Cry3Aa toxinu o koncentraci 4 mg/ml byl poskytnut firmou Monsanto Company (Saint Louis, Missouri, USA)

4.2. Pufry pro přípravu toxinů

4.2.1. 0,1 M draselný bikarbonátový pufr

11,75 mg uhličitanu draselného (K_2CO_3) bylo rozpuštěno v malém objemu destilované vody a doplněno do 850 ml. 2,5 mg hydrogenuhličitanu draselného ($KHCO_3$) bylo rozpuštěno a doplněno na objem 250 ml. Následně pomalým přidáním 250 ml 0,1 M $KHCO_3$ k 850 ml 0,1 M K_2CO_3 za neustálého míchání byl připraven zásobní roztok (přibližně 1,1 l) 0,1 M draselného bikarbonátového pufru (pH 10,6). Pro veškerá vážení byla použita analytická váha Kern - ABS 220-4 (Kern & Sohn GmbH, Německo, max. 220 mg, citlivost 0,1 mg).

4.2.2. 0,05 M draselný bikarbonátový pufr s přidavkem 1mM EDTA

Pro přípravu cca 500 ml 0,05 M draselného bikarbonátového pufru bylo ke 250 ml 0,1 M bikarbonátového pufru (příprava viz. předchozí odstavec) přidáno 186,17 mg 1 mM Na_2EDTA (sodná sůl kyseliny ethylendiamintetraoctové), která se nechala po dobu 15 min. rozpouštět při laboratorní teplotě za stálého míchání. Následně byl obsah doplněn 250 ml destilované vody. Pro

veškerá vážení byla použita analytická váha Kern – ABS 220-4 (Kern & Sohn GmbH, Německo, max. 220 mg, citlivost 0,1 mg).

4.3. Uchovávání toxinů a příprava jejich zásobních roztoků

4.3.1. Přírodní Cry3Aa toxin

Pro uchování toxinu bylo do krystalového roztoku dodaného I. A. Zaluninem přidáno několik kapek xylenu a následně byl roztok uložen do mrazicího boxu (-20 °C).

Před začátkem experimentu bylo z důvodu úplného odstranění xylenu k 1 ml roztoku přidáno 10ti až 20tinásobné množství destilované vody, vzorek centrifugován (10 000 otáček, 5°C, 10 min.) a získaný supernatant se zbytky xylenu slit. Celá procedura byla opakována do úplného odstranění xylenu.

Pro přípravu zásobního roztoku o koncentraci 200 ppm byly sedimentované krystaly rozpouštěny za stálého míchání po dobu 1 hodiny při laboratorní teplotě ve 24 ml 0,1 M draselného bikarbonátového pufru (pH 10,6). Z takto získaného zásobního roztoku bylo odebráno 10 µl, zředěno na 1 ml 0,1 M bikarbonátovým pufrem (pH 10,6) a použito pro stanovení koncentrace toxinu ve vzorku s předpokladem, že se v roztoku nenachází žádný jiný protein než krystalový. Koncentrace proteinů byla stanovena metodou dle **Bradfordové (1976)** porovnáním absorbance naměřené při vlnové délce 595 nm se standardem. Měření bylo provedeno na spektrofotometru SpectraMAX 340PC (Molecular Devices Corp., Kalifornie, USA).

4.3.2. Rekombinantní Cry3Aa toxin

Vzorky dodané firmou Monsanto (1 ml) byly skladovány v mrazicím boxu (-20 °C) a před použitím naředěny 0,1 M draselným bikarbonátovým pufrem (pH 10,6) na 200 ppm zásobní roztok toxinu: 1 ml vzorku byl přidán k 19 ml 0,1 M pufru a vše inkubováno po dobu 1 hod. při laboratorní teplotě za neustálého míchání.

4.4. Umělá potrava

4.4.1. Příprava potravy pro *Spodoptera littoralis*

Jako základ potravy byla použita komerčně dodávaná instantní sójovo-pšeničná moučka - Manduca - Heliothis Premix (Stonefly Industries Inc., Texas, USA). Dávka (cca 200 g) pro skupinu housenek chovaných na potravě s jedním toxinem (přírodní či rekombinantní) byla připravena smícháním 142 ml 0,05 M bikarbonátového pufru (pH 10,6 a 1 mM EDTA) s 8 ml 200 ppm zásobního roztoku odpovídajícího Cry3Aa. Poté byl celý obsah přidán k 50 g suché „premixové“ moučky a vše pečlivě promícháno do homogenní směsi. Výsledná koncentrace toxinu v potravě se tak snížila na požadovaných 8 ppm. Pro kontrolní skupinu bylo krmivo zhotoveno stejným způsobem ale bez přídavku toxinu (150 ml 0,05 M pufru + 50 g moučky). Potrava byla do vyčerpání uchovávána v chladícím boxu (5°C). V případě potřeby či na začátku každého nového experimentu byla připravena vždy čerstvá potrava. Pro navážení suché potravy byla použita váha GX-200-EC (AND-A&D Instruments Ltd., Japonsko, max. 210 g, citlivost 1 mg).

4.4.2. Příprava potravy pro *Leptinotarsa decemlineata*

Za základ potravy sloužil komerčně dodávaný produkt Colorado Potato Beetle (Bio-Serv (Entomological division), New Jersey, USA). Pro standardní test každého z toxinů (přírodní a rekombinantní) byla využita dávka o objemu cca 150 ml. 70 ml 2,8 % roztoku agaru v destilované vodě bylo povařeno v mikrovlnné troubě, následně ochlazené přidáním 40 ml studené vody a umístěno do vodní lázně při 48-56°C. K roztoku bylo za neustálého míchání přidáno 21,09 g suché potravy. Nádoba byla poté uzavřena a třepána na vodní lázni do dosažení homogenní suspenze, k níž bylo přidáno 0,38 ml 37 % formaldehydu a 0,68 ml 18,3 % hydroxidu draselného, a vše promícháno. Takto získaná potrava byla rozdělena na 13 g podíly, které byly nadále uchovávány ve vodní lázni při 50-53°C. Různé koncentrace toxinu v potravě bylo dosaženo přidáním specifického množství 2 ppm či 200 ppm předem připraveného zásobního roztoku Cry3Aa a destilované vody (**tab. A**). Celkový obsah byl poté řádně promíchán a napipetován po 0,3 ml dávkách do jamek titrační destičky (Iwaki, Barloworld Scientific Ltd., Velká Británie). Pro pipetování byla použita pipeta Eppendorf (Eppendorf AG, Německo) a ohřáté 1 ml špičky

s ustřiženými konci. Destičky s potravou byly uchovávány v chladícím boxu (5°C) po dobu max. 2 dnů před začátkem pokusu. Pro navážení suché potravu byla použita váha GX-200-EC (AND-A&D Instruments Ltd., Japonsko, max. 210 g, citlivost 1 mg).

Tab. A: Množství zásobního roztoku Cry3Aa a destil. vody přidané k 13 g dílům základní potravu

Konečná koncentrace toxinu v potravě [ppm]	Destil. voda [μl]	2 ppm zásobní roztok Cry3Aa [μl]	200 ppm zásobní roztok Cry3Aa [μl]
0.0	1000	-	-
0.004	930	70	-
0.01	825	175	-
0.05	650	350	-
0.1	300	700	-
0.5	965	-	35
1	930	-	70
2	860	-	140
4	720	-	280
8	440	-	560
15.5	15	-	985

4.5. Biotest se *Spodoptera littoralis*

4.5.1. Pokusný hmyz

Pro celý experiment byly vybrány 3 chovné linie *Spodoptera littoralis* (Boisd.):

- **Linie NRC:** získána z National Research Centre, Gíza (Egypt), chov byl udržován po několik let v laboratorních podmínkách na listech skočce obecného (*Ricinus communis*) během vegetační sezóny a na umělé agar-fazolové potravě v období zimy. V našich podmínkách chov probíhal na potravě Premix.

- **Citlivá linie (Egypt):** citlivá k insekticidům, získána z Central Agricultural Pesticides Laboratory, Agricultural Research Centre, Dokki, Gíza (Egypt), chov byl udržován po několik let na umělé fazolové potravě a pro zlepšení vitality byla jedna generace ročně živena listy skočce obecného (*Ricinus communis*). V našich podmínkách chov probíhal na potravě Premix.
- **Citlivá linie (Francie):** citlivá k insekticidům, získána z INRA Laboratory in Versailles (Francie), chov byl udržován na umělé sójovo-kukuřičné potravě s antibiotiky. Stejná potrava byla podávána i v našich podmínkách.

4.5.2. Biotest

Všechny linie byly chovány při 25°C a fotoperiodě 18 : 6 hodin (foto : skotofáze). Z každé linie bylo pro pokus vybráno 120 larev, rozděleno do tří skupin po 40ti a krmeno různou potravou (potrava s přírodním toxinem = ZAL, s rekombinantním toxinem = MON a kontrolní skupina). Výběrovým kritériem bylo:

- stáří larev: larvy v 5. instaru, vybrány do 12 hodin po svlečení
- váhové rozmezí: 60 ± 5 mg

Larvy byly jednotlivě umístěny do Petriho misek (9 cm v průměru) s filtračním papírem na dně (**Příloha - obr. A**) a označeny (skupina, číslo). Během každodenní kontroly byla housenkám vyměněna stará potrava za čerstvou (vždy v množství úměrném spotřebě) a z misek odstraněny veškeré nečistoty. Pro získání růstové křivky bylo několik jedinců váženo každý den a zaznamenána celková konzumace potravy během larválního stádia. Z ní byla následně stanovena tzv. využitelnost potravy (ECI - Efficiency of Conversion of Ingested food) v % dle vzorce: $ECI = 100 \times \text{hmotnostní přírůstek} / \text{spotřeba potravy}$. Rovněž byla sledována mortalita larev ve všech pokusných skupinách.

Ve stádiu předkukly (indikace produkcí likvidního exkretu) bylo podávání potravy ukončeno. Zvážením předkukel byl získán hmotnostní přírůstek larvy (odečtením počáteční hmotnosti od hmotnosti předpupy). Předkukly byly přemístěny do tmavých plastových kelímků (Eurobal s.r.o., Česká republika, objem 180 ml, horní průměr 7cm) naplněných směsí z pilin a komerční zahradní zeminy (Substrát pro trávníky, Rašelina Soběslav, Česká republika,

vlhkost max. 65%) (**Příloha - obr. B**). Kelímky byly uzavřeny čtvercem hedvábného vlákna (monofylu) připevněného gumičkou (**Příloha - obr. C**). Předkukly se postupně zahrabaly cca 3 - 5 cm hluboko do zemino-pilinové směsi a během 72 hodin proběhla přeměna v kuklu. Čerstvé kukly byly velmi jemně z kelímku vyjmuty, zváženy (max. 24 hodin od proměny) a vráceny zpět. Po určité době (cca 3 - 4 dny) byly kukly opět vyjmuty, pod binolupou (Arsenal, Česká republika) roztrženy dle pohlaví, zahrabány do směsi v kelímcích a sledována mortalita kukel, tj. počet kukel, ze kterých nevzešel žádný dospělec. Pro veškerá vážení byla použita váha GX-200-EC (AND-A&D Instruments Ltd., Japonsko, max. 210 g, citlivost 1 mg).

Vylétnuvší dospělci stejného nebo ± 1 den rozdílného stáří byli náhodně párováni (vždy samec a samice), a poté přemístěni do vertikálně umístěných bílých papírových válců (20 cm vysoké, cca 8 cm v průměru) uzavřených z obou stran víky Petriho misek (**Příloha - obr. D**). Imaga byla krmena denně 10 % cukerným roztokem kapaným na buničitou vatu. Během zhruba 2 až 3 dní začaly samičky klást vajíčka na stěny válců. Odtud byly snůšky vystřihovány a sčítány pod binolupou a poškozené válce nahrazeny novými. Po sečtení byla vajíčka uložena do Petriho misek, kde se (zpravidla po 3 dnech) začaly líhnout larvy prvního instaru. Odečtením nevylíhnutých vajíček od původní snůšky bylo zjištěno celkové množství čerstvých larev. Denně byla sledována i úmrtnost dospělců, přičemž experiment byl ukončen poté, co většina dospělců uhynula.

4.5.3. Statistické vyhodnocení dat

K vyhodnocení dat získaných z experimentu byl použit program STATISTICA 6.0 for Windows (StatSoft Inc., Oklahoma, USA). Na porovnání počátečních hmotností housenek, hmotnostních přírůstků, hmotností kukel, délky 5., 6. instaru, délky stádia předkukly a kukly byly aplikovány dvoucestné testy variance (Factorial ANOVA) - faktory pohlaví a skupina. V případě průkazného testu v rozdílnosti skupin byl z důvodu různého počtu jedinců ve skupinách dále použit Unequal N HSD test pro mnohonásobná porovnání. Příslušné grafy byly zpracovány v programu GraphPad Prism 4.0 (GraphPad Software Inc., Kalifornie, USA). Vyhodnocení dat nakladených vajíček a vylíhnutých larev bylo provedeno pomocí jednocestných testů variance (One-Way ANOVA). Grafy růstových křivek byly vytvořeny v Excelu 2007 (Microsoft Inc., Kalifornie, USA).

4.6. Biotest s *Leptinotarsa decemlineata*

4.6.1. Pokusný hmyz

Laboratorní chov *Leptinotarsa decemlineata* (Say), populace z okolí Českých Budějovic, byl udržován již cca 15 generací na rostlinách bramboru, *Solanum tuberosum* (kultivary Desirée a Superior) ve sklenících Entomologického ústavu, Biologického centra AVČR, v.v.i..

4.6.2. Biotest

Pro každý test bylo zapotřebí 400-500 vajíček *Leptinotarsa decemlineata* nakladených v průběhu ne déle než 4 dní na listech bramboru. Vajíčka byla z listů přemístěna pomocí entomologických pinzet a jednotlivě ponořena na 1 sekundu do 0,1 % formaldehydu. Přebytek formaldehydu byl z vajíček odstraněn jemným filtračním papírem a vajíčka přemístěna na sterilní suchý filtrační papír v Petriho misce a inkubována při 25°C a fotoperiodě 18:6 (foto : skotofáze).

Pro samotné testy byly vybrány larvy ve stáří méně jak 30 hodin po vylíhnutí a umístěny na připravenou potravu poté, co strávily část svého chorionu (**Příloha - obr. E**). Po osazení všech jamek byla destička pevně uzavřena potravinovou folií (Saran obal, Česká republika) 3x propíchnutou nad každou jamkou pomocí velmi jemné (velikost 00) entomologické pinzety, uzavřena plastovým víčkem a uložena do termostatu (25°C, fotoperioda 18:6). Denně byla zaznamenávána mortalita a ekdyze larev. Test byl ukončen osmý den.

4.6.3. Statistické vyhodnocení dat

Celý experiment byl 2x opakován, čímž bylo získáno 40 hodnot pro každou koncentraci toxinu v potravě. K vyhodnocení mortality (křivky přežívání) byl použit program STATISTICA 6.0 for Windows (StatSoft Inc., Oklahoma, USA), dále pak program GraphPad Prism 4.0 (GraphPad Software INC., Kalifornie, USA).

5. Výsledky

5.1. *Spodoptera littoralis*

5.1.1. Hmotnosti larev na počátku experimentu

Pro ověření správnosti výběru experimentálního hmyzu do jednotlivých skupin (ZAL, MON a kontrola) byl proveden test dvoucestné analýzy variance (faktory: pohlaví a skupina) pro **hmotnosti larev na počátku experimentu**. Test (na 5% hladině významnosti) potvrdil, že se skupiny od sebe neliší ani v jednom z faktorů (**tab. 1 A**). Průměrné hmotnosti larev jednotlivých skupin jsou zaznamenány v **tab. 1 B**.

Tab. 1 A: Počáteční hmotnost larev *Spodoptera littoralis*

Dvoucestná analýza variance						
Linie	NRC		Citlivá (Egypt)		Citlivá (Francie)	
Skupina	F (2, 111) = 1,17	P = 0,32	F (2, 85) = 1,83	P = 0,17	F (2, 91) = 0,41	P = 0,66
Pohlaví	F (1, 111) = 4.10 ⁻³	P = 0,95	F (1, 85) = 2,24	P = 0,14	F (1, 91) = 0,09	P = 0,77
Interakce	F (2, 111) = 0,12	P = 0,88	F (2, 85) = 0,01	P = 0,99	F (2, 91) = 2,04	P = 0,14

Tab. 1 B: Průměrná počáteční hmotnost larev *Spodoptera littoralis* [mg]

Linie		NRC	Citlivá (Egypt)	Citlivá (Francie)
MON	♂	60,2 ± 3,9	60,2 ± 3,3	60,4 ± 3,4
	♀	60,7 ± 4,1	59,1 ± 3,0	60,0 ± 3,7
ZAL	♂	59,1 ± 3,5	58,5 ± 2,9	58,4 ± 3,2
	♀	59,3 ± 3,7	57,6 ± 2,8	60,5 ± 3,1
Kontrola	♂	59,4 ± 3,5	59,1 ± 3,4	60,5 ± 3,2
	♀	58,9 ± 3,1	58,1 ± 3,9	59,4 ± 3,0

Vysvětlivky:

MON - skupina na potravě s rekombinantním toxinem

ZAL - skupina na potravě s přírodním toxinem

♂ - samci

♀ - samice

5.1.2. Hmotnostní přírůstky

V testu dvoucestné analýzy variance se u **hmotnostního přírůstku** na 5% hladině významnosti projevily silný vliv pohlaví, proto byl následně užit Post Hoc test a porovnán rozdíl v konkrétních skupinách (**tab. 2**). Grafické znázornění výsledků je uvedeno v **Příloze (grafy 1 A, 1 B a 1 C)**.

Tab. 2: Hmotnostní přírůstek larev

Dvoucestná analýza variance, $\alpha = 0,05$			
Linie	NRC	Citlivá (Egypt)	Citlivá (Francie)
Skupina	F (2, 111) = 9,69 P = 1.10 ⁻⁴	F (2, 85) = 6,77 P = 2.10 ⁻³	F (2, 91) = 0,61 P = 0,54
Pohlaví	F (1, 111) = 36,33 P = 2.10 ⁻⁸	F (1, 85) = 6,70 P = 0,01	F (1, 91) = 20,68 P = 2.10 ⁻⁵
Interakce	F (2, 111) = 0,71 P = 0,49	F (2, 85) = 0,74 P = 0,48	F (2, 91) = 0,15 P = 0,86
Post Hoc - Unequal N HSD test			
MON vs. kontrola:			
♂	P = 0,05	P = 0,98	P = 1,00
♀	P = 0,19	P = 1,00	P = 0,92
ZAL vs. kontrola:			
♂	P = 0,97	P = 0,46	P = 0,99
♀	P = 0,96	P = 0,03	P = 0,97
MON vs. ZAL:			
♂	P = 0,27	P = 0,90	P = 1,00
♀	P = 0,03	P = 0,12	P = 1,00

Vysvětlivky:

MON - skupina na potravě s rekombinantním toxinem

♂ - samci

ZAL - skupina na potravě s přírodním toxinem

♀ - samice

- **Linie NRC:** MON samci vykazovali vyšší hmotnostní přírůstky ($987,7 \pm 113,6$ mg) než kontrolní skupina ($847,4 \pm 115,9$ mg), ale průkaznost statistického testu (**tab. 2**) je velmi slabá. O určitém, nicméně na 5 % hladině významnosti neprůkazném (**tab. 2**), rozdílu svědčí i výsledek u MON samic ($1\ 144,2 \pm 139,0$ mg) vs. kontrola ($1\ 042,8 \pm 172,7$ mg). Při vzájemném porovnání toxinových skupin se projevuje rozdíl pouze mezi samicemi, kdy

MON samice měly vyšší hmotnostní přírůstky oproti ZAL samicím ($1\ 003,7 \pm 169,8$), ale test (**tab. 2**) vychází opět velmi slabý.

- **Citlivá linie (Egypt):** ZAL samice nabývaly na hmotnosti méně ($722,1 \pm 216,6$ mg) než samice kontrolní skupiny ($867,2 \pm 77,7$ mg), ale průkaznost testu (**tab. 2**) je velmi slabá. Při vzájemném porovnání účinku toxinů nebyl prokázán žádný rozdíl, ačkoli výsledek statistického porovnání (**tab. 2**) poukazuje na velmi malou shodu mezi samicemi, přičemž MON samice měly přírůstky poměrně vyšší ($856,4 \pm 113,8$ mg) než samice ZAL skupiny.
- **Citlivá linie (Francie):** při porovnání hmotnostních přírůstků vychází mezi samicemi i samci jednotlivých skupin velmi vysoká shoda (**tab. 2**).

5.1.3. Hmotnost kukel

Pro **hmotnost kukel** vycházejí vysoce průkazné testy (**tab. 3**) v rozdílu pohlaví. Rozdíly v konkrétních skupinách byly zjišťovány pomocí Post Hoc testu.

Tab. 3: Hmotnost kukel

Dvoucestná analýza variance, $\alpha = 0,05$			
Linie	NRC	Citlivá (Egypt)	Citlivá (Francie)
Skupina	F (2, 111) = 3,37 P = 0,04	F (2, 80) = 4,07 P = 0,02	F (2, 91) = 0,61 P = 0,55
Pohlaví	F (1, 111) = 61,41 P = $2 \cdot 10^{-8}$	F (1, 80) = 15,75 P = $2 \cdot 10^{-4}$	F (1, 91) = 37,90 P = $2 \cdot 10^{-8}$
Interakce	F (2, 111) = 1,43 P = 0,24	F (2, 80) = 1,01 P = 0,37	F (2, 91) = 0,09 P = 0,91
Post Hoc – Unequal N HSD test			
MON vs. kontrola:			
♂	P = 0,40	P = 0,41	P = 1,00
♀	P = 0,70	P = 0,96	P = 1,00
ZAL vs. kontrola:			
♂	P = 0,70	P = 0,85	P = 1,00
♀	P = 0,96	P = 0,11	P = 0,93
MON vs. ZAL:			
♂	P = 1,00	P = 1,00	P = 1,00
♀	P = 0,24	P = 0,12	P = 0,99

Vysvětlivky:

MON – skupina na potravě s rekombinantním toxinem

ZAL – skupina na potravě s přírodním toxinem

♂ - samci

♀ - samice

Ačkoli výsledek dvoucestné analýzy variance pro faktor skupina je slabě průkazný, po vyhodnocení Unequal N HSD testu nebyl ani u jedné z linií zjištěn průkazný rozdíl při porovnání hmotnosti kukel mezi samci i samicemi. Menší shoda se projevila jen u **Citlivé linie (Egypt)**, kdy kukly ZAL samic vychází nepatrně lehčí ($306,5 \pm 57,2$ mg) než u samic kontroly ($345,8 \pm 39,9$ mg) a MON ($331,8 \pm 33,0$). Grafické znázornění výsledků je v **Příloze (grafy 2 A, 2 B a 2 C)**.

5.1.4. Délka 5. instaru

Z testu dvoucestné analýzy variance pro **délku 5. instaru** vyplývá rozdíl mezi pohlavími pouze pro Citlivou linii (Egypt) a NRC, i když oba testy jsou poměrně slabé (**tab. 4**). Současně u těchto skupin vychází i slabé, nicméně na 5 % hladině významnosti neprůkazné, testy pro interakci – viz. **Diskuze (6.1.2.)**. Grafické znázornění je uvedeno v **Příloze (grafy 3 A, 3 B a 3 C)**.

Tab. 4: Délka 5. instaru

Dvoucestná analýza variance, $\alpha = 0,05$			
Linie	NRC	Citlivá (Egypt)	Citlivá (Francie)
Skupina	F (2, 111) = 0,64 P = 0,53	F (2, 85) = 7,54 P = 1.10^{-3}	F (2, 91) = 1,35 P = 0,26
Pohlaví	F (1, 111) = 5,62 P = 0,02	F (1, 85) = 4,70 P = 0,03	F (1, 91) = 0,88 P = 0,35
Interakce	F (2, 111) = 2,59 P = 0,08	F (2, 85) = 2,75 P = 0,07	F (2, 91) = 0,70 P = 0,50
Post Hoc - Unequal HSD test			
MON vs. kontrola:			
♂	P = 0,42	P = 0,55	P = 0,71
♀	P = 0,94	P = 0,04	P = 0,98
ZAL vs. kontrola:			
♂	P = 0,35	P = 0,91	P = 0,52
♀	P = 0,99	P = 0,96	P = 1,00
MON vs. ZAL:			
♂	P = 1,00	P = 0,98	P = 1,00
♀	P = 1,00	P = 4.10^{-3}	P = 0,99

Vysvětlivky:

MON – skupina na potravě s rekombinantním toxinem

ZAL – skupina na potravě s přírodním toxinem

♂ - samci

♀ - samice

- **Linie NRC:** jednotlivé skupiny se v rámci pohlaví v délce 5. instaru neliší (**tab. 4**).
- **Citlivé linie (Egypt):** MON samice měly trvání 5. instaru kratší ($2,2 \pm 0,4$ dne) než samice z kontroly ($2,7 \pm 0,5$ dne) i ZAL ($2,8 \pm 0,4$ dne).
- **Citlivá linie (Francie):** jednotlivé skupiny vykazují v délce 5. instaru značnou shodu (**tab. 4**).

5.1.5. Délka 6. instaru

Nebyl zjištěn žádný průkazný rozdíl pro **délku 6. instaru** (**tab. 5**). Objevuje se zde však slabá interakce u **Citlivé linie (Egypt)** - viz. **Diskuze (6.1.2)**. Grafické znázornění výsledků je součástí **Přílohy (grafy 4 A, 4 B a 4 C)**.

Tab. 5: Délka 6. instaru

Dvoucestná analýza variance, $\alpha = 0,05$						
Linie	NRC		Citlivá (Egypt)		Citlivá (Francie)	
Skupina	F (2, 111) = 0,12	P = 0,88	F (2, 85) = 1,91	P = 0,15	F (2, 91) = 0,16	P = 0,85
Pohlaví	F (1, 111) = 1,59	P = 0,21	F (1, 85) = 0,16	P = 0,69	F (1, 91) = 1,75	P = 0,19
Interakce	F (2, 111) = 0,34	P = 0,71	F (2, 85) = 3,93	P = 0,02	F (2, 91) = 0,94	P = 0,39

5.1.6. Délka stádia předkukly

V **délce stádia předkukly** nebyl zjištěn žádný průkazný meziskupinový rozdíl u ani jedné z linií (**tab. 6**). Grafické znázornění je součástí **Přílohy (grafy 5 A, 5 B a 5 C)**.

Tab. 6: Délka stádia předkukly

Dvoucestná analýza variance, $\alpha = 0,05$						
Linie	NRC		Citlivá (Egypt)		Citlivá (Francie)	
Skupina	F (2, 111) = 1,79	P = 0,17	F (2, 80) = 1,16	P = 0,32	F (2, 91) = 1,53	P = 0,22
Pohlaví	F (1, 111) = 5,03	P = 0,03	F (1, 80) = 0,72	P = 0,40	F (1, 91) = 3,56	P = 0,06
Interakce	F (2, 111) = 1,39	P = 0,25	F (2, 80) = 0,84	P = 0,44	F (2, 91) = 0,02	P = 0,98

5.1.7. Délka stádia kukly

Z dvoucestné analýzy variance pro **délku stádia kukly** vychází vysoce průkazné rozdíly mezi pohlavími u všech linií (**tab. 7**). Slabé testy pro interakce u obou citlivých linií vypovídají o tom, že zde mohl vstupovat do hry další faktor – viz. **Diskuze (6.1.2.)**. Grafické znázornění je součástí **Přílohy (grafy 6 A, 6 B a 6 C)**.

Tab. 7: Délka stádia kukly

Dvoucestná analýza variance, $\alpha = 0,05$			
Linie	NRC	Citlivá (Egypt)	Citlivá (Francie)
Skupina	$F(2, 108) = 204$ $P < 1.10^{-14}$	$F(2, 77) = 1,88$ $P = 0,16$	$F(2, 81) = 3,41$ $P = 0,04$
Pohlaví	$F(1, 108) = 161$ $P < 1.10^{-14}$	$F(1, 77) = 90,40$ $P = 1.10^{-14}$	$F(1, 81) = 62,01$ $P = 1.10^{-11}$
Interakce	$F(2, 108) = 0,29$ $P = 0,75$	$F(2, 77) = 2,59$ $P = 0,08$	$F(2, 81) = 2,89$ $P = 0,06$
Post Hoc - Unequal HSD test			
MON vs. kontrola:			
♂	$P = 1.10^{-4}$	$P = 0,98$	$P = 0,92$
♀	$P = 1.10^{-4}$	$P = 0,40$	$P = 0,99$
ZAL vs. kontrola:			
♂	$P = 0,19$	$P = 0,86$	$P = 0,15$
♀	$P = 0,78$	$P = 0,98$	$P = 0,99$
MON vs. ZAL:			
♂	$P = 1.10^{-4}$	$P = 0,99$	$P = 8.10^{-3}$
♀	$P = 1.10^{-4}$	$P = 0,12$	$P = 1,00$

Vysvětlivky:

MON – skupina na potravě s rekombinantním toxinem

♂ - samci

ZAL – skupina na potravě s přírodním toxinem

♀ - samice

- **Linie NRC:** Post Hoc test ukazuje vysoce průkazné rozdíly pro skupinu MON v obou pohlavích. Stádium kukly bylo v průměru u MON samic delší ($9,7 \pm 0,4$ dne) než u samic kontrolních ($8,2 \pm 0,4$ dne) a ZAL ($8,1 \pm 0,2$ dne). Delší vývoj kukly oproti kontrolním samcům ($9,3 \pm 0,5$ dne) a samcům skupiny ZAL ($8,9 \pm 0,2$ dne) byl pozorován i u MON samců ($10,7 \pm 0,5$ dne).

- **Citlivá linie (Egypt):** jednotlivé skupiny mezi sebou dle pohlaví vykazují v délce stádia kukly značnou shodu (**tab. 7**) až na velmi slabý (na 5 % hladině významnosti neprůkazný) rozdíl mezi samicemi MON ($7,5 \pm 0,5$ dne) a ZAL ($8,0 \pm 0,7$ dne).
- **Citlivá linie (Francie):** ZAL samce charakterizovalo delší stádium předkukly ($9,3 \pm 0,9$ dne) než u MON samců ($8,5 \pm 0,5$ dne) a slabý, i když neprůkazný, rozdíl (**tab. 7**) byl zjištěn i při porovnání se samci z kontroly ($8,7 \pm 0,5$ dne).

5.1.8. Počet nakladených vajíček a vylíhnutých larev

Porovnáním **počtu nakladených vajíček** (KLAD) a **vylíhnutých larev** (LÍH) nebyl u sledovaných skupin prokázán žádný významnější rozdíl, toxinové a kontrolní skupiny naopak vykazují poměrně značnou shodu (**tab. 8**). Grafické znázornění je v **Příloze** – nakladená vajíčka (**grafy 7 A, 7 B a 7 C**), vylíhnuté larvy (**grafy 8 A, 8 B a 8 C**).

Tab. 8: Počet nakladených vajíček a vylíhnutých larev

Jednocestná analýza variance, $\alpha = 0,05$			
Linie	NRC	Citlivá (Egypt)	Citlivá (Francie)
KLAD	F (2, 44) = 0,29 P = 0,89	F (2, 26) = 0,69 P = 0,51	F (2, 47) = 0,69 P = 0,84
LÍH	F (2, 44) = 0,29 P = 0,95	F (2, 26) = 0,52 P = 0,60	F (2, 47) = 0,52 P = 0,95

Vysvětlivky:

KLAD – nakladená vajíčka

LÍH – vylíhnuté larvy

5.1.9. Využitelnost potravy (ECI)

Využitelnost potravy (ECI) vychází podle předpokladu menší u citlivých linií (**tab. 9**), které byly na umělé potravě méně vitální. Mezi toxinovými a kontrolními skupinami nebyl shledán žádný zásadní rozdíl kromě skupiny ZAL u **Citlivé linie (Egypt)**.

Tab. 9: ECI (Efficiency of Conversion of Ingested food) v %

Linie	NRC	Citlivá (Egypt)	Citlivá (Francie)
MON	36,5 ± 1,6	28,7 ± 0,9	22,2 ± 3,0
ZAL	31,8 ± 10,1	20,2 ± 3,8	23,2 ± 1,6
Kontrola	32,1 ± 7,5	28,2 ± 6,0	21,4 ± 2,5

Vysvětlivky:

MON - skupina na potravě s rekombinantním toxinem

ZAL - skupina na potravě s přírodním toxinem

5.1.10. Růstové křivky

Růstové křivky (viz. **Příloha**) potvrzují výsledky statistického testu pro hmotnostní přírůstky (**tab. 2**).

- **Linie NRC:** více nabývala na hmotnosti skupina MON, přičemž u samců je rozdíl více patrný než u samic (**Příloha - grafy 9, 10**).
- **Citlivá linie (Egypt):** méně nabývala na hmotnosti skupina ZAL, přičemž rozdíl se daleko výrazněji projevil u samic (**Příloha - grafy 11, 12**).
- **Citlivá linie (Francie):** růstové křivky u samic z jednotlivých testovaných skupin jsou obdobné (**Příloha - graf 13**). Totéž platí i pro samce (**Příloha - graf 14**).

5.1.11. Mortalita

5.1.11.1. *Mortalita larev*

Mortalita larev (**tab. 10**) byla dle očekávání vyšší u citlivých linií. Vysoký úhyn v kontrolních skupinách nasvědčuje tomu, že zřejmě nešlo o účinek toxinů.

Tab. 10: Mortalita do stádia kukly

Linie	NRC	Citlivá (Egypt)	Citlivá (Francie)
MON (n = 40)	0	13	6
ZAL (n = 40)	3	13	10
Kontrola (n = 40)	0	8	7

Vysvětlivky:

MON – skupina na potravě s rekombinantním toxinem

ZAL – skupina na potravě s přírodním toxinem

5.1.11.2. *Mortalita kukel*

O mortalitě kukel vypovídá **tab. 11** (jedná se o kukly, ze kterých nevyklétl žádný dospělec). I zde je patrný vyšší úhyn jedinců zejména u francouzské citlivé linie. Obdobná mortalita byla zaznamenána i u kontrolní skupiny, což vypovídá o marginálním účinku toxinů.

Tab. 11: Mortalita kukel

Linie	NRC	Citlivá (Egypt)	Citlivá (Francie)
MON (n = 40)	0	0	4
ZAL (n = 40)	3	1	1
Kontrola (n = 40)	0	2	5

Vysvětlivky:

MON – skupina na potravě s rekombinantním toxinem

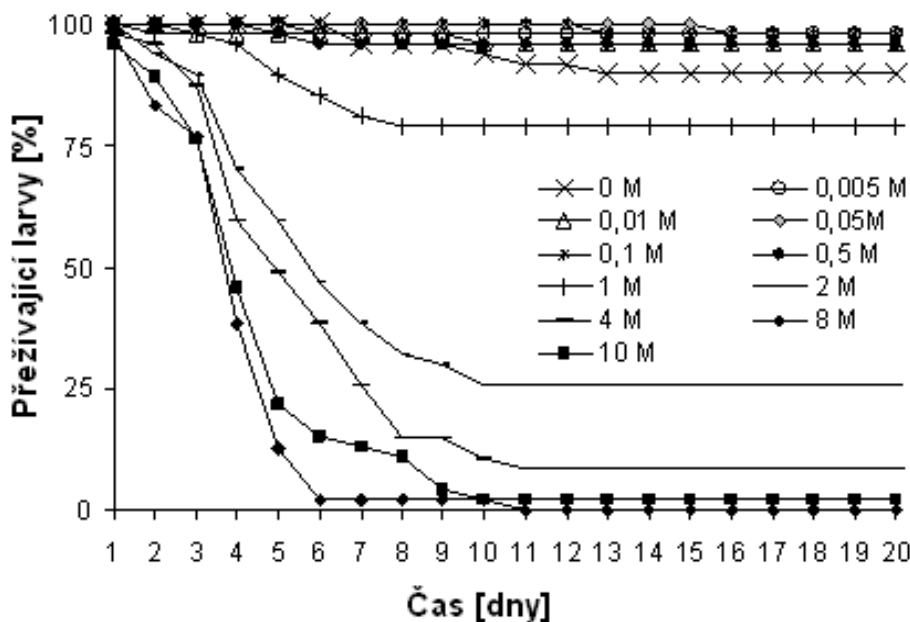
ZAL – skupina na potravě s přírodním toxinem

5.2. *Leptinotarsa decemlineata*

Obě varianty biotestu byly ukončeny 8. den od počátku experimentu a získaná data použita pro vyhodnocení LD₅₀ (Lethal Dose, 50 %).

5.2.1. Působení rekombinantního toxinu

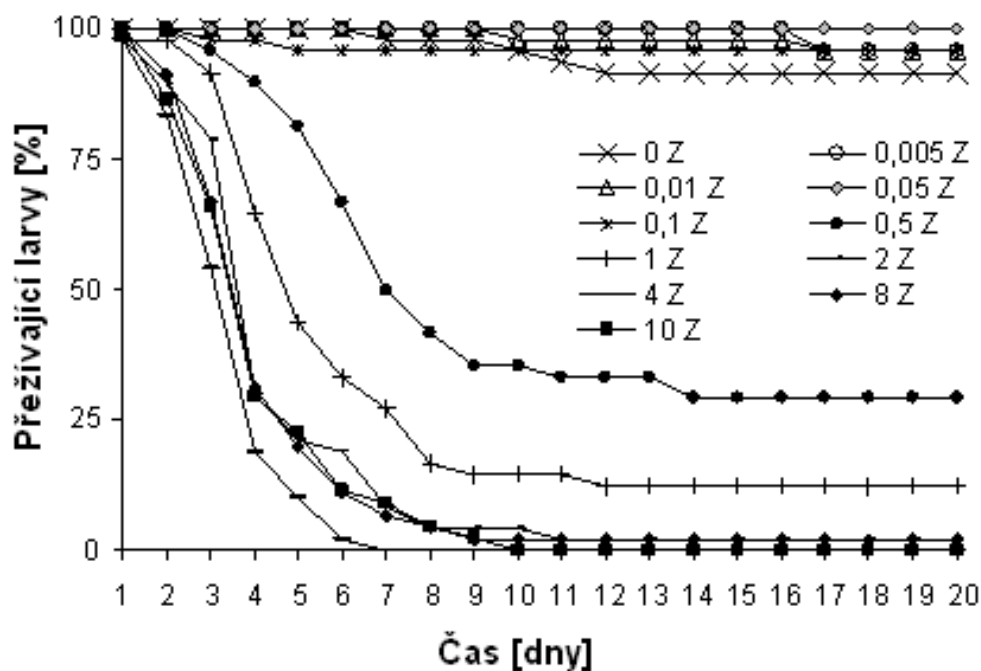
Jak ukazuje **graf A**, larvy na potravě s nižší koncentrací rekombinantního toxinu (MON) než 0,5 ppm dosáhly 8. dne obdobného 4 % maxima mortality, zatímco vyšší koncentrace toxinu ovlivnily přežívání larev daleko znatelněji. K hromadnému úhynu larev došlo 3. den a mortalita dosáhla k 8. dni 21 % u 1 ppm, 68 % u 2 ppm a více jak 85 % u vyšších toxinových koncentrací. LD₅₀ 8. dne bylo dosaženo při koncentraci toxinu 1,72 ppm (95% konfidenční interval: 1,45 - 2,01 ppm). Pro toto vyhodnocení byla vyloučena koncentrace 10 ppm, protože zjevně neodpovídala ostatním hodnotám.



Graf A: Mortalita larev *Leptinotarsa decemlineata* chovaných na umělé potravě s různými koncentracemi rekombinantního Cry3Aa toxinu

5.2.2. Působení přírodního toxinu

Larvy chované na potravě s přírodním toxinem (ZAL) byly ovlivněny již při nižších koncentracích a k hromadnému úhynu došlo o téměř jeden den dříve než u rekombinantního toxinu. Z dat v **grafu B** je zřejmé, že larvy měly do koncentrace 0,1 ppm k 8. dni obdobnou 4 % mortalitu. Při vyšších koncentracích toxinu v potravě však docházelo k znatelnějšímu úhynu, jenž dosáhl 58 % již u 0,5 ppm, 83 % u 1 ppm a více jak 95 % při koncentraci 2 ppm a vyšší. LD₅₀ pro 8. den byla stanovena na 0,51 ppm (95 % konfidenční interval: 0,43 - 0,60 ppm). Pro svou nesourodost byly z vyhodnocení vyloučeny koncentrace 4, 8 a 10 ppm.



Graf B: Mortalita larev *Leptinotarsa decemlineata* chovaných na umělé potravě s různými koncentracemi přírodního Cry3Aa toxinu.

6. Diskuze

6.1. Vliv rekombinantního (MON) a přírodního (ZAL) toxinu Cry3Aa na vývoj *Spodoptera littoralis*

O účincích Cry3Aa toxinu na necílové organismy je známo poměrně málo. Ze studie **Demla et al. (1999)** vyplývá, že přírodní forma tohoto toxinu měla škodlivé účinky na zástupce *Lepidoptera* (*Acherontia atropos*, *Manduca sexta*, *Autographa gamma*), a to zejména při podávání toxinu v umělé potravě, kdy došlo dokonce ke zvýšení mortality. Z výsledků téže studie vyplývá, že larvy starších instarů jsou k účinkům toxinu citlivější, což kontrastuje s prací **Kellera et al. (1996)**. V této bakalářské práci byly v experimentech použity čerstvé larvy 5. instaru *Spodoptera littoralis*, neboť množství přijaté potravy (tedy i toxinu) je u nich zdaleka nejvyšší. Předpokládali jsme, že případný účinek Cry3Aa toxinů (rekombinantního či přírodního) bude vzhledem k výše uvedenému faktu patrný právě v posledních instarech. Tělesné rozměry larev 5. a 6. instaru navíc eliminují riziko jejich poškození při manipulaci během experimentu.

Ve studovaných parametrech často vycházely signifikantní (na 5 % hladině významnosti) rozdíly mezi pohlavími, což koresponduje s výsledky **Bavaresca et al. (2004)**, který při pokusech s různými typy umělé potravy popsal výrazně kratší vývoj kukel samic příbuzného druhu *Spodoptera cosmioides* oproti samcům.

6.1.1. Vliv na hmotnostní přírůstek larev a hmotnost kukel

Při hodnocení hmotnostních přírůstků larev je nutno uvažovat s určitou nepřesností, která mohla znatelným způsobem ovlivnit výsledky. Maximální dosažená hmotnost larev byla totiž zaznamenávána pouze jednou denně. Důvodem této vědomé metodické nepřesnosti byla snaha co nejméně narušit potravní chování larev během manipulace a vážení. Individuální rozdíly v rychlosti příjmu potravy a přírůstcích hmotnosti tak mohly způsobit, že jednotlivé larvy dosáhly hmotnostního maxima až několik hodin po vážení. V porovnání s možnými důsledky opakované manipulace (např. změna typu a frekvence srdečního rytmu a dýchání a následné ovlivnění celkového metabolismu studovaného objektu (např. **Sláma (2003)**), však tyto chyby představují

„menší zlo“. Výsledky u linie NRC svědčí o možném vlivu rekombinantního toxinu, nicméně statistické testy vychází velmi slabě (**tab. 2**). Larvy této skupiny vykazovaly větší váhové přírůstky, což může být způsobeno tím, že změna složení potravy (přídavek toxinu) vyvolala odpověď v podobě úpravy spektra proteolytických enzymů středního střeva a odpovídající změnu efektivity trávení. S tím koresponduje i zvýšený příjem potravy, který byl u těchto larev zaznamenán, takže přítomnost toxinu mohla paradoxně jejich vitalitu zvyšovat. Změna spektra trávicích enzymů a množství přijaté potravy v důsledku její změněné kvality je u hmyzích škůdců řádů Lepidoptera a Coleoptera dobře známa. U mandelinky bramborové (*Leptinotarsa decemlineata*) ji podrobně studoval **Cloutier et al. (2000)**. U můry *Helicoverpa armigera* popsal změny v expresi trypsinových, chymotrypsinových a elastasových genů jako odpověď na různé typy potravy obsahující inhibitory proteáz **Gatehouse et al. (1997)**. Problematice vzniku rezistence hmyzu vůči Cry toxinům na bázi změny spektra trávicích enzymů jsou věnovány např. studie **Candase et al. (2003)** a **Huaronga et al. (2004)**. Přírůstky larev chovaných na potravě s přírodním toxinem (ZAL) byly takřka shodné s přírůstky larev kontrolních. U larev z citlivých linií byl obecný předpoklad, že se případný vliv kteréhokoli z toxinů projeví výrazněji, neboť jsou tyto linie vnímavější vůči jakýmkoliv změnám vnějších podmínek (tedy i ke složení podávané potravy). U Citlivé linie (Egypt) byl tentokrát zjištěn vliv přírodního toxinu (ZAL), a to pouze na hmotnostní přírůstek samic, kdy docházelo ke skutečnému hmotnostnímu úbytku. Statistický test (**tab. 2**) je ovšem opět velmi slabý a vzhledem k velké směrodatné odchylce u této skupiny ($722,1 \pm 216,6$ mg) je pravděpodobné, že hlavní příčinou zjištěného rozdílu je výše zmíněná a předem plánovaná metodická nepřesnost, spíše než vliv toxinu. K tomuto závěru přispívá i fakt, že u Citlivé linie (Francie) nebyl shledán žádný účinek u ani jednoho z toxinů.

Podobně mohly být ovlivněny i výsledky týkající se hmotnosti kukel. Zde je ovšem nedostatek částečně eliminován tím, že hmotnost kukel se na rozdíl od hmotnosti housenek příliš nemění (prakticky jde jen o úbytky důsledkem desikace). Jak je patrné ze statistického vyhodnocení (**tab. 3**), žádný účinek toxinů zde nebyl prokázán. Naproti tomu určitou redukcí hmotnosti kukel *Spodoptera littoralis* popisuje **Hussein et al. (2006)**, a to u jedinců chovaných na listech transgenních brambor (kultivar NewLeaf Superior) exprimujících toxin Cry3Aa.

6.1.2. Vliv na délku 5. a 6. instaru larev a délku stádia předkukly a kukly

Z výsledků vyhodnocení vlivu toxinů na délku 5. instaru larev (**tab. 4**) vychází poměrně slabý vliv jen pro rekombinantní toxin, a to pouze u samic z Citlivé linie (Egypt). U žádné z dalších dvou linií nebyl tento vliv ověřen, tudíž jde pravděpodobně o důsledek šetrnosti v zacházení s larvami podrobně rozebrané v předchozích odstavcích. V porovnání délek 6. instaru (**tab. 5**) a stádia prepupy (**tab. 6**) se neprojevil žádný účinek toxinů, nicméně u Citlivé linie (Egypt) zde dle statistického testu pro interakci (**tab. 5**) vstupuje do experimentu další faktor. O zřejmě totožném, nicméně na 5 % hladině významnosti neprůkazném, vlivu dalšího faktoru vypovídají i statistická vyhodnocení pro délku 5. instaru (**tab. 4**) - opět u Citlivé linie (Egypt) a tentokrát i linie NRC. Stejný problém se objevuje ve vyhodnocení délky stádia kukly (**tab. 7**) u obou citlivých linií (Egypt, Francie). Nekontrolovaným faktorem, jenž by mohl ovlivňovat experiment, může být např. vzdušná vlhkost, která může do jisté míry měnit kvalitu potravy (**Wheeler a Slansky, 1991**). Pro délku stádia kukly u linie NRC byl prokázán velmi silný vliv rekombinantního toxinu (MON), avšak tento účinek nebyl následně potvrzen u žádné z citlivých linií. Naopak u Citlivé linie (Egypt) prodlužoval vývoj kukly přírodní toxin (ZAL), ale pouze u samců.

6.1.3. Vliv na množství nakladených vajíček a množství vylíhnutých larev

U množství nakladených vajíček ani vylíhnutých larev nebyl sledán žádný vliv ani jednoho z toxinů, což kontrastuje s výsledky studie **Husseina et al. (2006)**, kdy při každém z trojího opakování bylo množství nakladených vajíček a vylíhnutých larev mýry *Spodoptera littoralis* značně redukováno.

6.1.4. Vliv na využitelnost potravy (ECI)

Výsledky pro využitelnost potravy (**tab. 9**) jsou pouze orientační a jejich výpovědní hodnota není příliš velká. Hlavním důvodem je malý počet sledovaných jedinců ($n = 5$). Určitý vliv je patrný u přírodního toxinu (ZAL), a to pouze u Citlivé linie (Egypt), což koresponduje s výsledky studie **Demla et al. (1999)**, který popsal významný účinek přírodního toxinu na snižování ECI. Pro větší reprezentativnost tohoto závěru je však nutné opakování pokusu s větším

množstvím jedinců. V práci **Husseina et al. (2006)** nebylo žádné ovlivnění využitelnosti potravy prokázáno.

6.1.5. Mortalita larev a kulek *Spodoptera littoralis* v průběhu experimentů

Zjištěná mortalita larev i kulek byla podle obecného předpokladu vyšší u citlivých skupin, které jsou náchylnější k vnějším podmínkám. Protože zároveň uhynulo poměrně značné množství larev a kulek z kontrolních skupin (**tab. 10, tab. 11**), což kontrastuje s prací **Demla et al. (1999)**, vše nasvědčuje tomu, že o účinek toxinů nešlo. Podle patologických změn pozorovaných u uhynulých jedinců bylo zřejmě hlavní příčinou úhynu virové onemocnění hmyzu, komplexně označované jako polyedróza, které v průběhu pokusu postihlo i laboratorní chovy.

6.2. Závěr

- Žádný z dílčích testů opakovaně nepotvrdil vliv ani jednoho z toxinů (přírodního či rekombinantního) na vývoj necílového hmyzu *Spodoptera littoralis*.
- Žádný z dílčích testů opakovaně nepotvrdil ani rozdíl mezi přírodním a rekombinantním toxinem na necílovém hmyzu *Spodoptera littoralis*.
- Předpoklad o významnějším projevu účinků *Bt*-toxinů u citlivých linií testovaného hmyzu se při testech nepotvrdil.

7. Použitá literatura

ADANG M. J., FIROOZABADY E., KLEIN J., DE BOER D., SEKAR V., KEMP J. D., MURRAY E. E., ROCHELEAU T. A., RASHKA K., STAFFELD G., STOCK C., SUTTON D., MERLO D. J. [1987]: Expression of a *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal protein gene in tobacco plants - v: VAŇKOVÁ J. [1990]: *Bacillus thuringiensis* - bakterijní insekticid - Academia, Praha, ČR, 120 pp.

BACILLUS THURINGIENSIS TOXIN NOMENCLATURE - full toxin list [Online] http://www.lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil_Crickmore/Bt/toxins2.html, 1. 4. 2008

BAVARESCO A., GARCIA M. S., GRUTZMACHER A. D., RINGENBERG R., FORESTI J. [2004]: Adaptation of an artificial diet for *Spodoptera cosmioides* (Walk.) (Lepidoptera : Noctuidae) laboratory rearing - Neotrop. Entomol. **33**: 155-161.

BEEGLE C. C., YAMAMOTO T. [1992]: History of *Bacillus thuringiensis* Berliner research and development - Can. Entomol. **124**: 587-616.

BERNHARD K., JARRETT P., MEADOWS M., BUTT J., ELLIS D. J., ROBERTS G. M., PAULI S., RODGERS P., BURGESS H. D. [1997]: Natural isolates of *Bacillus thuringiensis*: Worldwide distribution, characterization, and activity against insect pests - J. Invertebr. Pathol. **70**: 59-68.

BRADFORD M. M. [1976]: A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding - Anal. Biochem. **72**: 248-54.

BRAVO A. [1997]: Minireview - Phylogenetic relationships of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin family proteins and their functional domains - J. Bacteriol., **179**: 2793-2801

CANDAS M., LOSEVA O., OPPERT B., KOSARAJU P., BULLA L. A. JR. [2004]: Insect resistance to *Bacillus thuringiensis*: Alterations in the Indianmeal moth larval gut proteome - Mol. Cell. Proteomics **2**: 19-28

CHAUFAUX J., MARCHAL M., GILOIS N., JEHANNO I., BUISSON C. [1997]: Investigation of natural strains of *Bacillus thuringiensis* in different biotopes throughout the World - Can. J. Microbiol. **43**: 337-343.

CLOUTIER C., JEAN C., FOURNIER M., YELLE S., MICHAUD D. [2000]: Adult Colorado Potato Beetles, *Leptinotarsa decemlineata* Compensate for Nutritional Stress on Oryzacystatin I - Transgenic Potato Plants by Hypertrophic Behavior and Over-Production of Insensitive Proteases - Arch. Insect Biochem. Physiol. **44**: 69 - 81

CRICKMORE N., ZEIGLER D. R., FEITELSON J., SCHNEPF E., VAN RIE J., LERECLUS D., BAUM J., DEAN D. H. [1998]: Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins - Microbiol. Mol. Biol. R. **62**: 807-813.

DAMBORSKÝ J. [2006]: Proteinové inženýrství: od laboratorních testů k biotechnologiím - na stránkách Otevřené vědy - semináře [Online] <http://www.otevrena-veda.cz/ov/users/Image/default/C2Seminare/MultiObSem/106.pdf>, 22. 3. 2008

DE MAAGD R. A. [2002]: Environmental impact of insect-resistant crop plants expressing a *Bt* toxin. II. Non-target effects (updated) and *Bt*-resistance in target insects - Plant Research International B.V.- [Online] http://library.wur.nl/file/wurpubs/LUWPUBRD_00322140_A502_001.pdf, 4. 3. 2008

DEML R., MEISE T., DETTNER K. [1999]: Effect of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxins on food utilization, growth, and survival of selected phytophagous insects - J. Appl. Ent. **123**: 55-64

DROBNÍK J. [2006]: písemný referát na téma - Využití genetické modifikace v ochraně rostlin - Rostlinolékařské dny v Pardubicích 8. a 9. 11. 2006 [Online] http://www.biotrin.cz/czpages/act_b008.pdf, 1. 4. 2008

ELLIS S. E. [2005]: New Pest Response Guidelines: *Spodoptera* - [Online] http://www.aphis.usda.gov/import_export/plants/manuals/emergency/downloads/nprg_spodoptera.pdf, 3. 3. 2008

EPPO/CABI [1997]: *Spodoptera littoralis* and *Spodoptera litura* - v: SMITH I. M., MC NAMARA D. G., SCOTT P. R., HOLDERNESS M., eds. Quarantine pests for Europe, 2nd edition, Wallingford, UK: CAB International, 518-525.

ESCRICHE B., FERRÉ J., SILVA F. J. [1997]: Occurrence of a common binding site in *Mamestra brassicae*, *Phthorimaea operculella*, and *Spodoptera exigua* for the insecticidal crystal proteins CryIA from *Bacillus thuringiensis* - Insect Biochem. Mol. Biol. **27**: 651-656.

ESTRUCH J. J., WARREN G. W., MULLINS M. A., NYE G. J., CRAIG J. A., KOZIEL M. G. [1996]: Vip3A, a novel *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein with a wide spectrum of activities against lepidopteran insects - Proc . Natl. Acad. Sci. USA **93**: 5389-5394.

GATEHOUSE L. N., SHANNON A. L., BURGESS E. P. J. [1997]: Characterization of major midgut proteinase cDNAs from *Helicoverpa armigera* larvae and changes in gene expression in response to four proteinase inhibitors in diet - Insect Biochem. Mol. Biol. **27**: 929 - 944.

GROSSBLATT N. (edit.) [2000] - Committee on Genetically Modified Pest - Protected Plants, Board on Agriculture and Natural Resources, National Research Council - Genetically modified pest-protected plants: science and regulation, National Academy Press, Washington, D. C., 292 pp.

HILBECK A. [2001]: Implications of transgenic, insecticidal plants for insect and plant biodiversity - *Perspect. Plant Ecol.* **4**: 43-61.

HILBECK A., SCHMIDT J. E. U. [2006]: Another view on *Bt* proteins - How specific are they and what else might they do? - *Biopestic. Int.* **2**: 1-50.

HÖFTE H., WHITELEY H. R. [1989]: Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis* - *Microbiol. Mol. Biol. R.* **53**: 242-255.

HUARONG L., OPPERT B., HIGGINS R. A., HUANG F., ZHU K. Y., BUSCHMAN L. L. [2004]: Comparative analysis of proteinase activities of *Bacillus thuringiensis*-resistant and -susceptible *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera: Crambidae) - *Insect Biochem. Molec.* **34**: 753-762

HUSSEIN H. M., HABUŠTOVÁ O., TURANLI F., SEHNAL F. [2006]: Potato expressing beetle-specific *Bacillus thuringiensis* Cry3Aa toxin reduces performance of a moth - *J. Chem. Ecol.* **32**: 1-13

KAELIN P., MOREL P., GADANI F. [1994]: Isolation of *Bacillus thuringiensis* from stored tobacco and *Lasioderma serricorne* (F.) - *Appl. Environ. Microb.* **60**: 19-25.

KELLER M., SNEH B., STRIZHOV N., PRUDOVSKY E., REGEV A., KNOCZ C., SCHELL J., ZILBERSTEIN A. [1996]: Digestion of δ -endotoxins by gut proteases may explain reduced sensitivity of advanced instar larvae of *Spodoptera littoralis* to CryIC - *Insect Biochem. Molec.* **26**: 365-373

KOLLER C. N., BAUER L. S., HOLLINGWORTH R. M. [1992]: Characterization of the pH-mediated solubility of *Bacillus thuringiensis* var. *san diego* native delta-endotoxin crystals - *Biochem. Biophys. Res. Co.* **184**: 692-699.

LAMBERT B., PEFEROEN M. [1992]: Insecticidal Promise of *Bacillus thuringiensis* - *BioScience*, **42**: 112-122.

MARTIN P. A. W., TRAVERS R. S. [1989]: Worldwide abundance and distribution of *Bacillus thuringiensis* isolates - *Appl. Environ. Microb.* **55**: 2437-2442.

OBUKOWITZ M. G., PERLAK F. J., KUSANO-KRETZMER K., MAYER E. J., WATRUD L. S. [1986]: Integration of the delta-endotoxin gene of *Bacillus thuringiensis* into the chromosome of rootcolonizing strains of pseudomonas using Tn 5 - *Gene* **45**: 327-331.

OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development) [2007]: Environment, health and safety publications - Series on harmonisation of regulatory oversight in biotechnology - No. 42 (Consensus document on safety information on transgenic plants expressing *Bacillus thuringiensis* - derived insect control protein), Paris 2007 - [Online] <http://www.agbios.com/docroot/articles/07-214-001.pdf>, 15. 3. 2008

ONDŘEJ M., DROBNÍK J., GARTLAND K. M. A., GARTLAND J. S. [1999]: Genové inženýrství rostlin - VŠCHT, Praha, ČR, 122 pp.

PÁČES V. [2004]: Geneticky modifikované organismy: současnost a perspektivy – VŠCHT, Praha, ČR, 67 pp.

PETR J. [2003]: Geneticky modifikované rostliny – text k přednášce [Online] <http://www.osel.cz/soubory/kabinet/462/pc-franken.pdf>, 15. 3. 2008

PROTEIN KNOWLEDGEBASE - UniProtKB - [Online]<http://beta.uniprot.org/uniprot/P0A379>, 1. 3. 2008

REHCIGL J. E., REHCIGL N. A. [1998]: Biological and Biotechnological Control of insect pests – CRC Press, Boca Raton, USA, 374 pp.

SALAMA H. S., DIMETRY N. Z., SALEM S. A. [1970]: On the host preference and biology of the cotton leaf worm *Spodoptera littoralis* – Z. Angew. Entomol. **67**: 261-266.

SANVIDO O., STAR M., ROMEIS J., BIGLER F. [2006]: Ecological impact of genetically modified crops – Experience from ten years of experimental field research and commercial cultivation – [Online] http://www.services.art.admin.ch/pdf/ART_SR_01_E.pdf, 15. 3. 2008

SCHNEPF E., CRICKMORE N., VAN RIE J., LERECLUS D., BAUM J., FEITELSON J., ZEIGLER D. R., DEAN D. H. [1998]: *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins - Microbiol. Mol. Biol. R. **62**: 775-806

SHARMA H. C. [2005]: *Heliothis/Helicoverpa* Management: Emerging Trends and Strategies for Future Research, Oxford & IBH Publishing Co. Pvt. Ltd., New Delhi, India, 469 pp.

SLÁMA K. [2003]: Mechanical aspects of heartbeat reversal in pupae of *Manduca sexta* – J. Insect Physiol. **49**: 645 – 657.

SMITH R. A., COUCHE G. A. [1991]: The phylloplane as a source of *Bacillus thuringiensis* variants - App. Environ. Microb. **57**: 311-315.

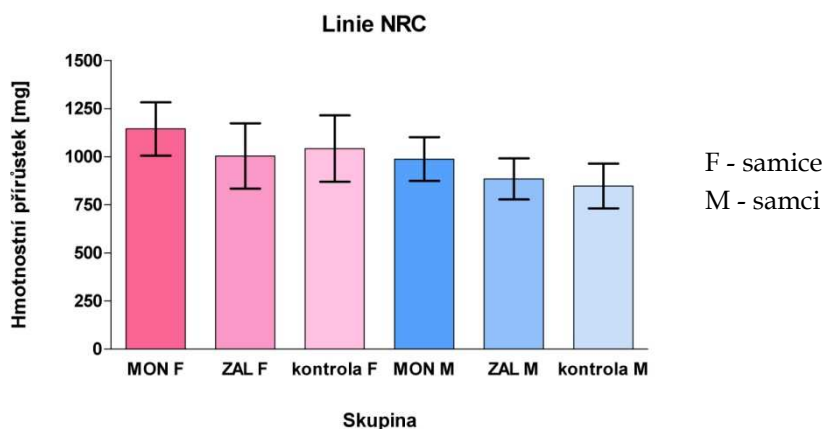
ŠIFNER F. A KOLEKTIV [1998]: Vybrané kapitoly z biotechnologií pro studující učitelství biologie a ekologické výchovy - Karolinum, Praha, ČR, 145 pp.

VAECK M., HÖFTE H., REYNAERTS A., LEEMANS J., MONTAGU M., ZABEAU M., [1987]: Engineering of insect resistant plants using a *Bacillus thuringiensis* gene – v: **VAŇKOVÁ J.** [1990]: *Bacillus thuringiensis* – bakterijní insekticid – Academia, Praha, ČR, 120 pp.

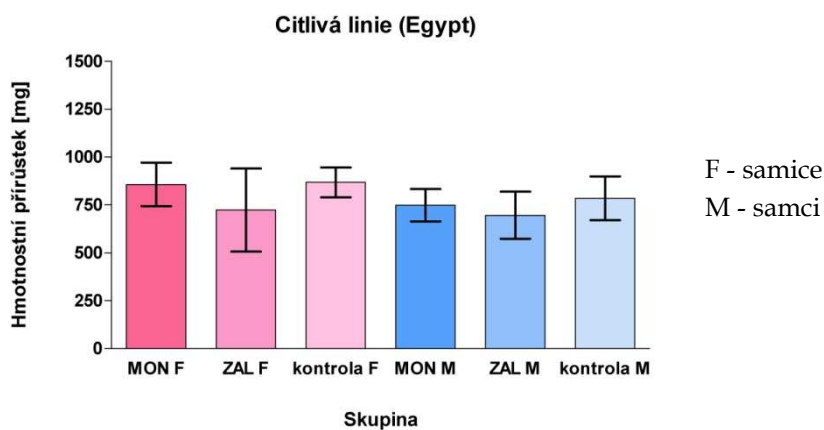
VAŇKOVÁ J. [1990]: *Bacillus thuringiensis* – bakterijní insekticid – Academia, Praha, ČR, 120 pp.

WHEELER G. S., F. SLANSKY [1991]: Compensatory responses of the fall armyworm (*Spodoptera frugiperda*) when fed water- and cellulose-diluted diets - Physiol. Entomol. **16**: 361-374

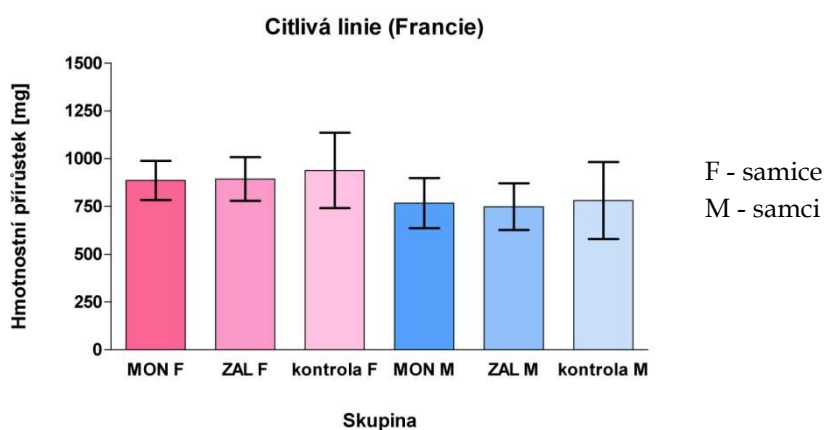
PŘÍLOHA



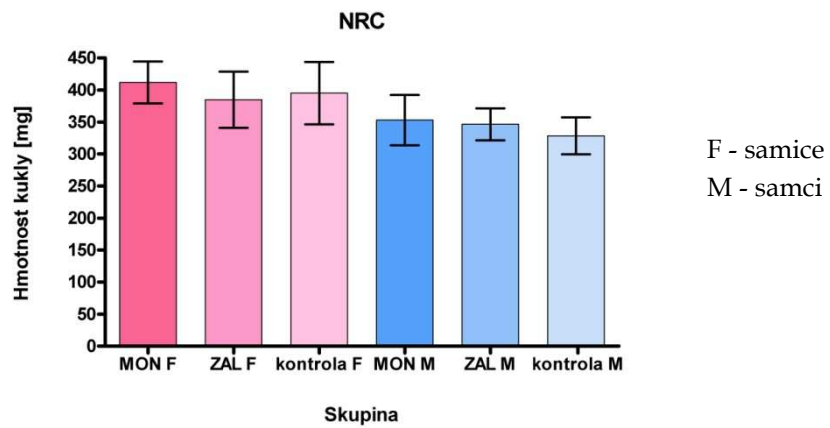
Graf 1 A: Vliv rekombinantního (MON) a přírodního (ZAL) toxinu Cry3Aa na hmotnostní přírůstek larev *Spodoptera littoralis* z linie NRC. Statisticky významné rozdíly jsou patrné pouze mezi samci (M) skupiny MON a kontroly, dále pak mezi samicemi (F) skupiny MON a ZAL.



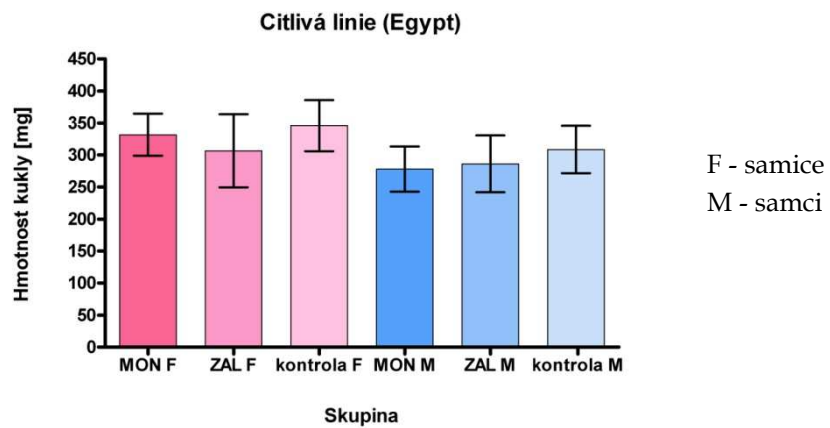
Graf 1 B: Vliv rekombinantního (MON) a přírodního (ZAL) toxinu Cry3Aa na hmotnostní přírůstek larev *Spodoptera littoralis* z Citlivé linie (Egypt). Statisticky významný rozdíl je patrný pouze mezi samicemi (F) skupiny ZAL a kontroly.



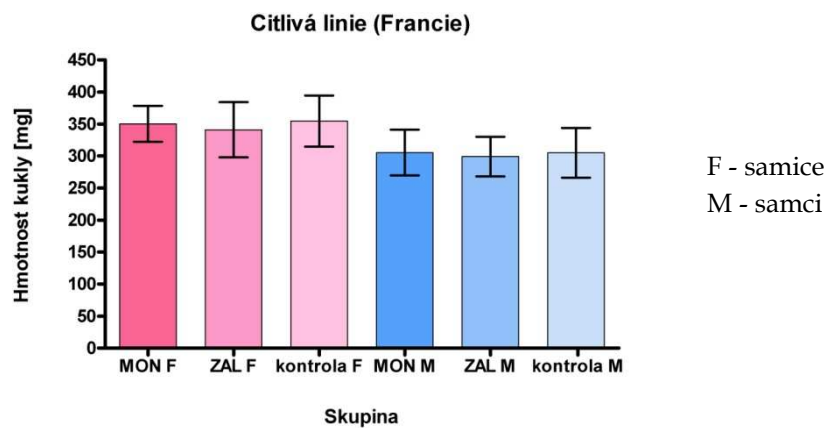
Graf 1 C: Vliv rekombinantního (MON) a přírodního (ZAL) toxinu Cry3Aa na hmotnostní přírůstek larev *Spodoptera littoralis* z Citlivé linie (Francie) - bez statisticky významného účinku.



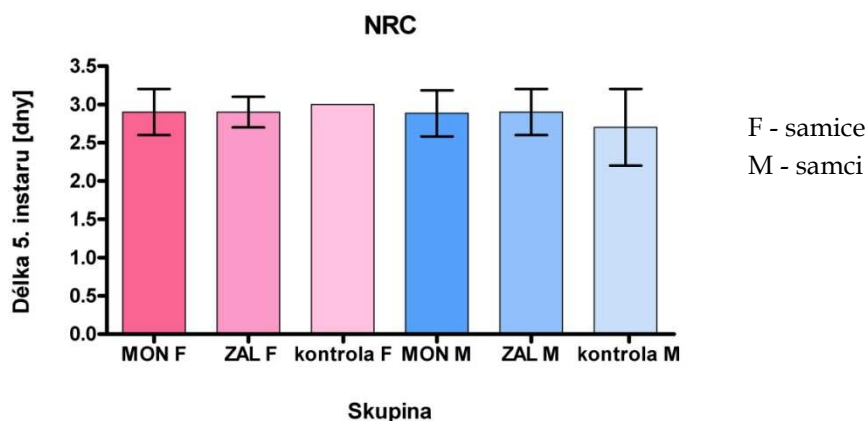
Graf 2 A: Vliv rekombinantního (MON) a přírodního (ZAL) toxinu Cry3Aa na hmotnost kukel *Spodoptera littoralis* z linie NRC - bez statisticky významného účinku.



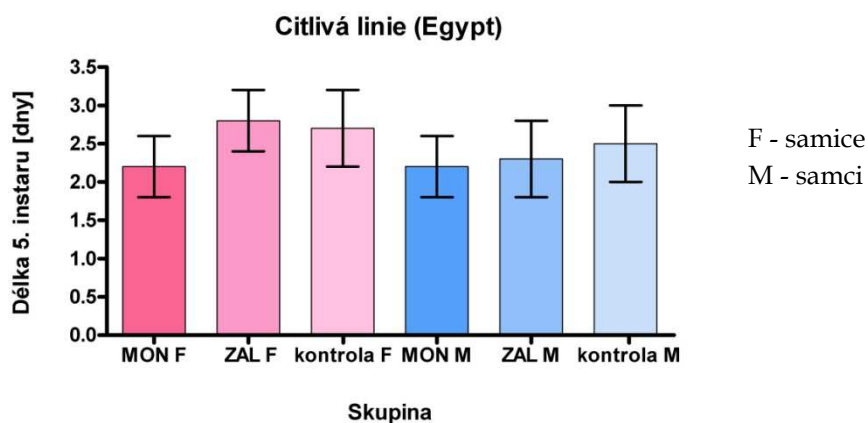
Graf 2 B: Vliv rekombinantního (MON) a přírodního (ZAL) toxinu Cry3Aa na hmotnost kukel *Spodoptera littoralis* z Citlivé linie (Egypt) - bez statisticky významného účinku.



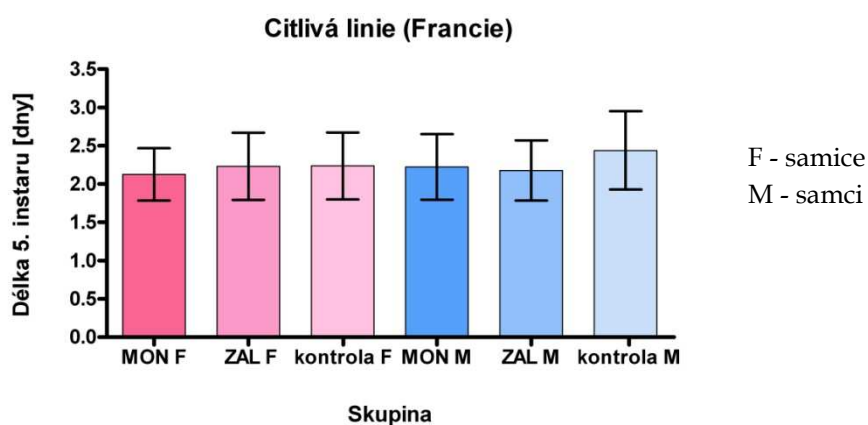
Graf 2 C: Vliv rekombinantního (MON) a přírodního (ZAL) toxinu Cry3Aa na hmotnost kukel *Spodoptera littoralis* z Citlivé linie (Francie) - bez statisticky významného účinku.



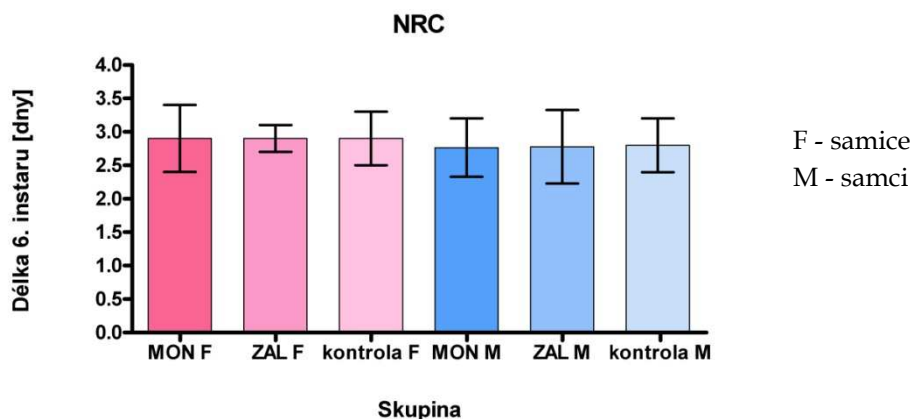
Graf 3 A: Vliv rekombinantního (MON) a přírodního (ZAL) toxinu Cry3Aa na délku 5. instaru larev *Spodoptera littoralis* z linie NRC - bez statisticky významného účinku.



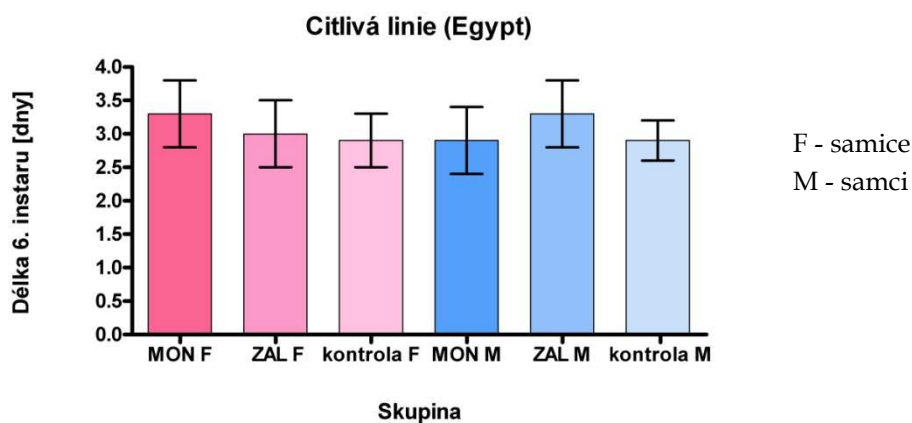
Graf 3 B: Vliv rekombinantního (MON) a přírodního (ZAL) toxinu Cry3Aa na délku 5. instaru larev *Spodoptera littoralis* z Citlivé linie (Egypt). Statisticky významný rozdíl je patrný pouze u samic (F) skupiny ZAL při porovnání s kontrolou i skupinou ZAL.



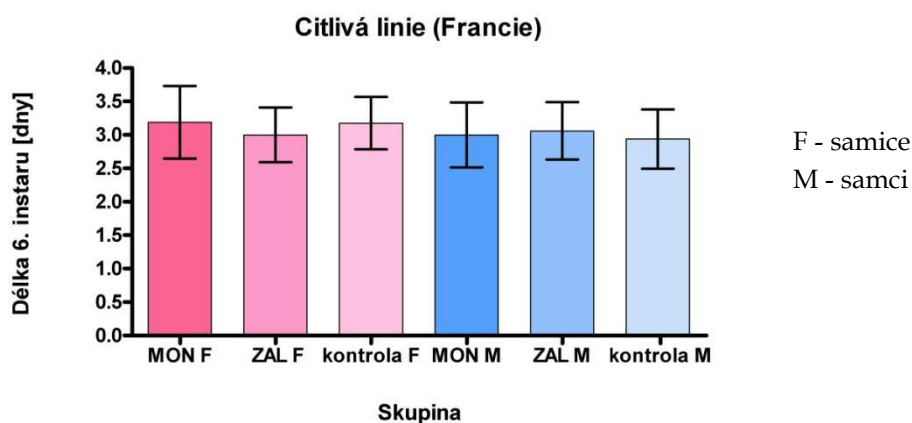
Graf 3 C: Vliv rekombinantního (MON) a přírodního (ZAL) toxinu Cry3Aa na délku 5. instaru larev *Spodoptera littoralis* z Citlivé linie (Francie) - bez statisticky významného účinku.



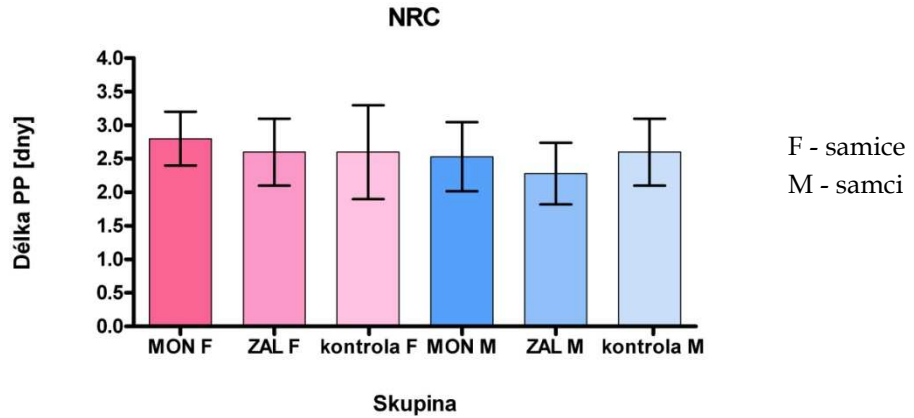
Graf 4 A: Vliv rekombinantního (MON) a přírodního (ZAL) toxinu Cry3Aa na délku 6. instaru larev *Spodoptera littoralis* z linie NRC - bez statisticky významného účinku.



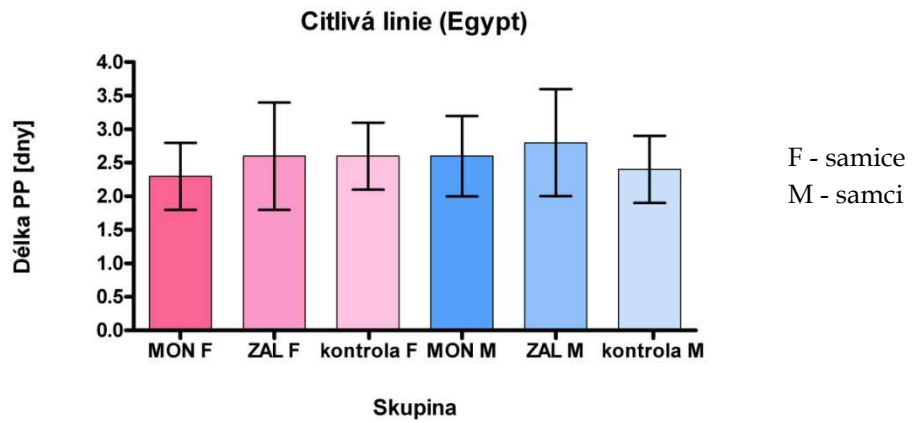
Graf 4 B: Vliv rekombinantního (MON) a přírodního (ZAL) toxinu Cry3Aa na délku 6. instaru larev *Spodoptera littoralis* z Citlivé linie (Egypt) - bez statisticky významného účinku.



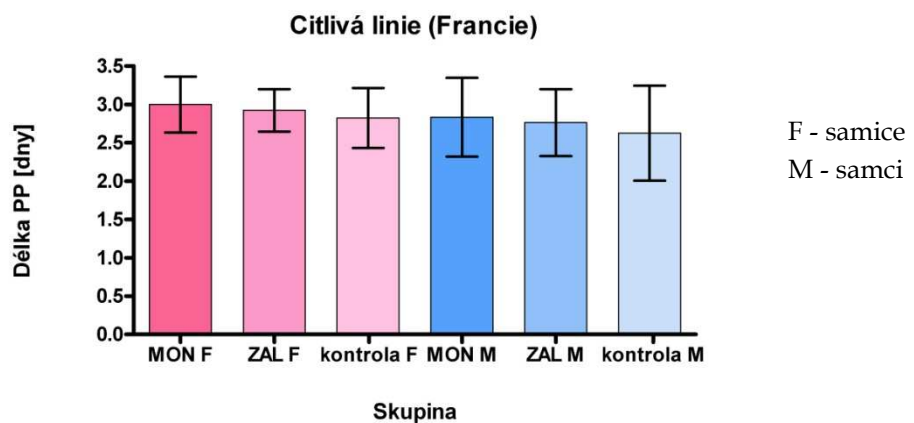
Graf 4 C: Vliv rekombinantního (MON) a přírodního (ZAL) toxinu Cry3Aa na délku 6. instaru larev *Spodoptera littoralis* z Citlivé linie (Francie) - bez statisticky významného účinku.



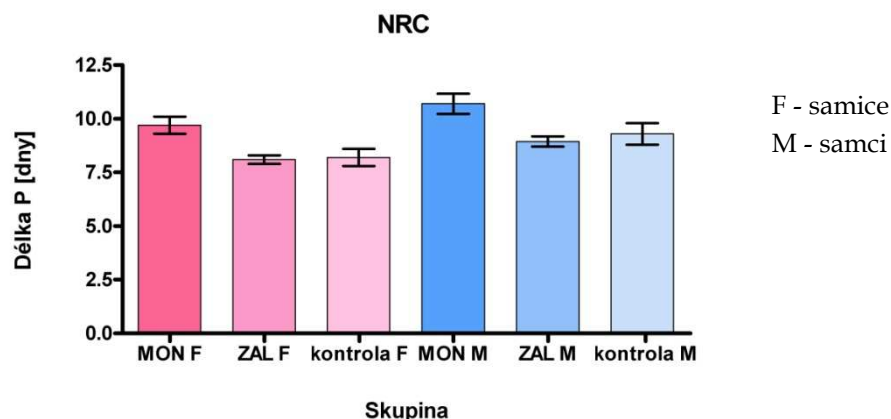
Graf 5 A: Vliv rekombinantního (MON) a přírodního (ZAL) toxinu Cry3Aa na délku stádia předkukly (PP) *Spodoptera littoralis* z linie NRC - bez statisticky významného účinku.



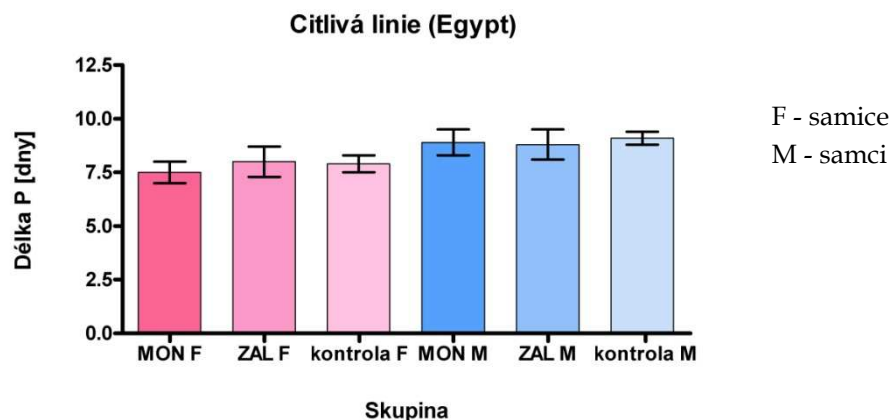
Graf 5 B: Vliv rekombinantního (MON) a přírodního (ZAL) toxinu Cry3Aa na délku stádia předkukly (PP) *Spodoptera littoralis* z Citlivé linie (Egypt) - bez statisticky významného účinku.



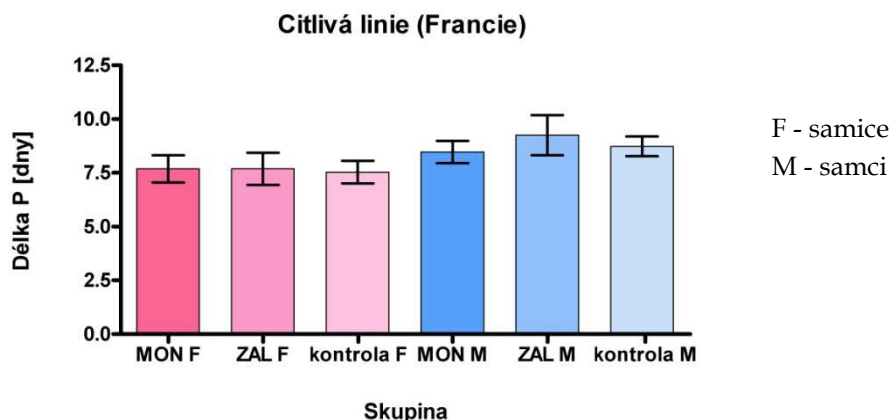
Graf 5 C: Vliv rekombinantního (MON) a přírodního (ZAL) toxinu Cry3Aa na délku stádia předkukly (PP) *Spodoptera littoralis* z Citlivé linie (Francie) - bez statisticky významného účinku.



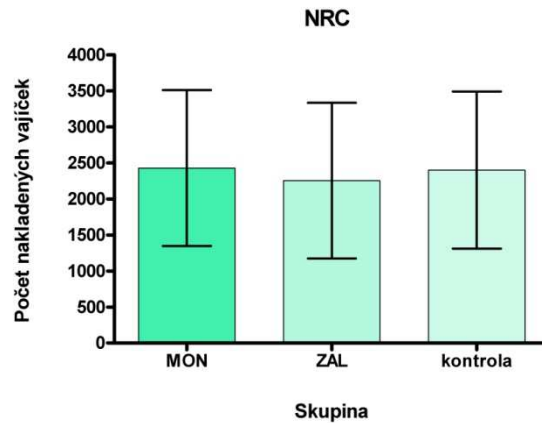
Graf 6 A: Vliv rekombinantního (MON) a přírodního (ZAL) toxinu Cry3Aa na délku stádia kukly (P) *Spodoptera littoralis* z linie NRC. Statisticky významný rozdíl je patrný u obou pohlaví skupiny MON při porovnání skontrolou i skupinou ZAL.



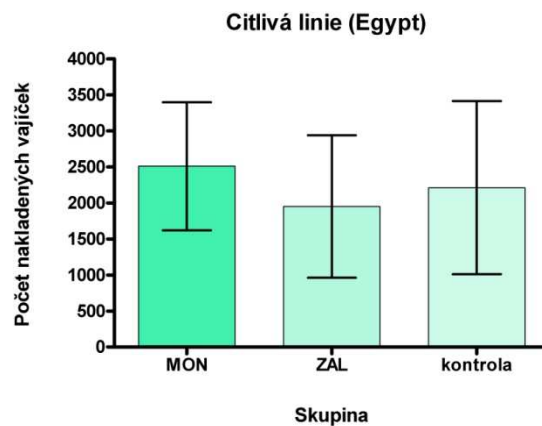
Graf 6 B: Vliv rekombinantního (MON) a přírodního (ZAL) toxinu Cry3Aa na délku stádia kukly (P) *Spodoptera littoralis* z Citlivé linie (Egypt) - bez statisticky významného účinku.



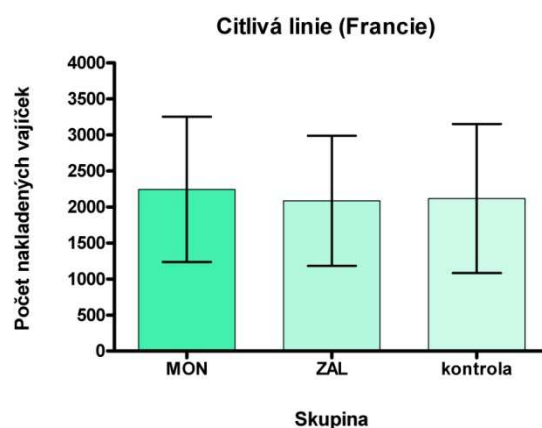
Graf 6 C: Vliv rekombinantního (MON) a přírodního (ZAL) toxinu Cry3Aa na délku stádia předkukly (PP) *Spodoptera littoralis* z Citlivé linie (Francie). Statisticky významný rozdíl je patrný pouze mezi samci (M) skupiny ZAL a MON.



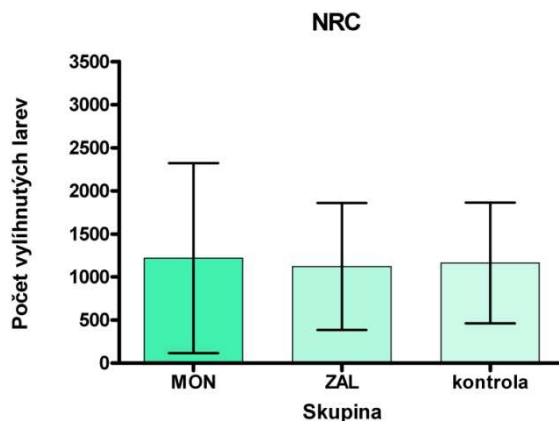
Graf 7 A: Vliv rekombinantního (MON) a přírodního (ZAL) toxinu Cry3Aa na počet nakladených vajíček *Spodoptera littoralis* z linie NRC - bez statisticky významného účinku.



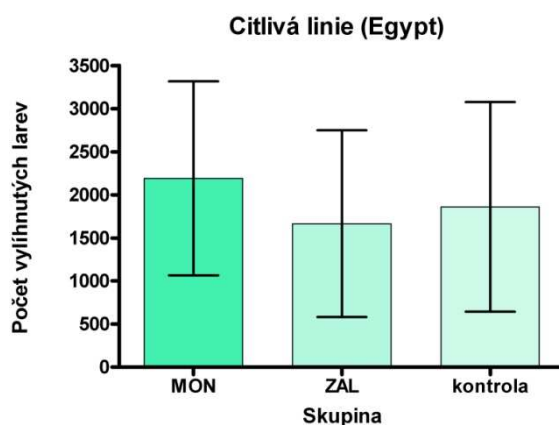
Graf 7 B: Vliv rekombinantního (MON) a přírodního (ZAL) toxinu Cry3Aa na počet nakladených vajíček *Spodoptera littoralis* z Citlivé linie (Egypt) - bez statisticky významného účinku.



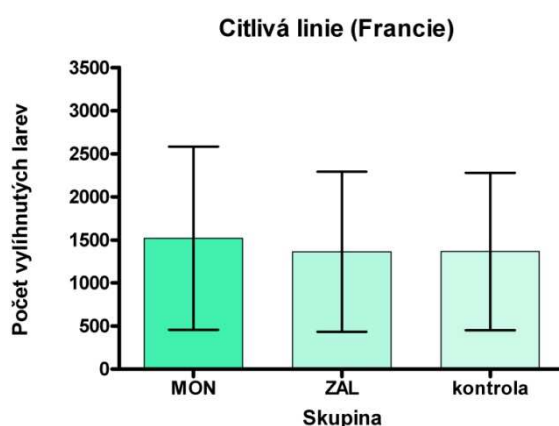
Graf 7 C: Vliv rekombinantního (MON) a přírodního toxinu (ZAL) Cry3Aa na počet nakladených vajíček *Spodoptera littoralis* z Citlivé linie (Francie) - bez statisticky významného účinku.



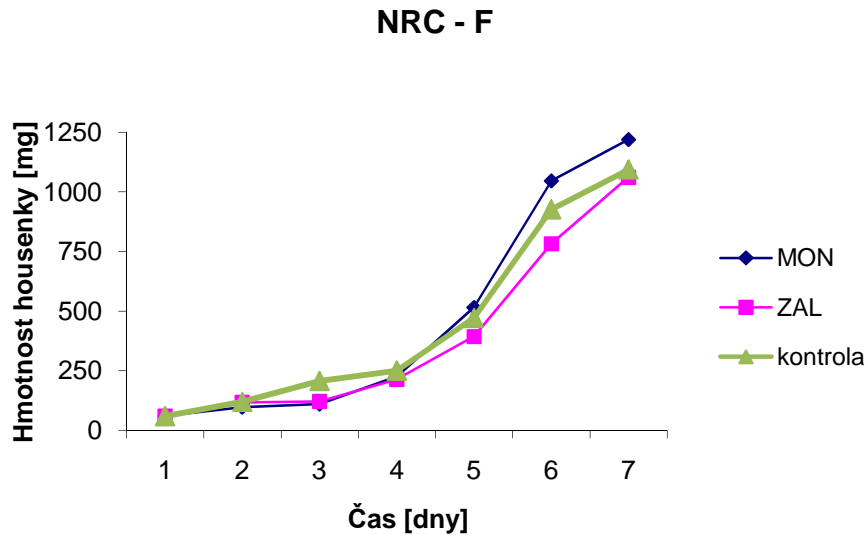
Graf 8 A: Vliv rekombinantního (MON) a přírodního (ZAL) toxinu Cry3Aa na počet vyvíhnutých larev *Spodoptera littoralis* z linie NRC - bez statisticky významného účinku.



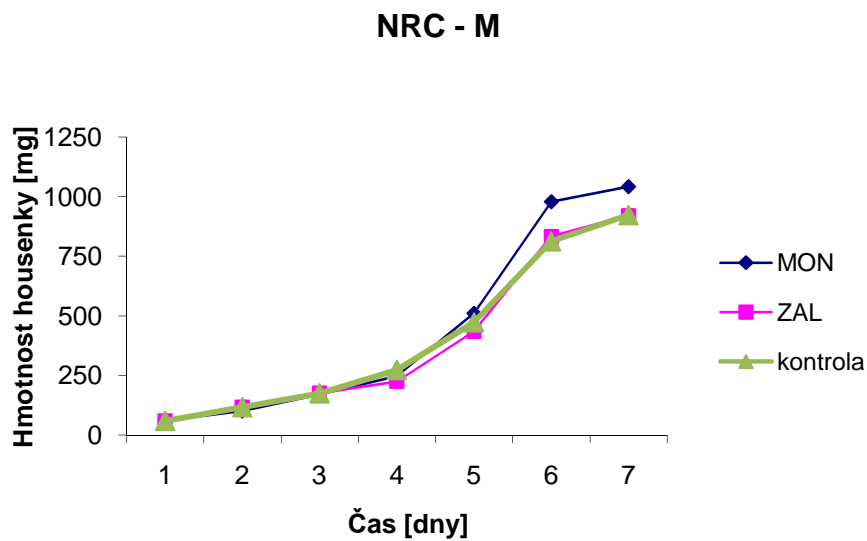
Graf 8 B: Vliv rekombinantního (MON) a přírodního (ZAL) toxinu Cry3Aa na počet vyvíhnutých larev *Spodoptera littoralis* z Citlivé linie (Egypt) - bez statisticky významného účinku.



Graf 8 C: Vliv rekombinantního (MON) a přírodního (ZAL) toxinu Cry3Aa na počet vyvíhnutých larev *Spodoptera littoralis* z Citlivé linie (Francie) - bez statisticky významného účinku.

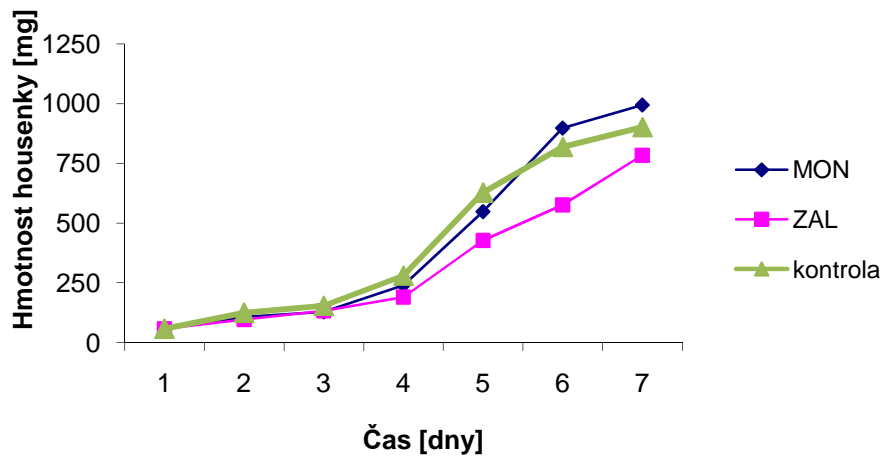


Graf 9: Vliv rekombinantního (MON) a přírodního (ZAL) toxinu Cry3Aa na vývoj larev (samic - F) *Spodoptera littoralis* z linie NRC - růstová křivka. Nejvyšší hmotnostní přírůstky jsou patrné u samic ze skupiny MON.



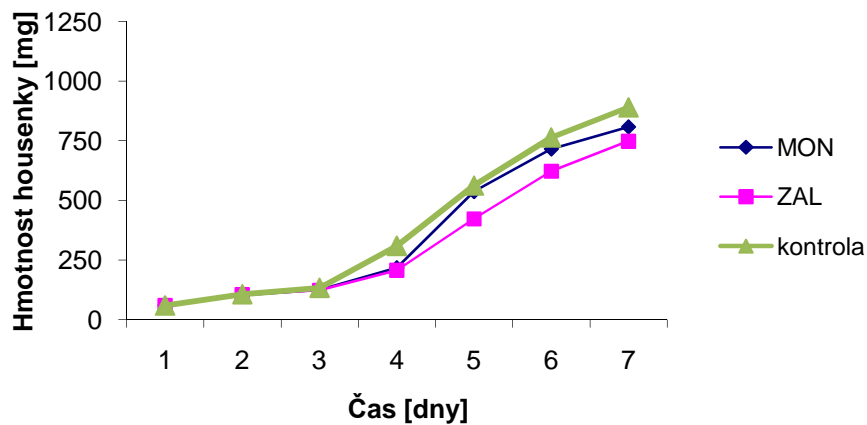
Graf 10: Vliv rekombinantního (MON) a přírodního (ZAL) toxinu Cry3Aa na vývoj larev (samců - M) *Spodoptera littoralis* z linie NRC - růstová křivka. Nejvyšší hmotnostní přírůstky jsou patrné u samců ze skupiny MON.

Citlivá linie (Egypt) - F



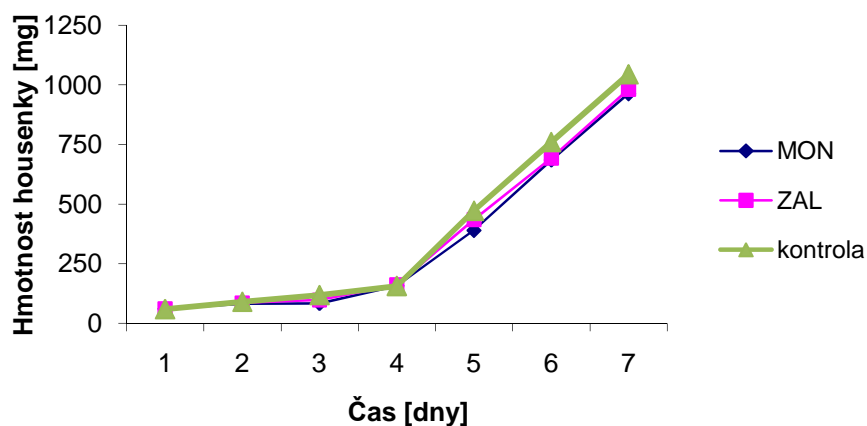
Graf 11: Vliv rekombinantního (MON) a přírodního (ZAL) toxinu Cry3Aa na vývoj larev (samic - F) *Spodoptera littoralis* z Citlivé linie (Egypt) - růstová křivka. Nejnižší hmotnostní přírůstky jsou patrné u samic ze skupiny ZAL.

Citlivá linie (Egypt) - M



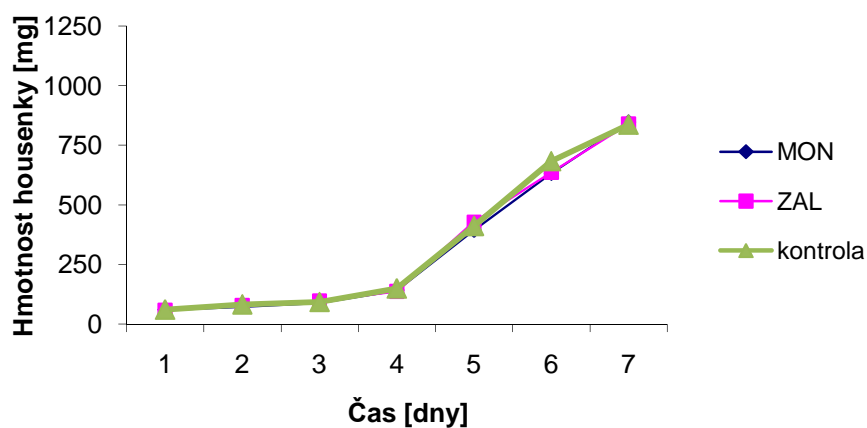
Graf 12: Vliv rekombinantního (MON) a přírodního (ZAL) toxinu Cry3Aa na vývoj larev (samců - M) *Spodoptera littoralis* z Citlivé linie (Egypt) - růstová křivka. Nejnižší hmotnostní přírůstky jsou patrné u samců ze skupiny ZAL.

Citlivá linie (Francie) - F



Graf 13: Vliv rekombinantního (MON) a přírodního toxinu (ZAL) Cry3Aa na vývoj larev (samic - F) *Spodoptera littoralis* z Citlivé linie (Francie) - růstová křivka. Je patrné, že hmotnostní přírůstky jsou u sledovaných skupin téměř rovnocenné.

Citlivá linie (Francie) - M



Graf 14: Vliv rekombinantního (MON) a přírodního toxinu (ZAL) Cry3Aa na vývoj larev (samců - M) *Spodoptera littoralis* z Citlivé linie (Francie) - růstová křivka. Je patrné, že hmotnostní přírůstky jsou u sledovaných skupin téměř rovnocenné.



Obr. A: Larva *S. littoralis* umístěná v Petriho misce s umělou potravou



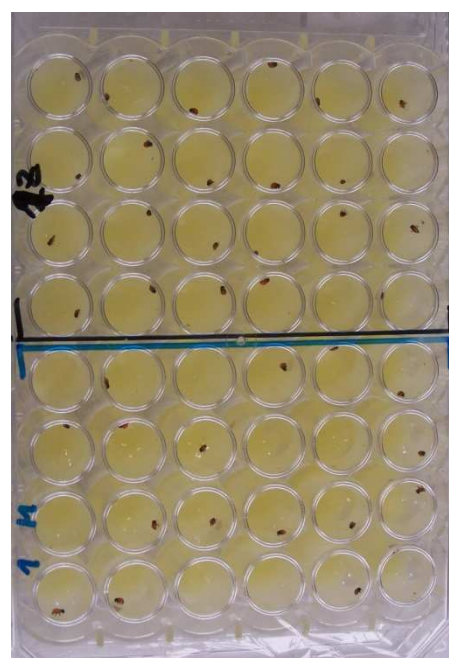
Obr. B: Plastové kelímky naplněné směsí pilin a zeminy



Obr. D: Dospělci *S. littoralis* chovaní v papírových válcích



Obr. C: Plastový kelímek uvnitř s kuklou *S. littoralis*, uzavřený hedvábným vláknem



Obr. E: Larvy *L. decemlineata* umístěné v jamkách titrační destičky s umělou potravou