

**Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta**



© Bernard Fransen

Bakalářská diplomová práce

*Vývoj *Spodoptera littoralis* (Boisduval)*
na geneticky modifikovaném bramboru
exprimujícím bakteriální toxin Cry3Aa

Zdeňka Svobodová

Vedoucí práce: Ing. Oxana Habuřtová Ph.D.

České Budějovice 2008

Bakalářská diplomová práce

Svobodová Z. (2008): Vývoj *Spodoptera littoralis* (Boisduval) na geneticky modifikovaném bramboru exprimujícím bakteriální toxin Cry3Aa [The development of *Spodoptera littoralis* (Boisduval) on the genetically modified potatoe expressing bacterial toxin Cry3Aa; Bc. Thesis, Czech Republic). Faculty of Science, The University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Anotace:

Spodoptera littoralis (Boisd.) larvae were fed potato leaves of the variety Newleaf Superior (NLS) that expresses *Bacillus thuringiensis* toxin Cry3Aa and is therefore resistant to the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata* (Say). The leaf content of Cry3Aa was determined by ELISA. Control larvae received leaves of the nearly isogenic but nontransgenic potato variety Superior. The developmental rate, mortality, weight of prepupa or pupa, female fecundity, and the egg hatchability of *S. littoralis* were independent of the potato type. The results suggest that Cry 3Aa toxin in the potatoe leaves has no negative effect on the development of caterpillars that consume them.

Housenky *Spodoptera littoralis* (Boisd.) byly krmeny listy dvou téměř izogenních kultivarů brambor, Superior a Newleaf Superior (NLS). Kultivar NLS je však geneticky modifikován a exprimuje toxin Cry3Aa, který pochází z *Bacillus thuringiensis* a chrání brambor proti mandelince bramborové, *Leptinotarsa decemlineata* (Say). Obsah toxinu v rostlinách byl sledován pomocí metody ELISA. Rychlost vývoje, úmrtnost, váhový růst, plodnost samiček a líhivost vajíček nebyly u *S. littoralis* ovlivněny kultivarem. Z výsledků vyplývá, že přítomnost toxinu Cry3Aa v listech brambor nemá negativní vliv na vývoj housenek, které se jimi živí.

Tato práce byla financována z grantu GA ČR 522/06/1591.

Prohlašuji, že jsem předloženou práci vypracovala samostatně, s použitím vlastních dat a citované literatury.

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 jejích internetových stránkách.

V Českých Budějovicích 15.4. 2008

.....

Poděkování:

Chtěla bych poděkovat Oxaně Habuštové za vstřícnost, ochotu a vytvoření příjemné atmosféry při práci. Mé díky patří i ostatním pracovníkům oddělení ekofyziologie za optimismus a pomoc při práci. Děkuji také prof. F. Sehnalovi za cenné rady při sestavení bakalářské práce a mé rodině za trpělivost a podporu při studiu.

Obsah:

1. Úvod	1
2. Literární přehled	3
2.1. <i>Bacillus thuringiensis</i> a genetické manipulace	3
2.2. Toxicita Bt	4
2.3. Cry proteiny s 3 doménami a jejich specifita	5
2.4. Rezistence na Bt toxiny	7
2.5. Charakteristika druhu <i>Spodoptera littoralis</i> (Boisd.)	8
3. Metodika	10
3.1. Charakteristika použitých linií	10
3.2. Pěstování brambor	11
3.3. Podmínky chovu larev	11
3.4. Podmínky pro předkukly a kukly	12
3.5. Chov dospělců	12
3.6. Stanovení obsahu Cry3Aa endotoxinu v listech bramboru	13
3.7. Statistické zpracování	14
4. Výsledky	15
4.1. Linie SE	15
4.2. Linie SF	17
4.3. Linie SN	19
4.4. Linie NC	20
4.5. Linie NR	22
5. Diskuze	24
6. Použitá literatura	27

1. Úvod

Prudký rozvoj molekulární biologie a genového inženýrství v posledních třech dekádách přinesl mimo jiné i možnost genetických úprav rostlin a živočichů. Genetickou modifikací se rozumí technologie, která manipuluje s geny. Jedná se o cílenou změnu genetického materiálu (vnesení nebo „umlčení“ genu či genů). Mohou tak vzniknout rekombinované genomy, které by běžnými šlechtitelskými postupy vzniknout nemohly. Transgen je do rostlinného genomu vnesen buď přímou transformací, nebo použitím vektoru (hlavně bakterie *Agrobacterium tumefaciens*). Takto pozměněné živé organizmy pak označujeme geneticky modifikovanými (dále GMO).

Vývoj transgenních organismů je významný hlavně pro zemědělství. Užitím GMO v zemědělství se zmenšují náklady na pesticidy a herbicidy i jejich rezidua v potravě a životním prostředí. GMO ale také představují určitá rizika, např. hromadění produktu transgenu v prostředí nebo nekontrolované šíření transgenu (zejména pylem). Proto podléhá používání GMO schvalovacímu řízení. V ČR se genetickými manipulacemi a následnými úkony v této oblasti zabývá zákon č. 78/2004 Sb. „O nakládání s geneticky modifikovanými organismy a genetickými produkty“, ve znění následného zákona 346/2005 Sb. Zákon vychází po vzoru EU z principu předběžné opatrnosti. Celkově EU přistupuje ke GMO mnohem konzervativněji než jiné země a omezuje i dovoz a použití GM produktů. V důsledku mezinárodní kritiky a zejména velkých rozdílů mezi státy EU nyní Evropská komise prosazuje pouze rámcová pravidla pro koexistenci GMO a „neGMO“ plodin.

Vývoj a využití GM plodin rozvířilo veřejnou debatu daleko větších rozměrů než kterýkoliv jiný vědecký objev současnosti. Práce v této oblasti jsou ostře sledovány a vědecké výsledky bývají zjednodušovány a někdy i zneužity. Předložená bakalářská práce je příspěvkem k poznání vlivu GM plodin na necílové organizmy. Ukazuje, že přítomnost toxinu Cry3Aa, který brambor chrání proti mandelince bramborové, *Leptinotarsa decemlineata* (Say), nemá vliv na můru *Spodoptera littoralis* (Boisd.).

Cíl práce

- Provéřit, zda exprese toxinu Cry 3Aa v listech geneticky modifikovaných brambor (kultivar Newleaf Superior) může negativně ovlivnit vývoj necílového druhu *Spodoptera littoralis* (Boisd.).

Stanovení hypotézy

- Toxin Cry3Aa specificky působí na mandelinku bramborovou, *Leptinotarsa decemlineata* (Say). Celá skupina toxinů typu Cry3 je popsána jako specificky působící na řád Coleoptera. To naznačuje, že by brambor exprimující tento toxin neměl mít vliv na druh *Spodoptera littoralis* (Boisd.) z řádu Lepidoptera. Nelze ovšem vyloučit, že transgen či jeho produkt ovlivní expresi endogenních genů a změny ve fyziologii rostliny pak ovlivní herbivory. Vstupní hypotézou této práce je předpoklad, že lze očekávat malé změny v performanci herbivorů jakým je *S. littoralis*.

2. Literární přehled

2.1. *Bacillus thuringiensis* a genetické manipulace

říše: *Eubacteria*
kmen: *Firmicutes*
třída: *Bacilli*
řád: *Bacillales*
čeleď: *Bacillaceae*

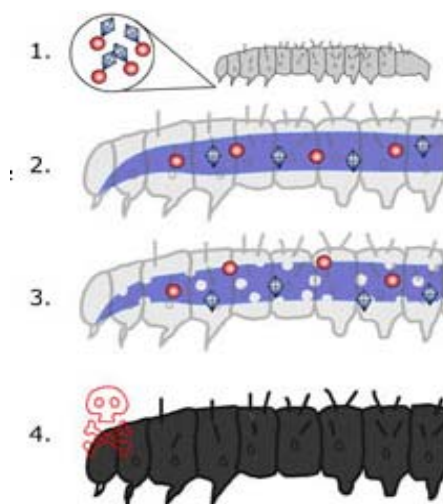
Bacillus thuringiensis, grampozitivní půdní bakterie, je dnes známá spíše jako Bt. Jedná se o sporulující mikroorganismus, který produkuje chemické látky toxické pro hmyz. Vyskytuje se prakticky po celém světě včetně tundry či pouště. Bt-toxiny objevil japonský vědec Shigatene Ishiwatary poté, co v roce 1901 začaly masově hynout chovy housenek bource morušového (*Bombyx mori*, L.), které požíraly spolu s morušovým listím i toxické spory této bakterie. Japonec pojmenoval bakterii *Bacillus sotto* (sotto je pojem pro náhlý kolaps). Zvířata chovaná v blízkosti ani lidé netrpěli žádnými zdravotními potížemi. V roce 1911 izoloval Němec Ernst Berlinek bakterii, která zabíjela larvy potěmníka (*Tenebrio molitor* L.). Pojmenoval ji *Bacillus thuringiensis* podle oblasti objevu, i když se ukázalo, že jde o stejnou bakterii, jaká byla popsána z Japonska. Později bylo zjištěno, že Bt produkuje několik typů toxinů účinných na hmyz, případně háďátka. Nejvýznamnější jsou bílkovinné toxiny, které vytvářejí krystaly uvnitř spor – proto byly nazvány endotoxiny Cry. Ukázalo se, že různé kmeny Bt produkují různé Cry toxiny, z nichž každý působí specificky jen na určitou skupinu hmyzu.

Spory Bt se začaly už před druhou světovou válkou používat jako bioagens pro potírání specifických škůdců. Dnes představují více než 90% veškeré produkce prostředků biologické ochrany a používají se celosvětově nejen v zemědělství a lesnictví ale i v boji proti larvám komárů. Vypracování metodiky genetické transformace rostlin v 70. letech minulého století otevřelo cestu k přípravě GM plodin. První komerčně využitelné vnesení genu do dědičné informace rostliny se uskutečnilo v roce 1981 a gen pro Cry toxin byl poprvé inkorporován do rostliny tabáku v r. 1987 (Sharma, 2005). K prvnímu komerčnímu výsevu transgenních plodin exprimujících Cry toxin došlo v roce 1996 (Sharma, 2005) a od té doby se území, na němž jsou pěstovány transgenní plodiny, stále rozrůstá.

Pro využití GM plodin je důležitá stabilní exprese transgenu, přítomnost jeho produktu v účinných koncentracích a odolnost produktu vůči degradačním enzymům

rostliny. V posledních letech se pozornost soustřeďuje na zajištění tkáňové specifity exprese (např. moderní transformanty kukuřice neexprimují Cry toxiny v květech ani zrna), expresi omezenou na určitá vývojová stádia rostliny, či expresi indukovanou buď požerem škůdce nebo aplikací chemického spouštěče.

2.2. Toxicita Bt



Obr. 1: Účinek Bt toxinu (převzato z internetové stránky University of California San Diego)

Dnes existuje 80 sérotypů Bt patogenních pro hmyz a je známo více než 200 jejich produktů, které lze použít v boji proti škůdcům. Bt produkuje α , β , γ a δ - toxiny. Nejdůležitější jsou Cry toxiny ze skupiny δ - toxinů a cytotoxické proteiny (Cyt). Cry proteiny, nazývané někdy také ICP (insecticidal crystal proteins) vytvářejí krystalické struktury a jsou součástí spor. V roce 1958 je objevili Hannay a Fitz-James ve sporách Bt. Cry bílkoviny ve sporách pro hmyz jedovaté nejsou. Stávají se toxickými až ve střevě hmyzu (nejvíce sensitivní jsou nedospělá stádia hmyzu), kde se působením enzymů na obou

koncích zkrátí jejich peptidický řetězec. Příhodné podmínky pro odštěpení koncových úseků panují především ve střevě housenek, kde je zásadité prostředí. Po odštěpení zůstanou v molekule 3 domény, z nichž má každá své funkce. Doména I interaguje svými 7 α -helixy se specifickými molekulami proteázy v plasmatické membráně střevních buněk – kadheriny. Otevrou se tak kanály pro K^+ ionty. Doména II (3 β -skládané listy) tyto proteázy rozpoznává a doména III (3 β -skládané listy) se účastní obou procesů. Navázané Cry toxiny se následně shlukují a vytvoří ve střevní stěně otvor. Hmyz pak hyne obvykle během 2 až 5 dní (již několik hodin po příjmu účinné dávky toxinu přestává přijímat potravu). Příčinou smrti je buď těžké porušení střeva a následné hladovění nebo průnik bakterií narušenou střevní stěnou dále do těla, kde vyvolají sepsi. Bez vazby na specifické proteázy nemůže toxin hmyzu uškodit a projde bez účinku celým trávicím traktem.

2.3. Cry proteiny s 3 doménami a jejich specifita

Cry proteiny tvoří hlavní substanci Bt-toxinů účinných specificky proti různým druhům hmyzu: Cry1 na *Lepidoptera*, Cry2 na *Lepidoptera* a *Diptera*, Cry3 na *Coleoptera*, Cry4 na *Diptera* a Cry5 na *Lepidoptera* a *Coleoptera*. Celkem byl prokázán účinek na asi 150 druhů hmyzu. Fylogenetická analýza prokázala, že rozmanitost tohoto Cry toxinu se vyvíjela jako důsledek nezávislé evoluce všech tří domén a jejich vzájemné dislokace. Celkově velká diverzita toxinů umožňuje velkou specializaci na druhově specifické kadheriny, která také zaručuje, že toxiny neúčinkují na necílové druhy hmyzu. Velká pozornost je tedy soustředěna na zkoumání jednotlivých skupin Cry toxinů a jejich vlivů na různé skupiny organismů.

Rozsáhlejší studii týkající se jak cílových tak necílových škůdců a i ostatních členovců provedl Head a kol. (2005). Ve Spojených státech se zabýval složením entomofauny na polích s Bt a non-Bt bavlníkem. Tam, kde se vyskytovali cíloví škůdci, zvláště *Helicoverpa zea* (Boddoo), byl jejich počet na Bt bavlníku signifikantně nižší. Byl zkoumán bavlník s expresí 2 genů ze skupiny Cry1A, který by měl působit i na *Spodoptera* sp., ale zástupců tohoto rodu se na polích vyskytovalo celkově velmi málo. Výsledky neprokázaly vliv na necílové druhy členovců, ba naopak ze srovnání Bt a non-Bt bavlníku vyplývá, že Bt plodina podporuje vyšší výskyt nepřátel škůdců, což má příznivý vliv na přirozenou biologickou ochranu plodin (Head a kol., 2005). V porostech Bt bavlníku neprokázal vliv Bt na entomofaunu ani Daly a kol. (2000). Obecně řečeno, abundance jednotlivých druhů byla největší v nestříkaných Bt polích > komerčních Bt polích >> konvenčních bavlníkových polích (Daly a kol., 2000). K podobným závěrům došel i Naranjo (2005), který opět poukázal na to, že běžně užívané insekticidy mají na populace hmyzu mnohem větší dopad než Bt plodiny. Předmětem jeho zkoumání byl i druh *Spodoptera exigua* (Hübner), u něhož byla v porostech bavlníku exprimujícího Cry1Ac pozorována zvýšená mortalita. Škůdce *Earias vittella* Fab. ze stejné čeledi (Noctuidae) byl zkoumán z hlediska rezistence různých kultivarů bavlníku šlechtěných tradičními metodami s cílem objasnit příčiny vyšší odolnosti proti ožeru (zvýšený obsah gossypolu, hemigossypolinu, taninů, redukce nutričních kvalit). Dhillon a Sharma (2004) zjistili, že genotyp kultivarů má vliv na délku vývoje larev, kladivost a fertilitu dospělců *E. vittella*. Studie naznačuje, že dalším intenzivním cíleným šlechtěním může dojít ke zvýšení ochrany proti hmyzím škůdcům. V tomto případě jde o rostliny bez transgenu a přece jsou zde měřitelné vlivy na škůdce.

Velmi významnou necílovou skupinou organismů tvoří včely (*Apis mellifera* L.), a proto několik studií zkoumalo, zda transgenní pyl nemá vliv na vývoj včel nebo kvalitu jejich produktů. Nebyly nalezeny žádné signifikantní rozdíly v žádném testovaném parametru mezi larvami krmenými Bt pylem Cry1A(b) či Cry1F a netransgenním pylem (Hanley a kol., 2003). V té samé studii byl sledován i vliv na zavíječe voskového, *Galleria mellonella* L., který v některých oblastech představuje nebezpečného škůdce včel. V případě Cry1F byla úmrtnost housenek zavíječe 100%, což naznačuje možné využití toxinu v boji proti *G. mellonella*.

Mnoho prací (Lozia a Manachini, 2000; Candolfi a kol., 2000.; Poza a kol., 2005; Sehnal a kol., 2004; Habušťová a kol., 2005) se také věnuje vlivu Bt kukuřice na necílové organismy. Bt kukuřice je jednou z nejvíce rozšířených GM plodin. Výsledky mnoha studií naznačují, že v celkovém počtu zástupců hmyzu v porostech Bt a non-Bt kukuřice není žádný signifikantní rozdíl oproti necílovým organismům na insekticidy ošetřených polích, na jejichž populace může mít užívání insekticidů vliv. Studie byly zaměřeny hlavně na hmyzí řády Heteroptera, Homoptera, Thysanoptera, Diptera, Coleoptera a Hymenoptera a také na zástupce významných nadčeledí a čeledí (Lycosidae, Linyphiidae, Opiliones, Staphylinidae, Carabidae, Cicadellidae, Anthocoridae, Nabidae, Coccinellidae, Chrysopidae a Chalcoidea). V pokusech Habušťové a kol. (2007) rovněž nebyl prokázán žádný negativní vliv Bt-kukuřice exprimující Cry1Ab na společenstva členovců. V porostech Bt kukuřice však bylo nalezeno mnohem méně cílových škůdců *Helicoverpa armigera* (Hübner) a *Ostrinia nubilalis* (Hübner) (Habušťová a kol., 2005, 2007). De Vaufleury a kol. (2006) ve své práci prokázali, že pěstování Bt kukuřice nemá vliv ani na půdní členovce, mykorhizní houby a hlemýžďe zahradního. Doposud se také neobjevila žádná studie potvrzující negativní vliv na ptáky, brojlery, hlodavce a další malé savce (Novartis, 1999).

Brambor byl první plodinou, do které byl vnesen gen Cry3Aa, komerční využití však bylo opožděné a poměrně omezené. Reed a kol. (2001) zkoumali vliv GM brambor Newleaf[®] na mandelinku bramborovou (*L. decemlineata*) i necílové druhy organismů. Výsledky dvouletých polních výzkumů ukázaly vysokou účinnost na mandelinku bramborovou a jednoznačně vyšší ochranu než každotýdenní postřiky Bt spor s Cry3Aa, aplikace permethrinu 2x týdně, nebo postřik systémovými insekticidy (phorate, disulfoton) na začátku a uprostřed sezóny. Když srovnáme konvenční rostliny brambor neošetřované žádným insekticidem, porost geneticky modifikovaného bramboru Newleaf[®] a pole ošetřované každý týden postřikem založeným na Bt,

nenalezneme žádné signifikantní rozdíly v abundanci prospěšných predátorů a sekundárních škůdců na bramborách (Reed a kol., 2001).

V současné době existuje již velké množství prací zaměřených jak na způsob fungování Bt toxinů tak jejich účinky na cílové i necílové organismy. Prakticky lze říci, že vědci se zabývají těmi druhy škůdců, které se nejvíce vyskytují v jejich zemi působení. Uvědomují si, jaké pozitivní i negativní důsledky by mělo zavedení Bt plodin do životního prostředí, a srovnávají možné nebezpečí s riziky tradičního zemědělství. Naprostá většina prací potvrzuje, že jednotlivé skupiny Cry toxinů specificky usmrcují cílové skupiny organismů. Doposud se neobjevily studie, které by jednoznačně prokázaly účinek na necílové druhy organismů.

Podle Strizhova (1996) je rod *Spodoptera* vůči Bt toxinům odolný a proto byl uměle vytvořen a chemicky syntetizován Cry1C, který poskytuje ochranu před *S. littoralis* (Boisd.) i *S. exigua* (Hübner). Působení Cry1C potvrdil Lin a kol. (2003) ve studii o vlivu na *S. litera* Fab. Dutton a kol. (2005) naopak potvrdili vliv kukuřice exprimující Cry1Ab u *S. littoralis* na zvýšení délky trvání přechodu mezi prvním a druhým instarem ($p < 0.0001$), druhým a třetím instarem ($p < 0.0001$) a vyšší mortalitu (16,7% oproti 3,3% kontrolních jedinců).

2.4. Rezistence na Bt toxiny

Rezistence je schopnost tolerovat dávku toxinu, která je smrtelná pro populace dosud nevystavené jeho působení. Bt toxiny se dnes stále více využívají a to jak v ekologickém zemědělství ve formě postřiku suspenzí spor tak ve standardním vysoce produkčním zemědělství ve formě transgenních rostlin. V obou případech se vytvářejí podmínky pro přežití a výběr odolnějších jedinců. Dramaticky se zvýhodňují genetické mutace podmiňující rezistenci, v případě Bt např. modifikace kadherinu, který ztratí schopnost vázat a upravovat Cry toxin.

Hmyz rezistentní k Bt-toxinům se již skutečně objevil - *Plutella xylostella* L. (Escriche a kol., 2000). Rezistentní populace tohoto škůdce brukvovitých se vyskytly v jihovýchodní Asii a později i jinde na polích a ve sklenících ošetřovaných postřikem spor. V porostech geneticky modifikovaných plodin nepředstavuje rezistence zatím závažný problém. Její vznik je brzděn dvěma opatřeními: (1) Sterilitou pylu (nemohou vzniknout hybridy se zmenšenou produkcí toxinu) a (2) Povinným vyséváním netransgenní plodiny asi na 20% plochy (nerezistentní jedinci z těchto refugií převáží

nad vzácnými rezistentními a šíření rezistence bude zastaveno). To tvrdí např. Tabashnik (1997) v korespondenci pro Nature Biotechnology. Přesto je na místě princip předběžné opatrnosti. Studium citlivosti a schopnosti vývoje rezistence u jednotlivých druhů je opravdu důležité, aby bylo zabráněno selhání GMO technologie. Uplatňuje se několik taktických postupů:

- Hromadění genů: Současné použití dvou genů pro Cry proteiny s různým mechanismem působení dramaticky snižuje možnost vzniku rezistence. Druhý gen také vůbec nemusí být Bt toxin ale rostlinný trypsinový či amylázový inhibitor.
- Refugia: Hmyz žijící na okrajových netransgenních rostlinách se bude rychle množit a zůstane citlivý k Bt proteinům. Po zkřížení s jedincem, který přežil v oblasti transgenních rostlin se gen rezistence „zředí“ v celém genetickém poolu. Vytvoří se tak maximálně heterozygotní potomstvo.
- Produkce vysokých dávek toxinů: Rostliny by měly produkovat 25x více toxinu, než je nutné k zabití 99% citlivého hmyzího škůdce. Bt toxin v transgenních rostlinách by měl být exprimován v takové koncentraci, aby bylo 95% heterozygotů nepochybně zabito.

Vědci se také pokoušejí najít v přírodě další zajímavé toxiny, které by bylo možné využít ve formě postřiků nebo pro tvorbu nových geneticky modifikovaných rostlin vzdorujících škůdcům. Velkou nadějí vkládají například do toxinů bakterie *Photobacterium luminescens* žijících v trávicím traktu některých hlístů. V boji proti škůdcům se používají i biopesticidy vyrobené ze stromů (*Azadirachta indica* A. Juss, *Pongamia glabra* Vent., *Madhuca indica* Roxb., *Melia azedarach* L.). Přičemž *Pongamia glabra* se jeví jako velmi účinná proti hmyzím škůdcům uskladněného zrna a polních plodin. Více jak 19 biologicky aktivních složek bylo v této rostlině identifikováno. Tyto látky způsobují redukci kládivosti a mohou i usmrtit larvální stadia mnoha druhů škůdců (Kumar a Singh, 2002).

2.5. Charakteristika druhu *Spodoptera littoralis* (Boisd.)

Taxonomické zařazení:

kmen: *Arthropoda*
třída: *Insecta*
podtřída: *Pterygota*
řád: *Lepidoptera*

nadčeleď: *Noctuoidea*
čeleď: *Noctuidae*
podčeleď: *Hadeninae*

Charakteristika druhu:



Obr. 2: Larva

Vajíčka jsou oválná (0,6 mm v průměru) a samice je kladou ve snůškách po 100 až 1000 kusech na spodní stranu listů. Jsou obvykle chráněna velkým množstvím chloupků. Po 3 - 5 dnech se líhnou tmavě zelené až černé larvy se světlejší hřbetní stranou. Housenky jsou polyfágní a živí se rostlinami asi 40 čeledí, které obsahují přinejmenším 87 ekonomicky významných druhů (Sharma, 2005). Housenky si vybírají mladé listy, ale při mohutném napadení se nevyhnou listům jakéhokoliv stáří. U rostlin dochází nejen k přímému poškození požerem ale i k sekundárním hnilobám.

V prvních 3 instarech žijí housenky pohromadě a v dalších třech jednotlivě. Den tráví obvykle v zemi pod hostitelskou rostlinou a živí se v noci a brzy ráno. Před kuklením mohou dosáhnout délky až 4 cm. Vyprazdňují střevo a v půdě si vytvářejí kuklové komůrky, t.j. dutinky, jejichž stěny jsou vyhlazené produkty labiálních žláz. Kukla je zpočátku zelená, později hnědá a velká 15-20 mm. Můry se líhnou přibližně za 11-14 dnů po zakuklení. Jejich přední křídla jsou šedohnědá, zdobená čtyřmi převrácenými znaménky (charakteristický znak druhu), zadní křídla jsou bílá až světle hnědá a tělo je také hnědě zbarvené. Můry jsou aktivní v noci. Během dvou dnů dojde k prvnímu páření a samičky začnou klást vajíčka. V průběhu svého krátkého života (4 - 10 dní) mohou samičky naklást 2000 i více vajíček. Vývojový cyklus je ovlivněn teplotou, vlhkostí, potravou a jinými vlivy. Může se změnit i počet larválních instarů. Období zimy přežívají larvy pod zemí. Obvykle má dvě za optimálních podmínek však až šest generací ročně.

Jedná se o velmi nebezpečného škůdce rozšířeného především v jižní části Evropy, Egyptě, středomořských ostrovech, jihozápadní a jihovýchodní Asii. Do roku 1968 se proti *S. littoralis* (Boisd.) bojovalo pomocí methyl – parathionu. Proti této látce se u ní však objevila rezistence. Od té doby bylo vystřídáno mnoho syntetických insekticidů. Díky omezením jejich používání se rezistence proti nejnovějším zatím neobjevila. Vzniklo také mnoho studií o využití biologické ochrany.

3. Metodika

3.1. Charakteristika použitých linií

V pokusu bylo použito 5 různých linií:

- SE: Kmen pochází z Central Agricultural Pesticides Laboratory, Agricultural Research Centre, Dokki v Gize, kde byl po mnoho let krměn potravou z fazolí. Pro zvýšení životaschopnosti larev byla vždy jedna generace ročně krmena listy z durmanu. Larvy vylíhlé ze získaných vajíček byly v Biologickém centru AV ČR v. v. i. krmeny stejným typem potravy až do začátku pátého instaru, kdy byly přeneseny na listy bramboru.
- SF: Pochází z INRA Laboratory ve Versailles. Chovy larev byly udržovány po několik let na potravě ze sojového a kukuřičného prášku s přídavkem antibiotik. I v tomto případě byly k pokusům na bramborách použity larvy pátého instaru chované na původní potravě.
- SN: Pochází z Central Agricultural Pesticides Laboratory, Agricultural Research Centre, Dokki v Gize v Egyptě. V okolí této instituce byly larvy posbírány a následně umístěny v laboratoři univerzity, kde byly krmeny potravou Premix (Manduca - Heliothis Premix produkovaný v Stonefly Industries Inc., Texas). I v tomto případě byly k pokusu použity larvy čerstvého pátého instaru z vajíček dopravených do laboratoře.
- NC: Pochází také z Egypta z National Research Centre. Během vegetační sezony byly larvy krmeny listy durmanu a v zimě fazolovou potravou. Larvy vylíhlé z vajíček poslaných do laboratoře byly udržovány na fazolové potravě a v čerstvém pátém instaru použité na pokus s NLS a kontrolními brambory.
- NR: Tato linie byla získaná z National Research Centre v Gize (Egypt), kde byla chována po mnoho desítek let. Tento kmen byl přivezen do české laboratoře před několika lety a chován zde na komerční potravě Premix. Na testy byly použity larvy čerstvě svlečené do pátého instaru.

Všechny použité linie byly považované za citlivé vůči pesticidům. Pocházeli buď z mnohaletých laboratorních chovů (SE, SF, NC, NR) či z volné přírody (SN) z míst, kde se používají pesticidy.

3.2. Pěstování brambor



Obr. 3: Meristémové kultury

Malé hlízky transgenních brambor variety NLS a jejich izogenní netransgenní kultivar byly získány od firmy Monsanto Co. (USA). Jejich pěstování bylo povoleno rozhodnutím MŽP 2456/OER/GMO/04. Brambory byly množeny řízkováním a udržovány na agarové půdě ve Výzkumném ústavu bramborářském v Havlíčkově Brodě. Z agarové půdy byly zakořeněné rostlinky přeneseny do zeminy v sadbovém platu a po dosažení cca 10 cm přesazeny do květináčů o průměru 22 cm. Ve skleníku byla udržována teplota 20°C. Pomocí

umělého osvětlení byla zajištěna délka dne 16 hod. Po dosažení 30-35 cm byly listy bramboru použity ke krmení housenek.

3.3. Podmínky chovu larev

Na testování byly vybírány larvy na počátku pátého instaru. Toto stádium vývoje bylo zvoleno s ohledem na to, že předposlední a poslední instar *S. littoralis* (Boisd.) je schopen přijmout maximální množství potravy, tudíž také toxinu, a také největší díl potravy využívá na vytvoření tělní hmoty a k přípravě na metamorfózu.



Obr.4: Podmínky chovu larev

Larvy byly vybrány z laboratorních chovů dle hmotnosti v rozmezí 70 – 80 mg (váhy: A&D instruments LTD, GX – 200 – EC, max: 210 g, min: 0,02 g, e = 0,01 g, d = 0,001 g). Pro každou linii bylo vybráno 30 jedinců pokusných a 30 jedinců kontrolních. Ve všech případech byly vytvořeny hmotnostně vyrovnané soubory (homogenita variance počátečních hmotností mezi kontrolní a NLS skupinou). Larvy byly po jedné vloženy do průhledných plastických kelímků o objemu

0,5 l a uzavřeny pomocí gumičky síťovinou. Chovány byly při $\pm 24^{\circ}\text{C}$ a dlouhém dni, tedy 16 hodin světla a 8 hodin tmy a konstantní relativní vlhkosti $\pm 75\%$. Ve stejných podmínkách byla chována i další stadia. Během pokusu byly u pěti jedinců sledovány každý den hmotnostní přírůstky a množství zbylé a nové potravy. U všech jedinců byla

zaznamenávána počáteční a nejvyšší dosažená konečná hmotnost, datum svlékání do posledního instaru a přechodu do předkukly a kukly.

Kontrolní jedinci byli krmeni listy ze vzrostlých ale nekvetoucích rostlin odrůdy Superior, pokusní jedinci listy kultivaru Newleaf Superior (Monsanto Co., USA). Obsah toxinu v listech byl stanoven pomocí ELISA a pohyboval se v rozmezí od 1,4 do 2,6 $\mu\text{g/g}$ čerstvé hmoty listu. Listy se měnily každý den. Byly umístovány do epruvet zabezpečených proti vylítí buničitou vatou. Epruveta byla omotávána kouskem filtračního papíru, který housence usnadnil pohyb. Po ukončení žíru byly housenky přemístěny do menších kelímků.

3.4. Podmínky pro předkukly a kukly

Předkukly byly umístěny do kelímků (0,18 l) tmavě hnědé barvy opatřené 2 vrstvami materiálu. Spodní, asi 1,5 – 2 cm, tvořily jemně přeseťé piliny, které absorbovaly vodu a zabraňovaly tak zapařování horní vrstvy, kterou tvořila zahradní zemina firmy Rašelina – Soběslav s maximální vlhkostí 65%. Aby se snížilo nebezpečí infekce, byla



zemina sterilizována 1,5 h při 125°C v autoklávu (Certo Clav Sterilizer GmbH A 4050). Larvy se během dne zahrabaly do zeminy, pro jistotu však byl do kelímku přidán bramborový list, který současně zajišťoval přiměřeně vlhké prostředí. Po jeho odstranění byl obsah kelímků obden rosen vodou z rozprašovače. Čerstvě svlečené kukly byly zváženy a bylo zjištěno pohlaví.

Obr.5: Umístění kukel

3.5. Chov dospělců

Vylíhlí dospělci byli z kelímků po párech přeneseni do papírových válců o průměru 8 cm a výšce 21 cm. Párování byli jedinci vylíhlí během 48 hodin. Všichni byli krmeni každý den čerstvým 10% roztokem medu. Každý den byla odebrána nakladená vajíčka pro kontrolu jejich množství a počtu vylíhlých jedinců.



Obr.6: Chov dospělců

3.6. Stanovení obsahu Cry3Aa endotoxinu v listech bramboru

Na determinaci obsahu toxinu byla použita ELISA (Enzyme-Linked Immunosensitive Assay). Je to jedna z nejpoužívanějších imunologických metod pro detekci antigenů, která využívá dvou základních schopností imunoglobulinů:

- proteiny se vážou na povrch umělých hmot
- proteiny váží enzymy na Fc fragmenty (= krystalizující fragment imunoglobulinu, který je tvořen těžkými řetězci)

Existuje několik modifikací základní metody (přímá, nepřímá, přímá sendvičová, nepřímá sendvičová).

Obsah Cry3Aa toxinu v listech byl zjišťován pomocí Elisa PathoScreen kit (Agdia Inc., Elkhart, Indiana). Tento speciální kit byl vytvořen pro kvantitativní vyjádření obsahu různých subtypů Cry3A toxinů v hlízách brambor včetně Cry3Aa produkovaných v rostlinných tkáních NLS. Na první protilátku, která je navázaná na destičku, se váže vyextrahovaný vzorek a posléze alkalická fosfatáza. Po přidání substrátů dochází k vizualizaci. Přesný princip reakce v používaném kitu je součástí výrobního tajemství.

Postup:

1g čerstvého bramborového listu se homogenizuje ve speciálním sáčku s 3 ml General extract buffer (GEB). Nechá se 15-20 min odstát a poté se odebere 100 μ l (vzorek). Roztok se centrifuguje v předem vychlazené centrifuze (Hettich Zentrifugen, EBA 12R) 10 min při 10 000 otáčkách za minutu. Supernatant se odstraní, vzniklý pelet se zředí 1:1000 v GEB, homogenizuje na vortexu a aplikuje na destičku. Součástí kitu je pozitivní a negativní kontrola, které jsou důležité při sestrování standardní křivky. Substrát pro sestrojení standardní křivky se ředí dvojkovou řadou.

Po aplikaci vzorků se přidává alkalická fosfatáza a nechá se 60 min reagovat při pokojové teplotě. Poté se obsah všech jamek vylije, řádně vyklepe a promyje. Posledním krokem je přidání substrátu A a B na 30 až 60 min. Absorbance se odečítá pomocí Elisa readeru (Spectra MAX 340 PC) při $\lambda = 630$ nm. Naměřené absorbance se pomocí programu *Graph Pad Prism 4* vyhodnocují k standardní křivce a přepočtou k použitému ředění vzorku.

3.7. Statistické zpracování

Data byla vyhodnocena pomocí programu *StatSoft Statistica 7*. Grafy znázorňující výsledky byly vytvořeny v *Microsoft Office Excell 2003*. S výjimkou hodnocení počtu vykladených vajíček a počtu potomků na samici šlo vždy o testování 2 faktorů (pohlaví a zařazení do skupiny) s faktoriálním uspořádáním, byla tedy použita dvoucestná analýza variance. Ve většině parametrů byly v důsledku nerovnoměrné úmrtnosti srovnávány různé počty jedinců, analýza variance však nevyžaduje stejné počty pozorování ve skupinách. Kvůli nestejnému počtu pozorování byl pro upřesnění rozdílů mezi pohlavími použit k mnohonásobnému porovnání Unequal N HSD, což je varianta Tukeyho testu pro nestejný počet pozorování. Kladení a množství vylíhlých potomků byly porovnány pomocí jednocestné analýzy variance. Všechny testy byly prováděny na hladině významnosti $\alpha = 0,05$.

4. Výsledky

Každá populace (linie) *S. littoralis* byla hodnocena zvlášť. Hodnocené parametry, jejich průměrné velikosti a směrodatné odchylky jsou spolu se statistickými výsledky uvedeny v tabulkách 1 – 5. Ve všech případech byly vytvořeny hmotnostně vyrovnané soubory, což bylo potvrzeno testováním homogenity variance počátečních hmotností mezi kontrolní a NLS skupinou a byla provedena i dvoucestná ANOVA, která spolu s testem homogenity variance potvrdila správnost výběru. Ve všech případech byla nulová hypotéza formulována tak, že skupiny (NLS, kontrola) se od sebe neliší. *S. littoralis* (Boisd.) je necílový organismus, na který by tedy neměl mít toxin Cry3Aa vliv. U sledovaných parametrů byl tedy požadován neprůkazný výsledek. Tím by se potvrdila hypotéza, že toxin Cry3Aa nemá vliv na žádný ze sledovaných parametrů.

Nejdůležitější výsledky jsou ve sloupci „Porovnání skupin“. Testy porovnávací jednotlivá pohlaví jsou doplňující, podle nichž je možné zjistit, jestli se vzájemně liší samci a samice ve skupině a také jestli není rozdíl mezi samicemi respektive samci v rámci populace. Větší význam by měl vliv na samice, protože by bezprostředně ovlivnil počty vajíček a jejich líhnivost. Bližší specifikace vlivu pohlaví byla provedena pomocí Unequal N HSD. Pro přehlednost zde nejsou uvedeny všechny výsledky z tohoto porovnání.

Růstové křivky byly vytvořeny z denně sledovaných hmotností larev, které byly také využity pro výpočet ECI (Conversion Efficiency of Ingested Food to Biomass nebo také Ratio of Bodymass Increase to the Amount of Ingested Food), tedy využitelnosti potravy. Jedná se o množství pozřené potravy (procentuálně vyjádřeno), které využije housenka ke tvorbě své vlastní biomasy.

4.1. Linie SE

Porovnání skupin: Ve většině sledovaných parametrů nebyly mezi jedinci na NLS a kontrolních bramborách průkazné rozdíly (Tab. 1). Jen délka vývoje předkukly, celková délka vývoje a délka vývoje kukly byly odlišné. Rozdíl byl zřejmě způsoben odlišným poměrem pohlaví, jejichž vývoj se v těchto faktorech poněkud liší (NLS: F - 8, M - 15; kon: F - 13, M - 12).

Porovnání pohlaví: Unequal N HSD test prokázal u výše jmenovaných parametrů a také u váhy kukel rozdíly mezi samicemi a samci v rámci všech skupin (NLS F, NLS

M, kon F, kon M) a nikoliv mezi skupinami na různé potravě (NLS F versus kon F a NLS M versus kon M). Neprůkazné rozdíly mezi samicemi na NLS a kontrolních bramborách (váha kukly: Unequal N HSD MS = 2286,0, df = 64,000, p = 0,744304, délka vývoje celkem: Unequal N HSD: MS = 0,46344, df = 64,000, p = 0,1768; délka vývoje předkukly: Unequal N HSD:MS = 0,25074, df = 64,000, p = 0,1116; délka vývoje kukly: Unequal N HSD: MS = 0,28267, df = 50,000, p = 0,0796) jsou v souladu s neprůkazným rozdílem v počtu vajíček na samici a potomstvu na samici.

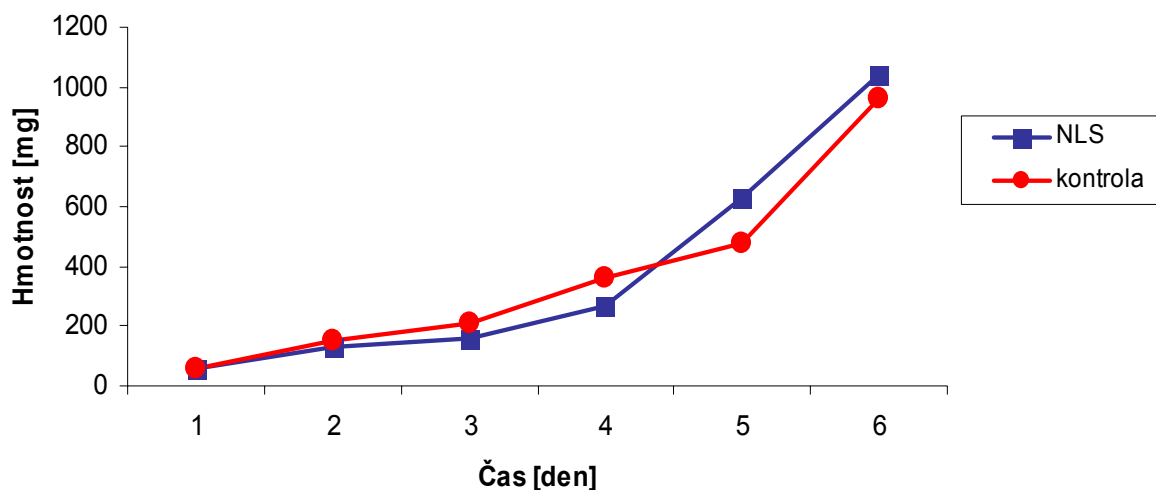
Z grafu 1 lze vyčíst, jak postupně stoupala hmotnost housenek v obou skupinách. Zpočátku se rychleji zvyšovala biomasa kontrolní skupiny, ale v závěru ji skupina NLS mírně převýšila.

V případě této linie u všech jedinců trval první instar neobvykle dlouho (10 dní). Důvodem mohla být potrava připravená dle receptury z velkých bílých fazolí (kultivar Maxidor). Po změně fazolí (malé bílé fazole, kultivar Aidagold) se již housenky vyvíjely běžným způsobem.

Tabulka 1: Výsledky – Linie SE

Linie SE	NLS	Kontrola	Porovnání skupin	Pohlaví
Počáteční váha (mg)	74,4 ± 3,7	75,8 ± 3,5	F = 0,0694 p = 0,7931	F = 1,6028 p = 0,2101
Nejvyšší dosažená hmotnost (mg)	970,0 ± 141,9	940,5 ± 130,5	F = 1,41081 p = 0,2393	F = 3,0916 p = 0,0835
Přírůstek váhy (mg)	908,8 ± 141,9	879,2 ± 132,5	F = 1,4248 p = 0,2370	F = 3,2740 p = 0,0751
Váha kukly (mg)	299,7 ± 43,9	286,3 ± 52,2	F = 2,2602 p = 0,1377	F = 5,5669 p = 0,0214
Délka 5. instaru (dny)	2,3 ± 0,5	2,3 ± 0,7	F = 0,0376 p = 0,8469	F = 0,5516 p = 0,4604
Délka 6. instaru (dny)	3,7 ± 0,5	3,7 ± 0,7	F = 0,0345 p = 0,8532	F = 3,2147 p = 0,0777
Délka vývoje předkukly (dny)	1,7 ± 0,5	1,4 ± 0,5	F = 7,7739 p = 0,0070	F = 4,7029 p = 0,0338
Délka vývoje celkem (dny)	7,7 ± 0,7	7,4 ± 0,7	F = 5,7139 p = 0,0198	F = 6,4899 p = 0,0133
Délka vývoje kukly (dny)	9,3 ± 0,8	8,8 ± 0,8	F = 13,4172 p = 0,0006	F = 83,8574 p < 10⁻⁵
Počet vajíček na samici	2677,1 ± 757,3	2544,7 ± 1107,8	F = 0,1129 p = 0,7398	
Potomstvo na samici	1355,9 ± 506,2	1470,7 ± 679,8	F = 0,2141 p = 0,6477	
ECl v %	25,6	24,2		
Mortalita larev v %	23,3	16,7		

Linie SE



Graf 1: Růstová křivka – Linie SE

4.2. Linie SF

Porovnání skupin: U této linie vyšlo průkazně mnoho sledovaných parametrů (Tab. 2) – nejvyšší dosažená hmotnost, přírůstek váhy, váha kukel, délka pátého instaru, délka trvání předkukly i kukly. Důvodem byl očividně různý poměr pohlaví ve skupinách (NLS: F – 10 , M – 12; kon: F - 6, M - 15).

Porovnání pohlaví: Rozdíl mezi pohlavími byl zaznamenán i v délce šestého instaru a délce vývoje kukel. Průkazná závislost na typu potravy byla zjištěna jen u délky vývoje předkukel samců (Unequal N HSD: MS = 0,32251, df = 52,000, p = 0,0002).

Z grafu 2 vyplývá, že u této linie byl přírůstek hmotnosti housenek u obou skupin rovnoměrný, až na konci se signifikantně rozlišil (nejvyšší dosažená hmotnost) ve prospěch NLS skupiny.

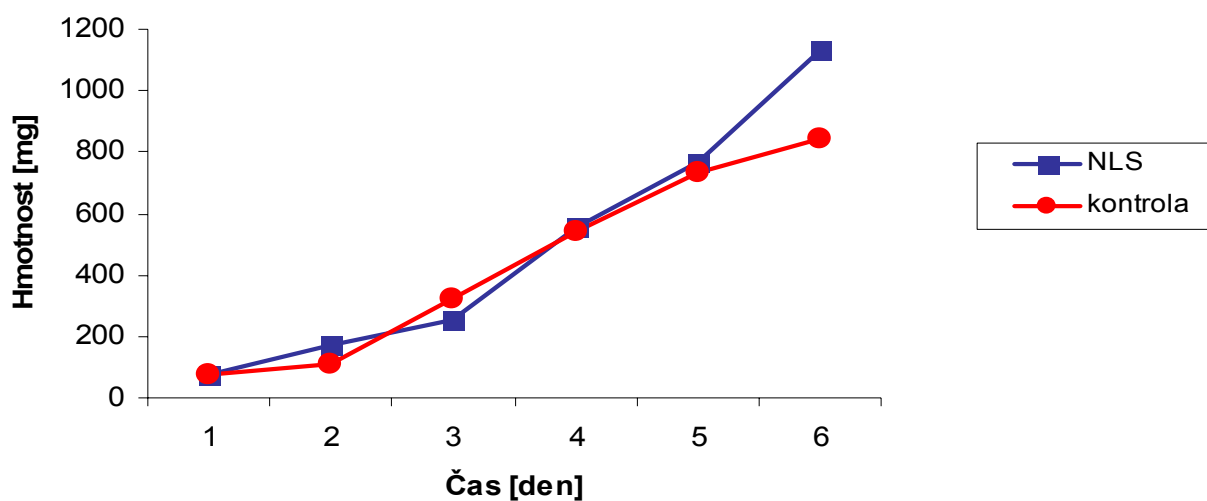
U pokusných i kontrolních jedinců bylo zaznamenáno velké množství housenek, které prodělaly nadpočetné larvální svlékání. Tento jev se normálně vyskytuje u několika procent jedinců, ale v tomto případě ale prošlo instarem navíc 23 ze 60 housenek (13 u NLS, 10 u kon). Mohlo to být způsobeno přechodem z umělé stravy na listy s jinou výživnou hodnotou, obsahem solaninu a jiných alkaloidů. V další generaci této linie na bramborových listech se již žádné neobvyklé množství instarů neobjevilo.

Tabulka 2: Výsledky – Linie SF

Linie SF	NLS	kontrola	Porovnání skupin	Pohlaví
Počáteční váha (mg)	74,3 ± 3,8	73,6 ± 3,7	F = 1,3032 p = 0,2589	F = 3,2885 p = 0,0755
Nejvyšší dosažená hmotnost (mg)	1048,0 ± 287,9	843,5 ± 319,2	F = 4,7044 p = 0,0346	F = 36,4234 p < 10 ⁻⁵
Přírůstek váhy (mg)	973,8 ± 289,1	769,9 ± 318,5	F = 4,6551 p = 0,0355	F = 36,9765 p < 10 ⁻⁵
Váha kukly (mg)	351,1 ± 90,6	295,0 ± 79,6	F = 5,8427 p = 0,0192	F = 76,5154 p < 10 ⁻⁵
Délka 5. instaru (dny)	1,1 ± 0,3	1,4 ± 0,5	F = 5,0418 p = 0,0289	F = 0,0254 p = 0,8741
Délka 6. instaru (dny)	4,4 ± 1,0	3,8 ± 0,9	F = 2,9377 p = 0,0924	F = 34,8389 p < 10 ⁻⁵
Délka vývoje předkukly (dny)	1,4 ± 0,5	1,3 ± 0,4	F = 65,2819 p < 10 ⁻⁵	F = 68,3634 p < 10 ⁻⁵
Délka vývoje celkem (dny)	6,9 ± 0,9	6,4 ± 0,7	F = 2,5815 p = 0,1141	F = 35,2990 p < 10 ⁻⁵
Délka vývoje kukly (dny)	10,1 ± 0,7	10,7 ± 0,7	F = 6,1403 p = 0,0191	F = 13,8157 p = 0,0008
Počet vajíček na samici	1925,4 ± 1084,3	1828,7 ± 1112,8	F = 0,1201 p = 0,7341	
Potomstvo na samici	1076,7 ± 1035,9	887,2 ± 1052,3	F = 0,2701 p = 0,6114	
ECI v %	21,0	16,7		
Mortalita larev v %	26,7	30,0		

Pozn.: Vývojové stadium, kterými housenky prošly navíc, bylo při statistickém zpracování zahrnuto do délky šestého instaru.

Linie SF



Graf 2: Růstová křivka – Linie SF

4.3. Linie SN

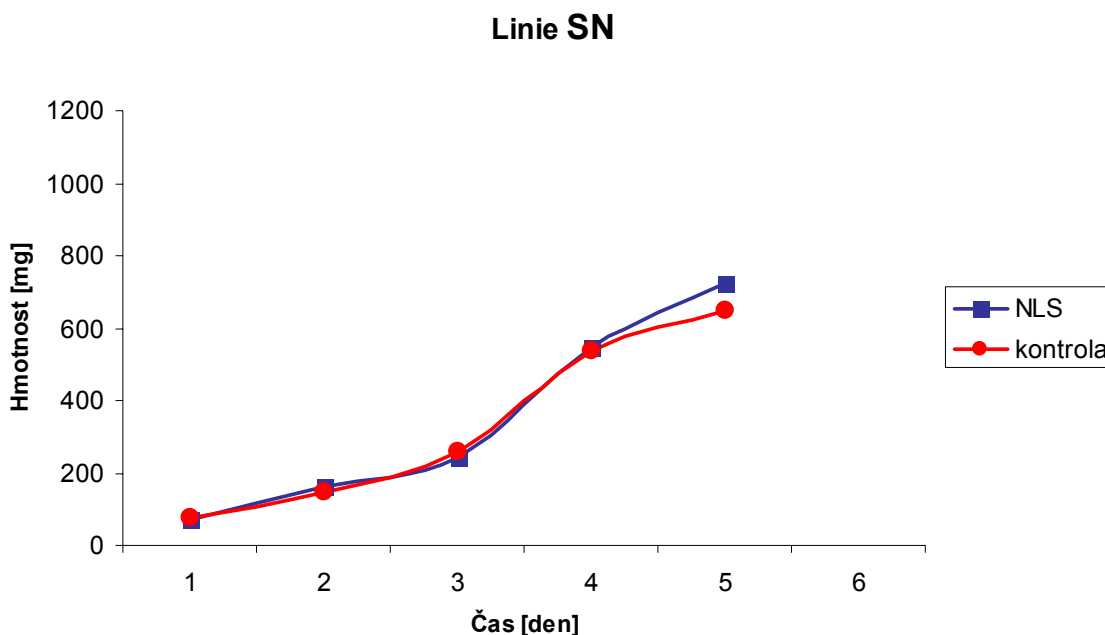
Porovnání skupin: U skupiny Sensitive byla naprostá většina parametrů nezávislá na typu bramborových listů (Tab. 4). Na rozdíl od všech ostatních pokusů však byl zjištěn průkazný rozdíl v počtu vylíhlých larev.

Porovnání pohlaví: Rozdíl v délce vývoje kukly nebyl způsoben rozdílem mezi samicemi respektive samci v rámci populace (Unequal N HSD: MS = 0,26455, df = 30,000, F: p = 0,2783; M: p = 0,8223. Poměr pohlaví byl u této linie nejvyrovnanější (NLS: F - 10 , M – 9; kon: F - 11, M – 11).

Graf 3 opět neukazuje žádné dramatické rozdíly ve vývoji hmotnosti housenek. Poslední den se ale znovu objevil mírný rozdíl v obou skupinách.

Tabulka 3: Výsledky – Linie SN

Linie SN	NLS	kontrola	Porovnání skupin	Pohlaví
Počáteční váha (mg)	73,9 ± 3,2	74,5 ± 3,2	F = 1,9540 p = 0,1724	F = 0,3617 p = 0,5521
Nejvyšší dosažená hmotnost (mg)	814,5 ± 133,9	778,0 ± 198,9	F = 0,5000 p = 0,4849	F = 3,0315 p = 0,0919
Přírůstek váhy (mg)	740,6 ± 134,8	703,5 ± 200,0	F = 0,5302 p = 0,4722	F = 2,9597 p = 0,0957
Váha kukly (mg)	288,3 ± 41,2	287,4 ± 38,8	F = 0,0005 p = 0,9816	F = 3,9284 p = 0,0567
Délka 5. instaru (dny)	2,1 ± 0,3	2,0 ± 0,2	F = 0,3182 p = 0,5769	F = 0,3182 p = 0,5769
Délka 6. instaru (dny)	2,9 ± 0,4	3,0 ± 0,2	F = 0,0000 p = 1,0000	F = 0,0001 p = 1,0000
Délka vývoje předkukly (dny)	1,9 ± 0,3	1,7 ± 0,5	F = 1,9425 p = 0,1736	F = 0,7356 p = 0,3979
Délka vývoje celkem (dny)	6,9 ± 0,2	6,5 ± 6,7	F = 3,7295 p = 0,0630	F = 1,8116 p = 0,1884
Délka vývoje kukly (dny)	7,6 ± 0,8	8,1 ± 0,8	F = 3,6980 p = 0,0640	F = 55,778 p < 10 ⁻⁵
Počet vajíček na samici	1999,1 ± 598,3	2451,8 ± 464,3	F = 2,3499 p = 0,1493	
Potomstvo na samici	1465,6 ± 593,7	2253,0 ± 452,2	F = 7,3345 p = 0,0179	
ECl v %	19,8	17,9		
Mortalita larev v %	36,7	26,7		



Graf 3: Růstová křivka – Linie SN

4.4. Linie NC

Porovnání skupin: V tomto případě se po statistickém vyhodnocení (Tab. 5) objevila závislost na typu brambor v délce šestého instaru, celkové délce vývoje a délce trvání kukly. U této linie nebylo možné statisticky určit rozdíl v délce pátého instaru, poněvadž byla všechna data absolutně shodná a neměla tedy varianci.

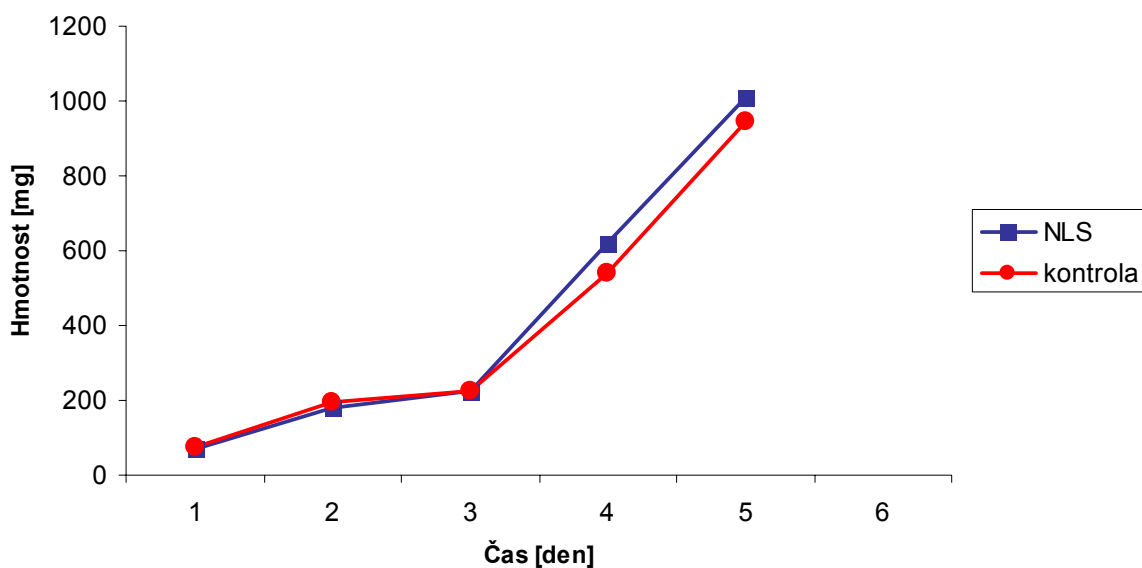
Porovnání pohlaví: V případě testu pohlaví se ukázalo, že u parametru délka vývoje kukly je rozdíl mezi samci (Unequal N HSD: MS = 0,25747, df = 29,000, p = 0,0002). Poměr pohlaví v této linii byl následující : NLS: F - 5 , M – 9; kon: F - 8, M – 12.

Graf 4 ukazuje již od třetího dne větší, avšak statisticky opět neprůkazné, nabírání hmotnosti u skupiny NLS.

Tabulka 4: Výsledky – Linie NC

Linie NC	NLS	kontrola	Porovnání skupin	Pohlaví
Počáteční váha (mg)	71,7 ± 1,7	72,7 ± 2,3	F = 2,5912 p = 0,1183	F = 0,1471 p = 0,7041
Nejvyšší dosažená hmotnost (mg)	985,3 ± 106,0	945,4 ± 121,8	F = 1,0286 p = 0,3189	F = 3,2563 p = 0,0815
Přírůstek váhy (mg)	913,6 ± 105,4	872,7 ± 122,3	F = 1,0878 p = 0,3056	F = 3,2253 p = 0,0829
Váha kukly (mg)	340,1 ± 24,6	333,3 ± 17,4	F = 0,7919 p = 0,3809	F = 3,652 p = 0,0659
Délka 5. instaru (dny)	2,0 ± 0	2,0 ± 0		
Délka 6. instaru (dny)	3,0 ± 0	3,4 ± 0,6	F = 4,1964 p = 0,0497	F = 0,1459 p = 0,7053
Délka vývoje předkukly (dny)	2,4 ± 0,5	2,6 ± 0,5	F = 1,1548 p = 0,2914	F = 2,6336 p = 0,1154
Délka vývoje celkem (dny)	7,4 ± 0,5	7,9 ± 0,2	F = 17,6051 p = 0,0002	F = 3,1251 p = 0,0876
Délka vývoje kukly (dny)	9,4 ± 0,7	8,2 ± 0,4	F = 32,8981 p < 10 ⁻⁵	F = 10,4092 p = 0,0031
Počet vajíček na samici	2468,6 ± 1113,9	2832,3 ± 836,8	F = 0,3474 p = 0,5687	
Potomstvo na samici	1964,0 ± 964,9	2252,7 ± 957,7	F = 0,2195 p = 0,6495	
ECI v %	33,1	24,0		
Mortalita larev v %	53,3	33,3		

Linie NC



Graf 4: Růstová křivka – Linie NC

4.5. Linie NR

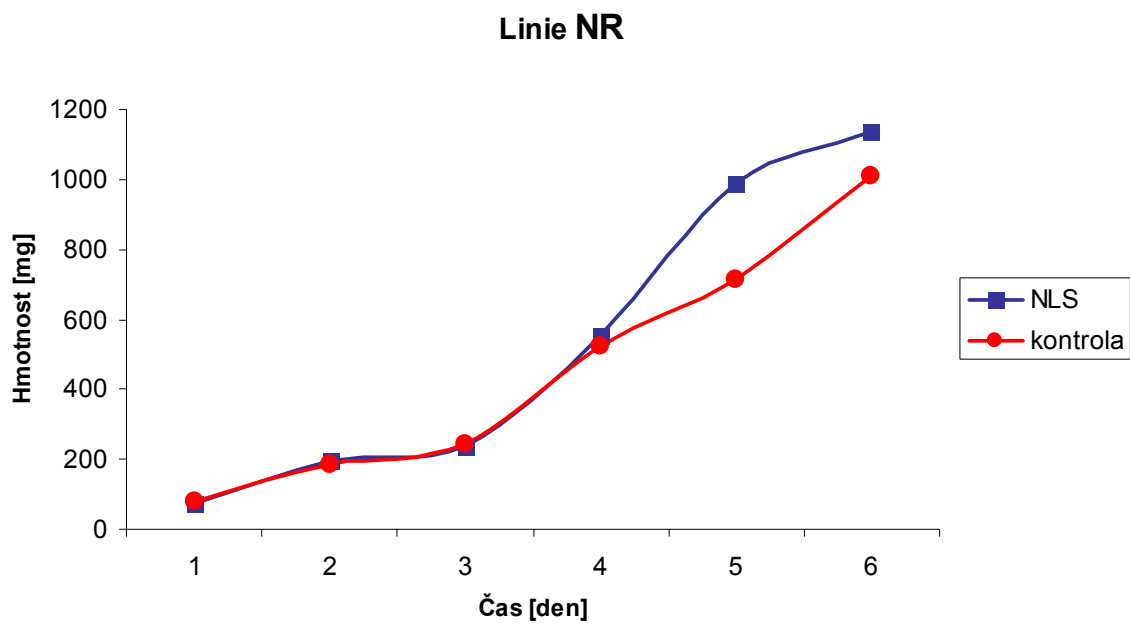
Porovnání skupin: V této skupině nevyšel průkazně rozdíl mezi NLS a kontrolou u žádného ze sledovaných parametrů (Tab. 3).

Porovnání pohlaví: U nejvyšší dosažené hmotnosti, váhového přírůstku, váhy kukel, celkové délky vývoje a u délky vývoje kukel byly zjištěny rozdíly mezi pohlavími ne však mezi jedinci stejného pohlaví na různé potravě. Poměr pohlaví v této linii byl vyrovnanější než u linie SE a SF (NLS: F - 11 , M – 14; kon: F - 17, M - 13).

Zvýšení hmotnosti NLS skupiny oproti kontrole v poslední fázi vývoje housenek bylo statisticky neprůkazné (Graf 5).

Tabulka 5: Výsledky – Linie NR

Linie NR	NLS	kontrola	Porovnání skupin	Pohlaví
Počáteční váha (mg)	74,7 ± 2,4	75,7 ± 2,3	F = 1,5712 p = 0,2188	F = 0,6809 p = 0,4152
Nejvyšší dosažená hmotnost (mg)	1008,0 ± 165,7	1040,3 ± 138,0	F = 0,1452 p = 0,7056	F = 36,1126 p < 10 ⁻⁵
Přírůstek váhy (mg)	933,3 ± 165,7	964,6 ± 137,9	F = 0,1668 p = 0,6856	F = 35,7824 p < 10 ⁻⁵
Váha kukly (mg)	326,1 ± 42,0	341,3 ± 29,5	F = 0,4687 p = 0,4983	F = 23,4481 p < 10 ⁻⁵
Délka 5. instaru (dny)	2,2 ± 0,4	2,4 ± 0,5	F = 0,5315 p = 0,4711	F = 3,1742 p = 0,0840
Délka 6. instaru (dny)	3,4 ± 0,6	3,5 ± 0,6	F = 0,00003 p = 0,9953	F = 1,1372 p = 0,2940
Délka vývoje předkukly (dny)	1,9 ± 0,5	1,7 ± 0,6	F = 2,2287 p = 0,1450	F = 1,5129 p = 0,2274
Délka vývoje celkem (dny)	7,6 ± 0,6	7,6 ± 0,6	F = 1,0476 p = 0,3135	F = 18,5528 p = 0,0001
Délka vývoje kukly (dny)	10,4 ± 0,6	10,4 ± 0,7	F = 0,4734 p = 0,4962	F = 32,9642 p < 10 ⁻⁵
Počet vajíček na samici	2491,3 ± 1132,7	1939,0 ± 866,3	F = 0,9879 p = 0,3384	
Potomstvo na samici	1254,4 ± 1060,7	1152,1 ± 812,6	F = 0,0386 p = 0,8473	
ECl v %	23,1	24,1		
Mortalita larev v %	16,7	0,0		



Graf 5: Růstová křivka – Linie NR

5. Diskuse

Pět populací *S. littoralis* (Boisd.) bylo použito jako model pro hodnocení vývoje necílových herbivorů na bramborových listech obsahujících Cry3Aa. Pokusné housenky byly od pátého instaru krmeny listy kultivaru NLS s obsahem toxinu 1,4 - 2,6 µg/g čerstvé hmoty listu. Kontrolní housenky dostávaly listy kultivaru, který neobsahoval gen pro Cry3Aa, ale jinak byl s NLS izogenní.

V některých případech byl zjištěn průkazný vliv typu listů na některý ze sledovaných parametrů, mezi liniemi však byly rozdíly. Navzdory tomu, že pokusy byly zakládány s hmotnostně homogenními skupinami, v průběhu vývoje housenek došlo k výrazným rozdílům. U klíčových ukazatelů - počty vykladených vajíček a vylíhlého potomstva - však výrazné signifikantní rozdíly mezi skupinami zaznamenány nebyly. Nejvíce průkazných rozdílů bylo u linie SF (nejvyšší dosažená hmotnost, přírůstek váhy, váha kukly, délka pátého instaru, délka vývoje předkukly, délka vývoje kukly). U ostatních linií se objevily průkazné rozdíly v délce vývoje šestého instaru (NC), délce vývoje předkukly (SE), celkové délce vývoje (SE, NC), délce kuklového vývoje (SE, NC) a v množství potomstva na samici (SN). Rozdíl v počtu vylíhlých jedinců u linie SN mohl být způsoben náhodným spárováním nekompatibilních jedinců a nebo neznámými vnějšími faktory. V žádné z dalších linií tento rozdíl zaznamenán nebyl. Navíc u této linie, stejně jako u ostatních testovaných linií, nebyl zaznamenán průkazný rozdíl u žádného ze zkoumaných parametrů mezi samicemi obou skupin. Je nutno poznamenat, že Hussein a kol. (2005) našli u jiné linie *S. littoralis* průkazný rozdíl právě v počtu vykladených vajíček a samozřejmě i v počtu vylíhlých larev další generace.

U žádné linie nebyl pozorován signifikantní vliv kultivaru NLS na rozlišení samic mezi NLS a kontrolou. U všech skupin byly prokázány rozdíly mezi pohlavími v délce vývoje kukly, dále byly zaznamenány rozdíly v hmotnosti kukel (SE, SF, NR), celkové délce vývoje (SE, SF, NR), nejvyšší dosažené hmotnosti (SF, NR), přírůstku váhy (SF, NR), délce vývoje předkukly (SE, SF) a délce šestého instaru (SF).

Krmení kultivarem NLS u všech skupin způsobilo ke konci larválního vývoje mírně vyšší nárůst biomasy než u kontrolních skupin. Výsledky dosažené statistickým zpracováním potvrdily průkazné rozdíly jen u linie SF ($F = 4,7044$; $p = 0,0346$). Vyšší nárůst biomasy může být způsoben lepším využitím potravy, která obsahuje Cry3Aa. Tomu nasvědčují hodnoty ECI, které jsou mírně vyšší při příjmu listů NLS než u listů kontrolních brambor (SE: NLS - 25,6%; kon - 24,2%; SF: NLS - 21,0%; kon - 16,7%;

SN: NLS - 19,8%; kon - 17,9%; NC: NLS - 33,1%; kon - 24,0%). Jediný opačný případ nastal u linie NR (NLS, 23,1%; kon, 24,1%). Velké rozdíly v hodnotách ECI jsou do značné míry způsobené metodickou chybou (např. různé ztráty vody odpařením před vážením listů), do určité míry ale pravděpodobně odrážejí skutečné rozdíly mezi liniemi.

Mezi pěti liniemi *S. littoralis* (Boisd.) se extrémně odlišovala pouze linie SF, která pocházela z mnohaletého laboratorního chovu krmeného umělou potravou s tetracyklinovými antibiotiky. Bramborové listy mohly být pro larvy neplnohodnotnou potravou. Např. alkaloidy přítomné v bramborách mohou v trávicím traktu reagovat s přijímanými aminokyselinami a snižovat jejich vstřebávání. Nedostatek esenciálních aminokyselin může vést k redukci hmotnosti a později také k nižšímu počtu vajíček. To je mnohem pravděpodobnější vysvětlení, než že listy nemají dostatek nutrientů potřebných pro vývoj larev (Hussain a kol., 2005). Housenky linie SF reagovaly na náhlou změnu potravy zvýšením jejího příjmu, nadpočetným larválním svlékáním a v porovnání s ostatními testovanými liniemi i nižším počtem vykladených vajíček. Podobně jako u jiné citlivé linie v našich testech (SN) vykazovaly housenky na listech brambor velmi nízké hodnoty ECI.

Dotton a kol. (2003) sledovali vývoj housenek prvního a druhého instaru na listech postříkaných přípravkem Dipel (Bt varianta *kurstaki*), což je v zemědělství nejrozšířenější preparát Bt. Mortalita a váha housenek ovlivněna nebyla, ale objevil se rozdíl v délce trvání prvního instaru ($p < 0,001$). Podle Salama a kol. (1990) má toxin větší vliv na mladé housenky než na pozdější stádia. V naší studii s housenkami dvou posledních instarů se objevil průkazný rozdíl v délce trvání instaru dvakrát a to u linie SF (délka pátého instaru: $F = 5,0418$; $p = 0,0289$) a NC (délka šestého instaru: $F = 4,1964$; $p = 0,0497$).

Salama a kol. (1983) popsali v hemolymfě housenek *S. littoralis* změny iontových poměrů a obsahu aminokyselin (zvýšení a u jiných naopak snížení množství) v důsledku perorální aplikace Bt kmenů *kurstaki* HD-129 a *entomocidus* HD-635. Vlastním housenkám tyto změny zřejmě nevadí, ale mohou ohrozit jejich predátory. Hilbeck a kol. (1999) ukázali, že housenky *S. littoralis* krmené kukuřicí obsahující Cry1Ab a použité jako výhradní potrava larev zlatoočky způsobí u tohoto predátora zvýšení úmrtnosti. V této studii byla použita i umělá potrava s obsahem Cry1Ab s třicetkrát vyšším než je obsah toxinu v listech kukuřice. Důležitější je však skutečnost, že *Chrysoperla carnea* (Stephens), predátor mnoha hmyzích druhů, dává v přírodě přednost mšicím, jejichž potrava (floém) Cry1Ab vůbec neobsahuje (Raps a kol., 2001).

Podle Romeise a kol. (2004) však představuje Bt kukuřice (respektive Cry1ab toxin) větší pravděpodobnost úhynu a prodloužení vývoje housenek. Snížení jejich počtu a možná i výživné hodnoty může druhotně ovlivnit další složky potravní pyramidy, t.j. predátory a parazitoidy. V přírodě je vliv GM plodin na necílové organizmy komplikován kolísáním obsahu toxinu v rostlině v průběhu vegetační sezóny. U kukuřice byla prokázána nejvyšší exprese toxinu v mladých listech a stoncích na začátku léta, zatímco v průběhu sezóny až do sklizně na podzim velmi rychle klesá (Jehle a Nguyen Thu, 2003; Dutton, 2003). Množství toxinu v rostlině se mění i v závislosti na teplotních a klimatických podmínkách (Habuřtová a kol., 2005).

Data prezentovaná v této práci naznačují, že Cry3Aa nemá vliv na vývoj *S. littoralis* (Boisd.). Statisticky průkazný rozdíl ve dvou klíčových sledovaných faktorech – počet vajíček a potomstva – byl pozorován pouze u jedné linie (SN). Linii SF považují za nejcitlivější, protože u ní bylo pozorováno nejvíce průkazných rozdílů, ale signifikantní rozdíl se neprojevil v plodnosti. Vyšší nárůst biomasy a vyšší hodnoty ECI u skupiny NLS než u kontrol zatím nelze vysvětlit. Výsledky získané u těchto dvou linií jsou natolik odlišné od ostatních tří pokusných linií, že pro potvrzení jejich pravdivosti by bylo vhodné testy zopakovat. Ve svém souboru výsledky ukazují, že necílový druh *S. littoralis* není expresí Cry3Aa v hostitelské rostlině ohrožen.

6. Použitá literatura

Candolfi M, Ahl Goy P., Reber B., Brown K. (2000): Novartis Field Study Results on Potential Effects on Bt-corn on Non-target Arthropods. ESF/AIGM (European Science Foundation). The Environmental Implications of Genetically Modified Plants with Insect Resistance Genes. Workshop. September 2000. Bern. Switzerland

Daly J., Finnegan J., Wilson L., Fitt G., Schellhorn N. (2000): Impact of Bt Cotton – Insect/Plant Interactions. ESF/AIGM (European Science Foundation). The Environmental Implications of Genetically Modified Plants with Insect Resistance Genes. Workshop. September 2000. Bern. Switzerland

Dhillon M. K., Sharma P. D. (2004): Studies on Biology and Behavior of *Earias vittella* (Lepidoptera: Noctuidea) for Mechanism of Resistance in Different citron Genotypes. Crop protection. 23. 235-241

Dutton A., Klein H., Romeis J., Bigler F. (2003): Prey-mediated Effects of *Bacillus thuringiensis* Spray on the Predator *Chrysoperla carnea* in Maize. Biological Control. 26. 209–215

Dutton, A., Romeis J., Bigler F. (2005): Effects of Bt Maize Expressing Cry1Ab and Bt Spray on *Spodoptera littoralis*. Entomologia Experimentalis et Applicata. 114 (3). 161-169

Escriche B., Herrero S., Zhao J. Z., Hilda H. L., Shelton A. M., Ferré J. (2000): Biochemical Base of the Resistance Selection of *Plutella xylostella* with Cry1Ac a Cry1C. ESF/AIGM (European Science Foundation). The Environmental Implications of Genetically Modified Plants with Insect Resistance Genes. Workshop. September 2000. Bern. Switzerland

Habuštová O., Ferit T., Doležal P., Růžička V., Spitzer L., Hussain H. M. (2007): Vliv Bt kukuřice na životní prostředí – tříleté zkušenosti. OILB wprs bulletin. 57-63

Habuštová O., Hussein H., Sehnal F. (2005): Insect communities on maize expressing a Bt-toxin. *Acta Phytotech. Zootech.* 9-11

Hanley A. V., Y Huang Z., Pett W. L. (2003): Effects of Dietary Transgenic Bt Corn Pollen on Larvae of *Apis mellifera* and *Galleria mellonella*. Journal of Apicultural Research. 42(4). 77–81

Head G., Moar W., Eubanks M., Freeman B., Ruberson J., Hagerty A., Turnipseed S. (2005): Multiyear, Large-Scale Comparison of Arthropod Populations on Commercially Managed Bt and Non-Bt Cotton Fields. Entomological Society of America. 1257-1266

Hilbeck, A., Moar W. J., Pusztai-Carey M., Filippini A., Bigler F. (1999): Prey-mediated Effects of Cry1Ab Toxin and Protoxin and Cry2A Protoxin on the Predator *Chrysoperla carnea*. Entomologia Experimentalis et Applicata. 91. 305–316

Hussain H. M., Habuštová O., Sehnal F. (2005): Beetle-specific *Bacillus thuringiensis* Cry3Aa toxin reduces larval growth and curbs reproduction in *Spodoptera littoralis* (Boisd.). Pest Management Science. 61. 1186-1192

Jehle J. A., Nguyen Thu H. (2003): The Seasonal Expression of Cry1Ab in the Transgenic Maize Lines MON810 and NOV176. OBC/wprs working group meeting. Ecological Impact of Genetically Modified Organism. November . 2003. Prague. Czech republic

Kumar M., Singh R. (2002): Potential of *Pongamia glabra* Vent as an Insekticide of Plant Origin. Biological Agriculture and Horticulture. 20. 29-50

Lin Ch., Chen Y., Tzeng Ch., Tesy H., Chen L. (2003): Expression of a *Bacillus thuringiensis* Cry1C Gene in Plastid Confers High Insecticidal Efficacy Against Tobacco Cutworm - a *Spodoptera* insect. Botanical Bulletin of Academia Sinica. 44. 199-210

Lozia G. C., Manachini B. (2000): Field Studies and Laboratory Bioassay of the Effect of BT on Non-target Arthropods. ESF/AIGM (European Science Foundation). The Environmental Implications of Genetically Modified Plants with Insect Resistance Genes. Workshop. September 2000. Bern. Switzerland

Naranjo S. E. (2005): Long-Term Assessment of the Effects of Transgenic *Bt* Cotton on the Abundance of Nontarget Arthropod Natural Enemies. Environmental Entomology. 34(5). 1193-1210

Novartis (1999): Bt-maize and Non-target Organisms Compilation of available data. Basel. 34s

Poza M. de la, Pons X., Farinós G. P., López C., Ortego F., Eizaguirre M., Castañera P., Albajes R. (2005): Impact of Farm-scale Bt Maize on Abundance of Predatory Arthropods in Spain. Crop Protection. 24 (7). 677-684

Raps, A., Kehr, J., Gugerli, P., Moar, W. J., Bigler, F., Hilbeck, A. (2001): Immunological analysis of phloem sap of *Bacillus thuringiensis* corn and of the nontarget herbivore *Rhopalosiphum padi* (Homoptera : Aphididae) for the presence of Cry1Ab. Molecular Ecology. 10. 525-533

Reed G. L., Jensen A. S., Foebe J., Head G., Duan J. J. (2001): Transgenic Bt Potato and Conventional Insecticides for Colorado Potato Beetle Management: Comparative Efficacy and Non-target Impacts. Entomologia Experiment et Applicata. 100. 89-100.

Romeis J., Dutton A., Bigler F. (2004): *Bacillus thuringiensis* toxin (Cry1Ab) Has no Direct Effect on Larva of the Green Lacewing *Chrysoperla carnea* (Stephens) (Neuroptera: Chrysopidae). Journal of Insect Physiology 50 .175–183

Salama H. S., Skaraby A., Ragaiei M. (1983): Chemical Changes in the Haemolymph of *Spodoptera littoralis* [Lep.: Noctuidae] as Affected by *Bacillus thuringiensis*. BioControl. 28. 333-337

Salama H. S., Zaki F. N., Salem S. A., Shams El-Din A. (1990): Comparative Effectiveness of *Bacillus thuringiensis* and Lannata against *Spodoptera littoralis*. Journal of Islamic Academy of Science. 3:4. 325-329

Sehnal F., Habušťová O., Spitzer L., Hussein H.M., Růžička V. (2004) A biannual study on the environmental impact of Bt-maize. *IOBS wprs Bull.* 27, 147-160

Sharma H. C. (2005): *Heliothis/Helicoverpa* Management: Emerging Trends and Strategie for Future Research. Oxford & IBP Publishing Co. Pvt. Ltd. New Delphi. 469

Strizhov N., Keller M., Mathur J., Koncz-Kálmán Z., Bosch D., Prudovsky E., Schell J., Sneh B., Koncz C., Zilberstein A. (1996): A Synthetic Cry I-C gene, Encoding a *Bacillus thuringiensis* endotoxin, confers *Spodoptera* resistance in Alfalfa and Tobacco. (USA). Proceedings of the National Academy of Science. 93.15012-15017

Tabashnik B. (1997): Insect Resistance to BT Revisited. Nature Biotechnology (correspondence). 15.1s

de Vaufleury A., Kramarz P., Binet P., Caul S., Andersen M.N., Cortet J., Plumey E., Coeurdassier, M., Krogh, P.H. (2006): Exposure and Effects Assessments of *Bt* maize on Non-target Organisms (Gastropod, Mycorrhizal Fungi) in a Semi-field Microcosm Experiment. 10th International Conference on Agricultural Biotechnology: Facts, Analysis and Policies, Ravello, Italy, 29 June–2 July

Webové reference:

Bacillus thuringiensis (General fact sheet. National Pesticide Telecommunications network
URL: <<http://npic.orst.edu/factsheets/BTgen.pdf>> [22.2. 2008]

Bacillus thuringiensis. University of California San Diego.
URL: <<http://www.bt.ucsd.edu/>> [15.3. 2008]

CABI and EPPO for the EU under Contract 90/399003: Data Sheets on Quarantine Pests *Spodoptera littoralis* and *Spodoptera litura*: 7s
Dostupné z URL:
<http://www.eppo.org/QUARANTINE/insects/Spodoptera_litura/PRODLI_ds.pdf>
[9. 3. 2008]

Húsenice motýľov. Plantpro.
URL: <http://www.plantprotection.hu/modulok/szlovak/paprika/caterpillars_pap.htm>
[12.3. 2008]

Hynek Fajmon. GMO, EU, USA, WTO a budoucnost českého zemědělství. Virtually názorový internetový deník
URL: <<http://www.virtually.cz/index.php?art=11056>> [12.3. 2008]

Spodoptera littoralis (Boisduval). HYPP Zoology
URL: <<http://www.inra.fr/hyppz/RAVAGEUR/6spolit.htm>> [12.3. 2008]

ELISA. Wikipedia.

URL: <<http://cs.wikipedia.org/wiki/ELISA>> [10.4. 2008]

Uvedené fotografie vyhotovila Jana Husáková (kromě Obr. 3).