

Škola doktorských studií v biologických vědách

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Přírodovědecká fakulta

Vliv GM kukuřice na entomofaunu

Disertační práce

Mgr. Zdeňka Svobodová

Školitel: prof. RNDr. František Sehnal CSc.

Entomologický ústav, Biologické centrum Akademie věd ČR v.v.i.
Přírodovědecká Fakulta, Jihočeská Univerzita v Českých Budějovicích

Školitelka specialista: Ing. Oxana Skoková Habuštová Ph.D.

Entomologický ústav, Biologické centrum Akademie věd ČR v.v.i.

České Budějovice 2016

Tato disertační práce by měla být citována jako:

Svobodová Z. (2016): Vliv GM kukuřice na entomofaunu. [Effect of GM maize on entomofauna. Ph.D. thesis, in Czech.] Série Ph.D. prací, č. 1. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Přírodovědecká fakulta, Škola doktorských studií v biologických vědách, České Budějovice, Česká republika, 156 stran.

■ ■ **Anotace**

Presented thesis examines possible environmental impact of the genetically modified (GM) maize expressing insecticidal Cry proteins. The impact was assessed from differences in the communities of the ground and above-ground arthropods in plots sown with the standard and the GM maize, respectively. The results revealed that neither the abundance nor the species richness of arthropods was affected. Laboratory experiments were used to study effect of maize expressing several types of Cry proteins on the arthropod predators. Despite the proven exposure of the predators to Cry proteins in the food, no Cry proteins accumulation and deleterious effects on predators were observed. The results confirm the importance of predators in insect resistance management using the GM maize seed blends method.

■ ■ **Prohlášení**

Prohlašuji, že svoji disertační práci jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své disertační práce, a to v úpravě vzniklé vypuštěním vyznačených částí archivovaných Přírodovědeckou fakultou elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

České Budějovice, 11. 1. 2016

.....
Zdeňka Svobodová

Tato práce vznikla z partnerství Přírodovědecké fakulty Jihočeské univerzity a Entomologického ústavu Biologického centra Akademie věd ČR, podporujícího postgraduální studium ve studijním oboru Biologie ekosystémů.



Přírodovědecká
fakulta
Faculty
of Science



BIOLOGICKÉ
CENTRUM
AV ČR, v. v. i.

■ Finanční podpora

Tato práce byla podpořena grantem QH91093 z Národní agentury pro zemědělský výzkum a projektem 13.228 z fondu na stipendia Sciex-NMS^{ch} (Scientific Exchange Program between Switzerland and the New Member States of the EU). Institucionální podporu poskytl Entomologický ústav BC AV ČR v.v.i. (RVO:60077344), Oddělení entomologie na Univerzitě v Minnesotě (USA) a Institut pro udržitelný rozvoj v zemědělství, Agroscope v Curychu (Švýcarsko). Můj pobyt na Univerzitě v Minnesotě byl podpořen z grantové agentury Jihočeské univerzity (038/2014/P) a projektem č. P502/11/1471 z Grantové agentury ČR.

■ Poděkování

Děkuji především Oxaně Skokové Habuštové za přátelský přístup, trpělivost, odborné vedení, a čas, který mi věnovala. Bez Oxaniny pomoci by nejen nevznikla tato práce, ale hlavně bych rozhodně nedošla ve svém (vědeckém) životě tam, kde jsem teď. Zvláštní poděkování patří též prof. Františku Sehnalovi za zásadní pomoc s publikační činností a mnohými dalšími aktivitami v průběhu mého studia. Ráda bych poděkovala i Zdeňkovi Faltýnkovi Fricovi, prof. Janu Frouzovi, Pavlovi Jedličkovi, prof. Daliborovi Kodríkovi, Janu Okrouhlíkovi, Lukáši Spitzerovi, Vladimírovi Půžovi, Vlastimilovi Růžičkovi, Radce Tanzer Fabiánové, Konstantinovi Vinokurovi a Jiřímu Zelenému za jejich cenné rady, pomoc v neřešitelných situacích a spolupráci. Dále jsem velice vděčná týmům na Univerzitě v Minnesotě a v Agroscope v Curychu za jejich vlídné přijetí a příjemnou atmosféru v průběhu mých stáží. V neposlední řadě děkuji také svému tatínkovi a celé rodině za jejich neustálý zájem o mou práci a humor, se kterým mi pomáhají vypořádat se s nástrahami v životě mladé vědecké pracovnice. Děkuji také svému příteli za podporu, pomoc a trpělivost (nejen s mými uživatelskými schopnostmi v oboru IT).

■ Seznam publikací a příspěvků autorky

Disertační práce je založena na následujících publikacích (řazeno chronologicky):

- I. **Svobodová Z.**, Habušťová O., Sehnal F., Holec M., Hussein H.M. (2013): Epigeic spiders are not affected by the genetically modified maize MON 88017. *Journal of Applied Entomology* 137(1–2): 56–67 (IF = 1.650).
Zdeňka Svobodová se podílela na odběru a třídění vzorků. Byla zodpovědná za statistické zpracování výsledků a napsání první verze rukopisu.

- II. **Svobodová Z.**, Skoková Habušťová O., Hutchison W.D., Hussein H.M., Sehnal F. (2015): Risk assessment of genetically engineered maize resistant to *Diabrotica* spp.: influence on above-ground arthropods in the Czech Republic. *PLoS ONE* 10(6): e0130656 (IF = 3.234).
Zdeňka Svobodová se podílela na odběru a třídění vzorků. Byla zodpovědná za statistické zpracování výsledků a napsání první verze rukopisu.

- III. **Svobodová Z.**, Skoková Habušťová O., Boháč J., Sehnal F.: Functional diversity of staphylinid beetles (Coleoptera: Staphylinidae) in maize fields: testing the possible effect of genetically modified, insect resistant maize. Přijato v *Bulletin of Entomological Research* (IF = 1.910).
Zdeňka Svobodová se podílela na odběru a třídění vzorků. Byla zodpovědná za statistické zpracování výsledků a napsání první verze rukopisu.

- IV. **Svobodová Z.**, Burkness E.C., Skoková Habušťová O., Hutchison W.D.: Predator preference for Bt-fed prey: Implications for insect resistance management in Bt maize seed blends. Rukopis.
Zdeňka Svobodová se podílela na designu experimentů a byla zodpovědná za provedení práce, statistické zpracování a napsání první verze rukopisu.

- V. **Svobodová Z.**, Romeis J., Skoková Habuřtová O., Meissle M.: Transfer of insecticidal Cry proteins from stacked Bt maize along the trophic chain. Rukopis.

Zdeňka Svobodová se podílela na designu experimentů a byla zodpovědná za provedení práce, statistické zpracování a napsání první verze rukopisu.

Spoluautoři potvrzují, že se Zdeňka Svobodová významně podílela na sestavování publikací uvedených výše tak, jak je uvedeno v prohlášeních u jednotlivých publikací.

.....
prof. RNDr. František Sehnal CSc.

.....
Ing. Oxana Skoková Habuřtová Ph.D.

■ **Obsah**

1. Úvod	
1.1. Pěstování geneticky modifikovaných plodin ve světě	1
1.2. Původ insekticidního transgenu a mechanismus účinku exprimovaného Cry proteinu	2
1.3. Exprese transgenu a detekce Bt plodin v komerční sféře	3
1.4. Design laboratorních experimentů a polních studií	4
1.5. Sledování vlivu Cry proteinů na necílové druhy bezobratlých	6
1.5.1. Herbivoři	7
1.5.2. Predátoři	8
1.5.3. Parazitoidi	9
1.5.4. Opylovači	9
1.5.5. Půdní fauna a degradace Cry proteinu v půdě	10
1.5.6. Vodní bezobratlí	11
1.5.7. Vyšší živočichové	11
1.6. Problémy spojené s pěstováním Bt plodin	12
1.6.1. Zvýšení abundance sekundárních škůdců	12
1.6.2. Rezistence cílových druhů	12
1.7. Předmět výzkumu, stanovení cílů a hypotéz	13
2. Výsledky	15
2.1. Publikace I	15
2.2. Publikace II	16
2.3. Publikace III	17
2.4. Publikace IV	18
2.5. Publikace V	19
3. Diskuze, závěr a perspektivy dalšího výzkumu	20
3.1. Hodnocení vlivu Bt kukuřice na necílové druhy bezobratlých (Publikace I, II a III)	20
3.2. Hodnocení vlivu Bt kukuřice na vybrané druhy predátorů v laboratoři a transfer Cry proteinů v potravním řetězci (Publikace IV a V)	22
4. Citovaná literatura	25
5. Publikace	37
5.1. Publikace I	37
5.2. Publikace II	50
5.3. Publikace III	68
5.4. Publikace IV	104
5.5. Publikace V	130

1. Úvod

1.1. Pěstování geneticky modifikovaných plodin ve světě

Genetická transformace umožňuje vložit do genomu rostlin gen pocházející ze zcela nepříbuzného organismu, např. z bakterie. První úspěšně transformovanou rostlinou byl v roce 1987 tabák (Vaeck et al. 1987) a první geneticky modifikovanou (GM) plodinou uvedenou na trh byla v roce 1996 kukuřice (Yu et al. 2011). Od té doby se rozloha, na níž jsou GM plodiny pěstovány, stále rozrůstá. Nejrozšířenější je sója, kukuřice, bavlník a řepka. Plodiny tolerantní k herbicidům a resistantní vůči škůdcům převažují, ovšem začínají se objevovat i další komerčně využitelné GM plodiny, např. s odolností proti suchu.

Ze stonásobného nárůstu oseté plochy mezi roky 1996 a 2014 jasně vyplývá, že jsou GM plodiny nejrychleji přijímanou technologií v historii moderního zemědělství (James 2014). V roce 2014 se GM plodiny pěstovaly ve 28 zemích. Největší výměry bylo dosaženo v USA, Brazílii a Argentíně; Česká republika byla se svými 1754 ha na 24. místě. Meziročně se plocha s GM rostlinami zvyšuje průměrně o 10 %, avšak v Evropě dochází naopak k poklesu (James 2014). Dovoz i použití GM produktů je zde omezeno a administrativně dosti ztíženo (Ricroch et al. 2015). Doposud byly pro pěstování v Evropské unii (EU) schváleny pouze dvě GM plodiny, a to v roce 1998 kukuřice odolná vůči zavíječi kukuřičnému (*Ostrinia nubilalis*) a v roce 2009 brambor se zablokovanou syntézou polysacharidu amylozy, který je pro průmyslové zpracování méně vhodný než amylopektin.

Po 19 letech zkušeností s komerčním pěstováním se objevují rozsáhlé meta-analýzy, které hodnotí pěstování GM plodin z ekonomického hlediska. Klümper & Qaim (2014) ukázaly, že pěstováním GM plodin došlo ke snížení používání pesticidů v průměru o 37 %, výnosy vzrostly o 22 % a pěstitelům se zvýšil zisk o 68 %. Vyšší výnos a snížení množství pesticidů jsou znatelnější u plodin rezistentních vůči hmyzu než u plodin tolerantních k herbicidům. Zvýšení výnosu a zisku je znatelnější v rozvojových zemích než ve vyspělých zemích. Pěstitelé GM plodin se přímo podílejí na snížení výskytu škůdců (Hutchison et al. 2010) a na snížení sekundárních nákaz souvisejících s napadením cílovými škůdci. Např. u jediné povolené GM odrůdy kukuřice v EU byl pozitivní vliv na zlepšení kvality zemědělských produktů jasně prokázán. Díky eliminaci poškození zavíječem kukuřičným nedochází k sekundárnímu napadení rostlin houbami, v našich podmínkách nejčastěji rodu *Fusarium*, v místě požerku, což významně snižuje množství nebezpečných mykotoxinů v zemědělských produktech (Nedělník 2010). GM plodiny jsou proto považovány nejen za důležitou součást

integrované ochrany rostlin, ale i za způsob zvýšení zdravotní bezpečnosti potravin a krmiv (Yu et al. 2011).

1.2. Původ insekticidního transgenů a mechanismus účinku exprimovaného Cry proteinu

Nejrozšířenějším produktem genového inženýrství k ochraně rostlin proti hmyzím škůdcům je skupina transgenů (geny přenesené z jednoho organismu do druhého) pocházejících z krystalových inkluzí (proto Cry), které tvoří při sporulaci aerobní ubikvistní půdní bakterie *Bacillus thuringiensis* (Bt, proto Bt plodiny) ze skupiny *Bacillus cereus* (Pigott et al. 2007). Insekticidní funkce spor této bakterie je známa již od začátku 20. století. První insekticid na bázi Bt byl použit v roce 1938 ve Francii a dnes tvoří 90 % komerčně využívaných biopesticidů (Gao et al. 2011). Jednotlivé sérotypy Bt produkují odlišné proteiny, které působí specificky na různé skupiny hmyzu: Cry1 na Lepidoptera, Cry2 na Lepidoptera a Diptera, Cry3 na Coleoptera, Cry4 na Diptera a Cry5 na Lepidoptera a Coleoptera. Fylogenetická analýza prokázala, že rozmanitost Cry proteinů se vyvíjela jako důsledek nezávislé evoluce tří domén zajišťujících funkčnost proteinu a jejich vzájemné dislokace (Bravo et al. 2007).

Ke Cry proteinům jsou citlivá nedospělá stádia holometabolního hmyzu (Glare & O'Callaghan 2000) především larvy nejmladších instarů (Álvarez-Alfageme et al. 2011). Každé zjištění vlivu na dospělá stádia je pečlivě sledováno (Romeis et al. 2011). V jedné studii byl např. zaznamenán vliv Cry3Bb1 na přežívání samců a hmotnost a plodnost samic bázlivce kukuřičného (*Diabrotica virgifera virgifera*) (Meissle et al. 2011), avšak jiné studie účinek na dospělé nepotvrdily (Al-Deeb & Wilde 2005, Nowatzki et al. 2006).

Ve sporách Bt jsou Cry proteiny uloženy jako prototoxiny, které se aktivují odštěpením N- a C- konce působením proteáz v zažívacím traktu hmyzu (Rausell et al. 2007). Po překonání peritrofické membrány se aktivovaný protein naváže v epitelu na specifické receptorové proteiny na mikroklcích – kadheriny. Potvrzení úlohy kadherinu při aktivaci Cry proteinů u motýlů (Gómez et al. 2007), komára *Aedes aegypti* (Chen et al. 2009a) a brouka potemníka moučného (*Tenebrio molitor*) (Fabrick et al. 2009) naznačuje, že jsou kadheriny pro funkčnost Cry proteinů obecně důležité (Gao et al. 2011). Specifičnost Cry proteinů pravděpodobně spočívá ve velké mezidruhové rozmanitosti kadherinů. Například Cry1A je vysoce účinný proti *Heliothis virescens* ale proti *Helicoverpa zea*, což je rovněž škůdce z čeledi Noctuidae, se musí pro úplnou ochranu použít i insekticid (Chen et al. 2007).

Bravo et al. (2004) navrhli model mechanismu působení Cry proteinů. Model předpokládá, že Cry protein navázaný na kadherin podmiňuje částečnou proteolýzu nutnou k oligomerizaci Cry proteinu. Vzniklé oligomery jsou vysoce afinitní k aminopeptidázám nebo alkalickým fosfatázám vázaným k membráně glykosylfosfatidylinositolovou kotvou. Oblasti buněčné membrány s vysokým výskytem těchto receptorů (lipidové rafty) mají zásadní význam pro životně důležité buněčné funkce (signální procesy a membránový transport). Právě zde dochází k inzerci oligomerů do buněčné membrány, jejichž následkem je otevření kanálů pro K⁺ ionty, vznik pórů a lyze buňky způsobená osmotickým šokem. Hmyz pak obvykle hyne na následnou sepsi nebo vyhladovění do 2 až 5 dnů. Alternativní model účinnosti spočívá ve vazbě monomeru Cry proteinu na kadherin, která spustí specifickou vnitrobuněčnou odpověď vedoucí k buněčné smrti (Zhang et al. 2005).

Podrobněji je proces aktivizace zatím znám jen u Cry1Ac: Po jeho navázání na kadherin dojde k odštěpení části molekuly a tím k aktivaci proteinu; vznikne oligomer ze čtyř molekul, který se naváže na sekundární receptor popsany výše (Krishnamoorthy et al. 2007). Mechanismus působení jiných typů Cry proteinů však může být odlišný. Bylo například zjištěno, že aminopeptidázy neslouží jako receptory pro Cry3Aa protein (Rausell et al. 2007).

V laboratořích jsou kromě Bt plodin vyvíjeny i plodiny, jejichž rezistence vůči herbivornímu hmyzu je založena na expresi inhibitorů proteáz (Kodrík et al. 2013) lektinů či RNAi (Baum et al. 2007). Dosud však nebyla žádná plodina takových vlastností komercializována. V současné době jsou spíše propagovány a stále více využívány Bt plodiny s více Cry proteiny, popřípadě v kombinaci s tolerancí k herbicidu/ům. USA je jedinými státem, který pěstuje GM kukuřici s osmi transgeny. Šest exprimuje Cry proteiny účinné proti škůdcům z řádu motýlů (Lepidoptera) (Svobodová et al. 2015) a brouků (Coleoptera) (Head et al. 2014) a dva zaručující toleranci vůči herbicidům na bázi glyfosátu a glufusínátu.

1.3. Exprese transgenů a detekce Bt plodin

U většiny Bt plodin je exprese transgenů řízena silným konstitutivním promotorem (např. 35S promotor viru kvěťákové mozaiky) (Bakó et al. 2011). Rozdíl může být v dalších regulačních sekvencích, které zajišťují například tkáňovou specifitu. Např. MON 88017 a MON 863 obsahují stejné inserty – Cry3Bb1, avšak novější MON 88017 exprimuje Cry3Bb1 ve vláskách čtyřikrát více a v pylu čtyřikrát méně než MON 863 (Meissle et al. 2011).

Nguyen v německém Neustadtu se dlouhodobě zabývá expresí genů pro Cry proteiny v plodinách. Podle jejích výsledků je exprese ve skleníku shodná s expresí na poli a závisí na růstové fázi kukuřice a typu rostlinné tkáně (Nguyen & Jehle 2007, 2009, Nguyen et al. 2008).

Pro detekci transgenů či jeho produktu se používá polymerázová řetězová reakce (PCR), délkový polymorfismus restrikčních fragmentů (RFLP), Southernova hybridizace, DNA sekvenování a imunologická metoda ELISA. Detekce Bt plodin je stále metodicky problematická avšak v EU nutná, protože většina obyvatel EU nepovažuje GM plodiny za rovnocenné s konvenčními plodinami a požaduje značení a především kontrolu zemědělských produktů dovážených ze zemí, kde nejsou kritéria pro zacházení s GM plodinami a jejich produkty tak přísná (Wang et al. 2007).

1.4. Design laboratorních experimentů a polních studií

Vývoj a využití GM plodin vyvolalo u široké veřejnosti řadu otázek, na které musí vědecká sféra přesvědčivě odpovídat. Výzkum v této oblasti je proto pečlivě sledován. Je kladen důraz na striktní dodržování předepsaných protokolů, protože zjištění negativního vlivu GM plodin, byť i dalším výzkumem vyvrácené, bývá příčinou rychlé byrokratické akce (např. zákaz GM plodin v Německu). Vědečtí pracovníci se intenzivně věnují možnosti šíření transgenů nebo jejich produktů, perzistenci a akumulaci produktů v životním prostředí, případným nežádoucím vlivům GM plodin na biotické a abiotické složky ekosystému a možnému vlivu GM plodin a jejich produktů na lidské zdraví.

Předmětem této práce je sledování vlivu geneticky modifikovaných Bt plodin exprimujících insekticidní Cry proteiny na necílové druhy bezobratlých. Prvním krokem při hodnocení možného environmentálního rizika spočívá ve vystavení studovaných organismů koncentracím transgenního proteinu, které odpovídají nebo převyšují koncentrace, se kterými se může organismus pravděpodobně setkat v polních podmínkách (nejhorší možný scénář). Základní testy jsou stejné, jako při testování toxicity jiných látek v kontrolovaných laboratorních podmínkách. Pokud není zjištěn žádný statisticky významný účinek, přicházejí na řadu polní pokusy, při kterých je přirozené společenstvo agroecosystému vystaveno expresi transgenů ovlivněné proměnlivými podmínkami životního prostředí. Pro získání validních výsledků je důležité plánovat polní pokusy v místech zajišťujících vysokou expresi transgenů a reprezentující určitou geografickou oblast. Nutné je užívání validních metod odchytu bezobratlých (blíže např. Schirmel et al. 2010). Polní pokusy poskytují, na rozdíl od laboratorních testů, více informací o

ekologických vztazích a jejich případných změnách v porostu Bt plodin. V případě potřeby jsou podle situací, které mohou nastat v reálném společenstvu v agroekosystému, navrženy další laboratorní experimenty simulující tyto scénáře.

Studované organismy musí splňovat několik základních podmínek, jako je citlivost ke změnám životního prostředí (tzv. bioindikátory), musí se v agroekosystému vyskytovat v dostatečném množství a musí jít o skupiny snadno rozpoznatelné (Leslie et al. 2009). Spektrum testovaných druhů musí reprezentovat taxonomickou i funkční diverzitu (zástupci herbivorů, predátorů, parazitoidů, opylovačů i edafonu) a všechny habitaty agroekosystému (podzemní, epigeičtí, létající a na rostlinách se vyskytující bezobratlí). Měly by být sledovány i druhy s určitou kulturní či estetickou hodnotou včetně druhů ohrožených. V případě laboratorních testů doporučuje Evropská a středozemní organizace ochrany rostlin (EPPO) a Testovací skupina pro registraci užitečných členovců (BART) užívat populace členovců chované dlouhodobě v laboratoři, čímž se zajišťuje opakovatelnost výsledků (Romeis et al. 2011, Yu et al. 2011).

Typickými sledovanými parametry jsou: mortalita (LD_{50} či LC_{50}), plodnost, délka vývoje a přírůstky hmotnosti. Důležité je sledovat negativní kontrolu, ze které se dá vydedukovat, zda na pokusné organismy nepůsobí přídatný stresový faktor. Při pokusech je možno použít i pozitivní kontrolu, tedy jinou látku obecně známou svou toxicitou vůči testovanému organismu, pomocí níž je zjišťováno, zda je možné u daného organismu zjistit subletální projevy intoxikace (Álvarez-Alfageme et al. 2011). Doporučená je také délka pokusu – minimálně 5 dní, ale preferuje se spíše 7 – 14 dní.

Při laboratorních pokusech jsou většinou testované organismy krmeny pouze určitým typem potravy (s Cry proteinem nebo bez něho), což může být pro některé druhy (generalisty) nepřirozené. V tomto případě taktéž hovoříme o navození nejhoršího možného scénáře (Romeis et al. 2011, Yu et al. 2011). Cry protein může být v laboratoři přidán do umělé potravy, medového roztoku, vstříknut do kořisti, aplikován na kořist nebo může být kořist krmna potravou s obsahem Cry proteinu. Použití čistého Cry proteinu v definované potravě eliminuje vliv případných nutritivních a jiných rozdílů mezi GM a kontrolním (izogenním, tedy mateřským) hybridem (Saxena & Stotzky 2001) a umožňuje ověření jeho stability (Meissle et al. 2011). Při polních pokusech se určitým rozdílem mezi Bt a izogenním hybridem nevyhneme, navíc může být problém s odlišnou úpravou osiva. Například semena Bt plodin s insertem pro Cry3 protein mohou být ošetřena neonikotinoidem pro kontrolu sekundárních škůdců

a tato skutečnost pak může mít vliv na výsledky studie. Právě u neonikotinoиду byl zjištěn negativní vliv na střevlíky (Mullin et al. 2005, Leslie et al. 2009).

Vlastní design experimentu a znalost biologie použitých druhů bezobratlých jsou důležitým faktorem. Schmidt et al. (2009) zjistili vyšší mortalitu slunéčka *Adalia bipunctata* vystaveného Cry proteinu. Práci však byl vytknut špatný design, nejasnosti v metodice a hlavně chybění některých údajů. Schmidt et al. (2009) aplikovali neověřené množství Cry proteinu na povrch vajíček *Ephestia kuehniella*, které pak byly nabídnuty jako potrava slunéčku. Vzhledem k tomu, že slunéčka prokazatelně vajíčka propichují a živí se obsahem, kdežto obal zůstává netknutý (Álvarez-Alfageme et al. 2011), je jasné, že příčinný vztah mezi pozorovanou mortalitou a Cry proteinem je přinejmenším diskutabilní a v pozdějších studiích nepotvrzený (Álvarez-Alfageme et al. 2011).

Správná interpretace výsledků je při sledování vlivu na jednotlivé trofické úrovně zásadní. V polních studiích je důležité odlišit přímo vliv Cry proteinu od závislosti abundance predátora či parazitoida na přítomnosti kořisti (cílového škůdce Cry proteinu) a v laboratorních experimentech vliv nutriční kvality kořisti (cílového škůdce) na fitness predátora či parazitoida. Například Riddick et al. (1998) zaznamenal snížení abundance střevlíka *Lebia grandis* specializovaného na mandelinku bramborovou (*Leptinotarsa decemlineata*) na poli s Bt bramborem odolným vůči mandelince. Snížení abundance tohoto střevlíka bylo druhotným důsledkem inzerce genu pro Cry protein do rostliny bramboru nikoliv výsledkem jeho přímého toxického účinku. V některých laboratorních studiích byl pozorován vliv na predátory a parazitoidy, avšak později bylo prokázáno, že se jedná o případy, kdy byly studované organismy vystaveny nutričně nekvalitnímu zdroji potravy (cíloví škůdci vystavení Cry proteinům) (Romeis et al. 2011, 2014, Yu et al. 2011).

1.5. Sledování vlivu Cry proteinů na necílové druhy bezobratlých

Necílové druhy bezobratlých se mohou s Cry proteinem dostat do kontaktu přímo žírem na Bt rostlině, přes kořist, která může být necílovým nebo cílovým škůdcem nebo se může Cry protein nacházet v okolním prostředí (půda, voda) (Leslie et al. 2009). Některé druhy přijdou do kontaktu s Cry proteinem s vyšší a jiné s nižší pravděpodobností. Mšice jsou například známy tím, že Cry proteiny neobsahují, nebo jen v malém množství, takže jejich specifictví predátorů a parazitoidů jsou méně ohroženi než přirození nepřátelé svlušek, u kterých byl naopak vysoký obsah Cry proteinu v těle potvrzen (viz. dále). Také opylovači jsou

méně ohroženou skupinou, protože transgen se většinou v pylových zrnech exprimuje ve velice malém množství nebo vůbec.

1.5.1. Herbivoři

V laboratorních experimentech se herbivoři spíše než jako samostatně studované objekty objevují jako prostředníci pro expozici přirozených nepřátel (predátorů, parazitoidů) Cry proteinům. Abundance herbivorů se sleduje v polních studiích. V necílových druzích herbivorů a v rezistentních kmenech původně senzitivních druhů byl prokázán rozklad Cry proteinů (Rausell et al. 2007), ale i přesto se Cry protein v tělech herbivorů nachází v aktivním stavu (Lawo et al. 2010, Meissle & Romeis 2009a) a aktivní protein je možné zaznamenat i v exkrementech (Zurbrügg & Nentwig 2009), což podporuje myšlenku expozice třetí trofické úrovně Cry proteinům.

Fytofágní organismy živící se Bt plodinami jsou sice v přímé blízkosti produktu transgenu, avšak vzhledem k různým potravním specializacím ne vždy Cry protein konzumují. Mšice jsou jednou z nejčastějších skupin herbivorů na kukuřici. V tělech mšic byl Cry protein detekován jen v některých případech a to ve velmi nízkém množství, což souvisí s nepřítomností Cry proteinu ve floému, kterým se mšice živí (Raps et al. 2001, Ramirez-Romero et al. 2008, Romeis & Meissle 2011). Studie potvrzují, že život na Bt rostlinách nemá vliv na jejich životní projevy (Ramirez-Romero et al. 2008, Lumbierres et al. 2011).

V tělech svlušek chmelových (*Tetranychus urticae*) byl naopak aktivní protein nalezen i v koncentracích převyšující hodnoty v listech (Álvarez-Alfageme et al. 2008, Torres & Ruberson 2008), což se vysvětluje tím, že se svlušky živí obsahem buněk mezofylu, kde je obsah Cry proteinů vysoký. Vliv na sledované parametry jejich vývoje zaznamenán nebyl ani po několika generacích (Dutton et al. 2002, Li & Romeis 2010, Álvarez-Alfageme et al. 2011). Zemková Rovenská et al. (2005) u svlušek zaznamenala preferenci listů Bt plodiny exprimující Cry3Bb1 pro kladení vajíček a Svobodová et al. (2013b) nejvyšší počet nakladených vajíček (signifikantně vyšší v porovnání s referenčním hybridem).

Cry proteiny v koncentracích nižších než u svlušek ale vyšších než u mšic jsou detekovány u herbivorů živících se celou rostlinou hmotou, např. u můry rodu *Spodoptera* (Dutra et al. 2012, Svobodová et al. 2015). Zurbrügg & Nentwig (2009) detekovali Cry3Bb1 a Cry1Ab v tělech i exkrementech dvou druhů slimáků *Arion lusitanicus* a *Deroceras reticulatum*, běžných škůdců a kořistí stěvlíků, pavouků, ptáků a ježků. Kramarz et al (2009) zjistil vliv Cry proteinu na vývoj a plodnost hlemýžďe *Cantareus aspersus*, ale v jeho práci jsou určité nejasnosti a

nepřesnosti. Rauschen et al. (2009) nezjistil žádný vliv Bt kukuřice (Cry3Bb1) na plošticu *Trigonotylus caelestialium*, i když v jejich těle byl Cry protein nalezen. Ani herbivorní brouci *Epilachna vigintioctopunctata* (Coccinellidae) a *Galerucella vittaticolis* (Chrysomelidae) nebyli ovlivněni konzumací Cry3Bb1 proteinu v pylu (Shirai et al. 2006).

Výsledky z polních experimentů ukazují podobnou abundanci herbivorů v porostech Bt plodin a izogenních hybridů (např. Bhatti et al. 2005a). Objevují se ale i publikace popisující vyšší abundanci na Bt plodinách, jedná se však většinou o nesignifikantní nebo nekonzistentní výsledky (viz. 1.6.1.). Eizaguirre et al. (2006) a Habuštová et al. (2014) ukázali nesignifikantně vyšší abundanci mšic, křísků a třásněnek v porostu Bt kukuřice.

1.5.2. Predátoři

Slunéčka, hladěnky, drabčící, pavouci, střevlíci, draví roztoči a další predátoři jsou důležitou skupinou v agrocenózách, protože jsou schopni ovlivňovat dynamiku populací svých kořistí. I v jejich tělech byly Cry proteiny zjištěny, např. v těle drabčička *Atheta coriaria* (García et al. 2010, 2012) či slunéčka *Adalia bipunctata* krmených sviluškou chmelovou (Álvarez-Alfageme et al. 2011). Množství aktivního Cry proteinu se v trofickém řetězci snižuje velmi rychle a v predátorech se detekuje méně jak 10 % původně aktivního Cry proteinu (Álvarez-Alfageme et al. 2008, 2011, Meissle & Romeis 2009b, Meissle & Romeis 2012, Tian et al. 2013, 2014).

Negativní vliv na predátory byl zaznamenán jen v těch případech, kdy byl jako zdroj Cry proteinu užit cílový druh, který představoval nutričně nekvalitní zdroj potravy (Chen et al. 2009b, Lawo et al. 2010). Žádný vliv nebyl zaznamenán při použití kořisti necitlivé k danému Cry proteinu a v mnoha případech ani při použití kořisti s prokazatelnou reakcí na Cry proteiny (subletální vliv). Tyto výsledky byly získány u zlatooček (Davidson et al. 2006b, Romeis et al. 2014), roztoče *Neoseiulus cucumeris* (Obrist et al. 2006), pavouka *Theridion impressum* (Meissle & Romeis 2009b), drabčička *Atheta coriaria* (García et al. 2010, 2012), střevlíka *Poecilus cupreus* (Álvarez-Alfageme et al. 2009) a u slunéčka *Adalia bipunctata* (Álvarez-Alfageme et al. 2011) a *Harmonia axyridis* (Svobodová et al. 2013a). U slunéčka *Stethorus punctillum* byla dokonce zaznamenána na potravě s obsahem Cry3Bb1 větší plodnost a kratší období před kladením vajíček (Li & Romeis 2010). Tian et al. 2013, 2014 použili ve svých experimentech resistantní kmeny kořisti původně citlivých druhů a ukázali tak bezpečnost Cry proteinu pro zlatoočku a predátory z řádu polokřídých.

Negativní efekt nebyl zaznamenán ani při podávání čistého Cry proteinu v potravě predátorům *Crysoperla carnea* (Li et al. 2008), *Coleomegilla maculata* (Duan et al. 2002), *Stethorus punctillum* (Álvarez-alfageme et al. 2008), larvy *Poecilus chalcites* (Duan et al. 2006), *Orius insidiosus* (Duan et al. 2008b, Al-Deeb & Wilde 2003) a ani při kmení Bt pylem nebyly ovlivněny životní projevy 10 druhů střevlíků zkoumaných Mullinem et al. (2005) a slunéčka *Coleomegilla maculata* (Lundgren & Wiedenmann 2002).

Abundance *Coleomegilla maculata* (McManus et al. 2005) a dalších druhů predátorů nebyla v polních podmínkách rozdílná mezi porostem izogenních a Bt plodin (Ahmad et al. 2005, Bhatti et al. 2005a,b, Eizaguirre et al. 2006, Ludy & Lang 2006, Schorling & Freier 2006, Higgins et al. 2009, Skoková Habuštová et al. 2015).

1.5.3. Parazitoidi

Negativní efekt na parametry přežívání byl opět pozorován pouze v případech, kdy byl jako hostitelský organismus vybrán sensitivní druh, který představuje méně kvalitní zdroj potravy (Liu et al. 2005b, Vojtech et al. 2005, Yang et al. 2005, Ramirez-Romero et al. 2006, Chen et al. 2008). Ale v případě lumčíka *Apanteles subandinus* bylo procento parazitismu a následně i procento potomků vzešlých z dospělců, kteří se vyvinuly na kořisti citlivé k Bt proteinu stejné jako u jedinců, kteří se vyvinuly na kořisti krmené kontrolními rostlinami bramboru (Davidson et al. 2006a). Při laboratorních experimentech nebyl zjištěn vliv přítomnosti Cry proteinu v kořistech, které byly necílové pro Cry proteiny na parazitické vosičky *Encarsia formosa*, mšicomary *Aphidius ervi* (Steinbrecher 2004). Bt kukuřice neovlivnila ani vztah mšic a parazitoidů v polním experimentu (Lumbierres et al. 2011).

Právě parazitoidi jsou vzhledem k jejich úzké specializaci nejohroženější skupinou a často jsou v porostech s Bt plodinami nalézáni v menší míře, protože jsou opravdu ovlivněni úbytkem hostitele, případně jeho dramaticky sníženou fitness (Romeis et al. 2006, Wolfenbarger et al. 2008).

1.5.4. Opylovači

Pyl je díky svým vysokým nutričním hodnotám častou potravou mnoha druhů bezobratlých (Meissle et al. 2011). Ve snaze učinit Bt plodiny bezpečné pro tyto necílové organizmy, je exprese Cry proteinů v pylu recentně užívaných Bt plodin nízká. Zásadní pozornost v tomto ohledu je věnována opylovačům, jakožto krucální složce agroekosystému, i když např. pro pěstování kukuřice, druhé

nejčastěji pěstované GM plodině, přímo důležité nejsou. Vzhledem k významu včel bylo provedeno velké množství testů. Nebyl pozorován žádný vliv na parametry jako je délka vývoje, chování, vývoj hypofaryngeálních žláz, řadu důležitých fyziologických procesů a bakteriální společenstvo v zažívacím traktu (Malone et al. 1999, Bailey et al. 2005, Babendreier et al. 2005, 2007, Liu et al. 2005a, Hofs et al. 2008, Hendriksma et al. 2011, 2013). Han et al. (2010a) uveřejnili výsledky sedmidenního pozorování – subletální ovlivnění včel krmených pylem s obsahem Cry proteinu. Později svůj pokus opakovali a žádný signifikantní vliv nenašli (Han et al. 2010b). I meta-analýza potvrzuje nezávadnost Bt pylu pro včely (Duan et al. 2008a).

1.5.5. Půdní fauna a degradace Cry proteinů v půdě

Cry proteiny jsou prokazatelně vylučovány v exudátech kořenů a do půdy se dostávají i z rostlinných zbytků. Jejich dlouhodobá perzistence ve větším množství nebyla potvrzena (Ahmad et al. 2005, Prihoda & Coats 2008), ale určité rozdíly při degradaci v různých podmínkách zjištěny byly. V kyseljším pH se Cry3Bb1 rozkládá v půdě s kaolinitem pomaleji než v neutrálním pH (Icoz & Stotzky 2008). Zwahlen et al. (2003) upozorňují na to, že je důležité sledovat degradaci nejen v laboratoři při kontrolovaných podmínkách, ale také na poli, kde nejsou podmínky konstantní. Podařilo se jim zjistit detekovatelné množství Cry1Ab nejen na podzim, ale potvrdili i přerušení degradace přes zimu a detekovatelné zbytky Cry proteinu našli ještě v červnu následujícího roku. Do své studie zahrnuli i bezorebný systém, kde došlo k degradaci proteinu velmi rychle. Perzistenci Cry1Ab po dobu 140 dní zaznamenali ve své studii i Saxena & Stotzky (2001). Zurbrügg & Nentwig (2009) srovnávali kukuřici s Cry3Bb1 a Cry1Ab. Obsah Cry1Ab byl vyšší, ale jeho degradace v exkrementech slimáků byla rychlejší, což poukazuje na jisté rozdíly v rychlosti degradace různých Cry proteinů v prostředí, a tedy na různé chemické vlastnosti Cry proteinů. U Bt kukuřice byl zjištěn vyšší obsah ligninu (Saxena & Stotzky 2001), což může zpomalit rozklad rostlinných zbytků. Griffiths et al. (2009) však zaznamenali vyšší rychlost dekompozice Bt kukuřice ve vodním toku. Zurbrügg et al. (2010) naopak nezaznamenali rozdíl v dekompozici mezi Bt kukuřicí a izogenním hybridem.

Bylo dokázáno, že Cry proteiny se váží na jílové partikule a huminové částice. Díky těmto vazbám jsou Cry proteiny rezistentní vůči biodegradaci a zachovávají si svou insekticidní aktivitu (Zwahlen et al. 2003, Saxena et al. 2000). Doposud nebyl vyvinut spolehlivý protokol ani extrakční pufr pro extrakci Cry proteinů navázaných na jílové partikule (Prihoda & Coats 2008). Většina studií se však shoduje, že majoritní část Cry proteinů se v půdě rozkládá velmi rychle (viz

výše) a jen nepatrné množství zůstane takto navázáno (Saxena & Stotzky 2000, Ahmad et al. 2005, Li et al. 2007, Fiorito et al. 2008, Icoz & Stotzky 2008, Icoz et al. 2008, Prihoda & Coats 2008, Shan et al. 2008, Daudu et al. 2009, Zurbrügg et al. 2010).

Vzhledem k nejednotným výsledkům týkajících se perzistence Cry proteinů v půdě a tomu, že exprese Cry3Bb1 v Bt kukuřici MON863 a MON 88017 by měla být nejvyšší v kořenech (larvy cílového škůdce se jimi živí), se v posledních letech objevilo mnoho prací zabývajících se vlivem Cry proteinů na půdní dekompozitory a mikrobiální společenstva. Studie potvrzují, že žížaly (Hönemann & Nentwig 2009, Liu et al. 2009), larvy dvoukřídlých (Knecht & Nentwig 2010), roztoči (Carter et al. 2004), chvostoskoci (Heckmann et al. 2006, Bai et al. 2010, Minarčíková 2015, Yang et al. 2015) a hlístice (Půža et al. 2011, Čerevková & Cagáň 2015) nejsou ovlivněni pěstováním Bt plodin. Bakonyi et al. (2006) však pozorovali u třech druhů chvostoskoků preferenci potravy z kontrolní plodiny. Ani v případě mikrobů většina prací neobjevila v půdě rozdíl ve složení mikrobiálních společenstev a mykorrhizních hub (Devare et al. 2004, Baumgarte & Tebbe 2005, Griffiths et al. 2007a,b, de Vaufleury et al. 2007, Knox et al. 2008, Lehman et al. 2008a,b, Oliveira et al. 2008, Miethling-Graff et al. 2010). Raubuch et al (2010) zaznamenal nižší aktivitu na počátku mikrobiálního procesu. Turrini et al. (2004) a Castaldini et al. (2005) zaznamenali snížení kolonizace kořenů Bt kukuřice mykorrhizními houbami.

1.5.6. Vodní bezobratlí

Vzhledem k tomu, že může dojít k náhodnému výskytu Cry proteinů ve vodě (splach půdy, pylu a rostlinného materiálu) několik studií se věnuje vlivu Bt plodin i na vodní bezobratlé. Chambers et al. (2010) potvrdili stejnou abundanci sledovaných vodních bezobratlých s i bez Cry proteinu v rostlinném detritu avšak v laboratoři zjistili pomalejší vývoj larev jednoho ze tří druhů chrostíků. Stejně tak výsledky studie Bøhna et al. 2008, která ukazuje vliv na *Daphnia magna* je důkazem toho, že v této oblasti je třeba dalších studií.

1.5.7. Vyšší živočichové

Receptory pro Cry proteiny se vyskytují pouze u hmyzu, ale vzhledem ke společenskému tlaku jsou prováděny i studie na obratlovcích (Siegel et al. 1987, McClintock et al. 1995). Vliv potravin s obsahem Bt plodin byl u drůbeže a savců, včetně potkanů, sledován po více generací a žádné signifikantní projevy toxicity Cry proteinů obsažených v potravě objeveny nebyly (Halle et al. 2004,

Flachowsky et al. 2005, Kiliç & Akay 2008, Appenzeller et al. 2009, Wang et al. 2014, shrnuto v Snell et al. 2012 a Van Eenennaam & Young 2014).

Z dosavadních výsledků laboratorních experimentů a polních studií lze vyvodit, že necíloví bezobratlí hebivoři, predátoři, parazitoidi, dekompozitoři, ani vyšší živočichové nejsou ohroženi přítomností Cry proteinů v plodinách, což dokazují i meta-analýzy porovnávající větší počet studií (Marvier et al. 2007, Wolfenbarger et al. 2008). Meta-analýzy slouží k získání relevantního obrazu o tom, zda jsou výsledky o vlivu na jednotlivé organismy konzistentní.

V polních studiích je abundance a druhová bohatost srovnatelná s plochami ošetřeny izogenními hybridy. Mnoho autorů polních studií porovnává vliv Bt plodin i s izogenními hybridy ošetřeny insekticidy. Srovnání Bt plodin s používáním často nespecifických chemických insekticidních látek je velice důležité, protože dokonce i u insekticidů aplikovaných na půdu byl při špatném užití zaznamenán vliv na včely (Pistorius et al. 2008). Mnohé studované necílové skupiny bezobratlých se v porovnání s plochami ošetřeny insekticidy vyskytují více v porostech Bt plodin (Daly et al. 2000, Dively 2005, Rose & Dively 2007, Marvier et al. 2007) a u jiných, především epigeických skupin, je výskyt srovnatelný (Al-deeb et al. 2003, Bhatti et al. 2005b).

1.6. Problémy spojené s pěstováním Bt plodin

1.6.1. Zvýšení abundance sekundárních škůdců

Vzhledem k snížení aplikací insekticidů se na Bt plodinách mohou rozšiřovat sekundární škůdci a mohou se z nich stát škůdci klíčoví (Yu et al. 2011). Například již bylo zjištěno, že na Bt bavlníku se vyskytuje více svilušek (Wu & Guo 2005) a klopuškovitých (Lu et al. 2010). U Bt kukuřice byl také zjištěn v některých zemích vyšší výskyt sekundárních škůdců, avšak zatím je tento nárůst výskytu nekonzistentní a nevzbuzuje žádné obavy (Lumbierres et al. 2004, Hellmich et al. 2008).

1.6.2. Rezistence cílových druhů

Rezistence ke Cry proteinům byla zaznamenána u populací ve volné přírodě (Storer et al. 2010, Gassmann et al. 2011), zejména však byla uměle navozena v laboratoři, např. u motýlů a mandelinky bramborové (Whalon et al. 1993, Gould et al. 1995, Oppert et al. 2009). V mnoha případech není jasný mechanismus rezistence. Teoreticky existuje několik různých mutací, které ke

vzniku rezistence vedou. Většina případů je spojována se změnou struktury kadherinu či jiného potenciálního receptoru Cry proteinu, nebo se snížením množství specifického kadherinu, které bylo prokázáno u rezistentního kmene *Heliothis virescens* (Jurat-Fuentes & Adang 2004). Byl nalezen i důkaz změny funkce proteázy, která Cry protein štěpením aktivizuje (Sayed et al. 2010). Znak rezistence je děděn recesivně (Conner et al. 2003), ale existují i důkazy o tom, že rezistence není recesivní (Meihls et al. 2008).

Vzniku rezistence by měla zabránit stabilní exprese transgenů, přítomnost jeho produktu v účinných koncentracích, odolnost produktu vůči degradačním enzymům rostliny, současná exprese různých Cry proteinů, zvýšení účinnosti, kombinace s jinými insekticidními transgeny a zachování určité plochy oseté nemodifikovanými rostlinami v tzv. refugiích, která by měla být bez jiných způsobů ochrany, protože aplikace insekticidu v refugiích urychluje vývoj rezistence (Onstad & Meinke 2010). Tato opatření zajistí, že případně vzniklá alela zodpovědná za rezistenci bude recesivní.

1.7. Předmět výzkumu, stanovení cílů a hypotéz

V předkládané práci se zabývám vlivem Bt kukuřice na necílové druhy bezobratlých, především na predátory, jako klíčové organismy důležité v systému integrované ochrany rostlin a managementu vzniku rezistence u cílových škůdců Bt plodin. Práce zahrnuje výsledky z tříletého polního experimentu, který je v porovnání s podobnými experimenty výjimečný svou rozlohou (14 ha), počtem porovnávaných managementů (5) a rozsahem biologických analýz. Díky rozlohám jednotlivých pokusných ploch (0.5 ha) byly získány reprezentativní vzorky společenstev vyskytujících se v kukuřičném poli v agroekologických podmínkách ČR. Na polní studii navazují laboratorní experimenty, ve kterých je blíže specifikována role bezobratlých predátorů v managementu vzniku rezistence u cílových škůdců Bt plodin. Dále je ověřen vliv jednoho Cry proteinu respektive synergického působení šesti Cry proteinů exprimovaných v Bt kukuřici na predátory. V případě Bt kukuřice exprimující šest různých Cry proteinů se jedná o první práci, která ověřuje jejich synergický vliv na necílové druhy bezobratlých. V laboratorní části je také kvantifikován obsah Cry proteinů v jednotlivých částech potravního řetězce a hodnoceno vystavení predátorů Cry proteinům z různých potravních zdrojů.

Cíle

1. Provéřit možný negativní vliv Bt kukuřice kombinující resistenci vůči bázlivci kukuřičnému (*Diabrotica virgifera virgifera* LeConte) s tolerancí k neselektivnímu herbicidu na bázi glyfosátu na necílové druhy bezobratlých.
2. Srovnat působení Bt kukuřice s účinky širokospektrálního půdního insekticidu Dursban 10G (chlorpyrifos) na entomofaunu.
3. Ověřit přímý, nepřímý (zprostředkovaný subletálně postiženou kořistí) a synergický vliv Cry proteinů na hmotnost, vývoj a mortalitu predátorů.
4. Ověřit preference predátora vůči kořisti, která je subletálně postižena v důsledku příjmu potravy s obsahem Cry proteinu.
5. Zjistit, jak se koncentrace různých Cry proteinů mění v potravním řetězci a zda nedochází k akumulaci Cry proteinů v tělech predátorů.

Hypotézy

1. V rozsáhlém polním experimentu neočekáváme negativní ovlivnění sledovaných společenstev bezobratlých expresí Cry proteinu v Bt kukuřici.
2. Snížení abundance vlivem expozice insekticidu aplikovaného na půdu se předpokládá u epigeických druhů bezobratlých.
3. Očekáváme možné nepřímé negativní ovlivnění predátora vlivem nutričně nevyhovující kořisti (subletální postižení v důsledku příjmu potravy s obsahem Cry proteinu). Neočekáváme přímé negativní ovlivnění sledovaných parametrů predátorů vlivem potravy s obsahem Cry proteinů.
4. Neočekáváme preferenci kořisti subletálně postižené v důsledku příjmu potravy s obsahem Cry proteinu.
5. Očekáváme snižování koncentrace Cry proteinů v potravním řetězci.

2. Výsledky

Disertační práce je založena na dvou publikovaných článcích, jedné přijaté publikaci a dvou rukopisech. První tři publikace vycházejí z polní studie zabývající se vlivem Bt kukuřice na abundanci a druhovou bohatost pavouků (Publikace I), bezobratlých vyskytujících se přímo v porostu kukuřice (Publikace II) a drabčků (Publikace III). Možné ovlivnění společenstev členovců expresí Cry3Bb1 proteinu je srovnáno s dalšími čtyřmi typy ploch (managementů) včetně půdním insekticidem ošetřeného izogenního hybridu. Tyto publikace se věnují cíli 1 a 2 a k práci bylo přistupováno s hypotézami 1 a 2. Další dva rukopisy popisují laboratorní experimenty, v nichž byl zjišťován vliv Cry proteinů na tři druhy predátorů běžně se vyskytujících v porostech kukuřice (cíl 3), možná role predátora v managementu vzniku rezistence u cílových škůdců (cíl 4) a též je kvantifikován obsah Cry proteinů v jednotlivých částech potravního řetězce (cíl 5). Vzhledem k výsledkům publikovaných jinými autory byly stanoveny hypotézy 3, 4 a 5.

2.1. Publikace I

Epigeičtí pavouci nejsou ovlivněni geneticky modifikovanou kukuřicí MON 88017

(Epigeic spiders are not affected by the genetically modified maize MON 88017)

V polním experimentu byl porovnán vliv Bt kukuřice s izogenním (mateřským) hybridem s a bez ošetření půdního insekticidu (chlorpyrifos) a dvěma nepříbuznými referenčními hybridy kukuřice. Každý z těchto managementů byl aplikován tři roky po sobě na pěti 0.5 ha parcelách. Pavouci byli odchyťováni do zemních pastí. Na každé parcele bylo umístěno 5 zemních pastí (celkem 125 pastí). Uprostřed parcely byla jedna past a ve dvou řadách blízko středu byly umístěny další čtyři pasti. Z celkových 79 druhů pavouků se nejčastěji vyskytovaly druhy *Oedothorax apicatus*, *Pardosa agrestis* a *Pachygnatha degeeri*, zástupci tří různých velikostních skupin pavouků. Druhové složení i dominance několika málo druhů jsou běžným znakem agroekosystémů. Na plochách s Bt kukuřicí byla ve srovnání s izogenním hybridem ošetřeným půdním insekticidem pozorována nesignifikantně vyšší abundace a ve dvou letech i druhová bohatost pavouků. Statistická analýza neukázala žádný negativní vliv Bt kukuřice na abundanci a druhové bohatství pavouků v porovnání se čtyřmi dalšími managementy.

2.2. Publikace II

Posouzení rizika geneticky modifikované kukuřice odolné proti *Diabrotica* spp.: vliv na členovce v porostu kukuřice v České republice

(Risk assessment of genetically engineered maize resistant to *Diabrotica* spp.: influence on above-ground arthropods in the Czech Republic)

V polním experimentu popsáném výše (Publikace I) byli sledováni i bezobratlí vyskytující se přímo na rostlinách kukuřice a v porostu. Z každé parcely byly odebírány vzorky 10 rostlin (250 rostlin v jednom odběru) včetně dvou rostlin s kořeny a na každou parcelu byly umístěny dvě leповé desky. Nejhojnějšími druhy herbivorů byly *Frankliniella occidentalis*, *Rhopalosiphum padi* a *Metopolophium dirhodum*. Nejčastěji pozorovanými skupinami predátorů byly *Orius* spp. a několik druhů řazených k čeledi Coccinellidae. Ordinační diagram k mnohorozměrné analýze ukázal, že byla abundance a druhová bohatost skupin bezobratlých vyskytujících se na rostlinách kukuřice podobnější na plochách osetých kukuřicí se stejným genetickým základem, a to na Bt kukuřici a izogenním hybridu s a bez ošetření insekticidu. Společenstva na plochách osetých referenčními hybridy se ukázala být navzájem podobnější než společenstva na ostatních plochách. Některé výsledky analýzy variance jednotlivých taxonů bezobratlých potvrdily tyto rozdíly, nicméně podle statistického porovnání v rámci mnohorozměrné analýzy představoval vliv různých managementů pouze zanedbatelnou část variability vysvětlující výskyt bezobratlých na pokusné lokalitě.

Metodou ELISA byla ověřena exprese transgenu pro Cry3Bb1 protein. Koncentrace Cry3Bb1 se pohybovala okolo 25 µg/g čerstvé rostlinné tkáně. Rozdíly byly zaznamenány mezi jednotlivými roky, ale během sezony byly zjištěny jen malé odchylky. Nejvyšší exprese byla zaznamenána v listech a kořenech.

2.3. Publikace III

Funkční diverzita drabčků (Coleoptera: Staphylinidae) v kukuřičném poli: testování možného vlivu geneticky modifikované kukuřice rezistentní proti hmyzu

(Functional diversity of staphylinid beetles (Coleoptera: Staphylinidae) in maize fields: testing the possible effect of genetically modified, insect resistant maize)

V polním experimentu popsaném výše (Publikace I) bylo sledováno i společenstvo drabčků. Drabčci jsou doporučeni jako bioindikátory změn v životním prostředí při posuzování rizik Bt kukuřice exprimující Cry3Bb1 protein před jejich uvedením na trh. Nicméně především vlivem obtížné druhové determinaci jsou studie věnující se společenstvu drabčků ojedinělé.

V zemních pastech jsme zaznamenali 77 druhů drabčků, z nichž byly nejvíce zastoupeny druhy *Lesteva longolytrata*, *Oxypoda acuminata*, *Aloconota sulcifrons* a *Anotylus rugosus*. U 25 nejběžnějších druhů byla stanovena bionomie, potravní specializace, požadavky na teplotu a velikostní skupina. Tyto vlastnosti specifikují výskyt drabčků na poli a blíže determinují způsob kontaktu s Cry3Bb1 proteinem. Statistická analýza početnosti, Rao indexy a mnohorozměrná analýza distribuce jednotlivých kategorií funkčních skupin ukázaly zanedbatelné ovlivnění společenstva drabčků pěti různými managementy včetně Bt kukuřice.

Na podzim byl sledován výskyt saprofágních larev dvoukřídlých (vývoj v zaoraném tlejícím rostlinném materiálu), které slouží jako potrava pro drabčiky či jako hostitelé pro parazitoidní druhy. Byla prokázána korelace mezi výskytem drabčků s parazitoidním vývojem a výskytem larev dvoukřídlých. Výskyt larev dvoukřídlých nebyl ovlivněn přítomností Cry3Bb1 v tlejícím zaoraném materiálu a korelace s výskytem parazitoidních drabčků nebyla na plochách s Bt kukuřicí narušena.

2.4. Publikace IV

Preference kořisti krmené potravou s obsahem Bt proteinu: důsledky pro management vzniku rezistence v systému RIB (směs Bt a kontrolního osiva)

(Predator preference for Bt-fed prey: implications for insect resistance management in Bt maize seed blends)

V laboratorním experimentu jsme ověřovali nepřímý negativní vliv Cry proteinu na predátora vlivem konzumace cílového druhu pro Cry protein, který představuje nutričně nekvalitní zdroj potravy. V nevýběrovém experimentu byly použity larvy *Spodoptera frugiperda*, jejichž vývoj je konzumací potravy s obsahem Cry1Ab prokazatelně zpomalen. Larvy *Harmonia axyridis* byly krmeny ad libitum kontinuálně od druhého do čtvrtého instaru. U *H. axyridis* nebyly v porovnání s jedinci krmenými kontrolními larvami *S. frugiperda* (potrava bez Cry proteinu) zjištěny negativní účinky konzumace kořisti subletálně ovlivněné Cry proteinem na hmotnost, vývoj a mortalitu. Nicméně *H. axyridis* konzumovala více *S. frugiperda* krmené na Bt kukuřici Agrisure. Ve výběrovém experimentu bylo zjištěno, že *H. axyridis* preferuje larvy *S. frugiperda* krmené potravou s obsahem Cry proteinu. K preferenci docházelo především u tři až pět dní starých *S. frugiperda*, kdy je rozdíl mezi larvami krmenými potravou s obsahem Cry proteinu a kontrolními jedinci větší, než první dva dny. Je pravděpodobné, že *H. axyridis* nevybírala kořist podle toho, zda obsahuje Cry protein ale probíhala zde velikostní selekce kořisti. Výsledky mohou mít uplatnění při pohledu na roli predátorů v managementu rezistence cílových škůdců ke Cry proteinům. Larvy cílových škůdců odolné proti Cry proteinům mohou růst pomaleji než citlivé larvy. Zvyšuje se tím pravděpodobnost, že budou uloveni predátorem, a tak budou spolu se svým genem, který způsobil jejich odolnost, odstraněny z populace. Tento scénář oddálení vzniku rezistence může mít pozitivní dopad na hodnocení významu systému RIB (směs Bt a kontrolního osiva, refuge in a bag) pro management vzniku rezistence. V systému RIB jsou netransgenní rostliny roztroušeny v porostu Bt plodiny. Jde o strategii výhodnou pro pěstitel, ale jde o systém s přinejmenším sporným dopadem na vznik rezistence u cílových škůdců. V případě RIB je větší pravděpodobnost, že se predátor setká s oběma typy kořisti než v systému celistvého refugia a z našich výsledků vyplývá, že vzhledem k velikostní selekci bude s větší pravděpodobností z populace vyrazen jedinec subletálně ovlivněn konzumací Cry proteinu.

Obsah Cry1Ab proteinu v larvách *S. frugiperda* byl devětkrát nižší než v listech a podobné hodnoty byly zjištěny u všech larev bez závislosti na době krmení na Bt kukuřici (1 – 5 dnů). U čtvrtého instaru *H. axyridis* v nevýběrovém experimentu

byla koncentrace 48krát nižší v porovnání s koncentrací v listech a ve výběrovém experimentu pak 1000krát nižší. U larev 2. – 4. instaru *H. Axyridis* bylo pozorováno rychlé snižování koncentrace Cry1Ab do 24 h po přenesení na potravu bez obsahu Cry proteinu, v tělech predátorů tedy nedocházelo k akumulaci Cry proteinu. Měřitelné hodnoty byly u některých jedinců zaznamenány i po přechodu do vyššího instaru.

2.5. Publikace V

Transfer pěti Cry proteinů z Bt kukuřice v potravním řetězci

(Transfer of insecticidal Cry proteins from stacked Bt maize along the trophic chain)

V laboratorním experimentu byla užita Bt kukuřice SmartStax exprimující šest Cry proteinů, z nichž pět je možné kvantifikovat pomocí komerčně dostupných sad na imunotesty (ELISA). Užití takové Bt kukuřice nám umožnilo studovat současně koncentrace všech Cry proteinů ve vzorcích a porovnat jejich chování v potravním řetězci. Navrhli jsme tritrofickou studii se dvěma modelovými herbivory, mšicí *Rhopalosiphum padi* a roztočem *Tetranychus urticae*, a kukuřičným pylem jako zdroji Cry proteinů pro predátory, a dvěma druhy predátorů, larvou zlatoočky *Chrysoperla carnea* a juvenilním pavoukem *Phylloneta impressa*. ELISA testy ukázaly, že byly Cry proteiny v listech exprimovány v různých koncentracích. Ve starších listech byla exprese Cry1A.105, Cry1F, Cry2Ab2 a Cry34Ab1 vyšší než v listech mladších, avšak u Cry3Bb1 byl zjištěn opačný trend. Odlišná byla i exprese Cry proteinů v pylu; kromě Cry1F nižší než v listech. Koncentrace všech Cry proteinů se u predátorů v porovnání s pylem snížila. Ve svluškách byly u Cry1A.105, Cry1F, Cry3Bb1 a Cry34Ab1 proteinu zjištěny vyšší koncentrace než v listech. U predátorů, kteří se svluškami živili, už bylo pozorováno snižování koncentrace všech Cry proteinů. Koncentrace Cry proteinů v mšicích byla zanedbatelná; ve většině případů na hranici kvantifikovatelnosti a detekovatelnosti. Poměry snižování koncentrací Cry proteinů v jednotlivých trofických řetězcích se lišily. Nejmenší koncentrace v porovnání s předchozí trofickou úrovní byla zaznamenána u Cry2Ab2. Proteiny Cry1A.105, Cry34Ab1 a Cry1F byly naopak ve všech trofických úrovních zachovávané ve vyšších koncentracích. V predátorech nebyla zjištěna akumulace Cry proteinů a statistické analýzy neodhalily žádný negativní vliv šesti Cry proteinů exprimovaných v jedné Bt kukuřici na vývoj, hmotnost a mortalitu dvou důležitých predátorů vyskytujících se v porostu kukuřice.

3. Diskuze, závěr a perspektivy dalšího výzkumu

3.1. Hodnocení vlivu Bt kukuřice na necílové druhy bezobratlých (Publikace I, II a III)

Před uvedením Bt plodin na trh je nutné důkladné zhodnocení vlivu na necílové druhy v agroekosystému. Polní pokus, jehož výsledky jsou součástí této práce, představuje hodnocení rizika pro necílové druhy bezobratlých v rámci pravděpodobně největšího manipulativního experimentu týkajícího se vlivu Bt kukuřice na necílové druhy bezobratlých na světě. Existuje mnoho podobných studií, avšak na menších rozlohách a determinace především epigeických členovců bývá obvykle realizována na úrovni řádů či čeledí. Velkoplošné manipulativní experimenty mají jisté nevýhody týkající se především realizovatelnosti samotné, ale z hlediska biologických analýz převažují spíše výhody, především minimalizace okrajových efektů, které jsou v dnešním způsobu monokulturního zemědělství v experimentech s ambicí uplatnitelnosti výsledků v praxi nežádoucím jevem.

U pavouků (Publikace I) bylo pozorováno sice velké množství druhů, ale z hlediska početnosti dominovalo několik málo druhů typických pro agroekosystémy. Nejpočetnější druhy, které nejvíce ovlivnily výsledky statistických analýz, byly druhy s širokou ekologickou valencí. U těchto druhů by bylo nutné razantní narušení životních podmínek, aby bylo narušení prokazatelné.

Společenstvo drabčků (Publikace III) představovalo různorodé a vyrovnanější společenstvo s širokou škálou potravních specializací. Díky této diverzifikaci, kterou jsme zohlednili při statistických analýzách, jsou drabčci vhodní pro posouzení bezpečnosti Bt kukuřice pro životní prostředí (Rose & Dively, 2007). Nicméně u skupin, jako jsou drabčci, je nutné dlouhodobé sledování s přesným načasováním odběru vzorků pro zachycení reprezentativní části společenstva. Právě nižší abundance, variabilita ve výskytu během sezony a obtížnost druhové determinace komplikují interpretaci výsledků (Dively 2005) do té míry, že jsou studie věnující se podrobně vlivům Bt plodin na drabčiky v polních experimentech poměrně vzácné.

U bezobratlých vyskytujících se v porostu kukuřice (Publikace II) byli nalezeni jedinci patřící k mnoha řádům, avšak jen několik skupin v dostatečném množství pro důvěryhodnou statistickou analýzu. V našich výsledcích se neukázala zvýšená abundance bezobratlých v porostu Bt kukuřice známá z jiných studií (Eizaguirre et al. 2006, Habuštová et al. 2014) s výjimkou hladěnky (*Orius* spp.).

U drabčků ani bezobratlých v porostu kukuřice nebyl zaznamenán vliv aplikace půdního insekticidu (chlorpyrifos) v době setí. Redukce epigeických pavouků na plochách ošetřených insekticidem nebyla statisticky potvrzena. I jiné zdroje ukazují, že k redukcí bezobratlých na rostlinách kukuřice vlivem aplikace půdního insekticidu nedochází (Bhatti et al. 2005a). Jednorázová aplikace insekticidu ovlivňuje abundanci epigeických druhů krátkodobě (Rose & Dively 2007). Studie také popisují snížení abundance pouze v některých letech (Bhatti et al. 2005b). V celosvětovém měřítku se ale ukazuje, že v případě intenzivně ošetřovaných ploch je rozdíl mezi Bt plodinami a konvenčně ošetřovanými plochami viditelnější (Marvier et al. 2007). Bt plodiny mají proto značný potenciál v boji proti škůdcům při zachování populací necílových druhů, včetně prospěšných skupin predátorů a parazitoidů.

Druhové složení a velikost společenstva bezobratlých se měnily každý rok, což bylo pravděpodobně způsobeno odlišnými mikroklimatickými podmínkami (teplota, vlhkost) a abundancí především saprofágních larev dvoukřídlých a následně i drabčků značně ovlivnily rozdíly v množství organické hmoty v půdě mezi rokem 2009 a dalšími dvěma lety studie. U bezobratlých vyskytujících se přímo na kukuřici byla zjištěna podobnější abundanci i druhové složení na plochách osetých hybridy se stejným genetickým základem (Bt kukuřice a izogenní hybrid s a bez aplikace insekticidu) a u dvou nepříbuzných referenčních hybridů. Tento trend byl sice neprůkazný, ale ukázal další faktor, který je pravděpodobně pro výskyt bezobratlých důležitý. Tuto myšlenku podporuje i fakt, že jsme na pokusné lokalitě zaznamenali preferenci jednoho z referenčních hybridů škůdcem zavíječem kukuřičným (*Ostrinia nubilalis*). Rauschen et al. (2009) též pozorovali podobný trend u klopšky *Trigonotylus caelestialium*. Bt kukuřice vzniká metodou transformace, která je ve snaze pěstovat v určitých klimatických podmínkách co nevhodnější hybrid, prováděna v různých hybridech. Výzkum preference různých hybridů škůdci může být jedním z vodítek, jaký hybrid použít pro transformaci. Výsledky ukazují, že aktuální počasí, přítomnost biomasy samotné a vlastnosti jednotlivých hybridů ovlivňují abundanci bezobratlých pravděpodobně více, než exprese Cry proteinu v Bt kukuřici.

Náš přístup nám umožnil detailně prostudovat společenstva bezobratlých na pokusné lokalitě v širším ekologickém kontextu. Data, která jsme shromáždili, představují aktualizaci seznamu bezobratlých vyskytujících se v kukuřici v ČR a dají se pravděpodobně využít i při přípravě metodiky pro monitoring vlivu GM plodin na životní prostředí po uvedení na trh (post-market monitoring, PMM). Vzhledem k tomu, že EU vychází v přístupu ke GM plodinám z principu

předběžné opatrnosti, diskutuje se i o způsobu a rozsahu tohoto sledování. Data, která máme k dispozici (nejen z polní studie zahrnuté v této disertaci), mohou významně pomoci při výběrů vhodných indikátorů vlivu GM plodin na životní prostředí pro PMM. Jednotný metodický přístup k PMM může zkrátit administrativní schvalování jiných GM plodin a je důležitý i z finančního hlediska (Sanvido et al. 2009, Yu et al. 2011).

K hodnocení vlivu Bt kukuřice na necílové druhy bezobratlých v polní studii lze na závěr shrnout, že v podmínkách typických pro řadu oblastí České republiky nebyl zjištěn žádný přídatný negativní přímý ani nepřímý vliv Bt kukuřice prokazatelně exprimující Cry3Bb1 protein na populaci sledovaných bezobratlých živočichů. Naše výsledky a většina dalších publikací (shrnuto v Devos et al. 2012) jednoznačně ukazují, že Bt kukuřice MON 88017 exprimující Cry3Bb1 může být bezpečně pěstována v systému integrované ochrany rostlin.

3.2. Hodnocení vlivu Bt kukuřice na vybrané druhy predátorů v laboratoři a transfer Cry proteinů v potravním řetězci (Publikace IV a V)

Mnoho studií popsalo nepřímé negativní působení Cry proteinů na predátory a především parazitoidy vlivem nutričně nekvalitního zdroje potravy. V naší studii jsme nezaznamenali nepřímé negativní ovlivnění predátora vlivem nutričně nekvalitního zdroje potravy. Podařilo se nám prokázat, že slunéčko východní (*Harmonia axyridis*) kompenzuje tento stav vyšším množstvím konzumované kořisti. Preference predátora byla vysvětlena velikostní selekcí, v jejímž důsledku larvy slunéčka konzumovaly více kořisti, která byla krmena Bt kukuřicí. Z toho vyplývá, že jedinci, kteří pomaleji rostou, jsou po delší dobu vystaveni možnosti predace. Zvyšuje se tím pravděpodobnost, že budou takový jedinci, nositelé genu rezistence proti Bt plodinám, odstraněny z populace.

Význam tohoto jevu je třeba dále studovat v polních podmínkách a dát do kontextu s ostatními faktory, které hrají roli při výběru kořisti predátorem a dále pak například i se zvýšenou pravděpodobností kanibalismu staršími (většími) larvami škůdce (intraspecifický kanibalismus). V Publikaci IV jsme specifikovali roli predátora v managementu vzniku rezistence u cílových škůdců Bt plodin, což je důležité, protože predátoři jsou obecně považováni za důležitou složku agroekosystému, ale jen zřídka je jejich role blíže specifikována, poněvadž rozsah predace je neznámý, nepředvídatelný a obtížné stanovitelný (Koch 2003). Tento fenomén prezentujeme jako pozitivní ve spojitosti se systémem RIB (směs Bt a kontrolního osiva). Bylo by vhodné dále se této problematice věnovat a zhodnotit, zda přínos, který tento fenomén přináší v systému RIB pro

management vzniku rezistence u cílových škůdců vyváží negativní vlivy tohoto systému na vznik rezistence prezentovaný jinými autory (Andow et al. 2010).

V Publikaci IV jsme kvantifikovali Cry1Ab (Bt kukuřice Agrisure) a v Publikaci V proteiny Cry1A.105, Cry1F, Cry2Ab2, Cry3Bb1 a Cry34Ab1 (Bt kukuřice SmartStax). Koncentrace jednotlivých Cry proteinů v Bt kukuřici SmartStax byla různá a lišily se i koncentrace Cry proteinů detekované v pylu. Cry proteiny jsou v potravním řetězci přenášeny na herbivory a organismy na vyšších trofických úrovních (predátoři a parazitoidi). Koncentrace Cry proteinů v bezobratlých by se měla lišit v závislosti na způsobu využití potravy, části tkáně, která je využita, a rychlosti trávení a vylučování. Nejnižší, v mnoha případech až nedetekovatelné, koncentrace jsme zaznamenali u mšic *R. padi*, které se živí floémem, kde se prokazatelně Cry protein nevyskytuje (Raps et al. 2001), střední koncentrace byly zjištěny u larev můry *S. frugiperda*, které se živí celistvou rostlinou hmotou (Dutra et al. 2012) a nejvyšší koncentrace byly zaznamenány u svilušek, které vysávají buňky mezofylu, kde je obsah Cry proteinů vysoký (Álvarez-Alfageme et al. 2008). I mezi predátory byl zaznamenán rozdíl, který lze vysvětlit jiným způsobem příjmu potravy. Vyšší koncentrace byla zaznamenána u larev zlatoočky *C. carnea*, které vysávají svou kořist pomocí klíšťkovitých mandibul, než u juvenilních pavouků *P. impressa* trávících částečně mimotělně. Vzhledem k tomu, že v experimentu se slunéčky byl použit jiný typ kořisti (larvy můry *S. frugiperda*) a jiný Cry protein (Bt kukuřice Agrisure) než v případě experimentu s larvami zlatoočky *C. carnea* a juvenilních pavouků *P. impressa* (Bt kukuřice SmartStax) není jednoduché hodnoty srovnat. Použití larev můry rodu *Spodoptera* bylo v Publikaci V původně v plánu, avšak nebylo to vzhledem k vysoké účinnosti použité Bt kukuřice vůči těmto larvám možné (Svobodová et al. 2015). Původně byly plánované i experimenty se slunéčkem *H. axyridis*, ale ani ty se z časových důvodů prozatím neuskutečnily. Experimenty se slunéčkem *H. axyridis* a Bt kukuřicí SmartStax by jistě přispěly k dotvoření představy o pohybu Cry proteinů v trofickém řetězci v závislosti na různých typech kořisti a zpracování potravy.

Dále byl u larev slunéčka *H. axyridis* a zlatoočky *C. carnea* v porovnání s posledními instary zjištěny vyšší koncentrace Cry proteinů u mladších instarů, což může být vysvětleno rychlejším metabolismem spojeným se zpracováváním většího množství potravy v posledním instaru v souvislosti s přípravou na metamorfózu v dospělce. V rozporu s literaturou, kde se uvádí, že nebyl Cry protein detekován po svlečení do dalšího instaru, jsme u některých jedinců slunéčka *H. axyridis* zaznamenali měřitelné koncentrace Cry1Ab i po svlečení. Tyto výsledky by bylo zajímavé ověřit.

Nebyla zjištěna ani akumulace Cry proteinů v predátorech, která byla sledována buď přechodem na potravu bez obsahu Cry proteinů (Publikace IV) nebo odběrem vzorků v průběhu dlouhodobého experimentu (Publikace V).

Po porovnání získaných hodnot koncentrací Cry proteinů v jednotlivých částech potravního řetězce s hodnotami publikovanými jinými autory jsme došli k závěru, že jsou naše výsledky víceméně srovnatelné. Nicméně při porovnávání je důležitá obezřetnost, protože neexistuje žádný standardizovaný protokol pro kvantifikaci Cry proteinů v potravním řetězci. Různé způsoby přípravy vzorků a provádění samotné analýzy mohou výslednou koncentraci výrazně ovlivnit (Nguyen et Jehle 2009). Vývoj standardizovaného postupu při kvantifikaci Cry proteinů v potravním řetězci by výrazně usnadnil proces hodnocení rizik Cry proteinů na necílové druhy bezobratlých a porovnávání možných rizik jednotlivých GM plodin. Naše výsledky ukázaly, že jednotný přístup k analýze je možný. Práce s dalšími organizmy a Bt plodinami při využití stejné metodiky umožní vytvoření obecné metodiky stanovování obsahu Cry proteinů v životním prostředí, např. v případě nežádoucích kontaminací.

I přes průkaznou expozici predátorů *C. carnea*, *H. axyridis* a *P. impressa* Cry proteinům v různých koncentracích v kořistech *R. padi*, *S. frugiperda* a *T. urticae* či pylu neměla konzumace této potravy žádné nežádoucí negativní účinky na hmotnost, vývoj a mortalitu predátorů, a to ani v případě potravního řetězce zahrnující sviluškou *T. urticae*, u které převyšovala koncentrace čtyř proteinů hodnoty detekované v listech. V Publikaci V bylo sledováno pět různých Cry proteinů exprimovaných jednou Bt kukuřicí, což umožnilo zhodnotit také synergický efekt těchto proteinů, který se nepotvrdil. Náš experiment byl první, který zhodnotil synergický efekt šesti Cry proteinů, z nichž pět bylo kvantifikovatelných, exprimovaných v Bt kukuřici SmartStax na predátory. Těž jsme jako první ověřili a kvantifikovali expresi Cry proteinů v této Bt kukuřici; doposud se pouze uvádělo, že je exprese srovnatelná s mateřskými hybridy.

Naše výsledky přispějí k vývoji obecného modelu transferu Cry proteinů v potravním řetězci. Zobecnění je vzhledem k velkému množství různých Bt plodin pro posouzení jejich rizika důležité. V případě existence obecného modelu chování jednotlivých Cry proteinů v potravním řetězci by bylo potřeba méně dat pro jednotlivé Cry proteiny, Bt plodiny a taxony bezobratlých. Zároveň je znalost koncentrací Cry proteinů na různých trofických úrovních důležitá pro posouzení rizika Bt plodin ve vztahu k funkcím agroekosystémů (přirození nepřátelé, ekosystémové služby apod.).

4. Citovaná literatura

- Ahmad A., Wilde G.E., Zhu K.Y. (2005): Delectability of coleopteran-specific Cry3Bb1 protein in soil and its effect on nontarget surface and below-ground arthropods. *Environmental Entomology* 34(2): 385–394.
- Al-Deeb M.A., Wilde G.E. (2003): Effect of Bt corn expressing the Cry3Bb1 toxin for corn rootworm control on aboveground nontarget arthropods. *Environmental Entomology* 32(5): 1164–1170.
- Al-Deeb M.A., Wilde G.E. (2005): Effect of Bt corn expressing the Cry3Bb1 toxin on western corn rootworm (Coleoptera: Chrysomelidae) biology. *Journal of the Kansas Entomological Society* 78(2): 142–52.
- Al-Deeb M.A., Wilde G.E., Blair J.M., Todd T.C. (2003): Effect of Bt corn for corn rootworm control on nontarget soil microarthropods and nematodes. *Environmental Entomology* 32(4): 859–65.
- Álvarez-Alfageme F., Bigler F., Romeis (2011): Laboratory toxicity studies demonstrate no adverse effects of Cry1Ab and Cry3Bb1 to larvae of *Adalia bipunctata* (Coleoptera: Coccinellidae): the importance of study design. *Transgenic Research* 20(3): 467–79.
- Álvarez-Alfageme F., Ferry N., Castañera P., Ortego F., Gatehouse A. M. R. (2008): Prey mediated effects of Bt maize on fitness and digestive physiology of the red spider mite predator *Stethorus punctillum* Weise (Coleoptera: Coccinellidae). *Transgenic Research* 17(5): 943–54.
- Álvarez-Alfageme F., Ortego F., Castañera P. (2009): Bt maize fed-prey mediated effect on fitness and digestive physiology of the ground predator *Poecilus cupreus* L. (Coleoptera: Carabidae). *Journal of Insect Physiology* 55(2): 143–49.
- Andow D.A., Farrell S.L., Hu Y. (2010): Planting patterns of in-field refuges observed for Bt maize in Minnesota. *Journal of Economic Entomology* 103(4): 1394–99.
- Appenzeller L.M., Malley L., MacKenzie S.A., Hoban D., Delaney B. (2009): Subchronic feeding study with genetically modified stacked trait lepidopteran and coleopteran resistant (DAS-Ø15Ø7-1xDAS-59122-7) maize grain in Sprague-Dawley rats. *Food and Chemical Toxicology* 47(7): 1512–20.
- Babendreier D., Joller D., Romeis J., Bigler F., Widmer F. (2007): Bacterial community structures in honeybee intestines and their response to two insecticidal proteins. *FEMS Microbiology Ecology* 59(3): 600–10.
- Babendreier D., Kalberer N.M., Romeis J., Fluri P., Mulligan E., Bigler F. (2005): Influence of Bt-transgenic pollen, Bt-toxin and protease inhibitor (SBTI) ingestion on development of the hypopharyngeal glands in honeybees. *Apidologie* 36: 585–94.
- Bai Y.Y., Yan R.H., Ye G.Y., Huang F.N., Cheng J.A. (2010): Effects of transgenic rice expressing *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab protein on ground-dwelling collembolan community in postharvest seasons. *Environmental Entomology* 39(1): 243–51.
- Bailey J., Scott-Dupree C., Harris R., Tolman J., Harris B. (2005): Contact and oral toxicity to honey bees (*Apis mellifera*) of agents registered for use for sweet corn insect control in Ontario, Canada. *Apidologie* 36(4): 623–33.
- Bakó A., Gell G., Balázs E. (2011): Quantification of transgene expression in maize (*Zea mays* L.) throughout the vegetation period. *Plant Breeding* 130(1): 41–45.

- Bakonyi G., Szira F., Kiss I., Villány I., Seres A., Székacs A. (2006): Preference tests with collembolas on isogenic and Bt-maize. *European Journal of Soil Biology* 42: S132–35.
- Baum J.A., Bogaert T., Clinton W., Heck G.R., Feldmann P., Ilagan O., Johnson S., Plaetinck G., Munyikwa T., Pleau M., Vaughn T., Roberts J. (2007): Control of coleopteran insect pests through RNA interference. *Nature Biotechnology* 25(11): 1322–26.
- Baumgarte S., Tebbe C.C. (2005): Field studies on the environmental fate of the Cry1Ab Bt-toxin produced by transgenic maize (MON810) and its effect on bacterial communities in the maize rhizosphere. *Molecular Ecology* 14(8): 2539–51.
- Bhatti M.A., Duan J., Head G., Jiang C., Mckee M.J., Nickson T. (2005a): Field evaluation of the impact of corn root-worm (Coleoptera: Chrysomelidae)-protected Bt corn on foliage-dwelling arthropods. *Environmental Entomology* 34(5): 1336–45.
- Bhatti M. A., Duan J., Head G., Jiang C. J., McKee M. J., Nickson T. E., Pilcher C. L., Pilcher C. D. (2005b): Field evaluation of the impact of corn rootworm (Coleoptera: Chrysomelidae)-protected Bt corn on ground-dwelling invertebrates. *Environmental Entomology* 34(5): 1325–35.
- Bøhn T., Primicerio R., Hessen D.O., Traavik T. (2008): Reduced fitness of *Daphnia magna* fed a Bt-transgenic maize variety. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 55(4): 584–92.
- Bravo A., Gill S.S., Soberón M. (2007): Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control (Review). *Toxicon* 49(4): 423–35.
- Bravo A., Gómez I., Conde J., Muñoz-Garay C., Sánchez J., Miranda R., Zhuang M., Gill S.S., Soberón M. (2004): Oligomerization triggers binding of a *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab pore-forming toxin to aminopeptidase N receptor leading to insertion into membrane microdomains. *Biochimica et Biophysica Acta* 17(1): 38–46.
- Carter M.E., Villani M.G., Allee L.L., Losey J.E. (2004): Absence of non-target effects of two *Bacillus thuringiensis* coleopteran active delta-endotoxins on the bulb mite, *Rhizoglyphus robini* (Claparede) (Acari, Acaridae). *Journal of Applied Entomology* 128(1): 56–63.
- Castaldini M., Turrini A., Sbrana C., Benedetti A., Marchionni M., Mocali S., Fabiani A., Landi S., Santomassimo F., Pietrangeli B., Nuti M.P., Miclaus N., Giovannetti M. (2005): Impact of Bt corn on rhizospheric and soil eubacterial communities and on beneficial mycorrhizal symbiosis in experimental microcosms. *Applied and Environmental Microbiology* 71(11): 6719–29.
- Conner A.J., Glare T.R., Nap J.-R. (2003): The release of genetically modified crops into the environment. Part II. Overview of ecological risk assessment. *The Plant Journal* 33(1): 19–46.
- Čerevková A., Cagáň Ľ. (2015): Effect of transgenic insect-resistant maize to the community structure of soil nematodes in two field trials. *Helmintologia* 52(1): 41–49.
- 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.
- Daudu C. K., Muchaonyerwa P., Mkeni P.N.S. (2009): Litterbag decomposition of genetically modified maize residues and their constituent *Bacillus thuringiensis* protein (Cry1Ab) under field conditions in the central region of the Eastern Cape, South Africa. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 134(3–4): 153–58.
- Davidson M.M., Butler R.C., Wratten S.D., Conner A.J. (2006a): Field evaluation of potato plants transgenic for a cry1Ac gene conferring resistance to potato tuber

- moth, *Phthorimaea operculella* (Zeller) (Lepidoptera: Gelechiidae). Crop Protection 25(3):216–24.
- Davidson M.M., Butler R.C., Wratten S.D., Conner A.J. (2006b): Impacts of insect-resistant transgenic potatoes on the survival and fecundity of a parasitoid and an insect predator. Biological Control 37(2): 224–30.
- Devare M.H., Jones C.M., Thies J.E. (2004): Effect of Cry3Bb transgenic corn and tefluthrin on the soil microbial community: biomass, activity, and diversity. Journal of Environmental Quality 33(3): 837–43.
- Devos Y., De Schrijver A., De Clercq P., Kiss J., Romeis J. (2012): Bt-maize event MON 88017 expressing Cry3Bb1 does not cause harm to non-target organisms. Transgenic Research 21(6): 1191–214.
- Dively G.P. (2005): Impact of transgenic VIP3A x Cry1Ab lepidopteran-resistant field corn on the nontarget arthropod community. Environmental Entomology 34(5): 1267–91.
- Duan J.J., Head G., McKee M.J., Nickson T.E., Martin J.W., Sayegh F.S. (2002): Evaluation of dietary effects of transgenic corn pollen expressing Cry3Bb1 protein on a non-target ladybird beetle, *Coleomegilla maculata*. Entomologia Experimentalis et Applicata 104(2–3): 271–80.
- Duan J. J., Marvier M., Huesing J., Dively G., Huang Z. Y. (2008a): A Meta-analysis of effects of Bt crops on honey bees (Hymenoptera: Apidae). Plos One 3(1): e1415.
- Duan J.J., Paradise M.S., Lundgren J.G., Bookout J.T., Jiang C J., Wiedenmann R.N. (2006): Assessing nontarget impacts of Bt corn resistant to corn rootworms: Tier-1 testing with larvae of *Poecilus chalcites* (Coleoptera: Carabidae). Environmental Entomology 35(1): 135–42.
- Duan J.J., Teixeira D., Huesing J.E., Jiang C. (2008b): Assessing the risk to nontarget organisms from Bt corn resistant to corn rootworms (Coleoptera: Chrysomelidae): Tier-I testing with *Orius insidiosus* (Heteroptera: Anthracoridae). Environmental Entomology 37(3):838–44.
- Dutra C.C., Koch R.L., Burkness E.C., Meissle M., Romeis J., Hutchison W.D., Fernandes M.G. (2012): *Harmonia axyridis* (Coleoptera: Coccinellidae) exhibits no preference between Bt and non-Bt maize fed *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). PLoS ONE 7(9): e44867.
- Dutton A., Klein H., Romeis J., Bigler, F. (2002): Uptake of Bt-toxin by herbivores feeding on transgenic maize and consequences for the predator *Chrysoperla carnea*. Ecological Entomology 27(4): 441–47.
- Eizaguirre M., Albajes R., López C., Eras J., Lumbierres B., Pons X. (2006): Six years after the commercial introduction of Bt maize in Spain: field evaluation, impact and future prospects. Transgenic Research 15(1): 1–12.
- Fabrick J., Oppert C., Lorenzen M.D., Morris K., Oppert B., Jurat-Fuentes J.L. (2009): A novel *Tenebrio molitor* cadherin is a functional receptor for *Bacillus thuringiensis* Cry3Aa toxin. Journal of Biological Chemistry 284(27): 18401–10.
- Fiorito T. M., Icoz I., Stotzky G. (2008): Adsorption and binding of the transgenic plant proteins, human serum albumin, beta-glucuronidase, and Cry3Bb1, on montmorillonite and kaolinite: Microbial utilization and enzymatic activity of free and clay-bound proteins. Applied Clay Science 39(3-4): 142–50.
- Flachowsky G., Halle I., Aulrich K. (2005): Long term feeding of Bt-corn – a ten-generation study with quails. Archives of Animal Nutrition 59(6): 449–51.
- Gao Y., Jurat-Fuentes J.L., Oppert B., Fabrick J.A., Liu C., Gao J., Lei Z. (2011): Increased toxicity of *Bacillus thuringiensis* Cry3Aa against *Crioceris quatuordecimpunctata*,

- Phaedon brassicae* and *Colaphellus bowringi* by a *Tenebrio molitor* cadherin fragment: Pest Management Science 67(9): 1076–81.
- García M., Ortego F., Castañera P., Farinós G.P. (2010): Effects of exposure to the toxin Cry1Ab through Bt maize fed-prey on the performance and digestive physiology of the predatory rove beetle *Atheta coriaria*. Biological Control 55(3): 225–33.
- García M., Ortego F., Castañera P., Farinós G.P. (2012): Assessment of prey-mediated effects of the coleopteran-specific toxin Cry3Bb1 on the generalist predator *Atheta coriaria* (Coleoptera: Staphylinidae). Bulletin of Entomological Research 102(3), 293–302.
- Gassmann A.J., Petzold-Maxwell J.L., Keweshan R.S., Dunbar M.W. (2011): Field-evolved resistance to Bt maize by Western corn rootworm. Plos One 6(7): e22629.
- Glare T.R., O'Callaghan M. (editoři) (2000): *Bacillus thuringiensis*: biology, ecology and safety. Hardcover XVIII. 368 p.
- Gould F., Anderson A., Reynolds A., Bumgarner L., Moar W. (1995): Selection and genetic analysis of a *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae) strain with high levels of resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins. Journal of Economic Entomology 88(6): 1545–59.
- Griffiths B.S., Caul S., Thompson J., Birch A., Cortet J., Andersen M.N., Krogh P. (2007a): Microbial and microfaunal community structure in cropping systems with genetically modified plants. Pedobiologia 51(3): 195–206.
- Griffiths B. S., Heckmann L.H., Caul S., Thompson J., Scrimgeour C., Krogh P.H. (2007b): Varietal effects of eight paired lines of transgenic Bt maize and near-isogenic non-Bt maize on soil microbial and nematode community structure. Plant Biotechnology Journal 5(1): 60–68.
- Griffiths N.A., Tank J.L., Royer T.V., Rosi-Marshall E.J., Whiles M.R., Chambers C.P., Frauendorf T.C., Evans-White A.A. (2009): Rapid decomposition of maize detritus in agricultural headwater streams. Ecological Applications 19(1): 133–42.
- Gómez I., Pardo-López L., Muñoz-Garay C., Fernandez L.E., Pérez C., Sánchez J., Soberón M., Bravo A. (2007): Role of receptor interaction in the mode of action of insecticidal Cry and Cyt toxins produced by *Bacillus thuringiensis*. Peptides 28(1): 169–73.
- Habuštová O., Doležal P., Spitzer L., Svobodová Z., Hussein H.M., Sehnal F. (2014): Impact of Cry1Ab toxin expression on the non-target insects dwelling on maize plants. Journal of Applied Entomology 138(3): 164–72.
- Halle I., Aulrich K., Flachowsky G. (2004a): Four generations of feeding of GMO-corn to breeder quail. Proceedings of the Society of Nutrition Physiology 13: 124.
- Han P., Niu C.Y., Lei C.L., Cui J.J., Desneux N. (2010a): Quantification of toxins in a Cry1Ac + CpTI cotton cultivar and its potential effects on the honey bee *Apis mellifera* L. Ecotoxicology 19(8): 1452–59.
- Han P., Niu C.Y., Lei C.L., Cui J.J., Desneux N. (2010b): Use of an innovative T-tube maze assay and the proboscis extension response assay to assess sublethal effects of GM products and pesticides on learning capacity of the honey bee *Apis mellifera* L. Ecotoxicology 19(8):1612–19.
- Head G., Carroll M., Clark T., Galvan T., Huckaba R.M., Price P., Samuel L., Storer N.P. (2014): Efficacy of SmartStax® insect-protected corn hybrids against corn rootworm: the value of pyramiding the Cry3Bb1 and Cry34/35Ab1 proteins. Crop Protection 57: 38–47.
- Heckmann L.H., Griffiths B.S., Caul S., Thompson J., Pusztai-Carey M., Moar W.J., Andersen M.N., Krogh P.H. (2006): Consequences for *Protaphorura armata*

- (Collembola: Onychiuridae) following exposure to genetically modified *Bacillus thuringiensis* (Bt) maize and non-Bt maize. *Environmental Pollution* 142(2): 212–16.
- Hellmich L.R., Albajes R., Bergvinson D., Prasifka J.R., Wang Z.-Y., Weiss M.J. (2008): The present and future role of insect-resistant genetically modified maize in IPM. *Progress in Biological Control* 5: 119–58.
- Hendriksma H.P., Härtel S., Steffan-Dewenter I. (2011): Testing pollen of single and stacked insect-resistant Bt-maize on in vitro reared honey bee larvae. *PLoS ONE* 6(12): e28174.
- Hendriksma H.P., Küting M., Härtel S., Näther A., Dohrmann A.B., Steffan-Dewenter I., Tebe C.C. (2013): Effect of stacked insecticidal Cry proteins from maize pollen on nurse bees (*Apis mellifera carnica*) and their gut bacteria. *PLoS ONE* 8(3): e59589.
- Higgins L.S., Babcock J., Neese P., Layton R.J., Moellenbeck D.J., Storer N. (2009): Three-year field monitoring of Cry1F, event DAS-Ø15Ø7-1, maize hybrids for nontarget arthropod effects. *Environmental Entomology* 38(1):281–92.
- Hofs J.-L., Schoeman A.S., Pierre J. (2008): Diversity and abundance of flower-visiting insects in Bt and non-Bt cotton fields of Maputaland (KwaZulu Natal Province, South Africa) 28: 211–19.
- Hönemann L., Nentwig W. (2009): Are survival and reproduction of *Enchytraeus albidus* (Annelida: Enchytraeidae) at risk by feeding on Bt-maize litter? *European Journal of Soil Biology* 45: 351–55.
- Hutchison W.D., Burkness E.C., Mitchell P.D., Moon R.D., Leslie T.W., Fleischer S.J., Abrahamson M., Hamilton K.L., Steffey K.L., Gray M.E., Hellmich R.L., Kaster L.V., Hunt T.E., Wright R.J., Pecinovsky K., Rabaey T.L., Flood B.R., Raun E.S. (2010) Areawide suppression of European corn borer with Bt maize reaps savings to non-Bt maize growers. *Science* 330(6001): 222–225.
- Chambers C.P., Whiles M.R., Rosi-Marshall E.J., Tank J.L., Royer T.V., Griffiths N.A., Evans-White M.A., Stojak A.R. (2010): Responses of stream macroinvertebrates to Bt maize leaf detritus. *Ecological Applications* 20(7): 1949–60.
- Chen J., Aimanova K. G., Fernandez L. E., Bravo A., Soberon M., Gill S.S. (2009a): *Aedes aegypti* cadherin serves as a putative receptor of the Cry11Aa toxin from *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. *Biochemical Journal* 424(2): 191–200.
- Chen J., Hua G., Jurat-Fuentes J.L., Abdullah M.A., Adang M.J. (2007): Synergism of *Bacillus thuringiensis* toxins by a fragment of a toxin-binding cadherin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States* 104(35): 13901–06.
- Chen M., Ye G., Liu Z., Fang Q., Hu C., Peng Y. Shelton A.M. (2009b): Analysis of Cry1Ab toxin bioaccumulation in a food chain of Bt rice, an herbivore and a predator. *Ecotoxicology* 12(2): 230–38.
- Chen M., Zhao J., Shelton A.M., Cao J., Earle E.D. (2008): Impact of single-gene and dual-gene Bt broccoli on the herbivore *Pieris rapae* (Lepidoptera: Pieridae) and its pupal endoparasitoid *Pteromalus puparum* (Hymenoptera: Pteromalidae). *Transgenic Research* 17(4): 545–55.
- Icoz I., Saxena D., Andow D.A., Zwahlen C., Stotzky G. (2008): Microbial populations and enzyme activities in soil in situ under transgenic corn expressing Cry proteins from *Bacillus thuringiensis*. *Journal of Environmental Quality* 37(2): 647–62.
- Icoz I., Stotzky G. (2008): Cry3Bb1 protein from *Bacillus thuringiensis* in root exudates and biomass of transgenic corn does not persist in soil. *Transgenic Research* 17(4): 609–20.

- James C. (2014): Global status of commercialized biotech/GM crops: 2014. ISAAA Brief No. 49: Executive Summary. Ithaca, ISAAA.
- Jurat-Fuentes J.L., Adang M.J. (2004): Characterization of a Cry1Ac-receptor alkaline phosphatase in susceptible and resistant *Heliothis virescens* larvae. *European Journal of Biochemistry*. 271(15): 3127–35.
- Kiliç A., Akay M.T. (2008): A three generation study with genetically modified Bt corn in rats: Biochemical and histopathological investigation. *Food and Chemical Toxicology* 46(3): 1164–70.
- Klümper W., Qaim M. (2014): A Meta-Analysis of the impacts of genetically modified crops. *PLoS ONE* 9(11): e111629.
- Knecht S., Nentwig W. (2010): Effect of Bt maize on the reproduction and development of saprophagous Diptera over multiple generations. *Basic and Applied Ecology* 11: 346–53.
- Knox O.G.G., Nehl D.B, Mor T., Roberts G.N., Gupta V.V.S.R. (2008): Genetically modified cotton has no effect on arbuscular mycorrhizal colonisation of roots. Short communication. *Field Crop Research* 109(1–3): 57–60.
- Koch R.L. (2003): The multicolored Asian lady beetle, *Harmonia axyridis*: a review of its biology, uses in biological control, and non-target impacts. *Journal of Insect Science* 3(32): 16pp.
- Kodrík D., Kludkiewicz B., Navrátil O., Skoková Habuštová O., Horáčková V., Svobodová Z., Vinokurov K.S., Sehnal F. (2013): Protease inhibitor from insect silk - activities of derivatives expressed in vitro and in transgenic potato. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 171: 209–24.
- Kramarz P., de Vaulfleury A., Gimbert F., Cortet J., Tabone E., Andersen M.N., Krogh P.H. (2009): Effects of Bt-maize material on the life cycle of the land snail *Cantareus asperses*. *Applied Soil Ecology* 42(3): 236–42.
- Krishnamoorthy M., Jurat-Fuentes J.L., McNall R.J., Andacht T., Adang M.J. (2007): Identification of novel Cry1Ac binding proteins in midgut membranes from *Heliothis virescens* using proteomic analyses. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 37(3):189–201.
- Lawo N.C., Wäckers F.L., Romeis J. (2010): Characterizing indirect prey-quality mediated effects of a Bt crop on predatory larvae of the green lacewing, *Chrysoperla carnea*. *Journal of Insect Physiology* 56(11): 1702–10.
- Lehman R.M., Osborne S.L., Rosentrater K.A. (2008a): No differences in decomposition rates observed between *Bacillus thuringiensis* and non-*Bacillus thuringiensis* corn residue incubated in the field. *Agronomy Journal* 100(1): 163–68.
- Lehman R.M., Osborne S.L., Rosentrater K.A. (2008b): No evidence that *Bacillus thuringiensis* genes and their products influence the susceptibility of corn residue to decomposition. *Agronomy Journal* 100(6): 1687–93.
- Leslie T.W., Biddinger D.J., Mullin C.A., Fleischer S.J. (2009): Carabidae population dynamics and temporal partitioning: response to coupled neonicotinoid-transgenic technologies in maize. *Environmental Entomology* 38(3): 935–43.
- Li Y., Meissle M., Romeis J. (2008): Consumption of Bt maize pollen expressing Cry1Ab or Cry3Bb1 does not harm adult green lacewings, *Chrysoperla carnea* (Neuroptera: Chrysopidae). *Plos One* 3(8): e2909.
- Li Y., Romeis J. (2010): Bt maize expressing Cry3Bb1 does not harm the spider mite, *Tetranychus urticae*, or its ladybird beetle predator, *Stethorus punctillum*. *Biological Control* 53(3): 337–44.

- Li Y., Wu K., Zhang Y., Yuan G. (2007): Degradation of Cry1Ac protein within transgenic *Bacillus thuringiensis* rice tissues under field and laboratory conditions. *Environmental Entomology* 36(5): 1275–82.
- Liu B., Wang L., Zeng Q., Meng J., Hu W., Li X., Zhou K., Xue K., Liu D., Zheng Y. (2009): Assessing effects of transgenic Cry1Ac cotton on the earthworm *Eisenia fetida*. *Soil Biology and Biochemistry* 41(2): 1841–46.
- Liu B., Xu C., Yan F., Gong R. (2005a): The Impacts of the pollen of insect-resistant transgenic cotton on honeybees. *Biodiversity and Conservation* 14(14): 3487–96.
- Liu X., Zhang Q., Zhao J., Li J., Xu B., Ma X. (2005b): Effects of Bt transgenic cotton lines on the cotton bollworm parasitoid *Microplitis mediator* in the laboratory. *Biological Control* 35(2): 134–41.
- Lu Y., Wu K., Jiang Y., Xia B., Li P., Feng H., Wyckhuys K. A. G., Guo Y. (2010): Mirid bug outbreaks in multiple crops correlated with wide-scale adoption of Bt cotton in China. *Science* 328(5982): 1151–54.
- Ludy C., Lang A. (2006): A 3-year field-scale monitoring of foliage-dwelling spiders (Araneae) in transgenic Bt maize fields and adjacent field margins. *Biological Control* 33(3): 314–24.
- Lumbierres B., Albajes R., Pons X. (2004): Transgenic Bt maize and *Rhopalosiphum padi* (Hom., Aphididae) performance. *Ecological Entomology* 29, 309–17.
- Lumbierres B., Starý P., Pons X. (2011): Effect of Bt maize on the plant-aphid-parasitoid tritrophic relationships. *BioControl* 56(2): 133–43.
- Lundgren G.J., Wiedenmann N.R. (2002): Coleopteran-specific Cry3Bb toxin from transgenic corn pollen does not affect the fitness of a nontarget species, *Coleomegilla maculata* DeGeer (Coleoptera: Coccinellidae). *Environmental Entomology* 31(6): 1213–18.
- Malone L. A., Burgess E. P. J., Stefanovic D. (1999): Effects of a *Bacillus thuringiensis* toxin, two *Bacillus thuringiensis* pesticide formulations, and a soybean trypsin inhibitor on honey bee (*Apis mellifera* L.) survival and food consumption. *Apidologie* 30(6): 465–73.
- Marvier M., McCreedy C., Regetz J., Kareiva P. (2007): A Meta-analysis of effects of Bt cotton and maize on nontarget invertebrates. *Science* 316(5830): 1475–77.
- McClintock J.T., Schaffer C.R., Sjoblad R.D. (1995): A comparative review of the mammalian toxicity of *Bacillus thuringiensis*-based pesticides. *Pesticide Science* 45(2): 95–105.
- McManus B.L., Fuller B.W., Boetel M.A., French B.W., Ellsbury M.M., Head, G.P. (2005): Abundance of *Coleomegilla maculata* (Coleoptera: Coccinellidae) in corn rootworm-resistant Cry3Bb1 Maize. *Journal of Economic Entomology* 98(6): 1992–98.
- Meihls L.N., Higdon M.L., Siegfried B.D., Miller N.J., Sappington T.W., Ellersieck M.R., Spencer T.A., Hibbard B.E. (2008): Increased survival of western corn rootworm on transgenic corn within three generations of on-plant greenhouse selection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105(49): 19177–82.
- Meissle M., Hellmich R. L., Romeis J. (2011): Impact of Cry3Bb1-expressing Bt maize on adults of the western corn rootworm, *Diabrotica virgifera virgifera* (Coleoptera: Chrysomelidae). *Pest Management Science* 67(7): 807–14.
- Meissle M., Romeis J. (2009a): Insecticidal activity of Cry3Bb1 expressed in Bt maize on larvae of the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 131(3): 308–319.

- Meissle M., Romeis J. (2009b): The web-building spider *Theridion impressum* (Araneae: Theridiidae) is not adversely affected by Bt maize resistant to corn rootworms. *Plant Biotechnology Journal* 7(7): 645–56.
- Meissle M., Romeis J. (2012): No accumulation of Bt protein in *Phylloneta impressa* (Araneae: Theridiidae) and prey arthropods in Bt maize. *Environmental Entomology* 41(4): 1037–42.
- Miethling-Graff R., Dockhorn S., Tebbe C.C. (2010): Release of the recombinant Cry3Bb1 protein of Bt maize MON88017 into field soil and detection of effects on the diversity of rhizosphere bacteria. *European Journal of Soil Biology* 46(1): 41–48.
- Minarčíková L. (2015): The impact of genetically modified maize on non-target insect with emphasis on collembola. Disertační práce. Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre. 137 p.
- Mullin C.A., Saunders M.C., Leslie T.W., Biddinger D.J., Fleischer S.J. (2005): Toxic and behavioral effects to Carabidae of seed treatments used on Cry3Bb1- and Cry1Ab/c-protected corn. *Environmental Entomology* 34(6): 1626–36.
- Nedělník J. (2010): Geneticky modifikovanou kukuřicí ke kvalitnější siláži. *Úroda* (12). 40–42.
- Nguyen H., Hunfeld H., Meissle M., Miethling-Graff R., Pagal-Wieder S., Rauschen S., Zurbrügg C., Eber S., Gessler F., Romeis J., Tebbe C.C., Nentwig W., Jehle J. A. (2008): Round robin quantitation of Cry3Bb1 using the qualitative PathoScreen ELISA. *IOBC/WPRS Bulletin* 33: 59–66.
- Nguyen H.T., Jehle J.A. (2007): Quantitative analysis of the seasonal and tissue-specific expression of Cry1Ab in transgenic maize Mon810. *Journal of Plant Diseases and Protection*. 114(2). 82–87.
- Nguyen H., Jehle J.A. (2009): Expression of Cry3Bb1 in transgenic corn MON88017. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57(21): 9990–96.
- Nowatzki T.M., Zhou X., Meinke L.J., Vaughn T., Siegfried B.D. (2006): Effect of *Bacillus thuringiensis* Cry3Bb1 protein on the feeding behavior and longevity of adult western corn rootworms (Coleoptera: Chrysomelidae). *Journal of Economic Entomology* 99(3): 927–30.
- Obrist L. B., Klein H., Dutton A., Bigler F. (2006): Assessing the effects of Bt maize on the predatory mite *Neoseiulus cucumeris*. *Experimental and Applied Acarology* 38(2–3):125–39.
- Oliveira A. P., Pampulha M. E., Bennett J. P. (2008): A two-year field study with transgenic *Bacillus thuringiensis* maize: effects on soil microorganisms. *Science of the Total Environment* 405(1–3): 351–57.
- Onstad D.W., Meinke L.J. (2010): Modeling evolution of *Diabrotica virgifera virgifera* (Coleoptera: Chrysomelidae) to transgenic corn with two insecticidal traits. *Journal of Economic Entomology* 103(3): 849–60.
- Oppert B., Kramer K.J., Johnson D.E., MacIntosh S.C., McGaughey W.H. (2009): Altered protoxin activation by midgut enzymes from a *Bacillus thuringiensis* resistant strain of *Plodia interpunctella*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 198(3): 940–47.
- Pigott C.R., Ellar D.J. (2007): Role of receptors in *Bacillus thuringiensis* crystal toxin activity. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 71. 255–81.
- Pistorius J., Bischoff G. (2008): Insecticidal seed treatment and honeybee poisoning incidents in Germany 2008-background and facts. *IOBC/IWGO-newsletter* 29:18.
- Prihoda K.R., Coats J.R. (2008): Fate of *Bacillus thuringiensis* (Bt) Cry3Bb1 protein in a soil microcosm. *Chemosphere* 73: 1102–07.

- Půža V., Habušťová O., Hussein H.M., Svobodová Z. (2011): The abundance, distribution and natural host range of entomopathogenic nematodes (Nematoda: Steinernematidae) in the experimental GM maize MON 88017 field. IOBC/WPRS Bulletin 66: 367–70.
- Ramirez-Romero R., Bernal J.S., Chaufaux J., Kaiser L. (2006): Impact assessment of Bt-maize on a moth parasitoid, *Cotesia marginiventris* (Hymenoptera: Braconidae), via host exposure to purified Cry1Ab protein or Bt-plants. Crop Protection 26(7): 953–62.
- Ramirez-Romero R., Desneux N., Chaufaux J., Kaiser L. (2008): Bt-maize effects on biological parameters of the non-target aphid *Sitobion avenae* (Homoptera: Aphididae) and Cry1Ab toxin detection. Pesticide Biochemistry and Physiology 91(2): 110–15.
- Raps A., Kehr J., Guerli 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: 525–33.
- Raubuch M., Behr K., Roose K., Joergensen R.G. (2010): Specific respiration rates, adenylates, and energy budgets of soil microorganisms after addition of transgenic Bt-maize straw. Pedobiologia 53: 191–96.
- Rausell C., Ochoa-Campuzano C., Martínez-Ramírez A. C., Bravo A., Real M. D. (2007): A membrane associated metalloprotease cleaves Cry3Aa *Bacillus thuringiensis* toxin reducing pore formation in Colorado potato beetle brush border membrane vesicles. Biochimica et Biophysica Acta 1768(9): 2293–99.
- Rauschen S., Schultheis E., Pagel-Wieder S., Schuphan I., Eber S. (2009): Impact of Bt-corn MON88017 in comparison to free conventional lines on *Trigonotylus caelestialium* (Kirkaldy) (Heteroptera: Miridae) field densities. Transgenic Research 18: 203–14.
- Ricroch A., Harwood W., Svobodová Z., Sági L., Hundleby P., Badea E.M., Rosca I., Cruz G., Fevereiro M.P.S., Riera V.M., Jansson S., Morandini P., Bojinov B., Cetiner S., Custers R., Schrader U., Jacobsen H., Martin-Laffon J., Boisron A., Kuntz M. (2015): Challenges facing European agriculture and possible biotechnological solutions. Critical Reviews in Biotechnology: v tisku.
- Riddick E.W., Dively G., Barbosa P. (1998): Effect of a seed-mix deployment of Cry3A transgenic and nontransgenic potato on the abundance of *Lebia grandis* (Coleoptera: Carabidae) and *Coleomegilla maculata* (Coleoptera: Coccinellidae). Annals of the Entomological Society of America 91(5): 647–53.
- Romeis J., Hellmich R.L., Candolfi M.P., Carstens K., De Schrijver A., Gatehouse A.M., Herman R.A., Huesing J.E., McLean M.A., Raybould A., Shelton A.M., Waggoner A. (2011): Recommendations for the design of laboratory studies on non-target arthropods for risk assessment of genetically engineered plants. Transgenic Research 20(1): 1–22.
- Romeis J., Meissle M. (2011): Non-target risk assessment of Bt crops – Cry protein uptake by aphids. Journal of Applied Entomology 135(1–2): 1–6.
- Romeis J., Meissle M., Bigler F. (2006): Transgenic crops expressing *Bacillus thuringiensis* toxins and biological control. Nature Biotechnology 24: 63–71.
- Romeis J., Meissle M., Naranjo S.E., Li Y., Bigler F. (2014): The end of a myth – Bt (Cry1Ab) maize does not harm green lacewings. Frontiers in Plant Science 5: 391.
- Rose R., Dively G.P. (2007): Effects of insecticide-treated and Lepidopteran-active Bt transgenic sweet corn on the abundance and diversity of arthropods. Environmental Entomology 36(5): 1254–68.

- Sanvido O., Romeis J., Bigler F. (2009): An approach for post-market monitoring of potential environmental effects of Bt-maize expressing Cry1Ab on natural enemies. *Journal of Applied Entomology* 133(4): 236–48.
- Saxena D., Stotzky G. (2000): Insecticidal toxin from *Bacillus thuringiensis* is released from roots of transgenic Bt corn in vitro and in situ. *FEMS Microbiology Ecology* 33: 35–39.
- Saxena D., Stotzky G. (2001): Bt corn has a higher lignin content than non-Bt corn. *American Journal of Botany* 88(9): 1704–06.
- Sayed A., Wiechman B., Struewing I., Smith M., French W., Nielsen C., Bagley M. (2010): Isolation of transcripts from *Diabrotica virgifera virgifera* LeConte responsive to the *Bacillus thuringiensis* toxin Cry3Bb1. *Insect Molecular Biology* 19(3): 381–89.
- Shan G., Embrey S.K., Herman R.A., McCormick R. (2008): Cry1F protein not detected in soil after three years of transgenic Bt corn (1507 corn) use. *Environmental Entomology* 37(1):255–62.
- Shirai Y. (2006): Laboratory evaluation of effects of transgenic Bt corn pollen on two non-target herbivorous beetles, *Epilachna vigintioctopunctata* (Coccinellidae) and *Galerucella vittaticollis* (Chrysomelidae). *Applied Entomology and Zoology* 41(4): 607–11.
- Schirmel J., Lenze S., Katzmann D., Buchholz S. (2010): Capture efficiency of pitfall trap is highly affected by sampling interval. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 136: 206–10.
- Schmidt J. E., Braun C. U., Whitehouse L. P., Hilbeck A. (2009): Effects of activated Bt transgene products (Cry1Ab, Cry3Bb) on immature stages of the ladybird *Adalia bipunctata* in laboratory ecotoxicity testing. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 56(2):221–28.
- Schorling M., Freier B. (2006): Six-year monitoring of non-target arthropods in Bt maize (Cry 1Ab) in the European corn borer (*Ostrinia nubilalis*) infestation area Oderbruch (Germany). *Journal of Consumer protection and Food Safety* 1(1): 106–08.
- Siegel J. P., Shaddock J. A., Szabo J. (1987): Safety of the entomopathogen *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* for mammals. *Journal of Economic Entomology* 80(4): 717–23.
- Skoková Habušťová O., Svobodová Z., Spitzer L., Doležal P., Hussein H.M., Sehnal F. (2015): Communities of ground-dwelling arthropods in conventional and transgenic maize: background data for the post-market environmental monitoring. *Journal of Applied Entomology* 139(1–2): 31–45.
- Snell C., Bernheim A., Bergé J.-B., Kuntz M., Pascal G., Paris A., Ricroch A.E. (2012): Assessment of the health impact of GM plant diets in long-term and multigenerational animal feeding trials: A literature review. *Food and Chemical Toxicology* 50(3–4): 1134–48.
- Steinbrecher I. (2004): Effects of Bt transgenes on herbivorous insect-parasitoid interactions. Disertační práce. Georg-August-Universität Göttingen. 81 p.
- Storer N.P., Babcock J.M., Schlenz M., Meade T., Thompson G.D., Bing J.W., Huckaba R.M. (2010): Discovery and characterization of field resistance to Bt maize: *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in Puerto Rico. *Journal of Economic Entomology* 103(4): 1031–38.
- Svobodová Z., Burkness E.C., Hutchison W.D., Skoková Habušťová O. (2013a): Cry toxin uptake by pests and implications for insecticide resistance management. *IOBC/WPRS Bulletin* 97: 115–19.

- Svobodová Z., Romeis J., Skoková Habuštová O., Meissle M. (2015): Susceptibility of *Spodoptera littoralis* (Boisd.) to lepidopteran active Cry proteins in stacked Bt maize. IOBC/WPRS Bulletin. v tisku.
- Svobodová Z., Zemek R., Habuštová O., Hussein H. M., Sehnal F. (2013b): The influence of different maize varieties and treatments on the two-spotted spider mite, *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae). IOBC/WPRS Bulletin 93: 119–23.
- Tian J.-C., Long L.-P., Wang X.-P., Naranjo S. E., Romeis J., Hellmich R. L., Wang P., Shelton A.M. (2014): Using resistant prey demonstrates that Bt plants producing Cry1Ac, Cry2Ab, and Cry1F have no negative effects on *Geocoris punctipes* and *Orius insidiosus*. Environmental Entomology 43(1): 242–51.
- Tian J.-C., Wang X.-P., Long L.-P., Romeis J., Naranjo S.E., Hellmich R.L., Wang P., Earle E.D., Shelton A.M. (2013): Bt crops producing Cry1Ac, Cry2Ab and Cry1F do not harm the green lacewing, *Chrysoperla rufilabris*. PLoS ONE 8(3): e60125.
- Torres J.B., Ruberson J.R. (2008): Interactions of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin in genetically engineered cotton with predatory heteropterans. Transgenic Research 17(3): 345–54.
- Turrini A., Sbrana C., Nuti M.P., Pietrangeli B.M., Giovannetti M. (2004): Development of a model system to assess the impact of genetically modified corn and aubergine plants on arbuscular mycorrhizal fungi. Plant and Soil 266(1–2): 69–75.
- Vaeck M., Reynaerts A., Höfte H., Jansens S., De Beuckeleer M., Dean C., Zabeau M., Van Montagu M., Leemans J. (1987): Transgenic plants protected from insect attack. Nature 328: 33–37.
- Van Eenennaam A.L., Young A.E. (2014): Prevalence and impacts of genetically engineered feedstuffs on livestock populations. Journal of Animal Science 92(10): 4255–78.
- de Vaufleury A., Kramarz P.E., Binet P., Cortet J., Caul S. (2007): Exposure and effects assessments of Bt-maize on non-target organisms (gastropods, microarthropods, mycorrhizal fungi) in microcosms. Pedobiologia 51(3): 185–94.
- Vojtech E., Meissle M., Poppy G.M. (2005): Effects of Bt maize on the herbivore *Spodoptera littoralis* (Lepidoptera: Noctuidae) and the parasitoid *Cotesia marginiventris* (Hymenoptera: Braconidae). Transgenic Research 14(2): 133–44.
- Wang S., Guo A.Y., Zheng W.J., Zhang Y., Qiao H., Kennedy I.R. (2007): Development of ELISA for the determination of transgenic Bt-cottons using antibodies against Cry1Ac protein from *Bacillus thuringiensis* HD-73. Engineering in Life Sciences 7(2): 149–54.
- Wang E.H., Yu Z., Hu J., Jia X.D., Xu H.B. (2014): A two-generation reproduction study with transgenic Bt rice TT51 in Wistar rats. Food and Chemical Toxicology 65: 312–20.
- Whalon M.E., Miller D.L., Hollingworth R.M., Grafius E.J., Miller J.R. (1993): Selection of a Colorado potato beetle (Coleoptera: Chrysomelidae) strain resistant to *Bacillus thuringiensis*. Journal of Economic Entomology 86(2): 226–33.
- Wolfenbarger L.L., Naranjo S.E., Lundgren J.G., Bitzer R.J., Watrud L.S. (2008): Bt crop effects on functional guilds of non-target arthropods: a meta-analysis. Plos One 3(5): e2118.
- Wu K.M., Guo Y.Y. (2005): The evolution of cotton pest management practices in China. Annual Review of Entomology 50: 31–52.
- Yang Y., Chen X., Cheng L., Cao F., Romeis J., Li Y., Peng Y. (2015): Toxicological and biochemical analyses demonstrate no toxic effect of Cry1C and Cry2A to *Folsomia candida*. Scientific Reports 5: 15619.

- Yang Y., Yu Y., Ren Lu., Shao Y., Qian K., Zalucki M. (2005): Possible incompatibility between transgenic cottons and parasitoids. *Australian Journal of Entomology* 44 (4): 442–45.
- Yu H., Li Y., Wu K. (2011): Risk assessment and ecological effects of transgenic *Bacillus thuringiensis* crops on non-target organisms. *Journal of Integrative Plant Biology* 53(7): 520–38.
- Zemková Rovenská G., Zemek R., Schmidt J.E.U., Hilbeck A. (2005): Altered host plant preference of *Tetranychus urticae* and prey preference of its predator *Phytoseiulus persimilis* (Acari: Tetranychidae, Phytoseiidae) on transgenic Cry3Bb-eggplants. *Biological Control* 33(3): 293–300.
- Zhang X., Candas M., Griko N.B., Rose-Young L., Bulla L.A. Jr. (2005): Cytotoxicity of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin depends on specific binding of the toxin to the cadherin receptor BT-R1 expressed in insect cells. *Cell Death and Differentiation* 12(11): 1407–16.
- Zurbrügg C., Hönemann L., Meissle M., Romeis J., Nentwig W. (2010): Decomposition dynamics and structural plant components of genetically modified Bt maize leaves do not differ from leaves of conventional hybrids. *Transgenic Research* 19(2): 257–67.
- Zurbrügg C., Nentwig W. (2009): Ingestion and excretion of two transgenic Bt corn varieties by slugs. *Transgenic Research* 18(2): 215–25.
- Zwahlen C., Hilbeck A., Gugerli P., Nentwig W. (2003): Degradation of the Cry1Ab protein within transgenic *Bacillus thuringiensis* corn tissue in the field. *Molecular Ecology* 12(3): 765–75.

5. Publikace

5.1. Publikace I

Svobodová Z., Habušťová O., Sehnal F., Holec M., Hussein H.M. (2013): Epigeic spiders are not affected by the genetically modified maize MON 88017. *Journal of Applied Entomology* 137(1–2): 56–67.

Epigeic spiders are not affected by the genetically modified MON 88017

Zdeňka Svobodová^{1,2}, Oxana Habuštová¹, František Sehnal^{1,2}, Michal Holec³, Hany M. Hussein¹

1 Institute of Entomology, Biology Centre CAS, Branišovská 31, 370 05 České Budějovice, Czech Republic

2 Faculty of Science, University of South Bohemia, Branišovská 31, 370 05 České Budějovice, Czech Republic

3 Faculty of Environment, Jan Evangelista Purkyně University, Králova výšina 7, 400 96 Ústí nad Labem, Czech Republic

Abstract

The genetically modified (GM) maize MON 88017 facilitates weed management owing to its tolerance to glyphosate, and resists western corn rootworm (WCR), *Diabrotica virgifera virgifera*, owing to the expression of Cry3Bb1 toxin. MON 88017 could therefore contribute to the solution of two major problems of European agriculture: continuous WCR spreading and high use of herbicides. To assess possible unwanted environmental impacts of MON 88017, we compared communities of spiders in plots planted in three successive years with this maize, its near isogenic non-GM cultivar treated or not treated with an insecticide and two unrelated maize cultivars. Each of the five treatments was applied on five 0.5 ha plots in a 14 ha field. Spiders were collected in five pitfall traps per plot five times per year. Upon reaching the waxy ripening stage, all plants of first-year cultivation were shredded to small pieces and ploughed into the soil in the respective plot, whereas in the 2nd and 3rd year the harvest was used for biogas production and only digestate was returned to the field. Out of 79 spider species, *Pardosa agrestis*, *Pachygnatha degeeri* and *Oedothorax apicatus* made up 28%, 25% and 23% of the total spider count in the 1st year of study; 2%, 8% and 84% in the 2nd; and 40%, 8% and 35% in the 3rd year. Statistical analysis did not reveal any influence of GM maize on the spider abundance and bio-diversity. The abundance, and in two years also the species diversity, was insignificantly higher on the plots with GM maize than on plots with the insecticide-treated non-GM maize. The composition and size of spider community varied year to year, probably reflecting weather conditions and differences in field fertilization with organic matter.

Těchto 12 stran práce je chráněno autorskými právy.

Plná verze disertační práce je archivována v Akademické knihovně Jihočeské Univerzity.

© 2012 Blackwell Verlag, GmbH

Publikace je k dispozici na adrese:

<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1439-0418.2012.01727.x/abstract>

5.2. Publikace II

Svobodová Z., Skoková Habuštová O., Hutchison W.D., Hussein H.M., Sehnal F. (2015): Risk assessment of genetically engineered maize resistant to *Diabrotica* spp.: influence on above-ground arthropods in the Czech Republic. PLoS ONE 10(6): e0130656.

Risk assessment of genetically engineered maize resistant to *Diabrotica* spp.: influence on above-ground arthropods in the Czech Republic

Zdeňka Svobodová^{1,2}, Oxana Skoková Habušťová¹, William D. Hutchison³, Hany M. Hussein¹, František Sehnal^{1,2}

1 Institute of Entomology, Biology Centre CAS, Branišovská 31, 370 05 České Budějovice, Czech Republic

2 Faculty of Science, University of South Bohemia, Branišovská 31, 370 05 České Budějovice, Czech Republic

3 Department of Entomology, University of Minnesota, 1980 Folwell Avenue, St. Paul, MN 55108-6125, USA.

Abstract

Transgenic maize MON88017, expressing the Cry3Bb1 toxin from *Bacillus thuringiensis* (Bt maize), confers resistance to corn rootworms (*Diabrotica* spp.) and provides tolerance to the herbicide glyphosate. However, prior to commercialization, substantial assessment of potential effects on non-target organisms within agroecosystems is required. The MON88017 event was therefore evaluated under field conditions in Southern Bohemia in 2009–2011, to detect possible impacts on the above-ground arthropod species. The study compared MON88017, its near-isogenic non-Bt hybrid DK315 (treated or not treated with the soil insecticide Dursban 10G) and two non-Bt reference hybrids (KIPOUS and PR38N86). Each hybrid was grown on five 0.5 ha plots distributed in a 14-ha field with a Latin square design. Semiquantitative ELISA was used to verify Cry3Bb1 toxin levels in the Bt maize. The species spectrum of non-target invertebrates changed during seasons and was affected by weather conditions. The thrips *Frankliniella occidentalis* was the most abundant species in all three successive years. The next most common species were aphids *Rhopalosiphum padi* and *Metopolophium dirhodum*. Frequently observed predators included *Orius* spp. and several species within the Coccinellidae. Throughout the three-year study, analysis of variance indicated some significant differences ($P < 0.05$). Multivariate analysis showed that the abundance and diversity of plant dwelling insects was similar in maize with the same genetic background, for both Bt (MON88017) and non-Bt (DK315) untreated or insecticide treated. KIPOUS and PR38N86 showed some differences in species abundance relative to the Bt maize and its near-isogenic hybrid. However, the effect of management regime

on arthropod community was insignificant and accounted only for a negligible portion of the variability.

Těchto 16 stran práce je chráněno autorskými právy.

Plná verze disertační práce je archivována v Akademické knihovně Jihočeské Univerzity.

© 2015 Svobodová et al. (Creative Commons Attribution License)

Publikace je k dispozici na adrese:

<http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0130656>

5.3. Publikace III

Svobodová Z., Skoková Habuštová O., Boháč J., Sehnal F.: Functional diversity of staphylinid beetles (Coleoptera: Staphylinidae) in maize fields: testing the possible effect of genetically modified, insect resistant maize. Přijato v Bulletin of Entomological Research.

Functional diversity of staphylinid beetles (Coleoptera: Staphylinidae) in maize fields: testing the possible effect of genetically modified, insect resistant maize

Zdeňka Svobodová^{1,2}, Oxana Skoková Habušťová¹, Jaroslav Boháč³, František Sehnal^{1,2}

1 Institute of Entomology, Biology Centre CAS, Branišovská 31, 370 05 České Budějovice, Czech Republic

2 Faculty of Science, University of South Bohemia, Branišovská 31, 370 05 České Budějovice, Czech Republic

3 Faculty of Agriculture, University of South Bohemia, Studentská 13, 370 05 České Budějovice, Czech Republic

Abstract

Staphylinid beetles are recommended bioindicators for the pre-market environmental risk assessment of genetically modified (GM) insect protected maize expressing the Cry3Bb1 toxin. Our multiannual study is a unique European analysis of a staphylinid community within a 14 ha maize field. GM maize, its near-isogenic hybrid (with or without insecticide treatment), and two other reference hybrids were each grown in five 0.5 ha plots. The opportunity for exposure to Cry toxin from plant residues ploughed into the soil was shown by presence of saprophagous dipteran larvae that are common prey of predatory staphylinid species and hosts of the parasitoid species. 2587 individuals belonging to 77 staphylinid species were sampled using pitfall traps. *Lesteva longolytrata* (31 %), *Oxypoda acuminata* (12 %), *Aloconota sulcifrons* (8 %) and *Anotylus rugosus* (7 %) were the most abundant beetles in the field. Bionomics, food specialization, temperature requirements and size group were assigned for 25 most common species. These traits determine the occurrence of staphylinid beetles in field, the food sources they could utilize and thus also their likely contact with the Cry3Bb1 toxin. Statistical analysis of activity abundance, Rao indices and multivariate analysis of distribution of particular categories of functional traits in the field showed negligible effects of the experimental treatments, including the GM maize, upon the staphylinid community. Staphylinid beetles represent a considerably diverse part of epigeic field fauna with wide food specialization; these features render them suitable for the assessment of environmental safety of GM insect protected maize. However, the

availability of prey, the presence of particular staphylinid species and their abundance is highly variable what complicates the interpretation of the results.

Těchto 35 stran práce je chráněno autorskými právy.

Plná verze disertační práce je archivována v Akademické knihovně Jihočeské Univerzity.

© Cambridge University Press 2015

Publikace bude k dispozici na adrese:

<http://journals.cambridge.org/action/displayJournal?jid=BER>

5.4. Publikace IV

Svobodová Z., Burkness E.C., Skoková Habuřtová O., Hutchison W.D.:
Predator preference for Bt-fed prey: Implications for insect resistance
management in Bt maize seed blends. Rukopis.

Predator preference for Bt-fed prey: implications for insect resistance management in Bt maize seed blends

Zdeňka Svobodová^{1,2}, Eric C. Burkness³, Oxana Skoková Habušťová¹, William D. Hutchison³

1 Institute of Entomology BC CAS, Branišovská 31, České Budějovice, 370 05, Czech Republic

2 Faculty of Science, University of South Bohemia, Branišovská 31, České Budějovice, 370 05, Czech Republic

3 Department of Entomology, University of Minnesota, 1980 Folwell Avenue, St. Paul, MN 55108-6125, USA.

Abstract

Previous research described indirect effects (nutritional deficiency) of the Bt-sensitive prey on the predators. To verify this observation, a no-choice experiment was performed using the predator *Harmonia axyridis* preying on *Spodoptera frugiperda* feeding on the Bt or non-Bt maize expressing Cry1Ab. *Spodoptera frugiperda* larvae consuming Bt maize were smaller and developed longer than larvae on the non-Bt maize. The ability of *S. frugiperda* to acquire Bt proteins from the host plants and passing them to the predators appears to have no adverse effects on *H. axyridis* development. However, *H. axyridis* consumed more of the smaller Bt-fed than of the normal size non-Bt fed caterpillars of *S. frugiperda* of the same age. Therefore, the question arises of whether, when given a choice, predators prefer prey that is affected by Bt protein uptake. To answer this question, a choice experiment was designed. *Harmonia axyridis* larvae were fed 1 – 5-day old *S. frugiperda* larvae fed on Bt or non-Bt maize. General, preference for larvae feeding on the Bt maize was evident. We suggest that *H. axyridis* prey preference is not based on the Bt presence or absence but on the size of larvae. These results may have implications for insect resistance management. Larvae of pests harboring various levels of resistance against plant-expressed Bt proteins could grow more slowly than the sensitive larvae on non-Bt maize. If Bt-fed *S. frugiperda* larvae are more likely to be preyed upon by *H. axyridis*, it is possible that such larvae, having experienced Bt selection, may be preferentially removed from local field populations. This scenario is now more likely to be played out under field conditions in the U.S. where seed blends of Bt and non-Bt hybrid seed are randomly mixed within commercial fields (“refuge in a bag” approach). The co-occurrence of Bt-fed and non-Bt-fed

herbivores on plants is higher in this approach. The frequency of this phenomenon should be studied further under field conditions.

Těchto 25 stran práce je chráněno autorskými právy.

Plná verze disertační práce je archivována v Akademické knihovně Jihočeské Univerzity.

5.5. Publikace V

Svobodová Z., Romeis J., Skoková Habušťová O., Meissle M.: Transfer of insecticidal Cry proteins from stacked Bt maize along the trophic chain. Rukopis.

Transfer of insecticidal Cry proteins from stacked Bt maize along the trophic chain

Zdeňka Svobodová^{1,2,3,4}, Jörg Romeis^{1,2}, Oxana Skoková Habušťová³, Michael Meissle²

1 Institute of Ecology and Evolution, University of Bern, Baltzerstrasse 6, Bern, 3012, Switzerland

2 Institute for Sustainability Sciences, Agroscope, Reckenholzstrasse 191, Zürich, 8046, Switzerland

3 Institute of Entomology BC CAS, Branišovská 31, České Budějovice, 370 05, Czech Republic

4 Faculty of Science, University of South Bohemia, Branišovská 31, České Budějovice, 370 05, Czech Republic

Abstract

Insecticidal Cry proteins produced by genetically modified plants are passed on to herbivores and organisms at higher trophic levels. The aim of our study was to explore how different Cry proteins are transferred in the trophic chain and how they interact in their effect on natural enemies. We used a stacked maize event expressing six Cry proteins from *Bacillus thuringiensis* (SmartStax). This allowed us to study simultaneously the concentrations of the individual proteins, their ratios and transfer in the trophic chain, and their effect on natural enemies. We designed tritrophic studies with two model herbivores, the aphid *Rhopalosiphum padi* and the spider mite *Tetranychus urticae*, and maize pollen as a food source for two natural enemies, the lacewing larva *Chrysoperla carnea* and the juvenile spider *Phylloneta impressa*. ELISA showed that the different proteins were produced in different concentrations in the maize plant and that natural enemies received Cry proteins in their food. The concentration of Cry proteins decreased as they moved up the trophic chain. However, there were differences in the uptake and transfer along the trophic levels. The concentrations of four Cry proteins, especially Cry1A.105, in the spider mites exceeded concentrations in the leaves. High concentrations of all Cry proteins were measured in predators feeding on the spider mites, while Cry2Ab2 was the most diluted Cry protein in all arthropods. Aphids ingested relatively low amounts of any Cry protein. The Cry proteins did not accumulate in either of the two natural enemies and statistical analyses showed a lack of effect of Cry

proteins expressed by stacked Bt maize on their development time, weight and mortality.

Těchto 26 stran práce je chráněno autorskými právy.

Plná verze disertační práce je archivována v Akademické knihovně Jihočeské Univerzity.

© nepublikovaných částí Zdeňka Svobodová
e-mailová adresa: svobodova@entu.cas.cz

Vliv GM kukuřice na entomofaunu
Série Ph.D. prací, 2016, č. 1.
Všechna práva vyhrazena
Pouze pro nekomerční použití

Vytištěno v České republice tiskárnou & studiem Typodesign
Vydání 20 kopií

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta
Branišovská 1760
CZ-37005 České Budějovice, Česká republika

Telefon: +420 387 776 201
www.prf.jcu.cz, e-mail: sekret-fpr@prf.jcu.cz