

Henryk MALINOWSKI
Instytut Badawczy Leśnictwa
Zakład Ochrony Lasu
ul. Bitwy Warszawskiej 1920 Roku nr 3, 00-973 Warszawa
e-mail: tarwack@ibles.waw.pl

STAN BADAŃ NAD ODPORNOŚCIĄ OWADÓW NA TOKSYNY *BACILLUS THURINGIENSIS*

STATE OF THE STUDIES ON INSECTS RESISTANCE
TO *BACILLUS THURINGIENSIS* TOXINS

Abstract: *The state of the field and laboratory studies on resistance of insects of different orders to *Bacillus thuringiensis* bioinsecticides and their crystal protein toxins, as well as genetic and physiological mechanisms of this resistance is presented.*

Key words: *Bacillus thuringiensis* toxins, resistance development, resistance mechanism, insect control, field resistance, bioinsecticides.

SPIS TREŚCI

1. Wstęp	55
1.1. Znaczenie bioinsektycydów <i>B. thuringiensis</i> dla ochrony roślin	55
1.2. Osiągnięcia badawcze i aplikacyjne	57
1.3. Klasyfikacja genów kryształów białkowych <i>B. thuringiensis</i>	59
2. Odporność wykształcona u owadów w warunkach praktycznego stosowania bioinsektycydów <i>B. thuringiensis</i>	60
3. Rozwój odporności u owadów na <i>B. thuringiensis</i> w wyniku selekcji laboratoryjnej	63
3.1. Rozwój odporności u <i>Lepidoptera</i>	64
3.1.1. Szkodniki magazynów	64
3.1.2. Szkodniki upraw polowych	65
3.1.3. Szkodniki lasów	67
3.2. Rozwój odporności u <i>Coleoptera</i>	67
3.3. Rozwój odporności u <i>Diptera</i>	68
4. Odporność krzyżowa	68
5. Mechanizmy odporności	71
5.1. Fizjologiczne i biochemiczne mechanizmy odporności	71
5.1.1. Mechanizmy odporności wynikające z modyfikacji specyficznych receptorów	73
5.1.2. Inne mechanizmy odporności.	74
5.2. Genetyczne mechanizmy odporności.	75
5.2.1. Dziedziczenie odporności	75
5.2.2. Trwałość odporności	77
6. Możliwości przeciwdziałania rozwojowi odporności na toksyny <i>B. thuringiensis</i> u owadów	79
7. Podsumowanie	83
8. Wnioski ogólne	85
Summary	86
Piśmiennictwo.	87

1. WSTĘP

Celem niniejszego opracowania jest przedstawienie aktualnego stanu wiedzy na temat odporności owadów na toksyny białkowe *Bacillus thuringiensis*. Negatywne dla środowiska skutki, zwłaszcza szybkie wykształcanie odporności u owadów na stosowane od wielu lat środki chemiczne, stanowiły wyzwanie do podjęcia szerokich, interdyscyplinarnych badań nad toksynami białkowymi o działaniu owadobójczym, produkowanymi przez bakterię *Bacillus thuringiensis*. Zastosowanie w latach osiemdziesiątych naszego stulecia nowych technik badawczych, zwłaszcza inżynierii genetycznej, doprowadziło do istotnego rozszerzenia wiedzy w zakresie struktury i mechanizmu działania toksyn *B. thuringiensis* (choć wiele zagadnień wymaga dalszych badań), natomiast badania w latach dziewięćdziesiątych pozwoliły na zrozumienie oddziaływania wymienionych toksyn na naturalne środowisko, co stworzyło podstawy do opracowania strategii kontroli owadów, które są efektywne i jednocześnie bezpieczne dla środowiska (VAN FRANKENHUYZEN 1993). Możliwość rozwoju odporności u owadów w wyniku stosowania nowych technologii jest jednym z najważniejszych problemów w ochronie roślin. Mając na uwadze lepsze zrozumienie zagadnień związanych z odpornością owadów na toksyny białkowe *B. thuringiensis*, zwłaszcza w zakresie ich nazewnictwa i klasyfikacji, we wstępie podano podstawowe informacje dotyczące znaczenia bioinsektycydów *B. thuringiensis* dla ochrony roślin, osiągnięć badawczych i aplikacyjnych oraz klasyfikacji genów kryształów białkowych. Następnie omówiono przypadki odporności wykształconej u owadów w warunkach praktycznego stosowania bioinsektycydów oraz w wyniku selekcji laboratoryjnej. Opisano również odporność krzyżową, fizjologiczne, biochemiczne i genetyczne mechanizmy odporności owadów na toksyny *B. thuringiensis* oraz możliwości przeciwdziałania temu zjawisku.

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

Chemiczne środki ochrony roślin, stosowane na znaczną skalę już blisko pół wieku, wywołują szereg niekorzystnych zmian w środowisku, jak np. wyselekcjonowanie odpornych populacji u ponad 500 gatunków owadów (GEORGHIU 1994), czy wyniszczanie wrogów naturalnych szkodników, przyczyniających się do utrzymywania ich populacji na niegroźnym dla roślin poziomie. Ponadto pozostałości chemicznych środków ochrony roślin mogą skażać środowisko oraz występować w produktach roślinnych przeznaczonych do konsumpcji lub na paszę powyżej dopuszczalnego poziomu, co zagraża bezpośrednio zdrowiu i życiu ludzi i zwierząt. Wymienione względy, a także nacisk różnych grup ekologicznych, spowodowały szersze zainteresowanie się bardziej przyjaznymi dla śro-

dowiska środkami, jakimi są bioinsektycydy oparte na bakterii *Bacillus thuringiensis* (Berliner). Wymienione bioinsektycydy zalicza się do bezpiecznych i najbardziej selektywnych spośród znanych obecnie środków owadobójczych. Nie przewiduje się dla nich okresu karencji (okres między zabiegiem a zbiorem plonów), mogą więc być stosowane do dnia zbioru plonów. W związku z tymi właściwościami bioinsektycydy są również zalecane do kontroli owadów na terenach rekreacyjnych, w pobliżu zbiorników wodnych, w parkach narodowych.

W ciągu ostatnich 20 lat nastąpił wyraźny postęp w stosowaniu bioinsektycydów *B. thuringiensis* w ochronie upraw rolniczych, warzywniczych, sadowniczych, w higienie sanitarnej, a zwłaszcza w ochronie lasu, gdzie zużywa się obecnie około 60-70% światowej produkcji tych biopreparatów (VAN FRANKENHUYZEN 1993). Analizując wartość sprzedawanych każdego roku na świecie biopestycydów (głównie bioinsektycydów, w których udział środków opartych na bakterii *Bacillus thuringiensis* wynosi około 80%) oszacowano, że w latach 1990-1994 nastąpił około 3-krotny wzrost wartości sprzedaży tych środków, chociaż w dalszym ciągu stanowiło to poniżej 1% ogólnej wartości środków ochrony roślin (MARRONE, MACINTOSH 1993; LISANSKY, COOMBS 1994). Można to częściowo tłumaczyć wprowadzeniem w ostatnich latach do stosowania na znaczną skalę tańszych bioinsektycydów *B. thuringiensis*, jak np. Foray (LISANSKY, COOMBS 1994). Przewiduje się dalszy, znaczący wzrost udziału bioinsektycydów, w tym zawierających toksyny *B. thuringiensis*, na rynku światowym (LISANSKY, COOMBS 1994; RAVENSBERG 1994).

Bioinsektycydy *B. thuringiensis*, ze względu na niewielki, uboczny wpływ na środowisko, są głównymi środkami ochrony lasu w Kanadzie, USA i w wielu innych krajach, gdzie niezbędne jest wykonywanie zabiegów ochronnych przeciwko szkodnikom liściożernym, występującym w zagęszczeniu zagrażającym zdrowotności drzewostanów. W Polsce (do 30 października 1997 r.) było zarejestrowanych w ochronie roślin 12 bioinsektycydów *B. thuringiensis*, w tym 7 w ochronie lasu: Dipel 8L; Dipel 3.2 WP; Ecotech Pro 07.5 OF; Ecotech Pro 15 OF; Foray 02.2 UL.; Foray 03.3 UL.; Thuridan krem PA (ten ostatni jest produkowany w kraju). Można przewidywać, że w naszym kraju udział omawianych bioinsektycydów w ochronie roślin będzie wzrastać, zwłaszcza w ochronie lasu w związku z zarejestrowaniem formułacji o zwiększonej zawartości czynnika aktywnego lub zwiększonej aktywności owadobójczej, czy zawierających toksyny białkowe *B. thuringiensis* o różnej specyficzności działania. W Polsce były dotychczas produkowane na małą skalę (według zapotrzebowania) dwa tego typu bioinsektycydy: Bacilan i Thuridan, z przeznaczeniem do ochrony upraw warzywniczych i sadowniczych, zwłaszcza w ogródkach przydomowych. Nie były one zalecane np. do stosowania w sadach towarowych ze względu na zbyt wolne działanie.

1.2. Osiągnięcia badawcze i aplikacyjne

Prowadzone w szerokim zakresie badania, mające na celu aspekt praktyczny, obejmują między innymi takie zagadnienia, jak:

a) poznanie biologii molekularnej i mechanizmów działania na owady toksyn białkowych (endotoksyn) *B. thuringiensis*;

b) poznanie wykształconych u owadów mechanizmów odporności na te endotoksyny;

c) poszukiwanie w naturze nowych szczepów bakterii o zwiększonej aktywności owadobójczej;

d) ulepszanie znanych i stosowanych już w bioinsektycydach szczepów technikami nierekombinacyjnymi, wykorzystującymi występujące u bakterii zjawisko koniugacji (polegające na przekazywaniu materiału genetycznego z komórki dawcy do komórki biorcy), lub technikami inżynierii genetycznej (technologia rekombinacji kwasu dezoksyrybonukleinowego – DNA);

e) wytworzenie roślin transgenicznych produkujących toksyczne dla owadów endotoksyny *B. thuringiensis*.

Wymienione badania doprowadziły do rozszerzenia wiedzy na temat mechanizmów działania toksyn białkowych i ich budowy molekularnej. Krystaliczne inkluzje, wytwarzane przez dany podgatunek podczas sporulacji tej bakterii, rozpuszczają się w jelicie środkowym larw owadów wrażliwych i zostają uwolnione toksyny białkowe o działaniu owadobójczym, tzw. delta-endotoksyny o masie cząsteczkowej 27 do 400 kilodaltonów (kDa). Najczęściej tych toksyn jest kilka i liczba ich wzrasta w miarę postępu prac badawczych. Wiele kryształów białkowych ma charakter protoksyn. Uwolnione toksyny białkowe i protoksyny ulegają następnie, w jelicie środkowym owadów, proteolitycznej (z udziałem enzymów proteolitycznych) przemianie do mniejszych jednostek białkowych tzw. polipeptydów. Te uaktywnione toksyny wchodzi w nieodwracalną interakcję z odpowiednimi receptorami o charakterze białek, występującymi w błonach komórek nabłonka jelita środkowego owadów wrażliwych (HOFFMAN i in. 1988 a,b). Badania elektrofizjologiczne (HARVEY i in. 1983) i biochemiczne (KNOWLES, ELLAR 1987) wskazują, że omawiane toksyny wchodzą w nieodwracalną interakcję z receptorami powodują powstawanie otworów (por) w błonie komórek nabłonka jelita środkowego, co prowadzi do naruszenia równowagi osmotycznej i zakłócenia w przewodzeniu jonów pierwiastków, pęcznienia komórek i ich zanikania.

Przeprowadzone badania pozwoliły na opracowanie technik klonowania genów kryształów białkowych *B. thuringiensis* o właściwościach owadobójczych (WHITELEY, SCHNEPF 1986) i ich ekspresji w mikroorganizmach związanych z rośliną (OBUKOWICZ i in. 1986) oraz transgenicznych roślinach (BARTON i in. 1987; FISCHHOFF i in. 1987; VAECK i in. 1987). Te nowe techniki stwarzają nowe możliwości i strategie ochrony roślin przed szkodliwymi owadami. LISANSKY i

COOMBS (1992) podają, że stosując nierekombinacyjne techniki (koniugacja) wytworzono nieistniejące w przyrodzie szczepy kodujące toksyny białkowe, które są aktywne wobec różnych gatunków owadów. W ten sposób powstały bioinsektycydy firmy Ecogen stosowane w praktyce (również w Polsce) do chwili obecnej: CondorTM (zawierający specyficznym działające toksyny białkowe wobec wyłogówki – *Choristoneura fumiferana* Clem. i brudnicy nieparki – *Lymantria dispar* L.), EcotechTM (transkoniugant *B. thuringiensis aizawai* × *B. thuringiensis kurstaki*) i FoilTM (toksyczny wobec larw motyli i chrząszczy). Natomiast firma Mycogen wprowadziła na rynek bioinsektycydy o większej trwałości działania, oparte na szczepach bakterii wytworzonych metodami inżynierii genetycznej (rekombinacja DNA) z zastosowaniem tzw. systemu kapsułkowania (Cell Cap[®]). System ten polega na wprowadzeniu genów delta-endotoksyny *B. thuringiensis* do komórek niepatogenicznej bakterii *Pseudomonas fluorescens*. Podczas fermentacji bakterie te produkują delta-endotoksynę wewnątrz własnych komórek. Następnie komórki bakterii są zabijane za pomocą czynników termicznych i chemicznych w taki sposób, by nie naruszyć znajdującej się w komórce biotoksyny. Proces ten utwardza jednocześnie i usztywnia błonę komórkową zabitych bakterii *P. fluorescens*, która służy jako ochronna, biologiczna mikrokapsułka dla delta-endotoksyny. Na rynku znajdują się dwa bioinsektycydy firmy Mycogen o dłuższym okresie działania, opracowane według opisanego systemu: MVPTM – przeciwko larwom motyli i M-TrakTM – przeciwko larwom chrząszczy (LISANSKY i COOMBS 1992). W piśmiennictwie polskim metoda ta została opisana przez MALINOWSKIEGO (1993) i SIERPIŃSKĄ (1997).

Rekombinacyjne techniki zostały również zastosowane do wprowadzenia genów kryształów białkowych *B. thuringiensis* do różnych organizmów, jak *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* itp. Na uwagę zasługuje wprowadzenie w 1993 r. przez firmę Crop Genetics International na rynek USA nowego bioinsektycydu InCideTM. Bioinsektycyd jest oparty na bakterii *Clavibacter xyli* var. *cynodontis*, będącej endofitem kukurydzy, do której wprowadzono gen endotoksyny *B. thuringiensis* specyficznym działający na najgroźniejszego szkodnika kukurydzy – omacnicę prosowiankę (*Ostrinia nubilalis* L.). Wymieniony endofit szybko zasiedla korzenie, liście i łodygi roślin kukurydzy, gdzie pozostaje przez całe życie rośliny chroniąc ją przed omacnicą.

Wyhodowano i wprowadzono do stosowania w praktyce, m.in. w USA, wiele gatunków transgenicznych roślin zarówno dwuliściennych jak i jednoliściennych, produkujących toksyny białkowe *B. thuringiensis* działające na larwy motyli i (lub) chrząszczy (ELY 1993; KANIEWSKI 1997). Spośród roślin dwuliściennych przykładowo można wymienić takie jak: ziemniak, burak cukrowy, marchew, kalafior, seler, sałata, pomidor, orzeszki ziemne, melon, ogórek, pieprz, soja, jabłoń, śliwa, topola, bawełna, tytoń, słonecznik i inne, w tym ogrodnicze i ozdobne. Spośród roślin jednoliściennych należy wymienić najważniejsze z punktu widzenia gospodarczego: ryż i kukurydzę. Wykazanie nieszkodliwości

uprawy wymienionych roślin było podstawą do wydania zgody przez władze państwowe USA na wprowadzenie ich do produkcji w 1996 r. Pierwsze lata wykazały, że są one korzystne dla producentów, konsumentów i środowiska (KANIEWSKI 1997).

1.3. Klasyfikacja genów kryształów białkowych *B. thuringiensis*

Badania wykonane w ostatnich latach wykazały, że gatunek *B. thuringiensis* obejmuje szerokie i różnorodne rodziny białek o działaniu owadobójczym. Ukazały się liczne publikacje dotyczące identyfikacji toksyn białkowych i ich genów. Powstał problem ujednoczenia nazewnictwa związanego z tymi genami i ich produktami, gdyż różni autorzy używali różnych oznaczeń w odniesieniu do tych samych genów. HÖFTE i WHITELEY (1989) dokonali przeglądu aktualnej wiedzy oraz podali propozycje nazewnictwa i schemat klasyfikacji kryształów białkowych *B. thuringiensis* i ich genów w oparciu o strukturę wydedukowaną z sekwencji DNA, z uwzględnieniem zakresu gospodarzy – owadów, na które działają.

HÖFTE i WHITELEY (1989) podają, że do roku 1989 opisano sekwencje nukleotydowe dla ponad 40 genów kryształów białkowych *B. thuringiensis*. Wiele z tych sekwencji jest identycznych lub prawie identycznych i reprezentuje ten sam gen lub warianty tego samego genu. Biorąc powyższe pod uwagę wymienieni autorzy wyodrębnili 14 typów genów kryształów białkowych *B. thuringiensis* na podstawie danych dotyczących szczepów bakterii aktywnych wobec komarów. Wiele danych wskazuje, że 13 z nich, tzw. geny “Cry” (od słów “crystal proteins”, czyli kryształów białkowych) charakteryzują rodziny odpowiednich białek owadobójczych. Te 13 typów genów kryształów białkowych obejmuje 4 główne klasy (Cry I, Cry II, Cry III, Cry IV) i wiele podklas utworzonych na podstawie zarówno strukturalnego podobieństwa, jak i spektrum aktywności owadobójczej białek. Wymienione cztery główne klasy genów kryształów białkowych są odpowiedzialne za specyficzne działanie w odniesieniu do owadów z następujących rzędów: Cry I – *Lepidoptera*, Cry II – *Lepidoptera* i *Diptera*, Cry III – *Coleoptera*, Cry IV – *Diptera*.

Pozostały, czternasty typ genów kryształów białkowych *B. thuringiensis* nie został nazwany “Cry” lecz “Cyt”, gdyż obejmuje on kryształy białkowe nie wykazujące działania owadobójczego. Sekwencje DNA genów kodujących nietoksyczne białka oraz ich relacje z genami kryształów białkowych opisanych wyżej nie są dotychczas znane. Znany jest natomiast jeden gen kryształów białkowych *B. thuringiensis* subsp. *israelensis*, kodujący białko o masie cząsteczkowej 27 kDa, które wykazuje cytolityczną aktywność wobec komórek bezkręgowców i kręgowców. Jednakże gen ten różni się całkowicie od genów “Cry”. Na tej podstawie HÖFTE i WHITELEY (1989) zaproponowali oznaczenie “Cyt A” dla genów kodujących białko 27 kDa.

Opisany system nazewnictwa jest uzupełniany w miarę wykrywania nowych szczepów produkujących podobne toksyny białkowe. LARECLUS i in. (1993) proponują dodanie V klasy genów – Cry V dla toksyn o masie cząsteczkowej 81 kDa, aktywnych dla *Lepidoptera* i *Coleoptera* oraz Cry VI, Cry VII – dla genów toksyn białkowych, które nie są jeszcze wykryte. Klasyfikację genów kryształów białkowych wg HÖFTE i WHITELEY (1989) z uzupełnieniem LARECLUS'a i in. (1993) podano w tabeli 1.

2. ODPORNOŚĆ WYKSZTAŁCONA U OWADÓW W WARUNKACH PRAKTYCZNEGO STOSOWANIA BIOINSEKTYCYDÓW *B. THURINGIENSIS*

W ciągu około 30 lat stosowania bioinsektycydów *B. thuringiensis* przeciwko niektórym szkodliwym owadom w przechowalniach, w uprawach rolniczych i w ochronie lasu (60–70% światowej produkcji bioinsektycydów *B. thuringiensis* jest wykorzystywane w ochronie lasu) nie notowano przypadków rozwoju odporności u naturalnych populacji traktowanych gatunków owadów w warunkach terenowych. Wydawało się więc, że powstanie odporności u owadów na te bioinsektycydy nie jest możliwe. Tłumaczono to złożonym mechanizmem działania *B. thuringiensis* na owady (LIPA 1989) oraz krótkim okresem trwałości toksyn bakteryjnych na liściach opryskanych roślin. Okazało się jednak, że powstanie odporności na wymienione insektycydy jest możliwe.

Pierwszy przypadek udokumentowanej odporności na *B. thuringiensis* u naturalnej populacji szkodnika magazynowego – omacnicy spichrzanki *Plodia interpunctella* Hbn. opisano w 1979 roku. KINSINGER i MCGAUGHEY (1979) donoszą, że różnice we wrażliwości na biopreparat Dipel® (*B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*) między populacją naturalną (terenową) omacnicy spichrzanki a populacją laboratoryjną były ponad 42-krotne. W dalszych badaniach populacji terenowych omacnicy spichrzanki pochodzących z różnych stanów USA wykazano również zmniejszoną wrażliwość na Dipel® (MCGAUGHEY 1985a). Stwierdzony rozwój odporności u populacji terenowych omacnicy spichrzanki w wyniku praktycznego stosowania bioinsektycydów *B. thuringiensis* był przez wiele lat uważany za wyjątek. Dopiero wykrycie odporności u innych gatunków owadów w warunkach polowych spowodowało zmianę poglądów w tej sprawie.

Pierwszy przypadek odporności na *B. thuringiensis* u szkodników rolniczych w warunkach polowych opisali TABASHNIK i in. (1990). Odporność ta wystąpiła u ważnego gospodarczo szkodnika roślin krzyżowych – tantnisia krzyżowiaczka *Plutella xylostella* L. na jednej z farm na Hawajach. Wymieniony szkodnik, występujący na rukwii wodnej *Nasturtium officinale*, był za pomocą biopreparatu Dipel® zwalczany 50–100 razy w latach 1978–1982 (od 5 do 8 zabiegów przeci-

Tabela 1

Table 1

Klasyfikacja genów kryształów białkowych *B. thuringiensis* i zakres działania kodowanych przez nie toksyn (wg HÖFTE i WHITELEY 1989 z uzupełnieniem LARECLUS'a i in. 1993)

Classification of *B. thuringiensis* crystals protein genes and scope of action of toxins encoded by them (accor. to HÖFTE and WHITELEY 1989 with the suppl. of LARECLUS et al. 1993)

Typ genu* Gene type*	Przewidywany ciężar cząsteczkowy Predicted molecular weight kDa	Zakres działania** Scope of action**	Przykłady wrażliwych owadów Examples of susceptible insect species
Cry I A(a)	132,2	L	<i>Manduca sexta</i> , <i>Bombyx mori</i> , <i>Pieris brassicae</i> , <i>Plutella xylostella</i> , <i>Ostrinia nubilalis</i>
Cry I A(b)	131	L	<i>Pieris brassicae</i> , <i>Manduca sexta</i> , <i>Heliothis virescens</i>
Cry I A(c)	130 133,3	L/D L	<i>Pieris brassicae</i> , <i>Aedes aegypti</i> , <i>Heliothis virescens</i> , <i>Manduca sexta</i> , <i>Trichoplusia ni</i> , <i>Ostrinia nubilalis</i> , <i>Pieris brassicae</i>
Cry I B	138	L	<i>Pieris brassicae</i>
Cry I C	134,8	L	<i>Spodoptera littoralis</i> , <i>Spodoptera exiqua</i> , <i>Mamestra brassicae</i>
Cry I D	132,5	L	<i>Manduca sexta</i> , <i>Spodoptera exiqua</i>
Cry I E	130	L	<i>Manduca sexta</i> , <i>Spodoptera littoralis</i> , <i>Spodoptera exiqua</i>
Cry I F	133,6	L	<i>Ostrinia nubilalis</i> , <i>Heliothis virescens</i> , <i>Spodoptera exiqua</i>
Cry II A	70,9	L/D	<i>Heliothis virescens</i> , <i>Lymantria dispar</i> , <i>Manduca sexta</i> , <i>Aedes aegypti</i>
Cry II B	70,8	L	<i>Manduca sexta</i> , <i>Heliothis virescens</i> , <i>Lymantria dispar</i> , <i>Trichoplusia ni</i>
Cry II C	69,5	L	<i>Manduca sexta</i> , <i>Lymantria dispar</i> , <i>Trichoplusia ni</i>
Cry III A	73,1	C	<i>Leptinotarsa decemlineata</i> , <i>Phaedon cochleariae</i>
Cry III B	74,2	C	<i>Leptinotarsa decemlineata</i>
Cry IV A	134,4	D	<i>Aedes aegypti</i> , <i>Anopheles stephensi</i> , <i>Culex pipiens</i>
Cry IV B	127,8	D	<i>Aedes aegypti</i> , <i>Anopheles stephensi</i>
Cry IV C	77,8	D	<i>Aedes aegypti</i>
Cry IV D	72,4	D	<i>Aedes aegypti</i> , <i>Culex pipiens</i>
Cry V A***	81,2	L/C	<i>Diabrotica</i> spp., <i>Leptinotarsa decemlineata</i> , <i>Ostrinia nubilalis</i>
Cyt A	27,4	niespecyficzne non specific	—

* wg Höfte i Whiteley (1989) according to Höfte and Whiteley (1989)

** L: *Lepidoptera*, D: *Diptera*, C: *Coleoptera*

*** wg Lareclus'a i in. (1993) according to Lareclus et al. (1993)

wko jednej generacji). Następnie zaprzestano stosowania tego bioinsektycydu, gdyż liczone się z możliwością wystąpienia odporności. W latach 1989–1990 aplikowano bioinsektycyd Javelin[®] (*B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*) wykonując łącznie 15 zabiegów, a następnie określono poziom odporności owadów zebranych z pól wymienionej farmy i z pól innych farm, równie często traktowanych bioinsektycydami. Stwierdzono 20–33-krotną odporność u badanych populacji owadów. Skuteczność działania zalecanych dawek bioinsektycydu dla populacji naturalnych wynosiła 34%, a w odniesieniu do wrażliwej populacji laboratoryjnej – 90–100%. Odporność u naturalnych populacji tantnisia krzyżowiaczka na *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*, wykształconą stosowaniem tych bioinsektycydów w warunkach polowych, stwierdzono również na farmach na Filipinach, Tajlandii, Malezji, Japonii i Florydzie (GEORGHIOU 1994).

W USA i Kanadzie, gdzie bioinsektycydy *B. thuringiensis* są głównymi środkami do ograniczania liczebności populacji najważniejszych szkodliwych owadów leśnych przeprowadzono badania mające na celu określenie, czy naturalne populacje brudnicy nieparki *Lymantria dispar* L. i wyłogówki *Choristoneura fumiferana* Clem. mają potencjał genetyczny do rozwoju odporności.

W badaniach prowadzonych w USA (ROSITER i in. 1990) zaobserwowano istotne różnice w odporności na *B. thuringiensis* wśród naturalnych populacji brudnicy nieparki. Wyniki badań sugerują, że było to spowodowane różną żywotnością (wigorem), czyli różnymi możliwościami wzrostu i rozwoju. Autorzy tłumaczą tę zmienność we wrażliwości różnicami w zaopatrzeniu jaj (z których wylęgały się larwy) w substancje zapasowe. Jaja składane jako pierwsze zawierały więcej substancji zapasowych, a wylęgające się z nich larwy szybciej się rozwijały, były bardziej żywotne i mniej wrażliwe na *B. thuringiensis*. Badania wskazują na możliwość wyselekcjonowania, przy dostatecznie dużej presji selekcyjnej, odpornych na *B. thuringiensis* populacji brudnicy nieparki. Autorzy dochodzą do wniosku, że odporniejsze genotypy będą faworyzowane, gdyż one są również bardziej żywotne.

Z badań prowadzonych w Kanadzie (FRANKENHUYZEN i in. 1995) wynika, że populacje naturalne *Ch. fumiferana* mają również potencjał genetyczny do wykształcenia odporności na *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*. W wymienionych badaniach stwierdzono duże zróżnicowanie wrażliwości larw (nawet 10-krotne) pochodzących od poszczególnych samic w ramach jednej populacji. Wyniki sugerują, że ta zróżnicowana wrażliwość jest w dużym stopniu uwarunkowana genetycznie. Instytut zajmujący się regulacją liczebności szkodników lasu w Kanadzie, w opracowanej informacji technicznej bioinsektycydu *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*, zaleca ostrożne stosowanie tych środków, ze względu na możliwość wykształcenia odpornych populacji owadów leśnych w warunkach naturalnych (ANONIM 1993).

Testowane w Polsce w doświadczeniach laboratoryjnych populacje leśnych owadów liściożernych z rzędu *Lepidoptera* – brudnica mniszka *Lymantria mona-*

cha L. i barczatka sosnowka *Dendrolimus pini* L., były wrażliwe na stosowane formułacje bioinsektycydów *B. thuringiensis* (Foray 02,2 UL, subsp. *kurstaki*, firmy Novo Nordisk oraz Ecotech Pro 07,5 OF, transkoniugant subsp. *kurstaki* × subsp. *aizawai*, firmy Ecogen) (MALINOWSKI 1996; 1997). Wymienione bioinsektycydy są w Polsce stosowane od niedawna i na niezbyt dużą skalę. Używanie ich na przemian ze związkami acylomocznikowymi i pyretroidami przeciwdziała powstawaniu odporności u traktowanych gatunków owadów.

W literaturze została również opisana odporność na *Bacillus sphaericus* u komarów *Culex quinquefasciatus* Say. Populacje komarów *C. quinquefasciatus* w wyniku intensywnego stosowania bioinsektycydu opartego na *B. sphaericus* wykształciły odporność na ten czynnik (GEORGHIOU 1994). Występują one na ograniczonych powierzchniach w Brazylii i Indiach. Pojawienie się odporności na *B. sphaericus* jest również spodziewane u komarów *Culex pipiens* w południowej Francji (GEORGHIOU 1994).

Należy podkreślić, że stwierdzone przypadki odporności owadów na bioinsektycydy bakteryjne w warunkach terenowych były związane z silną presją selekcyjną, wywieraną na populacje znajdujące się w izolacji i o krótkim okresie rozwoju. Z silną presją selekcyjną mamy do czynienia w przypadku transgenicznych roślin uprawnych produkujących określone, pojedyncze toksyny białkowe *B. thuringiensis* przeciwko danym gatunkom owadów, jak np. ziemniak odmiany Newleaf Russel-Burbank, produkujący toksynę Cry IIIA przeciwko stoncoziemniaczanej, bawełna odmiany Bollgard czy kukurydza odmiany Yield Gard, wytwarzające toksyny białkowe *B. thuringiensis* przeciwko gąsienicom motyli (KANIEWSKI 1997). Zgodnie z prawami selekcji, w przypadku roślin transgenicznych zawierających tylko pojedynczą toksynę *B. thuringiensis* permanentna presja selekcyjna prowadzi do szybkiego rozwoju odporności. Potwierdzeniem tego jest zaobserwowana w USA odporność u owadów z rzędu *Lepidoptera* na transgeniczne rośliny bawełny produkujące toksyczne białko *B. thuringiensis* (KAISER 1996; MACILWAIN 1996; BOCZEK 1997).

3. ROZWÓJ ODPORNOŚCI U OWADÓW NA *B. THURINGIENSIS* W WYNIKU SELEKCJI LABORATORYJNEJ

W przeszłości różni badacze podejmowali próby uzyskania populacji owadów odpornych na bioinsektycydy *B. thuringiensis* w warunkach selekcji laboratoryjnej. Próby te w większości przypadków nie zostały w pełni uwieńczone sukcesem. W piśmiennictwie światowym znajdujemy przegląd tych prac dokonany przez BRIESE (1981) i GEORGHIOU (1988), a w piśmiennictwie polskim – przez LIPEŃ (1989). Przegląd przykładów odporności na *B. thuringiensis* wyselekcjonowanej w laboratorium, a także odporności na omawiany czynnik biologiczny,

wykształconej u owadów w warunkach terenowych do roku 1993, podano w publikacji MARRONE i MACINTOSH (1993). GEORGHIOU (1994) podaje, że do roku 1994 uzyskano w warunkach laboratoryjnych odporność na *B. thuringiensis* u co najmniej 10 gatunków owadów. Rozwój odporności na bioinsektycydy *B. thuringiensis* w warunkach selekcji laboratoryjnej jest dobrze udokumentowany w literaturze i dotyczy owadów z następujących rzędów: *Lepidoptera*, *Coleoptera* i *Diptera*. Należy nadmienić, że liczebność owadów z wymienionych rzędów jest kontrolowana w praktyce za pomocą odpowiednich podgatunków (lub toksyn białkowych) *B. thuringiensis*.

3.1. Rozwój odporności u *Lepidoptera*

3.1.1. Szkodniki magazynów

Zaobserwowano (MCGAUGHEY 1985a), że efektywność działania różnych formułacji delta-endotoksyny *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* (HD-1) zarejestrowanych w USA do stosowania przeciwko szkodnikom przechowalni: omacnicy spichrzance *Plodia interpunctella* Hbn i mklikowi daktylowcowi *Cadra cautella* Walker, była zróżnicowana przy zabiegach wykonywanych na dużą skalę. Pobrane z traktowanych magazynów kolonie omacnicy spichrzanki były bardziej odporne na bioinsektycydy *B. thuringiensis* niż uzyskane z nietraktowanych pomieszczeń.

MCGAUGHEY (1985b) wykazał, że traktowane w warunkach terenowych populacje omacnicy spichrzanki mogą łatwo wykształcić odporność na Dipel[®] (handlowa formułacja spor i kryształów *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*, HD-1) w laboratorium. Jedna kolonia była poddana w laboratorium selekcji za pomocą wymienionego biopreparatu Dipel[®], wprowadzonego do diety (sztuczna pożywka) w dawce wywołującej 70–90% śmiertelności larw. Selekcja w ciągu 2 generacji doprowadziła do 30-krotnego wzrostu odporności, a selekcja przez 15 generacji – do 100-krotnego wzrostu odporności. Można sądzić, że był to maksymalny poziom odporności, uzyskany przez tę kolonię, gdyż dalsza selekcja nie powodowała wzrostu tej odporności (MCGAUGHEY 1985b).

Przeprowadzono również badania (MCGAUGHEY, BEEMAN 1988) nad szybkością rozwoju odporności na *B. thuringiensis* u pięciu innych kolonii naturalnych omacnicy spichrzanki pochodzących z różnych miejscowości i jednej kolonii laboratoryjnej mklikia daktylowca. Każda kolonia została podzielona na dwie subkolonie, z których pierwsza stanowiła kontrolę i była hodowana na diecie nie zawierającej bioinsektycydu, natomiast druga otrzymała dietę z bioinsektycydem w dawce powodującej 70–90% śmiertelności larw pierwszej generacji. Do selekcji użyto Dipel[®] formułacji WP (proszek do sporządzenia zawiesin wodnych) zawierający *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1, o aktywności 16 000 IU

(jednostek międzynarodowych) na 1 mg formulacji. Po selekcji przez wiele pokoleń, z niektórych kolonii wydzielono następne subkolonie i hodowano na diecie mającej większą zawartość bioinsektycydu w celu określenia, czy zwiększona dawka przyspieszy rozwój odporności.

Przeprowadzone badania (MCGAUGHEY, BEEMAN 1988) wykazały, że kolonie omacnicy spichrzanki i mklika daktyłowca poddane selekcji w laboratorium stały się w różnym stopniu odporne na *B. thuringiensis*. Odporność pięciu naturalnych kolonii omacnicy spichrzanki wzrosła 2–29-krotnie w wyniku selekcji przez 3 generacje i 15–100-krotnie po selekcji przez 40 generacji stosunkowo małą dawką – 62,5 mg bioinsektycydu na 1 kg diety. Wyższy nacisk selekcyjny dawką 500 mg bioinsektycydu na 1 kg diety spowodował u jednej kolonii ponad 250-krotny wzrost odporności.

Rozwój odporności u laboratoryjnej kolonii mklika daktyłowca przebiegał powoli w porównaniu do rozwoju odporności u naturalnych kolonii omacnicy spichrzanki, niezależnie od zastosowanych dawek. W rezultacie selekcji przez 8 pokoleń dawką 15,625 mg bioinsektycydu na 1 kg diety, a następnie przez 5 dalszych pokoleń dawką 62,5 mg/kg diety, kolonia mklika daktyłowca charakteryzowała się około 8-krotną odpornością. W tym przypadku uzyskany niski poziom odporności można tłumaczyć tym, że była to kolonia laboratoryjna o małej heterogeniczności (MCGAUGHEY, BEEMAN 1988).

3.1.2. Szkodniki upraw polowych

Selekcja laboratoryjna słonecznicy tytoniowej (*Heliothis virescens* F.) na odporność wobec genetycznie zmienionej niepatogenicznej bakterii glebowej *Pseudomonas fluorescens*, produkującej delta-endotoksynę *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* (szczep HD-1) o masie cząsteczkowej 130 kDa (OBUKOWICZ i in. 1989), prowadzona przez 14 generacji spowodowała wykształcenie odporności u tej populacji (STONE i in. 1989). Larwy po wylęgu karmiono dietą zawierającą odpowiednią dawkę liofilizowanych bakterii w postaci proszku. Selekcyjna dawka wyjściowa, ustalona na poziomie 0,150 mg wymienionego proszku na 1 ml diety, powodowała śmiertelność około 50% larw po 7 dniach. Następne generacje larw otrzymywały dietę o sukcesywnie wzrastającej zawartości liofilizowanych bakterii do takiego poziomu, by przeżyło 10–50% osobników. Selekcyjna dawka końcowa, wynosząca 5 000 mg proszku na 1 ml diety, powodowała przeżycie 50% osobników.

W przeprowadzonych badaniach (STONE i in. 1989) po 3 pokoleniach selekcji uzyskano 3-krotny wzrost odporności w porównaniu do kolonii kontrolnej (nieselekcjonowanej). Po 7 pokoleniach poddanych selekcji, odporność wzrosła 24-krotnie, a w ciągu selekcji przez kolejnych 7 pokoleń współczynnik odporności oscylował między wartościami 13 a 20. W dalszych badaniach pokolenia od 14 do 18 były poddane selekcji za pomocą bioinsektycydu Dipel, a pokolenia

między 18 a 22 – ponownie za pomocą opisanej wyżej genetycznie zmienionej bakterii *P. fluorescens*. W rezultacie otrzymano populację o 75-krotnej odporności na Dipel (który zawiera toksyny białkowe Cry I A(a), Cry I A(b), Cry I A(c) i Cry II A) oraz 71-krotnej odporności na oczyszczoną toksynę białkową Cry I A(b) i 16-krotną odporność na Cry I A(c) (MACINTOSH i in. 1991).

Selekcja laboratoryjna naturalnej populacji tantnisia krzyżowiaczka, który wykształcił w warunkach polowych około 20–30-krotną odporność na *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*, doprowadziła w ciągu 5 pokoleń do 150–190-krotnej odporności, a po 9 pokoleniach selekcji uzyskano odporność 430–820-krotną (TABASHNIK i in. 1991). Natomiast wykonanie 5 kolejnych zabiegów bioinsektycydem *B. thuringiensis* w warunkach polowych nie spowodowało istotnego wzrostu odporności u populacji naturalnej tantnisia krzyżowiaczka (TABASHNIK i in. 1991). Odporność populacji wykształcona w warunkach polowych obniżała się wolno po zaprzestaniu presji selekcyjnej.

W warunkach selekcji laboratoryjnej uzyskano również kolonie motyli nocnych: *Spodoptera exigua* Hbn. (MOAR i in. 1994) i *Spodoptera littoralis* Boisd. (MÜLLER-COHN i in. 1996), odporne na użyte do selekcji toksyny Cry I C *B. thuringiensis*. Motyle te są polifagami powodującymi duże szkody w ważnych ekonomicznie uprawach, jak bawełna, ryż, warzywa itp. Do ograniczania liczebności populacji wymienionych gatunków stosuje się formulacje *B. thuringiensis* subsp. *aizawai*. Podgatunek ten wytwarza różne toksyny Cry I, włączając Cry I C, która jest uważana za wysoce toksyczną dla *S. littoralis* i wykorzystywana w transgenicznych roślinach odpornych na ten gatunek (VAN DER SALM i in. 1994).

Laboratoryjną selekcję *S. littoralis* prowadzono przez 14 pokoleń za pomocą spor i kryształów białkowych Cry I C, wytwarzanych przez specjalnie skonstruowany szczep *B. thuringiensis*, który otrzymał geny odpowiedzialne za wytwarzanie wyłącznie toksyny Cry I C od podgatunku *aizawai* 7,29 (MÜLLER-COHN i in. 1996). Stosowano dwie metody selekcji: jedna polegała na indywidualnej hodowli larw na traktowanej pożywce przez 5 dni, a następnie na nietraktowanej aż do uzyskania poczwarek, przy czym selekcję prowadzono przez 14 generacji (szczep A); druga natomiast – na indywidualnej hodowli larw przez 9 generacji (jak w metodzie pierwszej), a następnie przez 5 generacji stosowano masową hodowlę larw na traktowanej diecie do przepoczwarczenia (szczep B). Wyjściowa dawka selekcyjna Cry I C wynosiła 0,273 mikrograma na 1 cm² pożywki i powodowała śmiertelność około 40% larw. Końcowa dawka Cry I C, użyta do selekcji 14 pokolenia, wynosiła przy pierwszej metodzie 4,709 mg na cm² pożywki i powodowała około 35% śmiertelność larw, a przy drugiej metodzie – 51,515 mg na cm² pożywki. Odporność uzyskana po 14 pokoleniach selekcji była następująca: przy pierwszej metodzie (szczep A) – około 10-krotna, przy drugiej (szczep B) – ponad 500-krotna. Dane te sugerują, że masowa hodowla przy dużej presji selekcyjnej może spowodować wykształcenie się populacji o dużym stopniu odporności.

FERRE i ESTADA (1994) poddawali selekcji laboratoryjną kolonię sówki kapuścianej *Trichoplusia ni* Hbn. za pomocą *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*. W momencie stwierdzenia wzrastającej odporności na czynnik selekcyjny, pobrano z tej kolonii próbkę owadów i dalej selekcjonowano za pomocą toksyny Cry I A(b), uzyskując po 7 pokoleniach 31-krotny wzrost odporności na tę toksynę.

3.1.3. Szkodniki lasów

Dotychczas nie opisano w literaturze selekcji owadów leśnych w warunkach laboratoryjnych w celu uzyskania odpornych populacji na bioinsektycydy *B. thuringiensis*. W informacji technicznej bioinsektycydu *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*, opracowanej wspólnie przez Kanadyjskie Stowarzyszenie Celulozy i Papieru oraz Instytut Sterowania Szkodnikami Leśnymi podano jedynie (ANONIM 1993), że naukowcom z wymienionego instytutu udało się wyselekcjonować w warunkach laboratoryjnych odporną na wymieniony bioinsektycyd populację wyłogówki *Ch. fumiferana*.

3.2. Rozwój odporności u *Coleoptera*

W 1993 roku po raz pierwszy opisano rozwój odporności u stonki ziemniaczanej (*Leptinotarsa decemlineata* Say) na Cry III A delta-endoksynę *B. thuringiensis* var. *san diego* lub *tenebrionis* (WHALON i in. 1993), specyficzną działającą na niektóre gatunki owadów z rzędu *Coleoptera*, zwłaszcza stonkę ziemniaczaną. Najpierw naturalna populacja stonki ziemniaczanej była poddana selekcji w warunkach terenowych przez dwa sezony za pomocą bioinsektycydu M-One zawierającego spory i kryształ białkowe *B. thuringiensis* Cry III A (firmy Mycogen). Osobniki, które przeżyły, dały początek populacji użytej do selekcji w warunkach laboratoryjnych.

Selekcji laboratoryjnej poddawano larwy drugiego stadium (w wieku 3 dni) stosując metodę ekspozycji owadów na traktowanych liściach ziemniaka w ciągu 2-3 dni. Larwy, które przeżyły, były przenoszone następnie na nietraktowane liście ziemniaka i hodowane do przepoczwarzania. Stosowano metodę opryskiwania lub zanurzania liści ziemniaka w takich stężeniach bioinsektycydu, by uzyskać śmiertelność około 98% larw. Do selekcji laboratoryjnej używano ten sam bioinsektycyd, który stosowano w warunkach polowych. Stężenie początkowe wynosiło 10 200–245 700, a końcowe 5 343 000 jednostek międzynarodowych (IU) stonki ziemniaczanej na 1 ml. Każdorazowo poddawano selekcji w ciągu 12 pokoleń kilkadziesiąt tysięcy larw. Po każdej selekcji (z wyjątkiem pokolenia 3 i 11) określono poziom odporności larw (pochodzących od osobników, które przeżyły zabieg), przez wyznaczenie LC_{50} (stężenie bioinsektycydu powodujące 50% śmiertelności) i porównano z LC_{50} dla populacji hodowanej bez selekcji. Po 12 pokoleniach, poddawana selekcji stonka ziemniaczana charakteryzowała się 60-

krotną odpornością w stosunku do odporności wyjściowej. Istotną odporność (około 22-krotną) uzyskano już po 4 pokoleniach selekcji. Należy zwrócić uwagę, że stosunkowo wysoki poziom odporności stonki na toksynę Cry III A uzyskano w wyniku bardzo dużej presji selekcyjnej (98% śmiertelności). W takim przypadku pozostają przy życiu prawie wyłącznie homozygoty odporne.

3.3. Rozwój odporności u *Diptera*

Próby uzyskania odpornych na bioinsektycydy *B. thuringiensis* owadów z rzędu *Diptera* podejmowano od dawna. Jednakże opisano dotychczas nieliczne przypadki rozwoju odporności u tych owadów. HARVEY i HOWELL (1965) opublikowali wyniki badań nad wykształceniem się odporności u muchy domowej *Musca domestica* L. na beta-egzotoksynę *B. thuringiensis* subsp. *thuringiensis* w warunkach laboratoryjnych. Uzyskany poziom odporności nie był wysoki: po selekcji przez 27 pokoleń otrzymano 8-krotny wzrost odporności na czynnik selekcyjny, a po 50 pokoleniach selekcji – 14-krotny. Podobnie niezbyt wysoką odporność u muchy domowej na beta-egzotoksynę otrzymali CARLBERG i LINDSTROM (1987) stosując do selekcji *B. thuringiensis* ser. H-1. WHALON i in. (1993) wymieniają rozprawy doktorskie, w wyniku których uzyskano pewien poziom odporności na beta-egzotoksynę *B. thuringiensis* u *Drosophila melanogaster* (VAN HERREWEGE 1969) oraz u komarów *Culex quinquefasciatus* Say na delta-endotoksynę *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* ser. H-14 (VAZQUEZ-GARCIA 1983).

MARRONE i MACINTOSH (1993) przytaczają wyniki badań dotyczących selekcji komarów *C. quinquefasciatus* przez 20 pokoleń za pomocą spor i kryształów białkowych *B. thuringiensis* subsp. *israelensis*, a następnie za pomocą oczyszczonej delta-endotoksyny o masie cząsteczkowej 72 kDa. Komary wykształciły 70-krotną odporność na oczyszczoną delta-endotoksynę o masie cząsteczkowej 72 kDa, ale tylko 3-krotną na bioinsektycyd zawierający spory i kryształy *B. thuringiensis* subsp. *israelensis*. Na tej podstawie MARRONE i MACINTOSH (1993) stawiają hipotezę, że przyczyną ograniczonego rozwoju odporności u owadów na *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* jest produkowanie przez ten podgatunek licznych toksyn białkowych o różnej aktywności biologicznej. Można również dodać, że mogą one być przyłączane przez różne specyficzne receptory jelita środkowego owadów i kontrolowane przez różne geny.

4. ODPORNOŚĆ KRZYŻOWA

Stosowanie danej substancji chemicznej lub czynnika biologicznego przez dłuższy okres powoduje na ogół wyselekcjonowanie populacji owadów

odpornych nie tylko na czynnik selekcyjny, ale również na inne, najczęściej pokrewne substancje toksyczne, z którymi badane populacje nigdy się nie zetknęły, czyli charakteryzujących się odpornością krzyżową. Wynika to stąd, że wyselekcjonowane mechanizmy odporności są skuteczne zarówno w odniesieniu do substancji użytej do selekcji, jak i innych dotychczas nie stosowanych. W przypadku bioinsektycydów *B. thuringiensis*, wykształcona u owadów odporność może obejmować zarówno toksynę lub szczep użyty do selekcji, jak i inne, pokrewne toksyny białkowe, lub szczepy, chociaż nie jest wykluczone, że będzie ona dotyczyć odległych toksyn.

Badanie odporności krzyżowej jest jednocześnie pierwszym etapem badań nad mechanizmami odporności oraz pozwala na określenie, jakie szczepy lub toksyny mogą być użyte w przypadku, gdy odporność na daną toksynę wystąpi u traktowanych populacji owadów. Znajomość odporności krzyżowej pozwala więc na opracowanie odpowiedniej strategii kontroli owadów, przeciwdziałającej pojawieniu się odporności lub opóźniającej jej wystąpienie.

Najważniejszą sprawą przy wprowadzaniu do stosowania na szerszą skalę bioinsektycydów *B. thuringiensis* jest określenie, czy populacje owadów, które wykształciły odporność na stosowane insektycydy chemiczne, nie wykazują odporności krzyżowej na wymienione środki biologiczne. WHALON i in. (1993) badali odporność krzyżową na Cry III A delta-endotoksynę *B. thuringiensis* specyficznie działającą na owady z rzędu *Coleoptera*, zwłaszcza stonkę ziemniaczaną, dwóch populacji tych owadów, wysoce odpornych — o znanych mechanizmach odporności — na insektycydy chemiczne. Jedna populacja charakteryzowała się wielokierunkową odpornością na związki fosforoorganiczne, karbaminy i pyretroidy; mechanizmy odpowiedzialne za tę odporność polegały na oksydacyjnej detoksykacji wymienionych insektycydów w organizmach owadów, katalizowanej przez enzymy z grupy polisubstratowych monoooksygenaz z udziałem cytochromu P-450 oraz na hydrolitycznej detoksykacji powodowanej przez esterazy. Druga populacja była odporna na pyretroidy w wyniku wykształcenia w trakcie selekcji mechanizmów powodujących zmniejszenie wrażliwości systemu nerwowego przez zmiany strukturalne w receptorze (mechanizm kdr) oraz zwiększenie metabolizmu oksydacyjnego. W przeprowadzonych badaniach (WHALON i in. 1993) nie stwierdzono krzyżowej odporności na Cry III A delta-endotoksynę *B. thuringiensis* u szczepów odpornych na wymienione, konwencjonalne insektycydy. Larwy stonki ziemniaczanej odpornej na insektycydy chemiczne były również wrażliwe na toksyny Cry III A produkowane przez transgeniczne rośliny ziemniaka (WIERENGA i in. 1996). Mechanizmy odporności wymienionych populacji stonki ziemniaczanej, wykształcone w wyniku stosowania środków chemicznych, są więc nieskuteczne wobec bakteryjnych toksyn białkowych.

Omacnica spichrzanka charakteryzująca się 100-krotną odpornością na Dipel (*B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*, HD-1), wykształconą w wyniku selekcji laboratoryjnej (MCGAUGHEY 1985b), nie wykazywała krzyżowej odporności na inne

podgatunki produkujące inne toksyny białkowe (MCGAUGHEY, JOHNSON 1987). Można wnioskować, że owad ten wykształcił odporność tylko na toksyny Cry I (I Aa, I Ab, I Ac) oraz Cry II A, obecne w użytym do selekcji biopreparacie Dipel®. Wymieniony szczep omacnicy spichrzanki nie wykazywał krzyżowej odporności na Cry I C (VAN RIE i in. 1990).

Słonecznica tytoniowa *H. virescens* poddana selekcji laboratoryjnej przez 14 generacji wykształcając odporność na czynnik selekcyjny (delta-endotoksyna *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*, szczep HD-1, produkowaną przez biotechnologicznie zmienioną niepatogeniczną bakterię *Pseudomonas fluorescens*) wykazała odporność krzyżową na Dipel® oraz około 4-krotną odporność na oczyszczoną delta-endotoksynę HD-1 (STONE i in. 1989). Ponadto stwierdzono krzyżową odporność na relatywnie odległe toksyny białkowe Cry II (GOULD i in. 1992).

W wyniku selekcji laboratoryjnej za pomocą spor i kryształów białkowych *B. thuringiensis* Cry I C przez 14 generacji otrzymano dwa odporne szczepy *Spodoptera littoralis*, charakteryzujące się ograniczoną krzyżową odpornością w stosunku do toksyn Cry I D i Cry I E (MÜLLER-COHN i in. 1996). Niewielką (5-7-krotną) krzyżową odporność stwierdzono również w odniesieniu do Cry I Ab i do szczepu rodzicielskiego *B. thuringiensis* subsp. *aizawai* 7.29, z którego pobrano gen Cry I C do konstrukcji szczepu produkującego wyłącznie toksyczne białko Cry I C. Jak wiadomo (SANCHIS i in. 1988), szczep rodzicielski *aizawai* 7.29 produkuje, oprócz Cry I C, inne toksyczne białka, jak Cry I D, Cry I Aa i Cry I Ab. Ponieważ białka Cry I Aa, Cry I Ab i Cry I D są mało aktywne wobec *S. littoralis*, jest prawdopodobne, że łącznie mogą one wykazywać addycyjny (sumujący) lub synergistyczny toksyczny efekt w stosunku do wymienionego gatunku (MÜLLER-COHN i in. 1996). Powyższym można wytłumaczyć fakt stosunkowo małej odporności krzyżowej *S. littoralis* wobec rodzicielskiego szczepu *B. thuringiensis* subsp. *aizawai* 7.29, produkującego przecież toksyczne białko Cry I C. Nie można również całkowicie wykluczyć możliwości produkowania przez ten szczep nie opisanych jeszcze toksyn kryształów białkowych.

Szczepy odporne *S. littoralis*, wyselekcjonowane za pomocą Cry I C, nie wykazywały odporności krzyżowej w stosunku do toksyny Cry I F, która jest silnie toksyczna dla *S. exigua* (CHAMBERS i in. 1991) oraz dla *S. littoralis* i może być bardziej obiecującą toksyną niż Cry I E do stosowania w kombinacji z Cry I C w programach strategicznych, opracowanych przeciwko tym wysoce szkodliwym motyloom nocnym (MÜLLER-COHN i in. 1996).

Testowanie laboratoryjnej kolonii sówki kapuścianej *Trichoplusia ni* Hb., posiadającej 31-krotną odporność na użytą do selekcji toksynę Cry I A(b) wykazało, że odporność ta była specyficzna i nie obejmowała strukturalnie zbliżonych toksyn owadobójczych Cry I A(a) i Cry I A(c) (FERRE i ESTADA 1994).

Przeprowadzono również badania nad odpornością krzyżową komarów, które w warunkach naturalnych wytworzyły odporne populacje na *B. sphaericus*. Z badań wynika, że populacje komarów *C. pipiens quinquefasciatus* odporne na

binarne toksyny *B. sphaericus* nie wykazują odporności krzyżowej na *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* (NIELSEN-LEROUX i in. 1994). Może to świadczyć o tym, że za wrażliwość owadów na *B. thuringiensis* i *B. sphaericus* odpowiadają inne receptory.

5. MECHANIZMY ODPORNOŚCI

Mechanizmy odporności na insektycydy chemiczne, wyselekcjonowane u owadów w ciągu wielu lat stosowania tych środków w warunkach terenowych, są dość dobrze poznane. Było to możliwe dzięki temu, że odporność na wymienione środki występuje powszechnie, a w związku z tym i możliwości badawcze są duże. Natomiast odporność na bioinsektycydy *B. thuringiensis* u owadów w warunkach terenowych została wykryta niedawno i dotyczy w zasadzie tylko dwóch przypadków: omacnicy spichrzanki (szkodnika magazynowego) i tantnisia krzyżowiaczka (szkodnika upraw polowych). Dlatego przeprowadzone dotychczas badania nad mechanizmami odporności na wymienione czynniki biologiczne dotyczą głównie owadów, które poddane były selekcji w warunkach laboratoryjnych.

Na podstawie aktualnego stanu wiedzy można mechanizmy odporności owadów na bioinsektycydy *B. thuringiensis* podzielić na dwie grupy: pierwsza obejmuje mechanizmy fizjologiczne i biochemiczne, druga – genetyczne, warunkujące działanie wcześniej wymienionych. Dodatkowo można wyróżnić mechanizmy behawioralne, czyli związane z zachowaniem się owadów, uniemożliwiającym pobranie dawki śmiertelnej. Odporność behawioralna może mieć pewne znaczenie dla przeżycia owadów ekspozowanych na toksyczne dla nich substancje. Największe jednak znaczenie w odporności mają mechanizmy fizjologiczne i biochemiczne.

5.1. Fizjologiczne i biochemiczne mechanizmy odporności

Fizjologiczne i biochemiczne mechanizmy odporności na bioinsektycydy *B. thuringiensis* (podobnie jak na insektycydy chemiczne), wyselekcjonowane u owadów, wiążą się z mechanizmami (sposobami) ich działania. Mając na uwadze ułatwienie zrozumienia tych zagadnień, najpierw zostaną krótko opisane mechanizmy działania bioinsektycydów *B. thuringiensis*, przy czym należy zauważyć, że stosuje się formy użytkowe wymienionych środków, zawierające zarówno kompleks spor i kryształów białkowych, jak i wyłącznie toksycznie działające kryształy białkowe, składające się z mniejszych podjednostek tzw. delta-endotoksyn.

W przebiegu procesów intoksykacji w organizmie owada wrażliwego na bioinsektycydy *B. thuringiensis*, które znalazły się w jelicie środkowym, można wyróżnić następujące fazy (HÖFTE, WHITELEY 1989; VISER i in. 1993; MARRONE, MACINTOSH 1993):

1) rozpuszczenie kryształów w alkalicznej treści jelita i uwolnienie, jednej lub więcej, mniejszych podjednostek kryształów białkowych, tzw. delta-endotoksyn; wiele kryształów białkowych ma charakter protoksyn, które również rozpuszczają się w treści jelita środkowego,

2) rozpuszczone kryształy białkowe lub protoksyny ulegają następnie – przy udziale enzymów proteolitycznych – przemianie do toksycznych peptydów (białek o mniejszej cząsteczce),

3) te uaktywnione toksyny (peptydy o mniejszej cząsteczce) wiążą się ze specyficznymi receptorami (o strukturze białek) obecnymi w błonach komórek nabłonka jelita środkowego owadów wrażliwych (HOFMAN i in. 1988 a,b); następuje wówczas paraliż jelita i larwa zaprzestaje żerowania (SLAMA, SHARABY, 1985),

4) połączone z odpowiednimi receptorami, uaktywnione toksyny indukują w błonie komórek nabłonka jelita środkowego powstanie otworów (por), zarówno specyficznych, jak niespecyficznych dla przenikania jonów K^+ (HARVEY i in. 1983; SACCHI i in. 1986; KNOWLES, ELLAR 1987; HENDRICKX i in. 1990). Następują zakłócenia w przewodzeniu jonów i zmiana ciśnienia osmotycznego, co prowadzi do pęcznienia komórek (mikrokosmków) i ich zanikania (PERCY, FAST 1983; DELELLO i in. 1984); larwa zamiera, jeśli dostateczna liczba komórek zostanie uszkodzonych,

5) w przypadku stosowania kompleksu spor i kryształów, pewną rolę w śmiertelności odgrywają również spory, które namnażając się w organizmie larwy powodują śmiertelną dla niej septicemię

Teoretycznie można stwierdzić, że jakiegokolwiek zmiany lub modyfikacje jednej lub kilku z wymienionych faz w procesie intoksykacji owadów bioinsektycydami *B. thuringiensis* mogą prowadzić do wytworzenia się odporności na te środki. Przeprowadzone dotychczas badania – głównie na owadach uodpornionych w wyniku selekcji laboratoryjnej, a w jednym przypadku na populacji odpornej, wyselekcjonowanej stosowaniem omawianych bioinsektycydów w warunkach terenowych, a następnie poddanej selekcji w laboratorium – wykazały, że najważniejszy mechanizm odporności był związany z trzecią fazą intoksykacji i polegał na braku lub zmniejszeniu powinowactwa uaktywnionych toksyn peptydowych do specyficznych receptorów. Inaczej mówiąc, uaktywnione toksyny nie wiązały się ze specyficznymi receptorami, lub wiązały się tylko w niewielkim stopniu. Z tego wynika, że specyficzne receptory błon komórek nabłonka jelita środkowego owadów odpornych uległy istotnej modyfikacji i nie przyłączały toksycznych białek *B. thuringiensis*. Niektóre wyniki badań sugerują istnienie innych jeszcze mechanizmów odporności owadów na *B. thuringiensis*.

5.1.1. Mechanizmy odporności wynikające z modyfikacji specyficznych receptorów

VAN RIE i in. (1990) pierwsi wykazali, że odporność omacnicy spichrzanki na Cry I A(b) była skorelowana z 50-krotną redukcją powinowactwa specyficznego receptora do tej toksyny. Odporny szczep omacnicy spichrzanki był wrażliwy na drugą toksynę Cry I C. Stopień powinowactwa wymienionych toksyn do odpowiednich receptorów był skorelowany z wrażliwością owadów. Z badań wynika, że chociaż powinowactwo receptora w jelicie środkowym omacnicy spichrzanki do Cry I A(b) uległo 50-krotnemu zmniejszeniu, to koncentracja wyizolowanego receptora u owadów odpornych była prawie taka sama, jak u owadów wrażliwych. Stopień powinowactwa receptora do Cry I C u wrażliwych i odpornych owadów był zbliżony, zaobserwowano natomiast około 3-krotny wzrost koncentracji specyficznego receptora u owadów odpornych (VAN RIE i in. 1990). Rozwojowi odporności w warunkach laboratoryjnych towarzyszyło wykształcenie dwu różniących się molekularnych zmian w receptorach specyficznych dla Cry I A(b) i Cry I C.

FERRE i in. (1991) zaobserwowali, że 200-krotna odporność tantnisia krzyżowiaczka na Cry I A(b) wynika z tego, iż toksyna ta nie jest przyłączana – w przeciwieństwie do owadów wrażliwych – do odpowiedniego receptora w jelicie środkowym. Prawdopodobnie nastąpiła zmiana lub modyfikacja receptora, który nie jest rozpoznawany przez te toksyny.

Odporność na *B. thuringiensis* u słonecznicy tytoniowej *H. virescens* polegała również na zmianie lub modyfikacji specyficznego dla toksycznych białek receptora (STONE i in. 1989; MARRONE i MCINTOSH 1993). U selekcyjonowanego szczepu słonecznicy tytoniowej stwierdzono 16 i 70-krotną odporność odpowiednio na Cry I A(c) i Cry I A(b), ale tylko 4 i 2-krotną redukcję powinowactwa do odpowiedniego receptora (MCINTOSH i in. 1991). Temu spadkowi powinowactwa towarzyszył wzrost koncentracji receptorów dla obu toksyn: 4-krotny dla Cry I A(c) i 6-krotny dla Cry I A(b).

NIELSON-LEROUX i in. (1994) prowadzili badania z zastosowaniem radioaktywnego jodu (J125), określając koncentrację receptorów błon odpowiednich komórek nabłonka jelita środkowego u odpornych na *B. sphaericus* i wrażliwych, laboratoryjnych populacji komarów *C. quinquefasciatus*. Badania te wykazały silną korelację między odpornością populacji a zdolnością przyłączania toksyn do odpowiednich receptorów w jelicie środkowym. Okazało się, że populacje odporne nie miały żadnych działających receptorów dla toksyn *B. sphaericus*. Wydaje się więc, że główny mechanizm odporności u *B. sphaericus* polega również na zmianach modyfikujących specyficzne dla tych toksyn receptory, podobnie jak to opisano uprzednio dla odpornych populacji omacnicy spichrzanki (VAN RIE i in. 1990) i tantnisia krzyżowiaczka (FERRE i in. 1991).

5.1.2. Inne mechanizmy odporności

Odporność może również wynikać ze zmiany, umownie określonych, pierwszej i drugiej fazy intoksykacji. Jak wspomniano uprzednio, dla wyzwolenia aktywności owadobójczej kryształów białkowych *B. thuringiensis* niezbędne jest ich rozpuszczenie w alkalicznej treści jelita środkowego i wydzielenie poszczególnych toksyn białkowych tzw. delta-endotoksyn, które następnie ulegają proteolitycznej przemianie do białek o mniejszej cząsteczce, łączących się z odpowiednimi receptorami. Mechanizm odporności mógłby polegać na obniżeniu pH lub proteolitycznych właściwości jelita środkowego i w związku z tym kryształy białkowe *B. thuringiensis* nie ulegałyby przemianie. Ponieważ perytroficzna membrana działa jako molekularne sito, mogłyby nie dopuścić do interakcji między nienaruszonymi kryształami białkowymi a nabłonkiem jelita środkowego i kryształy mogłyby być wydalane.

W badaniach na omacnicy spichrzance nie stwierdzono istotnych różnic w wartościach pH i właściwościach enzymów proteolitycznych między szczepami odpornymi i wrażliwymi (JOHNSON i in. 1990). Podobnie nie stwierdzono zmian w składzie enzymów proteolitycznych w soku jelita środkowego, jak i w przebiegu procesu przemiany toksyn Cry I A(b) i Cry I A(c) przy udziale tych enzymów w odpornych i wrażliwych szczepach słonecznicy tytoniowej (MARRONE i MCINTOSH 1993).

Selekcja słonecznicy tytoniowej za pomocą genetycznie zmienionej, niepatogenicznej bakterii *Pseudomonas fluorescens*, produkującej delta-endotoksynę *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*, szczep HD-1 o masie cząsteczkowej 130 kDa, doprowadziła do wytworzenia szczepu charakteryzującego się około 20-krotną odpornością na czynnik selekcyjny, ale tylko około 4-krotną na oczyszczoną delta-endotoksynę HD-1 i preparat Dipel (STONE i in. 1989). Podobnie MCGAUGHEY i JOHNSON (1987) wykazali, że odporny szczep omacnicy spichrzanki powstały w wyniku selekcji biopreparatem Dipel (stanowiącym mieszaninę spor i kryształów białkowych) był około 1,5-krotnie mniej odporny na oczyszczoną delta-endotoksynę HD-1 niż na mieszaninę spor i kryształów. Podjęto więc próbę (STONE i in. 1989) wyjaśnienia tych różnic w odporności wychodząc z założenia, że mogą one wynikać z udziału zarodników bakterii w toksyczności. Iniekcja larw genetycznie zmienioną i niezmienioną bakterią *P. fluorescens* nie spowodowała istotnej różnicy w śmiertelności, co wskazuje, że septicemia wywołana namnażaniem się bakterii może tylko w minimalnym stopniu wpłynąć na odporność. Badania sugerują, że miejsca działania zmienione przez selekcję nie są zlokalizowane w hemolimfie.

Większość wyników dotychczas przeprowadzonych badań wskazuje, że główny mechanizm odporności na toksyny *B. thuringiensis* polega na zmianie powinowactwa do specyficznych receptorów, wynikającej z ich modyfikacji. W kilku przypadkach nie stwierdzono jednak korelacji między powinowactwem

do specyficznych receptorów a odpornością populacji lub jest ona niezrozumiała. Dotyczy ona głównie badań na słonecznicy tytoniowej (MACINTOSH i in. 1991), które wskazują na istnienie innych mechanizmów. GEORGHIOU (1994) wymienia badania sugerujące, że zmiana aktywacji protoksyn przez enzymy proteolityczne (proteinyazy) jelita środkowego może powodować pewien typ odporności na toksyny bakteryjne. Opisują one różnice w proteolitycznej przemianie protoksyn *B. thuringiensis* między ekstraktami soku jelita środkowego odpornych i wrażliwych szczepów omacnicy spichrzanki. Rozszczepianie proteolityczne protoksyn Cry I A(c) w populacji odpornej na *B. thuringiensis* subsp. *entomocidus* było wolniejsze niż w populacjach rodzicielskiej wrażliwej lub odpornej na *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*.

5.2. Genetyczne mechanizmy odporności

Wiedza na temat genetycznych podstaw odporności owadów na *B. thuringiensis* jest niezwykle użyteczna, gdyż pozwala przedsięwziąć odpowiednie działania mające na celu opóźnienie rozwoju tego zjawiska u traktowanych gatunków. Genetyczne podstawy odporności owadów na *B. thuringiensis*, uzyskanej w wyniku selekcji laboratoryjnej, były badane u następujących gatunków z rzędu *Lepidoptera*: omacnicy spichrzanki *Plodia interpunctella*, słonecznicy tytoniowej *Heliothis virescens* F. i tantnisia krzyżowiaczka *Plutella xylostella* L., a z rzędu *Coleoptera* u stonki ziemniaczanej *Leptinotarsa decemlineata* Say. Należy dodać, że tantniś krzyżowiaczek wykazując 20-30-krotną odporność, uzyskaną w warunkach terenowych, był następnie poddany selekcji w laboratorium. W jednym przypadku badano genetyczne podstawy odporności u tantnisia krzyżowiaczka, wykształconej w warunkach terenowych. Przedstawione genetyczne podstawy odporności dotyczą jej dziedziczenia i trwałości po zaprzestaniu presji selekcyjnej.

5.2.1. Dziedziczenie odporności

Dziedziczenie odporności wykształconej u owadów w wyniku selekcji laboratoryjnej może przebiegać inaczej niż odporności wyselekcjonowanej w warunkach polowych (ROUSH, MCKENZIE 1987; TABASHNIK i in. 1992), jednakże uzyskana w tym zakresie wiedza pozwoli na zrozumienie zagadnień, z jakimi możemy mieć do czynienia w przyszłości.

Wykonując krzyżówki dwustronne i wsteczne określono dziedziczenie się odporności na *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* u kilku gatunków owadów. Dziedziczenie się 100-krotnej odporności u jednej kolonii omacnicy spichrzanki, uzyskanej w wyniku selekcji przez 15 pokoleń, miało charakter recesywny (MCGAUGHEY 1985 b). Dziedziczenie się 15-100-krotnej odporności, wykształconej po około 40 pokoleniach selekcji, u pięciu kolonii omacnicy spichrzanki

było niecałkowicie recesywne i charakteryzowało się różnym stopniem recesywności (MCGAUGHEY, BEEMAN 1988). Z omawianych badań wynika, że odporność dziedziczyła się niezależnie od recesywnych, genetycznych markerów: miedziane (cu), złote (g) i białe (w) oczy. Niezdolność kolonii do uzyskania zbliżonego poziomu odporności w ciągu kilku pokoleń selekcji sugeruje, że użyte do badań kolonie omacnicy spichrzanki reprezentują różne biotypy, których odporność może być kontrolowana przez wiele alleli lub wiele loci. Ponadto można przypuszczać, że różne modyfikujące geny wpływały na ekspresję odporności w badanych koloniach. Jednakże szybkie wytworzenie się – w warunkach selekcji laboratoryjnej za pomocą stosunkowo małej dawki – odporności o niecałkowicie recesywnym charakterze dziedziczenia może świadczyć o tym, że jest ona w głównej mierze związana z pojedynczym czynnikiem, który występuje w koloniach z dużą częstotliwością (WOOD, MANI 1981). Wcześniejsze publikacje (KINSINGER, MCGAUGHEY 1979) opisujące duże różnice we wrażliwości omacnicy spichrzanki i mklika daktyłowca na *B. thuringiensis* mogą również świadczyć o tym, że naturalne populacje wymienionych gatunków mogą być polimorficzne pod względem genotypów odpornych.

SIMS i STONE (1991) na podstawie przeprowadzonych krzyżówek dwustronnych i wstecznych wywnioskowali, że wykształcona w wyniku selekcji laboratoryjnej odporność u słonecznicy tytoniowej na delta-endotoksynę *B. thuringiensis* o masie cząsteczkowej 130 kDa (produkowaną przez genetycznie zmienioną bakterię *Pseudomonas fluorescens*) była dziedziczona autosomalnie. Dziedziczenie tej odporności było niecałkowicie dominujące i kontrolowane przez kilka loci. Wymienieni autorzy uważają, że istotnych jest więcej niż jeden locus, gdyż reakcje owadów pochodzących z czterech pojedynczych krzyżówek wstecznych, dwóch krzyżówek pokolenia F_2 i serii trzech powtarzanych krzyżówek wstecznych, różniły się istotnie od spodziewanej reakcji przy dziedziczeniu monogenicznym. Badania (HECKEL i in. 1997) wykazały, że odporność słonecznicy tytoniowej na Cry I A(c) była związana z jedną, główną grupą sprzężenia (genem) (około 80% całej odporności); dodatkowa, druga grupa sprzężenia powodowała dużo mniejszą odporność, którą można było wykryć tylko wtedy, gdy efekt grupy pierwszej został wyeliminowany.

TABASHNIK i in. (1992) testowali potomstwo różnych krzyżówek, należącego do rzędu motyli, tantnisia krzyżowiaczka (który wytworzył 30-krotną odporność na *B. thuringiensis* w warunkach polowych, a następnie w wyniku selekcji laboratoryjnej – ponad 700-krotną) w celu określenia sposobu dziedziczenia odporności na handlowe formułacje *B. thuringiensis*. Potomstwo F_1 dwustronnych krzyżówek (odporne samce \times wrażliwe samice oraz odporne samice \times wrażliwe samce) reagowało podobnie na *B. thuringiensis*, co wskazuje na dziedziczenie autosomalne. Stężenie preparatu powodujące 50% śmiertelności (LC_{50}) potomstwa F_1 nie różniło się istotnie od analogicznego stężenia dla szczepu wrażliwego, z czego można wnioskować, że dziedziczenie się tej odporności

ma charakter recesywny. Dane te wskazują, że dziedziczenie odporności jest kontrolowane przez jeden locus lub najwyżej kilka loci. Testowanie pośrednie różnych modeli wykazało, że dane bardziej przemawiają za modelem pojedynczego locus.

Badania dziedziczenia odporności u tantnisia krzyżowiaczka, wykształconej w wyniku praktycznego stosowania bioinsektycydu *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* wykazały, że była ona niecałkowicie recesywna, autosomalna i prawdopodobnie kontrolowana przez pojedynczy gen (TANG i in. 1997). W tym przypadku, wyniki uzyskane dla populacji owadów, które wykształciły trwałą odporność w warunkach terenowych, są zbliżone do tych, jakie otrzymano dla populacji poddawanej dalszej selekcji w laboratorium.

RAHARDJA i WHALON (1995) badali dziedziczenie się 200-krotnej odporności u stonki ziemniaczanej na Cry III A delta-endotoksynę *B. thuringiensis*, stosując standardowe krzyżówki dwustronne i wsteczne między szczepami wrażliwym i odpornym oraz pokoleniem F_1 . Analiza linii regresji pokolenia F_1 z krzyżówek dwustronnych wykazała autosomalny charakter tej odporności, bez wpływu matecznego. Ponadto stwierdzono, że odporność jest kontrolowana przez niecałkowicie dominujące geny. Odchylenie od spodziewanej śmiertelności w eksperymentach z krzyżówkami wstecznymi sugeruje, że za odporność może być odpowiedzialnych więcej niż jeden locus.

Dziedziczenie odporności na *Bacillus sphaericus* u komarów *Culex pipiens quinquefasciatus* badali NIELSEN-LEROUX i in. (1994). Wymienieni badacze wykonywali krzyżówki dwustronne i wsteczne między odpornymi i wrażliwymi populacjami oraz określali LC_{50} (stężenie powodujące 50% śmiertelności). Badania wykazały, że wartość LC_{50} dla pokolenia F_1 (odporne \times wrażliwe) jest zbliżona do analogicznej wartości dla populacji wrażliwej. Autorzy dochodzą do wniosku, że dziedziczenie tej odporności jest prawie całkowicie recesywne. Stwierdzenie to zostało poparte badaniami nad charakterem receptorów błon odpowiednich komórek nabłonka jelita środkowego u odpornych i wrażliwych populacji oraz ich krzyżówki. Wykazano mianowicie, że receptory błon odpowiednich komórek nabłonka jelita środkowego pokolenia F_1 dwustronnych krzyżówek, podobnie jak populacji wrażliwej, silnie wiązały binarne toksyny *B. sphaericus*, natomiast receptory populacji odpornej były zmienione i nie przyłączały wymienionych toksyn bakteryjnych.

5.2.2. Trwałość odporności

100-krotna odporność naturalnej populacji omacnicy spichrzanki, uzyskana w wyniku selekcji laboratoryjnej przez 15 generacji, była trwała (nie uległa obniżeniu) po zaprzestaniu presji selekcyjnej za pomocą bioinsektycydu *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*, HD-1 (MCGAUGHEY 1985b). W drugim doświadczeniu z innymi populacjami omacnicy spichrzanki, uzyskana w warunkach laborato-

ryjnych odporność była również trwała, gdy przerwano selekcję w momencie, kiedy poziom odporności już nie wzrastał (utrzymywał się na jednakowym poziomie); wcześniejsze przerwanie selekcji prowadziło do spadku odporności (MCGAUGHEY, BEEMAN 1988).

STONE i in. (1989) badali trwałość około 20-krotnej odporności słonecznicy tytoniowej, uzyskanej podczas selekcji w warunkach laboratoryjnych przez 13 pokoleń za pomocą genetycznie zmienionej niepatogenicznej bakterii *Pseudomonas fluorescens*, kodującej delta-endotoksynę *B. thuringiensis* o masie cząsteczkowej 130 kDa. Z badań tych wynika, że hodowla larw przez 2 generacje bez selekcji nie obniżyła poziomu odporności. Można przypuszczać, że uzyskana odporność była względnie stabilna.

MÜLLER-COHN i in. (1996) badali stabilność odporności u *Spodoptera littoralis* na Cry I C, wykształconej w wyniku selekcji laboratoryjnej metodą masowej hodowli larw na traktowanej pożywce. Wytworzona odporność nie była trwała. Pozostawienie populacji bez selekcji przez jedno pokolenie spowodowało zmniejszenie się współczynnika odporności z ponad 500 do ponad 74, natomiast nieprzewodzenie selekcji przez 8 kolejnych pokoleń wywołało zmniejszenie się wartości współczynnika odporności do 11. Przeprowadzone badania wykazały szybki zanik odporności u selekcjonowanej populacji, co wskazuje na obecność dużej liczby genotypów wrażliwych. W przypadku innych owadów, które wykształciły odporność na toksyny białkowe *B. thuringiensis*, na ogół poziom odporności ulegał również znacznemu obniżeniu po zaprzestaniu presji selekcyjnej. Pozostawał jednak pewien znaczący poziom odporności populacji, który jest bardzo istotny z punktu widzenia strategii sterowania tym zjawiskiem, zwłaszcza w odizolowanych ekosystemach.

TABASHNIK i in. (1991) podają, że około 30-krotna odporność tantnisia krzyżowiaczka, wykształcona w warunkach polowych w wyniku stosowania bioinsektycydów *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* (HD-1), zanikała wolno po zaprzestaniu presji selekcyjnej. Badania (TANG i in. 1997) wykazały, że ponad 1500-krotna odporność u tantnisia krzyżowiaczka (populacja z Florydy) wyselekcjonowana stosowaniem bioinsektycydu *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* w warunkach terenowych zmniejszyła się do około 300-krotnej, w ciągu trzech pokoleń po zaprzestaniu selekcji. Odporność na tym poziomie (300-krotna) była stała bez stosowania selekcji laboratoryjnej. Jest to jeden z nielicznych wyników badań, które wykazały trwałość odporności na *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* u owadów, które przeniesione z pola do laboratorium nie były dalej poddawane selekcji.

RAHARDIA i WHALON (1995) badali trwałość 200-krotnej odporności u stonki ziemniaczanej na Cry III A delta-endotoksynę *B. thuringiensis*, wykształconą w warunkach selekcji laboratoryjnej przez 29 pokoleń. Uzyskana odporność nie była stabilna. Po zaprzestaniu presji selekcyjnej obserwowano tendencję spadkową poziomu odporności. Poziom odporności stonki obniżył się istotnie już po 5 pokole-

niach hodowanych bez selekcji. Wartość współczynnika odporności zmniejszyła się z 200 do 48 w ciągu hodowli przez ponad 10 pokoleń bez selekcji. Dalsze kontynuowanie hodowli owadów bez selekcji nie powodowało już istotnej redukcji w poziomie odporności. Na tej podstawie RAHARDJA i WHALON (1995) wnioskuje, że homozygotyczność została prawdopodobnie osiągnięta przez wszystkie geny warunkujące odporność. Dopiero ponowne wprowadzenie genów wrażliwości do populacji będzie sprzyjało dalszemu obniżeniu poziomu odporności.

Badano (TRISYONO, WHALON 1997) również przystosowanie się genotypów stonki ziemniaczanej o 700-krotnej odporności na Cry III A delta-endotoksynę. W większości badań uzyskane parametry były zbliżone u owadów wrażliwych i odpornych. Stwierdzono jedynie, że odporne samice produkowały 60% mniej jaj, a okres ich składania był krótszy niż u owadów wrażliwych; ponadto obserwowano wolniejszy rozwój jaj.

6. MOŻLIWOŚCI PRZECIWDZIAŁANIA ROZWOJOWI ODPORNOŚCI NA TOKSYNY *B. THURINGIENSIS* U OWADÓW

Stosowanie z dobrym skutkiem przez wiele lat ulepszonych bioinsektycydów *B. thuringiensis*, jak i roślin transgenicznych produkujących toksyny białkowe tej bakterii będzie zależało od opracowania i wdrożenia odpowiednich strategii przeciwdziałania odporności, zanim to zjawisko wystąpi w szerszym zakresie u owadów. W przeszłości sterowanie odpornością owadów na insektycydy chemiczne rozpoczęto w momencie, gdy osiągnęła ona stan krytyczny (MARRONE, MACJNTOSH 1993). Obecnie mamy inną sytuację. Odporność owadów w warunkach polowych na bioinsektycydy *B. thuringiensis* występuje tylko w nielicznych przypadkach intensywnego stosowania tych środków. Z tego należy wyciągnąć odpowiednie wnioski odnośnie do przyszłego, prawidłowego użytkowania nowych, opartych na *B. thuringiensis*, biotechnologii. Wdrożenie odpowiednich strategii przeciwdziałających wykształcaniu odporności na toksyny *B. thuringiensis* u owadów jest sprawą najważniejszą, zwłaszcza, że jak przewidywali niektórzy badacze (m.in. TABASHNIK i in. 1991; TABASHNIK 1992), owady stają się odporne na transgeniczne rośliny pierwszej generacji, zawierające pojedyncze geny toksyn białkowych.

W roku 1988 utworzono grupę roboczą, zajmującą się sterowaniem odpornością na *B. thuringiensis* (*Bacillus thuringiensis* Management Working Group), będącą konsorcjum biotechnologicznych i agrochemicznych firm (MARRONE 1989, KNAUF 1992). Grupa ta powstała w ramach Komitetu do Spraw Odporności Owadów na Insektycydy – IRAC (Insecticide Resistance Action Committee), powołanego przez międzynarodową grupę narodowych stowarzyszeń produ-

centów chemikalii (GIFAP). Zadaniem tej grupy jest określenie możliwości rozwoju odporności na *B. thuringiensis* u najważniejszych gatunków szkodliwych owadów, określanie mechanizmów odporności, strategii sterowania odpornością oraz zbierania podstawowych danych do opracowania metod pozwalających na uzyskanie maksymalnej skuteczności przy stosowaniu produktów *B. thuringiensis*.

Zasady strategii sterowania odpornością na *B. thuringiensis* są – ogólnie biorąc – zbliżone do tych, jakie stosuje się dla insektycydów chemicznych (SUTHERST, COMINS 1979; GEORGHIOU 1983). W polskim piśmiennictwie zostały one przedstawione przez MALINOWSKIEGO (1991). Zasady te dotyczą tzw. czynników operacyjnych, związanych z samym insektycydem i sposobem jego stosowania. Nie ulega wątpliwości, że pierwszą i najważniejszą sprawą jest stałe prowadzenie monitoringu wrażliwości owadów na stosowane środki (ROUSH, MILLER 1986; CROFT 1990).

Najlepszą metodą sterowania odpornością owadów na używane środki jest jej zapobieganie (TABASHNIK i in. 1991). Temu celowi służy stosowanie metod zmniejszających jednokierunkową presję selekcyjną. Może to być stosowanie bioinsektycydów *B. thuringiensis* w mieszaninach z innymi entomopatogennymi mikroorganizmami lub środkami chemicznymi albo sekwencyjne wykonywanie zabiegów: najpierw jednym, a następnie drugim środkiem. Należy nadmienić, że dwa (lub więcej) środki stosowane w mieszaninie lub sekwencyjnie mogą wykazywać działanie sumujące (addycyjne), synergistyczne (łączny efekt jest większy niż uzyskany przy oddzielnym stosowaniu pojedynczych środków) lub antagonistyczne (łączny efekt jest słabszy niż uzyskany przy oddzielnym stosowaniu pojedynczych środków). Należy wykorzystać tylko mieszaniny powodujące synergistyczny lub co najmniej addycyjny efekt.

Koncepcja stosowania mieszanin insektycydów wywodzi się z obserwacji wysokiej skuteczności takich środków, jak arseniany czy preparaty miedziowe, które oddziałując jednocześnie na wiele ośrodków życiowych, nie selekcjonowały odporności u zwalczanych organizmów. Podobne działanie powinny wykazywać mieszaniny insektycydów, które odpowiednio dobrane muszą spełniać szereg warunków, między innymi każdy środek powinien selekcjonować u owadów inny mechanizm odporności, kontrolowany przez różne geny, przy czym geny odporności powinny występować z tak małą częstotliwością, że łączne ich stwierdzenie w danym osobniku jest mało prawdopodobne. Stosowanie mieszanin należy rozpocząć przed wystąpieniem odporności na którykolwiek ze składników. Stosowanie wymienionej strategii zmniejszania jednokierunkowego nacisku selekcyjnego dotyczy zarówno tradycyjnych bioinsektycydów *B. thuringiensis*, jak i roślin transgenicznych produkujących toksyny białkowe tej bakterii.

Wirusy nuklearnej poliedrozy (NPVs) tworzą główną podgrupę patogenniczej dla owadów rodziny *Baculoviridae*; są szczególnie ważne jako patogeny szkodliwych gatunków *Lepidoptera* i w szerokim zakresie badane jako czynniki

biologicznej kontroli owadów. Bakulowirusy są również stosowane w niektórych krajach w praktyce, np. Gypchek przeciwko brudnicy nieparce w USA. Efektywność łącznego działania bioinsektycydów NPVs i *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* była zarówno addycyjna, jak i antagonistyczna w badaniach na kilku gatunkach szkodników rolniczych (JAQUES, MORRIS 1981; NAVON 1993). Działanie antagonistyczne wynika z tego, że owad pobierając dawkę letalną *B. thuringiensis* zaprzestaje żerowania, nie zdążywszy pobrać odpowiedniej dawki wirusa, by zwiększyć efektywność działania pierwszego czynnika. Addycyjne działanie tych dwu mikroorganizmów może wynikać z infekowania przez NPVs larw, które przeżyły zabieg *B. thuringiensis* i ponownie zaczęły żerować lub były najpierw porażone przez NPV. Wykazano addycyjne działanie *B. thuringiensis* i NPVs w przypadku zastosowania adjuwantu wspomagającego żerowanie. Stosowanie *B. thuringiensis* z NPVs przeciwko *Heliothis virescens* powodowało zwiększenie plonu (BELL, ROMINE 1980).

Bioinsektycydy *B. thuringiensis*, zastosowane w odpowiednim terminie, mogą również pozytywnie współdziałać z parazytoidami i drapieżcami szkodliwych owadów. Brudnica nieparka traktowana *B. thuringiensis* (szczep HD-1 lub HD-263) była w większym stopniu opanowana przez parazytoidy *Apanteles melanoscelus* (*Braconidae*) niż nietraktowana (WESELOH i in. 1983; NAVON 1993). Można to tłumaczyć wydłużeniem u owadów traktowanych czasu trwania stadiów wrażliwych na spasożytowanie. Nie zawsze jednak takie pozytywne współdziałanie ma miejsce. Uzyskano np. tylko nieliczne parazytoidy *Cotesia rubecula* z larw *Pieris rapae*, traktowanych *B. thuringiensis*, gdyż nie mogły one dokończyć rozwoju w gospodarzu, który uległ silnemu zatruciu żołądkowemu (MCDONALD i in. 1990). Stosowanie mniejszej dawki *B. thuringiensis* daje większą szansę przeżycia parazytoidom. Spasożytowane larwy słabo reagują na *B. thuringiensis*, ponieważ pobierają mniej pokarmu, a z nim mniejszą, nietoksyczną dawkę tego bioinsektycydu.

W latach siedemdziesiątych zaobserwowano, że małe dawki insektycydów chemicznych z *B. thuringiensis* dawały dobrą ochronę przed owadami (JAQUES, MORRIS 1981). Większość stwierdzonych interakcji insektycydów chemicznych z *B. thuringiensis* miała charakter addycyjny lub synergistyczny (NAVON 1993). Działanie *B. thuringiensis* z pyretroidami jest z reguły synergistyczne, natomiast z regulatorami wzrostu owadów (inhibitorami biosyntezy chityny), jak np. diflubenzuron (Dimilin), może być uznane za antagonistyczne (przy obserwacji w krótkim czasie po zabiegu) (MOHAMED i in. 1983). Diflubenzuron i inne insektycydy acylomocznikowe wykazują jednak długotrwałe działanie na liściach roślin i larwy, które przeżyły zatrucie *B. thuringiensis* i zaczęły ponownie żerować, pobierając toksyczną dawkę tych środków nie wytwarzają chityny i giną przy kolejnej wylince. Kombinacje regulatorów wzrostu owadów i *B. thuringiensis* były stosowane z dobrym skutkiem w Kanadzie przeciwko brudnicy nieparce (DREISTADT, DAHLSTEN 1989) i zastąpiły mniej selektywny insektycyd – karbaryl. Wydaje się,

że podobne współdziałanie można uzyskać między *B. thuringiensis*, a wprowadzonym ostatnio do stosowania w leśnictwie insektycydem – tebufenozydem (Mimic 240 LV), należącym do grupy agonistów ekdyzonu i działającym na owady z rzędu *Lepidoptera*.

Naturalne insektycydy uzyskane z miodli indyjskiej, oparte na azadyrachtynie, wykazały, jak dotychczas, antagonistyczne współdziałanie z *B. thuringiensis*, co może wynikać z repelencyjnego działania azadyrachtyny (MOAR, TRUMBLE 1987). Konieczne są dalsze badania nad wyjaśnieniem mechanizmu działania azadyrachtyny i innych środków (tebufenozyd) oraz ocena ich przydatności do ewentualnego użycia z *B. thuringiensis*.

Inną możliwością opóźnienia powstawania odporności jest stosowanie przemienne (rotacyjne) bioinsektycydów *B. thuringiensis* z insektycydami chemicznymi. Ogólne zasady działania i warunki stosowania tej metody są podobne jak opisano przy używaniu mieszanin. Należy dodać, że np. stosowanie w danym roku jakiegoś insektycydu powoduje wzrost odporności zwalczanej populacji owadów, przy czym odporność ta zanika całkowicie podczas trzyletniej przerwy (presja selekcyjna tego insektycydu ustaje), gdy używane są inne środki (GEORGHIOU 1983; MALINOWSKI 1991). Rotacja insektycydów w ciągu poszczególnych generacji owadów jest uważana za bardziej skuteczną niż rotacja w czasie, np. co 7 dni (MARRONE, MACINTOSH 1993). Stosowanie takiej rotacji odnosi się raczej do bioinsektycydów *B. thuringiensis*, niż do roślin transgenicznych, produkujących przez cały sezon toksyny białkowe.

Inną metodą możliwą do stosowania zarówno w odniesieniu do roślin transgenicznych produkujących toksyczne białko *B. thuringiensis*, jak i bioinsektycydów opartych na tej bakterii jest stosowanie mozaiki, polegającej na tym, że pewna liczba roślin na plantacji nie zostanie traktowana lub będzie nietransgeniczna. Wykazano (GOULD 1986 a,b), że szkodnik będzie rozwijał się dużo wolniej na niejednorodnych genetycznie odmianach roślin, które w 80% są odporne, a w 20% nieodporne na owady. Wymieniony autor podchodzi sceptycznie do tej metody, gdyż jest łatwiej wprowadzać do stosowania genetycznie jednorodne odmiany roślin niż mieszane, poza tym farmerzy chcą uprawiać głównie rośliny odporne na owady.

W przypadku roślin transgenicznych powinno się wprowadzić więcej niż jeden gen odporności; geny te powinny kontrolować wytwarzanie toksyn o różnym mechanizmie działania. Powstanie populacji owadów odpornych na dwie (lub więcej) toksyny *B. thuringiensis* o różnych mechanizmach działania, kontrolowanych przez różne geny jest procesem o wiele wolniejszym niż w przypadku jednej toksyny. Obecnie wiele firm wprowadza na rynek odmiany roślin transgenicznych, wytwarzające dwie lub więcej toksyn *B. thuringiensis*, co powinno wyraźnie opóźnić powstawanie odporności u owadów. Zagadnienie odporności owadów na *B. thuringiensis* jest jednak bardzo złożone. Wykazano bowiem rozwój odporności na Dipel, zawierający wiele genów toksyn białkowych (TA-

BASHNIK i in. 1991). Dalsze badania nad mechanizmami działania toksyn białkowych *B. thuringiensis* oraz mechanizmami odporności owadów na wymienione toksyny są niezbędne.

7. PODSUMOWANIE

Coraz lepsze poznanie mechanizmów działania kryształów białkowych *B. thuringiensis* oraz mechanizmów odporności owadów na te toksyny pozwala na wykorzystanie ich w szerszym zakresie, zarówno jako bioinsektycydów, jak i w roślinach transgenicznych, produkujących toksyczne białka tych bakterii, a także na opracowanie odpowiednich strategii przeciwdziałających powstawaniu odporności u owadów.

MECHANIZMY DZIAŁANIA

Bakteria *B. thuringiensis* syntetyzuje podczas sporulacji krystaliczne inkluzje składające się z jednego lub wielu białek. W większości przypadków białka te charakteryzują się aktywnością w stosunku do niektórych gatunków owadów. Specyficzność działania kryształów białkowych wynika z występowania odpowiednich receptorów, wiążących te toksyny tylko u niektórych gatunków owadów. Po zjedzeniu przez owada wrażliwego kryształów białkowych *B. thuringiensis*, następuje ich rozpuszczenie w alkalicznej treści jelita środkowego i uwolnienie mniejszych podjednostek białkowych (protoksyn), z których składa się kryształ tzw. delta-endotoksyn. Następnie te protoksyny ulegają proteolitycznej przemianie do aktywnych toksyn o masie cząsteczkowej około 60 kDa, które przenikają przez perytroficzną błonę i są wiązane w specyficznych receptorach błon komórek nabłonka jelita środkowego. Połączone z odpowiednimi receptorami, uaktywnione toksyny powodują powstawanie otworów (por) w błonie komórek nabłonka jelita środkowego. Następuje zakłócenie równowagi osmotycznej i zaburzenie w przewodzeniu jonów pierwiastków, co prowadzi do pęcznienia komórek i ich zanikania. Przyjmuje się, że kluczem określającym wysoką specyficzność toksyn *B. thuringiensis* jest ich wiązanie do odpowiednich receptorów błon komórek nabłonka jelita środkowego owadów. Owady poszczególnych rzędów, a nawet gatunków mają specyficzne receptory dla odpowiednich toksyn *B. thuringiensis*. Stąd wynika wysoka selektywność ich działania.

POWSTAWANIE ODPORNOŚCI U OWADÓW

Mimo złożonego mechanizmu działania toksyn *B. thuringiensis* i krótkiego okresu ich aktywności na liściach opryskanych roślin (ulegają one rozkładowi pod wpływem promieni UV, temperatury i wilgotności), owady były w stanie wytworzyć odporne na te toksyny populacje w warunkach praktycznego ich stosowania. Opisane przypadki odporności dotyczą populacji omacnicy spichrzanki i

tantnisia krzyżowiaczka o krótkim okresie rozwoju, które były poddane silnej presji selekcyjnej bioinsektycydami *B. thuringiensis* w warunkach naturalnych przez wiele pokoleń.

Selekcja laboratoryjna różnych gatunków owadów z rzędów *Lepidoptera*, *Coleoptera* i *Diptera* wykazała stosunkowo dużą łatwość szybkiego rozwoju odporności na omawiane bioinsektycydy. Przeprowadzone badania nad naturalnymi populacjami szkodników leśnych brudnicy nieparki *L. dispar* (USA) i wyłogówki *Ch. fumiferana* (w Kanadzie) wykazały, że mają one potencjał genetyczny do rozwoju odporności na bioinsektycydy *B. thuringiensis*.

ODPORNOŚĆ KRZYŻOWA

Z dotychczasowych badań wynika, że owady odporne na insektycydy chemiczne nie wykazują krzyżowej odporności na bioinsektycydy *B. thuringiensis*. Wyselekcjonowane różnorodnymi insektycydami chemicznymi mechanizmy, polegające na ich detoksykacji w organizmie owadów przy udziale enzymów utleniających, czy hydrolitycznych, lub na modyfikacji specyficznych receptorów nie są skuteczne wobec toksyn *B. thuringiensis*. Dlatego można je stosować przeciwko populacjom owadów odpornych na konwencjonalne insektycydy i w wielu przypadkach mogą one zastąpić te środki.

Krzyżowa odporność między poszczególnymi podgatunkami lub szczepami *B. thuringiensis* występuje u owadów odpornych na omawiane bioinsektycydy. Dotyczy ona toksyn białkowych produkowanych przez dany podgatunek lub szczep. Stosowany np. do selekcji bioinsektycyd Dipel[®], zawierający *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* (szczep HD-1), powoduje powstawanie populacji, która jest krzyżowo odporna na toksyny Cry I A(a), Cry I A(b) i Cry I A(c) występujące w tym środku. Krzyżowa odporność zależy również od gatunku owada. Należy ją brać pod uwagę przy wprowadzaniu do stosowania bioinsektycydów, opartych na pojedynczych toksynach *B. thuringiensis*, lub roślin transgenicznych produkujących omawiane toksyny.

DZIEDZICZENIE I TRWAŁOŚĆ ODPORNOŚCI

Taktyka sterowania odpornością będzie w dużej mierze zależała od znajomości jej genetycznych podstaw. Dotychczasowe badania wskazują, że odporność dziedziczy się autosomalnie; to dziedziczenie może mieć charakter całkowicie, lub częściowo recesywny, lub niecałkowicie dominujący zależnie od gatunku oraz sposobu selekcji i może być kontrolowane przez jeden lub kilka genów. Stabilność odporności zależy między innymi od toksyny użytej do selekcji, czasu selekcji, liczby genów kontrolujących odporność itp. Odporność, która osiągnęła maksymalny poziom (zwiększanie dawki nie powodowało już wzrostu jej poziomu), była trwała i zanikała wolno. Odporność, która nie osiągnęła maksymalnego poziomu, nie była trwała.

MECHANIZMY ODPORNOŚCI

Mechanizmy, które przyczyniają się do tego, że owady są odporne na daną toksynę, stanowiącą przedtem dla nich śmiertelne zagrożenie, wiążą się z mechanizmami jej działania. Jak podano w opisie mechanizmów działania toksyn *B. thuringiensis*, kluczem określającym specyficzność jest ich wiązanie się z odpowiednimi receptorami, występującymi w jelicie środkowym niektórych gatunków owadów wrażliwych. Chociaż inne mechanizmy mogą być brane pod uwagę, to główny mechanizm odporności na toksyny *B. thuringiensis* u wszystkich przebadanych dotychczas gatunków owadów polegał na zmianach strukturalnych w receptorach jelita środkowego, które – w przeciwieństwie do owadów wrażliwych – nie wiązały wymienionych toksyn lub wiązały je tylko w niewielkim stopniu. Dalsze badania nad mechanizmami odporności owadów na toksyny *B. thuringiensis* są niezbędne w celu wyjaśnienia złożonego charakteru tej odporności.

PRZECIWDZIAŁANIE ROZWOJOWI ODPORNOŚCI

Przeciwdziałanie rozwojowi odporności polega – podobnie jak w przypadku insektycydów chemicznych – na zmniejszeniu jednostronnej presji selekcyjnej, czyli na racjonalnym stosowaniu bioinsektycydów *B. thuringiensis* w rotacji z innymi środkami, o innych mechanizmach działania, np. z insektycydami acylomocznikowymi, blokującymi syntezę chityny u młodocianych stadiów rozwojowych owadów. Rotacja środków nie dotyczy oczywiście roślin transgenicznych, które przez cały czas produkują toksyny bakteryjne. W przypadku roślin transgenicznych dobrym rozwiązaniem wydaje się być wprowadzenie do nich co najmniej dwu genów kontrolujących wytwarzanie toksyn o różnej specyficzności działania. Powstawanie odporności u owadów jednocześnie na dwie lub więcej toksyn trwa o wiele dłużej niż na jedną.

8. WNIOSKI OGÓLNE

Mając na uwadze ochronę środowiska należy przewidywać, że stosowanie toksyn bakteryjnych, zwłaszcza opartych na *B. thuringiensis*, będzie wzrastać, szczególnie w ochronie lasu. Wynika to z faktu wykrywania coraz to nowych toksyn, o innym spektrum działania, jak i ulepszania znanych toksyn metodami inżynierii genetycznej oraz opracowania lepszych form użytkowych, możliwych do stosowania w małych dawkach techniką samolotową. Ponadto opracowanie transgenicznych roślin uprawnych, najważniejszych z ekonomicznego punktu widzenia gatunków (bawełna, ziemniak, pomidor, tytoń, drzewa owocowe i in.) wytwarzających toksyczne dla owadów białko *B. thuringiensis* ograniczy, a w

niektórych przypadkach wyeliminuje stosowanie środków chemicznych, zwłaszcza tych, na które owady wykształciły odporne populacje.

Powstawanie odporności u owadów na bioinsektycydy *B. thuringiensis* w warunkach silnej presji selekcyjnej jest możliwe, podobnie jak na insektycydy chemiczne. Niebezpieczeństwo szybkiego powstania odporności u owadów dotyczy w pierwszej kolejności roślin transgenicznych, zwłaszcza tych, które mają pojedyncze geny kodujące toksyczne białko *B. thuringiensis*. Uważa się, że owady żerujące na tych roślinach, są poddawane permanentnej presji selekcyjnej i szybko wytwarzają odporność. Wprowadza się więc transgeniczne rośliny tzw. drugiej generacji zawierające dwa lub więcej genów kodujących toksyczne białka o różnej specyficzności działania.

Poznanie biochemicznych, fizjologicznych i genetycznych mechanizmów odporności owadów na toksyny *B. thuringiensis* pozwala na opracowanie strategii przeciwdziałania lub opóźnienia powstawania odporności. Ogólne zasady tej strategii są podobne do tych, jakie obowiązują przy insektycydach chemicznych i polegają na racjonalnym stosowaniu bioinsektycydów *B. thuringiensis*, między innymi w rotacji ze środkami chemicznymi. Przestrzeganie tych zasad zadecyduje o okresie stosowania omawianych bioinsektycydów.

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

Praca została przyjęta przez Komitet Redakcyjny 2 października 1998 r.

STATE OF STUDIES ON INSECTS RESISTANCE TO BACILLUS THURINGIENSIS TOXINS

Summary

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

The development of resistance to *B. thuringiensis* toxins in insects under the conditions of high selection pressure is possible, like as in the case of chemical insecticides. It may be assumed that the resistance will occur mainly against transgenic plants having a single gene with specific activity. The cases of such resistance are already

observed. The introduction of second generation transgenic plants containing two or more genes encoded toxins of different action specificities will delay the development of resistance.

The better recognition of biochemical, physiological and genetical mechanisms of resistance to *B. thuringiensis* toxins allow to adopt a proper strategy for delaying insects resistance. The general principles of such strategy are similar to that used in the case of chemical insecticides and involve the rational application of *B. thuringiensis* toxins and their rotation with other insecticides.

It may be concluded that further intensive studies on mechanisms of action of *B. thuringiensis* toxins as well as on mechanisms of insects resistance to them will allow to find the effective solution against the resistance development.

PIŚMIENNICTWO

- ANONIM 1993: *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* – technical reference. A joint report of the Canadian Pulp and Paper Association and the Forest Pest Management Institute.
- ARONSON A. I., BECKMAN W., DUNN P. 1986: *Bacillus thuringiensis* and related insect pathogens. *Microbiol. Rev.* 50: 1-24.
- BARTON K. A., WHITELEY H. R., YANG N. S. 1987: *Bacillus thuringiensis* delta endotoxin expressed in transgenic *Nicotiana tabacum* provides resistance to lepidopteran insects. *Plant Physiol.*, 85: 1103-1109.
- BELL M. R., Romine C. L. 1980: Tobacco budworm field evolution of microbial control in cotton using *Bacillus thuringiensis* and nuclear polyhedrosis virus with a feeding adjuvant. *J. Econ. Entomol.*, 73: 427-430.
- BOCZEK J. 1997: Wykorzystanie inżynierii genetycznej dla zwalczania szkodników. *Progress in Plant Protection*, 37 (1): 281-285.
- BRIESE D. T. 1981: Resistance of insect species to microbial pathogens. W: *Pathogenesis of Invertebrate Microbial Diseases* (E. Davidson ed.), Allenheld, Osmun, Totowa, N. J., 511- 545.
- CARLBERG G., LINDSTROM R. 1987: Testing fly resistance to thuringiensin produced by *Bacillus thuringiensis* ser. H-1. *J. Invertebr. Pathol.*, 49: 194-197.
- CHAMBERS J. A., JELEN A., GILBERT M. P., JANY C. S., JOHNSON T. B. 1991: Isolation and characterization of a novel crystal proteine gene from *Bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai*. *J. Bacteriol.*, 173: 3966-3976.
- CROFT B. A. 1990: Developing a philosophy and program of pesticide resistance management. W: *Pesticide resistance in arthropods* (R.T. Roush, B.E. Tabashnik eds), Chapman, Hall, New York, 277-296.
- DELELLO E., HANTON W. K., BISHOFF S. T., MISCH D. W. 1984: Histopathological effect of *Bacillus thuringiensis* on the midgut of tobacco hornworm larvae (*Manduca sexta*): low doses compared with fasting. *J. Invert. Pathol.*, 43: 169-181.
- DREISTADT S. H., DAHLSTEN D. L. 1989. Gypsy moth eradication in Pacific coast states: history and evaluation. *Bull. Entomol. Soc. Am.*, 35: 13-19.
- ELY S. 1993: The engineering of plants to express *B. thuringiensis* delta-endotoxin. W: *Bacillus thuringiensis* an environmental biopesticide: theory and practice (Ph. F. Entwistle, J.S. Cory, M.J. Bailey, S. Higgs eds). John Wiley and Sons, Chichester, 105-124.

- FERRE J., ESTADA V. 1994: Toxicity basis and mechanisms of resistance to *Bacillus thuringiensis*: the *Trichoplusia ni* model. Proc. of XXVII Annual Meeting of the Society for Invertebrate Pathology, Montpellier, France, 28 Aug. - 2 Sept., 1: 194-196.
- FERRE J., REAL M. D., VAN RIE J., JANSSENS S., PEFEROEN M. 1991: Resistance to *Bacillus thuringiensis* in a field population of *Plutella xylostella* is free to change in midgut membrane receptor. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88: 5119-5123.
- GEORGHIOU G. P. 1983: Management of resistance in arthropods. W: Pest resistance to pesticides (G. P. Georghiou, T. Saito eds), Pergamon Press, New York, 769-792.
- GEORGHIOU G. P. 1988: Implication of potential resistance to biopesticides. W: Biotechnology, Biological Pesticide, and Novel Plant Pest Resistance for Insects Pest Management (D. W. Roberts, R. R. Granados eds), Boyce Thompson Institute, Ithaca, N Y, 137-146.
- GEORGHIOU G. P. 1994: Mechanisms and microbial characteristics of invertebrate resistance to bacterial toxins. Proc. of XXVII Annual Meeting of the Society for Invertebrate Pathology, Montpellier, France, 28 Aug. - 2 Sept. 1994, 48-50.
- GOULD F. 1986a: Simulation models for predicting durability of insect resistant germplasm: a deterministic diploid, two-locus model. Env. Entomol., 15: 1-10.
- GOULD F. 1986b: Simulation models for predicting durability of insect resistant germplasm: hessian fly (*Diptera: Cecydomyiidae*) – resistant winter wheat. Env. Entomol., 15: 11-23.
- GOULD F., MARTINEZ-RAMIREZ A., ANDERSON A., FERRE J., SILVA F. J., MOAR W. J. 1992: Broad – spectrum resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins in *Heliothis virescens*. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 89: 7986-7988.
- GRANDY N.J., RICHARDS J. 1994: International harmonisation of pesticide control procedures – the OECD pesticides programme. Brighton Crop Protection Conference – Pests and Diseases, 3: 10-4, 1409-1418.
- HARVEY T. L., HOWELL D. E. 1965: Resistance of the house fly to *Bacillus thuringiensis* Berliner. J. Invertebr. Pathol., 7: 92-100.
- HARVEY W. R., CIOFFI M., DOWN J. A. T., WOLFERSBERGER M. G. 1983: Potassium ion transport ATPase in insect epithelium. J. Exp. Biol., 106: 91-117.
- HECKEL D. G., GAHON L. C., GOULD F., ANDERSON A. 1997: Identification of a linkage group with a major effect on resistance to *Bacillus thuringiensis* Cry I A(c) endotoxin in the tobacco budworm (*Lepidoptera: Noctuidae*). J. Econ. Entomol., 90 (1): 75-86.
- HENDRICKX K., DE LOOF A., VAN MELLAERT H. 1990: Effect of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin on the permeability of brush border membrane vesicles from tobacco hornworm (*Manduca sexta*) midgut. Comp. Biochem. Physiol., 95C: 241-245.
- HOFMANN C., LÜTHY P., HÜTTER R., PLISKA V. 1988a: Binding of the delta endotoxin from *Bacillus thuringiensis* to brush border membrane vesicles of the cabbage butterfly (*Pieris brassicae*). Eur. J. Biochem., 173: 85-91.
- HOFMANN C., VANDERBRUGGEN H., HÜTTER R., VAN RIE J., JANSEN S., VAN MELLAERT H. 1988b: Specificity of *Bacillus thuringiensis* delta endotoxins is correlated with the presence of high-affinity binding sites in the brush border membrane of insect midguts. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85: 7844-7848.
- HÖFTE H., WHITELEY H. R. 1989: Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. Microbiological Reviews, 53 (2): 242-255.
- JAQUES R. P., MORRIS O. N. 1981: Compatibility of pathogens with other methods of pest control and with different crops. W: Microbial Control of Pests and Plant Diseases 1970-1980 (H. D. Burges ed.), Acad. Press, New York, 695-715.
- JOHNSON D. E., BROOKHART G. L., KRAMER K. J., BARNELT B. D., MCGAUGHEY W. H. 1990: Resistance to *Bacillus thuringiensis* by the Indian mealmoth, *Plodia interpunctella*: comparison of midgut proteinases from susceptible and resistant larvae. J. Invert. Pathol., 55: 235-244.
- KAISER J. 1996: Pests overwhelm Bt cotton crop. Science, 273: 423-424.

- KANIEWSKI W. K. 1997: The introduction of genetically engineered plants into commercial production; an overview and report on the initial years. *Progress in Plant Protection*, 37 (1): 286-290.
- KINSINGER R. A., MCGAUGHEY W. H. 1979: Susceptibility of populations of Indian meal moth and almond moth to *Bacillus thuringiensis*. *J. Econ. Entomol.*, 72: 346-349.
- KNAUF W. 1992: Status of IRAC – the Insecticides Resistance Action Committee from industry. W: *Insecticides: mechanism of action and resistance*. (D. Otto, B. Weber eds), Intercept Ltd., Andover, England, 291-292.
- KNOWLES B. H., ELLAR D. J. 1987: Colloid-osmotic lysis is a general feature of the mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* delta endotoxins with different insect specificities. *Biochim. Biophys. Acta*, 924: 509-518.
- LERECLUS D., DELECLUSE A., LECADET M.-M. 1993: Diversity of *Bacillus thuringiensis* strains and toxins. W: *Bacillus thuringiensis* an environmental biopesticide: theory and practice (Ph. F. Entwistle, J. S. Cory, M. J. Bailey, S. Higgs eds). John Wiley and sons, Chichester, 1-36.
- LISANSKY S. G., COOMBS J. 1992: Technical improvements to biopesticides. Brighton Crop Protection Conference – Pests and Diseases, 1(4C-1): 345-350.
- LISANSKY S. G., COOMBS J. 1994: Development in the market for biopesticides. Brighton Crop Protection Conference – Pests and Diseases, 3(8D-1): 1049-1054.
- MACILWAIN C. 1996: Bollworms chew hole in gene – engineered cotton. *Nature*, 289, 382.
- MACINTOSH S. C., STONE T. B., JOKERST R. S., FUCHS R. L. 1991: Binding of *Bacillus thuringiensis* proteins to a laboratory selected line of *Heliothis virescens*. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 88: 8930-8933.
- MALINOWSKI H. 1985: Oznaczenie aktywności biopreparatów *Bacillus thuringiensis* (Berliner) na młki mącznym *Ephestia (Anagasta) kühniella* (Zeller). *Pestycydy*, 4: 33-41.
- MALINOWSKI H. 1991: Metody przeciwdziałania odporności na zoocydy w populacjach stawonogów. *Mat. XXXI Sesji Nauk. Inst. Ochr. Roślin w Poznaniu, Cz. I*: 180-187.
- MALINOWSKI H. 1993: Postępy w zakresie biopreparatów opartych na bakterii *Bacillus thuringiensis* (Berliner). *Sylwan*, 7: 67-74.
- MALINOWSKI H. 1996: Comparative evaluation of Ecotech Pro 07,5 OF and Foray 02,2 UL activities against *Lymantria monacha* and *Dendrolimus pini* larvae under laboratory conditions. *Proc. of the meeting of IOBC/WPRS and IOBC/EPRS, Working Groups "Insect Pathogen and Insect Parasitic Nematodes"*, 27 Aug.-1 Sept. 1995, Poznań (Poland), IOBC/WPRS Bulletin vol., 19 (9): 293-295.
- MALINOWSKI H. 1997: Stan odporności ważniejszych szkodliwych owadów leśnych na insektycydy. *Prace Inst. Bad. Leś. Ser. A*, 830: 5-44.
- MARRONE P. G. 1989: B.t. Working Group. Pest resistance management, Western regional coordinating committee (WRCC). *Newsletter*, 1: 13.
- MARRONE P. G., MACINTOSH S. C. 1993: Resistance to *Bacillus thuringiensis*. An environmental biopesticide: theory and practice (Ph.F. Entwistle, J.S. Cory, M.J. Bailey, S. Higgs eds), John Wiley and sons, Chichester, 221-235.
- MCDONALD R. C., KOK L. T., YOSTEN A. A. 1990: Response of fourth instar *Pieris rapae* parasitized by the braconid *Cotesia rubecula* to *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* delta-endotoxin. *J. Invert. Pathol.*, 56: 422-423.
- MCGAUGHEY W. H. 1985a: Evaluation of *Bacillus thuringiensis* for controlling Indianmeal moth (*Lepidoptera: Pyralidae*) in farm grain bins and elevator silos. *J. Econ. Entomol.*, 78: 1089-1094.
- MCGAUGHEY W. H. 1985b: Insect resistance to the biological insecticide *Bacillus thuringiensis*. *Science* (Washington, DC), 229: 193-195.
- MCGAUGHEY W. H., BEEMAN R. W. 1988: Resistance to *Bacillus thuringiensis* in colonies of Indianmeal moth and almond moth (*Lepidoptera: Pyralidae*). *J. Econ. Entomol.*, 81 (1): 28-33.

- MCGAUGHEY W. H., JOHNSON D. E. 1987: Toxicity of different serotypes and toxins of *Bacillus thuringiensis* to resistant and susceptible Indianmeal moth (*Lepidoptera: Pyralidae*). J. Econ. Entomol., 80: 1122-1126.
- MOAR W.J., TRUMBLE J. T. 1987: Toxicity, joint action, and mean time of mortality of Dipel 2X, avermectin B1, neem and thuringiensis against beet armyworms (*Lepidoptera: Noctuidae*). J. Econ. Entomol., 80: 588-592.
- MOAR W. M., PUTSZTAI-CAREY M., VAN FAASSEN H., BOSCH D., FRUTOS R., RANG C., LUO K., ADANG M. J. 1994: Development of *Bacillus thuringiensis* Cry I C resistance by *Spodoptera exigua* (Hübner) (*Lepidoptera: Noctuidae*). Appl. Environ. Microbiol., 61: 2086-2092.
- MOHAMED A. I., YOUNG S. Y., YEARIAN W. C. 1983: Susceptibility of *Heliothis virescens* (F.) (*Lepidoptera: Noctuidae*) larvae to microbial agent – chemical pesticide mixtures on cotton foliage. Env. Entomol., 12:1403-1405.
- MÜLLER-COHN J., CHAUFaux J., BUISSON C., GILOIS N., SANCHIS V., LARECLUS D. 1996: *Spodoptera littoralis* (*Lepidoptera: Noctuidae*) resistance to Cry I C and cross – resistance to other *Bacillus thuringiensis* crystal toxins. J. Econ. Entomol., 89 (4): 791-792.
- NAVON A. 1993: Control of lepidopteran pests with *Bacillus thuringiensis*. W: *Bacillus thuringiensis* an environmental biopesticide: theory and practice (Ph.F. Entwistle, J. S. Cory, M. J. Bailey, S. Higgs eds), John Wiley and sons, Chichester, 125-146.
- NIELSEN-LEROUX C., CHARLES J. F., GEORGHIOU G. P., SILVA-FILHA M. H., REGIS L. 1994: Mechanisms of resistance of mosquito larvae to *Bacillus sphaericus* toxins. Proc. of XXVII Ann. Meeting of the Society for Invertebrate Pathology, Montpellier, France, 28 Aug. - 2 Sept., 1: 201-206.
- OBUKOWICZ M. G., PERLAK F. J., KUSANO-KRETZMER K., MAYER E. J., WATRUD L. S. 1986: Integration of the delta-endotoxin gene of *Bacillus thuringiensis* into the chromosome of root-colonizing strains of pseudomonas using Tn 5. Gene, 45: 327-331.
- PERCY J., FAST G. P. 1983. *Bacillus thuringiensis* crystal toxin: ultrastructural studies of its effect on silkworm midgut cell. J. Invert. Pathol., 41: 86-98.
- POWELL A.K., JUTSUM A. R. 1993: Technical and commercial aspects of biocontrol products. Pestic. Sci., 37: 315-321.
- RAHARDJA U., WHALON M. E. 1995: Inheritance of resistance to *Bacillus thuringiensis* subsp. *tenebrionis* Cry III A delta-endotoxin in Colorado potato beetle (*Coleoptera: Chrysomelidae*). J. Econ. Entomol., 88 (1): 21-26.
- RAVENSBERG W. J. 1994: Biological control of pests: current trends and future prospects. Brighton Crop Protection Conference – Pests and Diseases, 2(6A-1): 591-600.
- Rodgers P. B. 1993: Potential of biopesticides in agriculture. Pestic. Sci., 39: 117-129.
- ROSSITER M., YENDOL W. G., DUBOIS N. R. 1990. Resistance to *Bacillus thuringiensis* in gypsy moth (*Lepidoptera: Lymantriidae*): Genetic and environmental causes. J. Econ. Entomol., 83 (6): 2211-2218.
- ROUSH R. T., MCKENZIE J. A. 1987: Ecological genetics of insecticide resistance. Annu. Rev. Entomol., 32: 361-380.
- ROUSH R. T., MILLER G. L. 1986: Consideration for design of insecticide resistance monitoring programs. J. Econ. Entomol., 79: 293-298.
- SACCHI V. F., PARENTI P., HANOZET G. M., BIODANA B., LÜTHY P., WOLFERSBERGER M. G. 1986: *Bacillus thuringiensis* toxin inhibit K⁺-gradient – dependent amino acid transport across the brush border membrane of *Pieris brassicae* midgut cells. FEBS Lett., 204: 213-218.
- SALAMA H. S., SHARABY A. 1985: Histopathological changes in *Heliothis armigera* infected with *Bacillus thuringiensis* as detected by electron microscopy. Insect Sci. Applic., 6: 503-511.
- SANCHIS V., LARECLUS D., MENOUE G., CHAUFaux J., LECADet M.-M. 1988. Multiplicity of d-endotoxin genes with different specificities in *Bacillus thuringiensis aizawai* 7.29. Mol. Microbiol., 2: 393-404.

- SIERPIŃSKA A. 1997a: Toxicity of *Bacillus thuringiensis* to some defoliating forest *Lepidoptera*. Fol. For. Pol., Ser. A, 39: 79-92.
- SIERPIŃSKA A. 1997b: *Bacillus thuringiensis* – stan obecny i perspektywy wykorzystania w ograniczaniu liczebności owadów liściożernych. Sylwan, 9: 63-70.
- SIMS S. R., STONE T. B. 1991: Genetic basis of tobacco budworm resistance to an engineered *Pseudomonas fluorescens* expressing the delta-endotoxin of *Bacillus thuringiensis kurstaki*. J. Invert Pathol., 57: 206-210.
- STONE T. B., SIMS S. R., MARRONE P. G. 1989: Selection of tobacco budworm for resistance to genetically an engineered *Pseudomonas fluorescens* containing the delta-endotoxin of *Bacillus thuringiensis kurstaki*. J. Invert Pathol., 5: 228-234.
- SUTHERST R. W., COMINS H. N. 1979: The management of acaricide resistance in the cattle tick, *Boophilus microplus* (*Canestrini*) (*Acari: Ixodidae*) in Australia. Bull. Entomol. Res., 6: 519-523.
- TABASHNIK B. E. 1992: Resistance risk assessment: realized heritability of resistance to *Bacillus thuringiensis* in diamondback moth (*Lepidoptera: Plutellidae*), tobacco budworm (*Lepidoptera: Noctuidae*), and Colorado Potato beetle (*Coleoptera: Chrysomelidae*). J. Econ. Entomol., 85: 1551-1559.
- TABASHNIK B. E. 1994: Evolution of resistance to *Bacillus thuringiensis*. Ann. Rev. Entomol., 39: 47-79.
- TABASHNIK B. E., CUSHING N. L., FINSON N., JOHNSON M. W. 1990: Field development of resistance to *Bacillus thuringiensis* in diamondback moth (*Lepidoptera: Plutellidae*). J. Econ. Entomol., 83: 1671-1676.
- TABASHNIK B. E., FINSON N., JOHNSON N. W. 1991: Managing resistance to *Bacillus thuringiensis*: Lessons from the diamondback moth (*Lepidoptera: Plutellidae*). J. Econ. Entomol., 84 (1): 49-55.
- TABASHNIK B. E., SCHWARTZ J. M., FINSON N., JOHNSON N.W. 1991: Inheritance of resistance to *Bacillus thuringiensis* in diamondback (*Lepidoptera: Plutellidae*). J. Econ. Entomol., 85 (4): 1046-1055.
- TANAKA H., KIMURA Y. 1991: Resistant to BT formulation in diamondback moth, *Plutella xylostella* L., on watercress. Japanese J. Appl. Entomol. Zool., 35: 253-255.
- TANG J. D., GILBOA S., ROUSH R. T., SHELTON A. M. 1997. Inheritance, stability, and lack-of – fitness costs of field – selected resistance to *Bacillus thuringiensis* in diamondback moth (*Lepidoptera: Plutellidae*) from Florida. J. Econ. Entomol., 90 (3): 732-741.
- TRISYONO A., WHALON M. E. 1997: Fitness costs of resistance to *Bacillus thuringiensis* in Colorado potato beetle (*Coleoptera: Chrysomelidae*). J. Econ. Entomol., 90 (2): 267-271.
- VAECK M., REYNAERTS A., HÖFTE H., JANSEN S., DE BEUKELEER M., DEAN C., ZABEAUN M., Van MONTAGU M., LEEMANS J. 1987: Transgenic plants protected from insect attack. Nature (London), 328: 33-37.
- VAN DER SALM, BOSCH T. D., HONEE G., FENG L., MUNSTERMAN E., BAKER P., STIEKEMA W. J., VISSER B. 1994: Insect resistance of transgenic plants that express modified *Bacillus thuringiensis* Cry I Ab and Cry I C genes: a resistance management strategy. Plant Mol. Biol., 26: 51-59.
- VAN FRANKENHUYZEN K. 1993: The challenge of *Bacillus thuringiensis*. W: *Bacillus thuringiensis* an environmental biopesticide: theory and practice (Ph.F. Entwistle, J. S. Cory, M. J. Bailey, S. Higgs eds), John Wiley and sons, Chichester, 1-36.
- VAN FRANKENHUYZEN K., NYSTROM C. W., TABASHNIK B. E. 1995: Variation in tolerance to *Bacillus thuringiensis* among and within populations of the spruce budworm (*Lepidoptera: Tortricidae*) in Ontario. J. Econ. Entomol., 88 (1): 97-105.
- VAN HERREWEGE J. 1969: La toxine thermostable de *Bacillus thuringiensis* Berliner (Ser. I): effects sur *Drosophila melanogaster* M. Ph. D. dissertation. University of Lyon. France.

- VAN RIE J., JANSEN S., HÖFTE H., DEGHEELE D., VAN MELLAERT H. 1990: Receptors on the brush border membrane of the insect midgut as determinants of the specificity of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxins. *Appl. Environ. Microbiol.*, 56: 1378-1385.
- VAN RIE J., MCGAUGHEY W. H., JOHNSON D. E., BARNETT B. D., VAN MELLAERT H. 1990: Mechanism of insect resistance to the microbial insecticide *Bacillus thuringiensis*. *Science*, 247: 72-74.
- VAZQUEZ-GARCIA M. 1983: Investigations of the potentiality of resistance to *Bacillus thuringiensis* ser. H-14 in *Culex quinquefasciatus* through accelerated selection pressure in the laboratory. Ph. D. dissertation. University of California. Riverside.
- VISER B., BOSCH D., HONEE G. 1993: Domain – function studies of *Bacillus thuringiensis* crystal proteins: a genetic approach. W: *Bacillus thuringiensis*, an environmental biopesticide: theory and practice (Ph.F. Entwistle, J. S. Cory, M. J. Bailey, S. Higgs eds), 71-88. John Wiley and sons, Chichester.
- VISSER B., MUNSTERMAN E., STOKER A., DIRKSE W.G. 1990: A novel *B. thuringiensis* gene encoding a *Spodoptera exigua* – specific crystal protein. *J. Bacteriol.*, 172: 6783-6788.
- WESELOH R. M., ANDREADIS T. G., MOORE R. E. B. 1983: Field confirmation of a mechanism causing synergism between *Bacillus thuringiensis* and the gypsy moth parasitoid, *Apanteles melanoscclus*. *J. Invert. Pathol.*, 41: 99-103.
- 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*. *J. Econ. Entomol.*, 86 (2): 226-233.
- WIERENGA J. M., NORRIS D. L., WHALON M. E. 1996: Stage – specific mortality of Colorado potato beetle (*Coleoptera: Chrysomelidae*) feeding on transgenic potatoes. *J. Econ. Entomol.*, 89 (5): 1047-1052.
- WHITELEY H. R., SCHNEPT H. E. 1986: The molecular biology of parasporal crystal body formation in *Bacillus thuringiensis*. *Annu. Rev. Microbiol.*, 40: 549-576.
- WOOD R. J., MANI G. S. 1981: The effective dominance of resistance genes in relation to the evolution of resistance. *Pestic. Sci.*, 12: 573-581.