

ALICJA SIERPIŃSKA

***Bacillus thuringiensis* – stan obecny i perspektywy wykorzystania w ograniczaniu liczebności owadów liściożernych**

The Use of *Bacillus thuringiensis* in the Control of Forest Defoliating Insects – the Present State and Perspectives

Insektycydy biologiczne (biopreparaty) mogą zawierać jako składnik aktywny wirusy, bakterie, grzyby, pierwotniaki, nicienie lub produkty przemiany materii tych organizmów. Szczególnie ważną pozycję wśród insektycydów biologicznych służących do ograniczania liczebności owadów liściożernych zajmują środki zawierające jako czynnik owadobójczy kryształki białkowe i zarodniki (spory) bakterii *Bacillus thuringiensis* Berliner. Zaletami tej bakterii jako potencjalnego insektycydu jest wysoka skuteczność, specyficzność i naturalna różnorodność toksyn, względna łatwość i niskie koszty masowej produkcji na tanich substratach organicznych oraz możliwość tworzenia odpowiednich formułacji, które mogą być stosowane przy użyciu nowoczesnych technologii opryskiwania.

Rocznie na świecie sprzedaje się insektycydy *B. thuringiensis* za 50–80 mln dolarów, z czego 60–70% jest wykorzystywane w leśnictwie (6, 11 i 12). Stanowi to wciąż jedynie około 1% całkowitej wartości sprzedawanych pestycydów, ale szacuje się, że sprzedaż insektycydów *B. thuringiensis* rośnie o 10–25% rocznie (10).

Szacuje się, że z różnych środowisk uzyskano dotąd ponad 20 000 izolatów *B. thuringiensis* (4), spośród których nieliczne posłużyły do wyprodukowania biopreparatów.

Producenci wytwarzający insektycydy *B. thuringiensis* na uznawany za największy w świecie rynek północnoamerykański, najpowszechniej wykorzystują obecnie szczep HD-1 z podgatunku kurstaki. Oprócz niego stosuje się szczepy należące do podgatunków:

- *aizawai* – do zwalczania mola barciaka *Galleria mellonella* L. (*Lepidoptera: Pyralidae*) i tantnisia krzyżowiaczka *Plutella xylostella* L., (*Lepidoptera: Plutellidae*),

- *israelensis* – do zwalczania owadów z rzędu muchówek *Diptera* – wektorów chorób człowieka,
- *morrisoni (tenebrionis)* do zwalczania owadów z rzędu chrząszczy *Coleoptera*, głównie stonki ziemniaczanej *Leptinotarsa decemlineata* Say (*Coleoptera: Chrysomelidae*).

W ostatnich latach rozwinęły się badania nad konstruowaniem mikroorganizmów o cechach genetycznych nie występujących w naturze. Przykładami insektycydów zawierających bakterie *B. thuringiensis* o nowych, nieznanach w naturze cechach są Condor OF i Ecotech XL. Nowe mikroorganizmy wytworzono wykorzystując naturalnie występujące u bakterii zjawisko zwane koniugacją, które polega na przekazywaniu materiału genetycznego z komórki dawcy do komórki biorcy. W ten sposób powstała również bakteria, która posłużyła do wyprodukowania insektycydu o nazwie Foil, toksycznego zarówno wobec larw motyli jak i chrząszczy (7).

Przykładem wykorzystania techniki inżynierii genetycznej do uzyskania szczepów *B. thuringiensis* o nowych, nieznanach w naturze właściwościach są szczepy, które posłużyły do wyprodukowania insektycydów o nazwach MVP (*B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*) i M – Trak (*B. thuringiensis* subsp. *morrisoni*). Do komórek niesporujących bakterii *Pseudomonas fluorescens* wprowadzono geny *B. thuringiensis* odpowiedzialne za produkcję kryształów białkowych. Komórki *P. fluorescens*, po wyprodukowaniu kryształów białkowych są zabijane chemicznie, a ściany komórkowe martwych bakterii tworzą wokół kryształów kapsułki (system CellCap^R) chroniące przed degradacyjnymi czynnikami środowiska, głównie przed promieniowaniem ultrafioletowym. Dzięki temu uzyskuje się wzrost trwałości insektycydu (4).

W krajach byłego ZSRR do produkcji biopreparatów wykorzystuje się szczepy należące do podgatunków:

- *caucasicus* (w aktualnej systematyce *darmstadiensis*),
- *dendrolimus* (w aktualnej systematyce *sotto* biotyp *dendrolimus*),
- *galleriae*
- *kurstaki*,
- *thuringiensis* (13).

Niektóre z tych szczepów wytwarzają szkodliwą również dla ssaków β -egzotoksynę (15) i produkowane na ich podstawie biopreparaty mogą ją zawierać w ilości od 0,6 do 20%. W leśnictwie krajów byłego ZSRR insektycydy *B. thuringiensis* wykorzystuje się m.in. do zwalczania barczatki syberyjskiej *Dendrolimus sibiricus* Tsht. (*Lepidoptera: Lasiocampidae*) (1 i 16), brudnicy mniszki *Lymantria monacha* L. (*Lepidoptera: Lymantriidae*) i brudnicy nieparki *Lymantria dispar* L. (*Lepidoptera: Lymantriidae*).

Oprócz wymienionych szczepów *B. thuringiensis*, które posłużyły do wyprodukowania insektycydów, znane są szczepy wykazujące aktywność owadobójczą wobec popilii japońskiej i innych pędraków (*Coleoptera: Scarabeidae*) oraz wielu reprezentantów *Diptera*, wśród których są larwy muchówek minujących liście, imagines muchy domowej (*Muscidae*), larwy koziułkowatych (*Tipulidae*) i in. Znaleziono szczepy aktywne wobec mrówek (*Hymenoptera: Formicidae*), rośliniarek (*Hymenoptera, Symphyta*), mszyc (*Homoptera*),

wszy (*Phthiraptera*) i karaczanów (*Orthoptera*). Odkryto szczepy aktywne wobec nicieni (*Nematoda*) (zarówno tych, których żywicielami są rośliny, jak i tych, których żywicielami są zwierzęta), pierwotniaków (*Protozoa*), motylicy wątrobowej (*Trematoda*) i roztoczy (*Acarina*) (2 i 5).

Poszukiwanie i identyfikacja nowych szczepów *B. thuringiensis* o zwiększonej aktywności owadobójczej w porównaniu do już znanych i stosowanych szczepów, a także szczepów o nieznanym dotąd spektrum aktywności, pozostaje jednym z ważniejszych kierunków badań nad tą bakterią.

Oprócz poszukiwania nowych szczepów *B. thuringiensis* w naturze i konstruowania szczepów o nowych właściwościach, szczególnie intensywnie badana jest:

- biologia molekularna endotoksyn *B. thuringiensis*;
- molekularne mechanizmy działania endotoksyn *B. thuringiensis* i powstawania odporności owadów na te endotoksyny;
- strategie zapobiegania rozwojowi odporności na *B. thuringiensis* w naturalnych populacjach owadów;
- "konstruowanie" metodami inżynierii genetycznej roślin transgenicznych, które w swoich tkankach wytwarzają owadobójcze białka *B. thuringiensis* w ilościach wystarczających do zniszczenia żerujących na nich wrażliwych szkodników;
- doskonalenie technologii produkcji biopreparatów;
- doskonalenie technologii stosowania biopreparatów *Bacillus thuringiensis*;
- skuteczność metod zwalczania owadów liściożernych i nosicieli chorób;
- wpływ *B. thuringiensis* na środowisko.

Wielu badaczy starało się określić jaki wpływ na owady pasożytnicze i drapieżne mają biopreparaty *B. thuringiensis*, ponieważ w Integrowanych Programach Ochrony Roślin przed owadami liściożernymi najskuteczniejszą strategią wydaje się być łączenie oprysków biopreparatami z działaniem wprowadzonych do środowiska lub już w nim egzystujących owadów pasożytniczych i drapieżnych (11).

Śmiertelność stawonogów nie będących celem zabiegów zwalczania mierzona jako opad martwych owadów pożytecznych, gospodarczo obojętnych oraz pajaków na 1 m² w drzewostanach opryskiwanych insektycydami kontaktowymi z grupy pyretroidów okazała się ok. 10-krotnie wyższa niż śmiertelność w drzewostanach opryskiwanych insektycydami o działaniu żołądkowym, jak Dimilin 480 SC (preparat acylomocznikowy) i Foray 48B (*B. thuringiensis*) (8).

Znane jest synergistyczne oddziaływanie *B. thuringiensis* i parazytoidów brudnicy nieparki *Lymantria dispar* L. (*Lepidoptera: Lymantriidae*) z rodziny *Braconidae* (19 i 20). Zjawisko to jest wyjaśniane w ten sposób, że część populacji larw brudnicy nieparki na skutek połknięcia dawek subletalnych nie jest szybko zabijana, a jedynie choruje. Ich rozwój larwalny i zarazem okres ekspozycji na zasiedlanie przez parazytoidy ulega wydłużeniu w porównaniu do owadów nietraktowanych *B. thuringiensis*.

Porównanie reakcji na *B. thuringiensis* larw L4 bielinka rzepika *Pieris rapae* L. (*Lepidoptera*) porażonych przez *Cotesia rubecula* (*Hymenoptera: Braconidae*) i larw zdrowych wskazuje, że owady porażone są mniej wrażliwe na toksyczne działanie bakterii niż larwy zdrowe. Larwy parazytoidea mogą się bez przeszkód przepoczwarzać, kiedy larwy żywiciela są porażone dawką 100 i 1000 razy mniejszą od dawki zalecanej do zwalczania (9).

Zastosowanie *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* do zwalczania szkodnika bawełny *Spodoptera littoralis* (Boisd.) (*Lepidoptera: Noctuidae*) nie wpływa ujemnie na kompleks związanych z tym gatunkiem owadów drapieżnych z rodzin *Coccinellidae*, *Staphylinidae*, *Anthocoridae* i *Chrysopidae* (14).

B. thuringiensis subsp. *kurstaki* i parazytoidy z rodziny *Braconidae* działają antagonistycznie w populacjach larw *Prays oleae* Bern. (*Lepidoptera: Yponomeutidae*). Działanie to jest wielokierunkowe i polega na bezpośrednim zabijaniu spasożytowanego żywiciela przez *B. thuringiensis*, zwiększeniu śmiertelności parazytoidów w organizmach żywicieli przeżywających opryskiwanie biopreparatem oraz zredukowaniu rozmiarów ciała (a więc prawdopodobnie również płodności) imagines parazytoidów (17).

Różnorodność obserwacji dotyczących wpływu *B. thuringiensis* na owady pasożytnicze i drapieżne świadczy o tym, że aby w miarę możliwości unikać ujemnych skutków ingerencji w środowisko leśne, należy dokładnie poznać rodzaj oddziaływań pomiędzy patogenem, owadem liściożernym a kompleksem jego parazytoidów oraz drapieżców. Nie można przy tym wyciągnąć wniosków natury ogólnej z pojedynczych poznanych zależności, ale każdy układ żywiciel–parazytoid–patogen należy rozpatrywać osobno.

W badaniach wpływu jednorazowego zabiegu Foray'em 48B przeciw brudnicy nieparce na larwy 41 gatunków *Lepidoptera* z ośmiu rodzin stwierdzono znaczącą śmiertelność wśród larw 26 gatunków, przy czym u 21 gatunków śmiertelność obserwowano już w piątym dniu doświadczenia. Piętnaście badanych gatunków nie wykazało wrażliwości na Foray. Autorzy wnioskuje, że chcąc poznać rzeczywisty wpływ biopreparatów *B. thuringiensis* na gatunki nie będące obiektem zwalczania, należałoby prowadzić oznaczenia wrażliwości każdego z nich (3).

W badaniach skutków aplikacji biopreparatu *B. thuringiensis* na *Lepidoptera* nie będące celem zwalczania, przeprowadzonych w warunkach terenowych, stwierdzono znaczącą redukcję liczebności larw *Macro-* i *Microlepidoptera* związanych z piętnem koron i podszytu w roku, w którym przeprowadzano zabieg. W roku następnym jednak, liczebność owadów z rzędu *Lepidoptera* w opryskanym drzewostanie jest w dużym stopniu odbudowywana (17).

Celem przeprowadzonych w ostatnich latach w Zakładzie Ochrony Lasu IBL badań była, m.in. ocena aktywności owadobójczej kilku szczepów *B. thuringiensis*, w tym szczepu standardowego, wobec wybranych gatunków liściożernych owadów leśnych z rzędu *Lepidoptera*.

Badano aktywność owadobójczą szczepów *Bacillus thuringiensis* z następujących podgatunków:

— *aizawai* (1 szczep),

- *galleriae* (1 szczep),
- *kurstaki* (2 szczepy),
- *sotto* biotyp *dendrolimus* (1 szczep),
- *thuringiensis* (1 szczep).

Zawieszinami spor i kryształów wymienionych szczepów *B. thuringiensis* infekowano owady testowe:

- barczatkę sosnówkę *Dendrolimus pini* L. (*Lepidoptera: Lasiocampidae*), larwy L3,
- brudnicę mniszkę *Lymantria monacha* L. (*Lepidoptera: Lymantriidae*), larwy L3,
- piędzika przedzimka *Operophtera brumata* L (*Lepidoptera: Geometridae*), larwy L5.

Aktywność każdego szczepu bakterii wobec każdego gatunku owada badano w dwóch lub trzech stężeniach oraz w temperaturze różniącej się o 10°C.

Uwzględniając jednocześnie śmiertelność infekowanych larw oraz intensywność żerowania larw infekowanych w porównaniu do kontrolnych stwierdzono, że ograniczaniu liczebności populacji barczatki sosnówki i ochronie listowia przed żerowaniem larw tego gatunku owada najlepiej służy szczep z podgatunku *sotto* biotyp *dendrolimus*, mniej aktywne są szczepy z podgatunku *kurstaki* (standardowy i reizolowany), a najmniej odpowiedni jest szczep z podgatunku *thuringiensis*.

Podobnie, uwzględniając jednocześnie śmiertelność larw oraz stopień zahamowania intensywności żerowania stwierdzono, że w ograniczaniu liczebności populacji brudnicy mniszki i ochronie listowia przed żerowaniem larw tego gatunku owada najlepiej sprawdza się szczep z podgatunku *thuringiensis*, mniej aktywne są szczepy z podgatunków *aizawai* i *sotto* biotyp *dendrolimus*, a najmniej odpowiednie szczepy HD-1 z podgatunku *kurstaki* (standardowy i reizolowany).

W ten sam sposób stwierdzono, że ograniczaniu liczebności populacji piędzika przedzimka i ochronie listowia przed żerowaniem larw tego gatunku owada najlepiej służy szczep z podgatunku *aizawai*, mniej aktywne są szczepy HD-1 z podgatunku *kurstaki* (standardowy i reizolowany), a najmniej odpowiednie – szczepy z podgatunków *thuringiensis* i *sotto* biotyp *dendrolimus*. Szczep z podgatunku *galleriae* wykazywało brak aktywności wobec wszystkich testowanych gatunków owadów.

Uzyskane wyniki pozwalają stwierdzić, że jakkolwiek szczep HD-1 z podgatunku *kurstaki*, obecnie używany do produkcji biopreparatów *B. thuringiensis* stosowanych w leśnictwie do ograniczania liczebności populacji owadów liściożernych wykazuje wysoką toksyczność wobec wielu gatunków owadów liściożernych, to wobec niektórych gatunków (barczatki sosnówki, brudnicy mniszki i piędzika przedzimka) jest ona mniejsza niż toksyczność innych badanych szczepów (z podgatunków, odpowiednio, *sotto* biotyp *dendrolimus*, *thuringiensis* i *aizawai*).

Z Zakładu Ochrony Lasu
Instytutu Badawczego Leśnictwa

Literatura

1. **Baranowski V.I., Zurabowa E.R., Larionow G.V.**, 1986: Lepidocyd against the pine moth *Dendrolimus sibiricus* Tsht. (Lepidocyd w borbie s sibirskim szelkoprjadom.) Lesnoe Khozjajstwo, 1.
2. **Benz G. i Joeressen H.-J.**, 1994: A new pathotype of *Bacillus thuringiensis* with pathogenic action against sawflies (*Hymenoptera, Symphyta*). IOBC/WPRS Bulletin, Bulletin OILB/SROP t. 17 (3).
3. **Carter J.L., Peacock J.W., Schweitzer D.F. i Dubois N.R.**, 1994: A laboratory assessment of the effects of *Bacillus thuringiensis* on non-target *Lepidoptera*, w "Proceedings of U.S. Department of Agriculture, Interagency Gypsy Moth Research Forum".
4. **Federici B.A.** *Bacillus thuringiensis*: Biology, Application, and Prospects for Further Development. W "Proceedings of the 2nd Canberra *Bacillus thuringiensis* Meeting, September 1993". Canberra, R.J. Akhurst, 1994.
5. **Feitelson J.S.** Novel pesticidal δ -endotoxins from *Bacillus thuringiensis*. W "Proceedings of VIth International Colloquium on Invertebrate Pathology and Microbial Control incorporating the IInd International Conference on *Bacillus thuringiensis* and the XXVIIth Annual Meeting of the Society for Invertebrate Pathology", Montpellier, France, 28.08–02.09.94. Montpellier, Society for Invertebrate Pathology, 1994.
6. **Frankenhuyzen K. van.** The Challenge of *Bacillus thuringiensis*, w "*Bacillus thuringiensis*, An Environmental Biopesticide: Theory and Practice". Chichester, New York, Brisbane, Toronto, Singapore. P.F. Entwistle, J.S. Cory, M.J. Bailey i S. Higgs., 1993.
7. **Gelernter W. i Schwab G.E.** Transgenic Bacteria, Viruses, Algae and Other Microorganisms as *Bacillus thuringiensis* Toxin Delivery Systems, w "*Bacillus thuringiensis*, An Environmental Biopesticide: Theory and Practice". Chichester, New York, Brisbane, Toronto, Singapore P.F. Entwistle, J.S. Cory, M.J. Bailey i S. Higgs, 1993.
8. **Głowacka B.**, 1995: Zwalczanie brudnicy mniszki (*Lymantria monacha* L.) w latach 1993–1994 i wpływ użytych insektycydów na stawonogi pożyteczne i gospodarczo obojęne. Prace IBL, seria B, nr 23.
9. **McDonald R.C., Kok L.T. i Yousten A.A.**, 1990: Response of Fourth Instar *Pieris rapae* Parasitized by the Braconid *Cotesia rubecula* to *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* δ -Endotoxin. J. Inv. Pathol., 56.
10. **McManus M.**, 1991: Limitations to the development of microbial pesticides. W "Proceedings U.S. Department of Agriculture, Interagency Gypsy Moth, Research Review 1990".
11. **Navon A.**, 1993: Control of Lepidopteran Pests with *Bacillus thuringiensis*, w "*Bacillus thuringiensis*, An Environmental Biopesticide: Theory and Practice", wydane przez P.F. Entwistle, J.S. Cory, M.J. Bailey i S. Higgs. John Wiley & Sons, Chichester, New York, Brisbane, Toronto, Singapore.

12. **Reardon R., Dubois N. i McLane W.** *Bacillus thuringiensis* for Managing Gypsy Moth: Review. FHM – NC – 01 – 94, USDA Forest Service, National Center of Forest Health Management, 180 Canfield Street, Morgantown, West Virginia 25505, 1994.
13. **Salama H.S. i Morris O.N.** The Use of *Bacillus thuringiensis* in Developing Countries. W "*Bacillus thuringiensis*, An Environmental Biopesticide: Theory and Practice". Chichester, New York, Brisbane, Toronto, Singapore. P.F. Entwistle, J.S. Cory, M.J. Bailey i S. Higgs, 1993.
14. **Salama H.S. i Zaki F.N.**, 1984: Impact of *Bacillus thuringiensis* Berl. on the predator complex of *Spodoptera littoralis* (Boisd.) in cotton fields. Z. ang. Ent., 97.
15. **Sebesta K., Farkas J., Horska K. i Vankova J.** Thuringiensin, the beta-exotoxin of *Bacillus thuringiensis*. W "Microbial Control of Pests and Diseases 1970–1980". London, H.D. Burges, 1981.
16. **Talalajev E.W.**, 1956: Septicemia gusenik sibirskogo schelkoprijada. Mikrobiologija, t. XXV.
17. **Varlez S., Jervis M.A., Kidd N.A.C., Campos M. i McEven P.K.**, Effects of *Bacillus thuringiensis* on parasitoids of the olive moth, *Prayz oleae* Bern. (*Lep.*, *Yponomeuti-dae*). J. Appl. Ent., 116.
18. **Wagner D.L., Carter J.L., Peacock J.W. i Talley S.E.**, 1994: A field assessment of the effects of *Bacillus thuringiensis* on non-target *Lepidoptera*. W "Proceedings of U.S. Department of Agriculture, Interagency Gypsy Moth Research Forum".
19. **Webb R.E., Shapiro M., Podgwaite J.D., Reardon R.C., Tatman K.M., Venables L. i Kolodny-Hirsch D.M.**, 1989. Effect of aerial spraying with Dimilin, Dipel, or Gypscek on two natural enemies of the gypsy moth (*Lepidoptera: Lymantriidae*). J. Econ. Entomol., 82.
20. **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 melanoscelus*. J. Inv. Pathol., 41.

Summary

The use of *Bacillus thuringiensis* in the control of forest defoliating insects – the present state and perspectives

An overview of natural and genetically changed *Bacillus thuringiensis* strains used in mass production of insecticides is given together with an insecticidal activity spectrum of the species. Research disciplines important to the future success of *B. thuringiensis* are mentioned. An influence of *B. thuringiensis* on non-target insects (parasitoids, predators and non-target *Lepidoptera*) is described.

Results of the last years studies concerning the estimation of the toxicity of a few *B. thuringiensis* strains to some of defoliating forest *Lepidoptera* are shortly described. The strongest toxic effects against the pine moth *Dendrolimus pini* L. (*Lepidoptera: Lasiocam-*

pidae), nun moth *Lymantria monacha* L. (*Lepidoptera: Lymantriidae*) and winter moth *Operophtera brumata* L. (*Lepidoptera: Geometridae*) larvae were observed, when the strains of *B. thuringiensis* subsp. sotto biotype *dendrolimus*, *B. thuringiensis* subsp. *thuringiensis* and *B. thuringiensis* subsp. *aizawai* were used, respectively. It appeared that the HD-1 strain of *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*, the strain commonly used for production of many *B. thuringiensis* formulations for forest protection, was not the most toxic to any of the tested insect species.