

## Biologické přípravky na bázi entomopatogenních bakterií

Přehled a praktické aspekty jejich záměrného využívání v ekologickém zemědělství

### Entomopatogenní bakterie

Doposud bylo izolováno více než 90 druhů bakterií prokazatelně vykazujících statut fakultativních nebo obligátních patogenů hmyzu. K významným druhům entomopatogenních bakterií patří jak Gram- tyčinkovité bakterie z čeledi *Pseudomonadaceae* (pohyblivé, anaerobní druhy, např. *Pseudomonas aeuriginosa*, *P. fluorescens*) a *Enterobacteriaceae* (fakultativně anaerobní druhy, např. *Serratia marcescens*, *S. entomophila*), tak i Gram+ bakterie z čeledě *Deinococcaceae* (anaerobní nepohyblivé koky, např. *Melissococcus pluton*). Z hlediska praktického využití v biologické ochraně rostlin však v sortimentu entomopatogenních druhů sehrávají jednoznačně bezkonkurenční úlohu bakterie z čeledě *Bacillaceae* (Gram+, tyčinkovité bakterie formující endospory), zejména pak zástupci rodů *Clostridium* sp. (striktně anaerobní, *C. bifermentans*) a *Bacillus* sp. (aerobní resp. fakultativně anaerobní). V rámci rodu *Bacillus* je známo přibližně 70 druhů, z nichž více než 20 je běžně izolováno z různých druhů hmyzích hostitelů. K běžným entomopatogenním zástupcům tohoto rodu patří *Bacillus alvei*, *B. cereus*, *B. larvae*, *B. laterosporus*, *B. popilliae*, *B. sphaericus*, *B. subtilis* a svým významem zcela unikátní druh - *Bacillus thuringiensis*. V současnosti jsou k dispozici tisíce kmenů a izolátů *B. thuringiensis* (dále i jen *Bt.*), z nichž sice jen zlomek vykazuje virulenci vůči některému ekonomicky významnému druhu hmyzího hostitele, nicméně na bázi právě těchto kmenů jsou nejen produkovány standardní biopreparáty, ale v současnosti i konstruovány transgenní odrůdy mnoha druhů kulturních rostlin.

*B. thuringiensis* byl poprvé odizolován z hmyzího hostitele (housenky bource morušového) již v roce 1901. Přímá insekticidní aktivita *Bt.* byla prokázána v roce 1911. Od té doby byly izolovány tisíce kmenů *Bt.*, z nichž však pouze některé vykazují schopnost vyvolat primární onemocnění u larev některých druhů hmyzu. V 50. letech se na trhu objevily první biopreparáty na bázi *Bt.* určené proti larvám některých druhů motýlů. V roce 1976 byl na trh zaveden přípravek na bázi kmene *Bt.* vyvolávajícího letální onemocnění u některých skupin dvoukřídlého hmyzu (např. muchniček a komárů) a v roce 1984 byl odizolován kmen vykazující účinnost i na larvy některých druhů brouků (např. larvy mandelinky bramborové *Leptinotarsa decemlineata*). V současnosti se dokonce podařilo odizolovat i kmeny vykazující virulenci na nehmyzích hostitelích (např. na roztočích a háďátcích).

V současnosti je v ČR k dispozici sice stále se zužující (!?) nicméně dostatečně reprezentativní sortiment *Bt.*-biopreparátů pokrývající téměř celý komplex hmyzích hostitelů, tj. larvy významných druhů motýlů a mandelinky bramborové. V registru povolených přípravků však od roku 1999 nejsou evidovány přípravky na bázi *B. thuringiensis* ssp. *israelensis* (virulentní vůči larvám komárů a muchniček) a doposud nebyl registrován žádný přípravek na bázi *Bt.* ssp. *azawai* (vysoce virulentní vůči larvám zavíječe voskového *Galleria mellonella*).

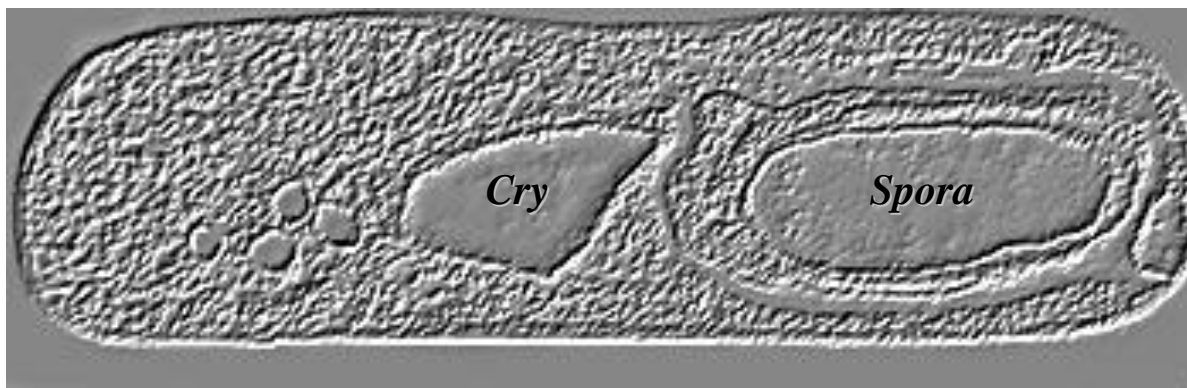
### *Bacillus thuringiensis*

*Bt.* je kosmopolitně rozšířená sporulující tyčinkovitá bakterie (velikost >0,9µm) zcela běžně se vyskytující v půdě, na povrchu rostlin a v různých organických odpadech (např. prašný odpad v obilních silech). Ve sporangiu *Bt.* je lokalizována oválná nepohlavní buňka (spora) a parasporální proteinová inkluze (tzv. krystal -

*Cry*). Přítomnost parasporálního tělíska odlišuje *Bt.* od příbuzného druhu půdní bakterie *Bacillus cereus*. Na rozdíl od *B. cereus* jsou u *Bt.* přítomny velké plazmidy nesoucí geny kódující produkci různých bílkovinných toxinů (tzv.  $\delta$ -endotoxiny), které jsou součástí krystalu. Parasporální krystal představuje klíčový a unikátní prvek toxicity všech biopreparátů na bázi *Bt.* Parasporální krystal izolátů *Bt.* obsahuje 1-5 různých endotoxinů (proteinů), které vykazují odlišnou schopnost vazby na specifické receptory buněk epitelu středního střeva larev hmyzu. Virulence (či avirulence) každého izolátu *Bt.* vůči konkrétnímu druhu hostitele je závislá na kombinaci toxinů přítomných v krystalu a schopnosti jejich exprese v průběhu interakce s receptory buněk střeva hostitele. Doposud bylo popsáno a charakterizováno přibližně 70 různých toxinů *Bt.* jejichž přirozené kombinace představují reálnou či potenciální patogenitu druhu *B. thuringiensis*. Novým fenoménem výrazně ovlivňujícím přirozenou pathogenicitu *Bt.* je cílená konstrukce "nových kmenů" *Bt.* Pomocí genetických manipulací na úrovni *Cry* genů kódujících skladbu a množství  $\delta$ -endotoxinů vznikají rekombinantní resp. geneticky modifikované kmeny *Bt.* vykazující některé nové vlastnosti (např. zvýšená virulence, účinnost i na rezistentní populace, zvýšená produkce  $\delta$ -endotoxinů při submerzní fermentaci, větší odolnost abiotickým faktorům.... a pod.).

### **Klasifikace *Bacillus thuringiensis***

Klasifikace druhu *B. thuringiensis* je poměrně složitá, nicméně pro pochopení vnitřní struktury sortimentu biopreparátů na bázi *Bt.* je její znalost absolutně nezbytná. Původní klasifikace *Bt.* byla založena na principu sérotypickém. Podle typu flagelárních antigenů byl druh *Bt.* vnitřně diverzifikován na 45 sérotypů zahrnujících 55 sérovarů.



**Sporangium entomopatogenní bakterie *Bacillus thuringiensis***  
(vegetativní buňka – spora a parasporální proteinový krystal – *Cry*)

V tomto klasifikačním systému jsou sérovary identické s poddruhy (*subspecies* - ssp.) a při klasifikaci je využívána trinominální nomenklatura. K nejznámějším a v praktické ochraně rostlin nejvyužívanějším poddruhům patří *B. thuringiensis* ssp. *kurstaki*, *Bt.-israelensis*, *Bt.-tenebrionis*, *Bt.-morrisoni*, *Bt.-aizawai* a *Bt.-san diego*. Toto členění sice poměrně dobře koreluje s morfologickými a biochemickými charakteristikami *Bt.*, ale v oblasti virulence již vyazuje nedostatečnou klasifikační a predikční úroveň. Při praktickém označování a charakteristice biopreparátů na bázi *Bt.* je však tato klasifikace stále běžně používána a jednotlivé podruhy jsou rostlinolékařskou praxí rutinně asociovány se standardním okruhem vnímavých

hostitelů (*Bt.-kurstaki* - larvy motýlů, *Bt.-israelensis* - larvy muchniček a komárů, *Bt.-tenebrionis* - larvy některých brouků.. a pod.).

Moderní klasifikace druhu *B. thuringiensis* se odvíjí od hodnocení komplexu *Cry* proteinů jednotlivých poddruhů, resp. od kategorizace sekvencí toxigenních aminokyselin v proteinech lokalizovaných v parasporálních krystalech jednotlivých poddruhů a kmenů *Bt.* V současnosti je definováno 6 tříd klasifikujících *Cry* proteiny *Bt.* (dříve *Cry I-Cry VI*, nověji pak *Cry1-Cry6*), které jsou dále detailně členěny na podtřídy (např. *Cry1A* až *Cry1F*; *Cry2A* a *B*, *Cry3A* až *C* a pod.). Každá z tříd *Cry* proteinů je charakterizována velikostí proteinů (kDa) a je implicitně vázána na specifický okruh hostitelů (např. *Cry1*- larvy motýlů). Tato klasifikace je jednoznačně přesnější a přes svou zdánlivou komplikovanost je i mnohem přehlednější. Důvodem změny klasifikačního systému bylo jednak zjištění, že některé sérotypově odlišné poddruhy mají shodné *Cry*-geny (např. ssp. *aizawai* a *entomocidus*) nebo že jeden sérotypově definovaný poddruh vykazuje schopnost produkovat proteinové krystaly obsahující  $\delta$ -endotoxiny toxické pro různé skupiny hostitelů. Například, některé kmeny *Bt.-morrisoni* produkují proteinové krystaly s účinností proti housenkám motýlů, jiné kmeny téhož poddruhu proti larvám brouků a další kmeny jsou virulentní proti larvám dvoukřídlého hmyzu. Hlavním důvodem změny klasifikačního systému *B. thuringiensis* však byla absolutní nemožnost využít sérotypickou klasifikaci i v případě rekombinantních nebo geneticky modifikovaných kmenů.

### **Mechanismus účinku *B. thuringiensis***

Mechanismus účinku *Bt.* na larvy hmyzu lze rozdělit na dvě konsekventní fáze:

1. *Toxikémie* - fáze oslabení až usmrcení hostitele v důsledku působení toxických  $\delta$ -endotoxinů parasporálního krystalu na buňky epitelu středního střeva hostitele
2. *Septikémie* - fáze masivní invaze bakterií do tělní dutiny a tkání a usmrcení hostitele v důsledku namnožení bakterií

Detailně lze mechanismus účinku *Bt.* interpretovat a demonstrovat různými způsoby. V obecné rovině lze základní posloupnosti v interakčním systému "*Bt.* - hostitel" popsat následovně. Krystaly *Bt.* jsou v principu agregáty velkých proteinů (polypeptidy, 130-140 kDa), které fungují jako protoxiny a musí být nejprve aktivovány. Krystaly *Bt.* jsou velmi stabilní (nerozpustné v neutrálním a kyselém prostředí) a v zažívacím traktu většiny živočichů (včetně člověka) proto nedochází k aktivaci protoxinů. V alkalickém prostředí středního střeva hmyzích hostitelů (pH zpravidla > 9,5) však dochází k rozpuštění krystalů a uvolnění resp. aktivaci protoxinů. Protoxin sám o sobě toxicky nepůsobí, ale v důsledku působení proteolytických enzymů (enzymy přirozeně se vyskytujících ve středním střevě hostitele, velmi často trypsiny) jsou postupně degradovány na toxiny (proteiny o průměrné velikosti 60 kDa). Toxiny se postupně vážou na specifické receptory na povrchu buněk epitelu středního střeva a indukují tvorbu mikroskopických pórů v buněčných membránách, následně dochází k vytvoření průchodných kanálků, které propojují vnitřní stěnu středního střeva s tělní dutinou. Při poškození buněčných membrán dochází k narušení jejich semipermeability což v důsledku vede k neusměrněnému pohybu iontů. Toxiny poškozené buňky bobtnají a následně odumírají (praskají, lyzují). V důsledku paralýzy a rozpadu buněk dochází k rychlé imobilizaci až desintegraci celé střední části zažívacího traktu napadeného hostitele, larva přestává přijímat potravu, produkuje tekuté výkaly, není schopna pohybu a často již v této fázi hyne (letální toxikémie, projevuje se již po několika hodinách po perorálním příjmu krystalu). V narušeném středním střevě dochází k výraznému snížení pH, což způsobuje aktivaci spor *Bt.* (případně i jiných nepatogenních druhů

bakterií), které klíčí, pronikají do tělní dutiny hostitele a po namnožení způsobují (letální) septikémii. V této fázi infikovaná larva v důsledku vnitřní dekompozice postupně měkne, ztekuceje a mění barvu na hnědočernou. Příznaky septikémie jsou na larvách zpravidla zjevné 3 - 5 dnů od iniciace infekce

Recentní výzkumy prokázaly, že ve struktuře toxinů *Bt.* existují 3 výrazně definované oblasti (integrované skupiny  $\pm 220$  aminokyselin na jednu doménu, modelová struktura viz Obr. 3), z nichž každá je zodpovědná za některou z klíčových fází interakcí s buňkami epitelu středního střeva. Tento poznatek má sice značný význam při konstrukci rekombinantních nebo konjugovaných kmenů *Bt.*, nicméně biopreparáty na bázi takto modifikovaných kmenů jsou pro potřeby ekologického zemědělství nepoužitelné

### **Toxikologické a ekologické efekty**

Biopreparáty na bázi *Bt.*, (případně samotných separovaných krystalů) vykazují velmi nízkou akutní nebo chronickou toxicitu vůči teplokrevným živočichům, dermální iritace je zcela zanedbatelná a jen mírně iritují při inhalaci, účinek na oči je výrazně dráždivý. Dlouhodobé expozice *Bt.* nevykazují negativní vliv na reprodukci, nemají teratogenní účinky, mutagenní nebo kancerogenní účinky *Bt.* na savcích doposud nebyly zjištěny. Mírný mutagenní účinek *Bt.* byl prokázán pouze v testech na rostlinných pletivech. Při požití spolu s potravou nebyla zjištěna perzistence *Bt.* v zažívacím traktu savců, doposud nebyl zaznamenán žádný případ spontánní nebo doprovodné invaze do těla nebo jednotlivých orgánů testovaných savců.

Primární proces aktivace protoxinu je hlavním důvodem vysoce specifického insekticidního účinku *B. thuringiensis*. Komplexní evaluace přímého vlivu a vedlejších účinků prokázala minimální vliv *Bt.* na necílové organizmy. Biopreparáty na bázi *Bt.* jsou zcela kompatibilní s většinou ostatních přirozených nepřátel hmyzích škůdců. *Bt.* byl testován na 74 druzích ptáků a 11 druzích ryb a ani v jednom případě nebyl zjištěn přímý toxický efekt nebo negativní vliv na reprodukci a vývoj, nebyla zaznamenána invaze do tkání nebo jednotlivých orgánů. V některých případech byl prokázán negativní vliv *Bt.* (ssp. *israelensis*) na některé druhy vodních měkkýšů a korýšů. Při hodnocení vlivu *Bt.* na opylovače (včela medonosná a čmelák *Bombus terrestris*) byl zjištěn vysoký stupeň kompatibility, což nejlépe dokazuje skutečnost, že i rekombinantní preparáty na bázi *Bt.-aizawai* jsou ve vysokých dávkách povoleny k ochraně včelstev před zavíječem voskovým *Galleria mellonella*.

*Bt.* může za vhodných podmínek přežívat v půdě až 5 měsíců, avšak v prostředí  $pH < 5$  je velmi rychle degradován. Mobilita v půdním profilu je velmi malá a proto nepatří mezi agens rizikové z hlediska kontaminace spodních vod. Na povrchu půdy a rostlin vykazuje *Bt.* malou až velmi nízkou životnost. Klíčovým abiotickým faktorem ovlivňujícím přežívání *Bt.* na povrchu rostlin je UV složka slunečního záření. Při plném oslunění přežívá *Bt.* na povrchu ošetřených rostlin pouze několik hodin (polovina spor *Bt.* je inaktivována již po 4 hodinách expozice přímému slunečnímu záření!!!). Určitá omezení jsou doporučována pouze při aplikaci v okolí chráněných vodních zdrojů a při přímé aplikaci na vodní plochy. Po aplikaci na povrch vodních ploch má *Bt.* tendenci sedimentovat a krátkodobě (48 - 72 hod po aplikaci) mohou být překročeny bezpečné koncentrace *Bt.* v sedimentech na dně. Stručná sumarizace základních údajů dokumentuje vysoký až výjimečný stupeň hygienické, toxikologické a ekologické nezávadnosti *Bt.*-preparátů.

## **Biopreparáty na bázi *B. thuringiensis***

Současný sortiment biopreparátů na bázi *Bt.* je velmi široký a sestává z desítek hlavních nebo generických verzí přípravků. Hlavním kriteriem kategorizace sortimentu *Bt.*-bioinsekticidů je podle kmenů, na jejichž bázi je přípravek koncipován. Většina *Bt.*-přípravků je stále koncipována na bázi původních kmenů, získaných po izolaci z výskytu na přirozeném hostiteli. Stále častěji se však na trhu objevují i přípravky nové generace koncipované na bázi kmenů pozměněných záměrnou selekcí nebo pomocí genetických modifikací (rekombinantní kmeny, transkonjugované kmeny a pod.).

Až do konce 70. let byly k dispozici pouze přípravky na bázi kmene *Bt.-kurstaki*, které vykazují účinnost proti larvám některých druhů motýlů. V tomto období sehrál zcela výjimečnou úlohu kmen *Bt.-kurstaki* označovaný HD1, který je již více než 30 let používán při výrobě biopreparátů, které jsou i dnes na trhu dostupné. Převážná většina *Bt.*-insekticidů registrovaných v ČR je stále koncipována na bázi tohoto kmene (viz tabulky v přílohách). Současný sortiment biopreparátů na bázi *Bt.* lze rozdělit do 3 skupin:

1. **Biopreparáty na bázi kmenů účinných na larvy motýlů** - přípravky na bázi *Bt.-kurstaki* (komerční názvy přípravků a jejich verzí - Biobit, Condor, Cutlass, Dipel, Forey, Full-Bac, Javelin, ..mnoho dalšícha) a *Bt.- aizawai* (Agree, Certan, Xentari..); *Bt.-k* mají široké uplatnění v ochraně polní zeleniny, bavlny, ovocných výsadeb a révy vinné, ochrana lesních porostů; převládají přípravky na bázi přirozených kmenů, ale v sortimentu jsou zastoupeny i přípravky rekombinantní (přípravky Crymax®, Raven® - firma Ecogen) a transkonjugantní (např. přípravek Foil® - kombinovaná účinnost na larvy motýlů a některých brouků, firma Ecogen); k dispozici je celá škála formulací (WP, WG, WD, LC)
2. **Biopreparáty na bázi kmenů účinných na larvy dvoukřídlého hmyzu** - biopreparáty na bázi kmene *Bt.-israelensis* (např. přípravky Skeetal® a Vectobac® - fi. Abbott, Bactimos® - Solvay/Duphar, Teknar® - Thermo Trilogy); velmi účinné na larvy některých druhů muchniček a komárů (*Aedes* spp., *Psorophora* spp.), nižší účinnost na larvy komárů rodu *Anopheles* a *Culex*, neúčinné na "vyšší mouchy" (např. moucha domácí *Musca domestica* aj.), velkoplošné aplikace na stojaté vody, velmi využívané v komunální hygieně; k dispozici jsou různé formulace včetně speciálních (tvrzené kroužky, ve kterých je *Bt.* immobilizován v kukuřičné drti, kroužky jsou kladou do vody a *Bt.* se do prostředí uvolňuje postupně, hojně využíván při likvidaci drobných zdrojů komárů - pneumatiky, rostliny, barely s dešťovou či jinak jímanou vodou.. a pod.), v ČR není v současnosti registrován žádný přípravek na bázi tohoto kmene *Bt.*
3. **Biopreparáty na bázi kmenů účinných na larvy některých brouků** - biopreparáty na bázi kmenů *Bt.-tenebrionis* a *Bt.-san diego*, účinné pouze vůči několika druhům brouků (mandelinka bramborové, některé druhy bázlivců a květopasů), selektivní účinnost na úrovni čeledí resp. podčeledí, zcela neúčinné na larvy většinu brouků; přípravky M-Trak (geneticky modifikovaný přípravek, část genomu kódující tvorbu *Cry* transformována do bakterie *Pseudomonas fluorescens*, přípravek obsahuje pouze *Cry*) a Novodor® (registrován i v ČR), v sortimentu přípravků účinných na larvy brouků je zvláštním případem je přípravek Foil® (transkonjugantní *Bt.-kurstaki* vykazující účinnost jak na larvy brouků, tak i housenky některých motýlů)

### **Současnost a perspektivy využívání *B. thuringiensis***

Přípravky na bázi *Bt.* jsou široce využívány na celém světě. K tradičně nejvýznamnějším uživatelům *Bt.* patří USA (cca 45% světové spotřeby), Čína (15%) a evropské státy (15%). Globální nárůst roční produkce a spotřeby *Bt.*-přípravků činí 5,5-7,0% a z větší části je realizován rozšiřováním trhu i do méně tradičních oblastí (státy Jižní Ameriky, Asie a Afriky).

Při praktickém využívání *Bt.* doposud stále převládá strategie tzv. *inundativních introdukcí*. Inundativní introdukce je jednou ze strategií biologické ochrany, při které je přirozený nepřítel do cílového agroekosystému aplikován zpravidla jednorázově v množství, které za normálních okolností zajistí regulaci četnosti populace škůdce na požadované (tolerovatelné) úrovni. Tato strategie biologické ochrany je standardně využívána v ochraně proti endemickým druhům škůdců, kteří realizují jednu (*monovoltinní druhy*) maximálně dvě (*bivoltinní druhy*) generace v průběhu vegetačního cyklu. Příkladem je široké využívání přípravků na bázi kmene *Bt.-kurstaki* HD1 v ochraně rychlené i polní zeleniny, ovocných kultur, vinic a lesních porostů proti larvám různých druhů motýlů, případně biopreparátů na bázi *Bt.-tenebrionis* a *san diego* proti larvám mandelinky bramborové. Druhou strategií ve využívání biopreparátů na bázi *Bt.* představuje strategie sezónních inokulativních introdukcí, při které jsou biopreparáty na bázi *Bt.* aplikovány proti vícegeneračním druhům (*polyvoltinní druhy*) opakovaně podle potřeby po celou sezónu. Příkladem této strategie je využívání biopreparátů na bázi *Bt.-israelensis* v biologické ochraně proti komárům resp. *Bt.-aizawai* v ochraně včelstev proti zavíječi voskovému *Galleria mellonella*.

Biotechnologickým předpokladem realizace inundativní resp. sezónně inokulativní strategie je dostupnost standardních biopreparátů. Ve stávajícím sortimentu doposud sice stále převládají různé formulace biopreparátů koncipovaných na bázi původních přírodních kmenů *Bt.*, nicméně stále častěji jsou zastoupeny i přípravky na bázi záměrnou selekcí vylepšených nebo geneticky manipulovaných kmenů. Razantní zásahy do přirozeného charakteru kmenů *Bt.* jsou motivovány řadou důvodů.

Známou nevýhodou (?) přípravků na bázi *Bt.* v porovnání s konvenčními insekticidy je jejich úzké spektrum účinnosti. Jak již bylo uvedeno, velmi typickou vlastností jednotlivých kmenů *Bt.* je účinnost na úzký okruh hostitelů, který je nejen striktně limitován řádem (např. kmeny účinné pouze na larvy motýlů, *Lepidoptera*), ale i uvnitř takto vymezené taxonomické jednotky vykazují výrazné odlišnosti v účinnosti. Příkladem je vynikající účinnost nejrozšířenějšího kmen *Bt.-israelensis* HD1 na larvy motýlů rodu *Spodoptera* a zároveň nízká účinnost vůči jiným druhům téhož řádu (např. larvám motýlů rodu *Heliothis*, housenkám předevek rodu *Plutella*). Takto diverzifikovaná virulence snižuje zájem o využívání *Bt.-biopreparátů* v multidruhových komplexech škůdců, které jsou typické pro zemědělské systémy. Naopak, stejná vlastnost (tj. *selektivita*) je vysoce ceněna při využívání *Bt.* v ochraně proti lesním škůdcům (např. bekyně rodu *Lymantria*), případně proti obtížnému hmyzu a přenašečům chorob (komáři rodů *Aedes*, *Psorophora*, *Anopheles* nebo *Culex*), kdy je *Bt.* aplikován do relativně komplexního ekosystému s četným zastoupením necílových druhů organizmů.

### **Geneticky modifikované kmeny *Bt.* a biopreparáty neakceptovatelné ekologickým zemědělstvím**

Nově koncipované kmeny *Bt.* jsou zpravidla konstruovány pomocí genetických manipulací na úrovni *Cry* genů (tj. genů kódující tvorbu a složení parasporálního krystalu resp.  $\delta$ -endotoxinů). V současnosti je definováno téměř 100 různých *Cry* genů lokalizovaných ve velkých plasmidech vegetativních buněk *Bt.* (Schéma 1) Cíleným přenosem vybraných *Cry* genů se podařilo vytvořit nové, rekombinantní resp. transkonjugované kmeny *Bt.* Nově konstruované kmeny vykazují některé vlastnosti, které nelze najít ani při monitoringu tisíců přírodních kmenů. Mezi unikátní vlastnosti geneticky modifikovaných kmenů patří například 1) obecné zvýšení účinnosti (až na úrovni synergismu), 2) rozšířené spektrum účinnosti až po kombinovanou účinnost (např. kombinací *Cry1Ac* a *Cry3A* byl zkonstruován transkonjugantní kmen *Bt.* vykazující účinnost jak na larvy některých motýlů tak i brouků, přípravek FOIL® fi. Ecogen), 3) obnovená účinnost i na rezistentní populace hostitelů, 4) vyšší produkce parasporálních krystalů, 5) výrazné snížení až eliminace produkce nežádoucích sekundárních metabolitů a další. V mnoha zemích světa jsou již registrovány komerční biopreparáty koncipované na bázi geneticky manipulovaných kmenů *Bt.* (na bázi transkonjugantních kmenů - Agree®, Design®, Condor®, Cutlass® a Foil®; na bázi rekombinantních kmenů - Crymax®, Raven® a Lepinox®). Praktické využívání biopreparátů na bázi geneticky manipulovaných kmenů *Bt.* vyžaduje jak dobré znalosti ohledně „původu“ modifikovaných kmenů, tak i legislativní úpravy, které používání preparátů na bázi geneticky manipulovaných organismů (GMO) umožňují. V případě preparátů na bázi *Bt.* lze legislativní restrikce v oblasti GMO částečně obejít formulací přípravků (přípravky bez přítomnosti vegetativních buněk *Bt.* obsahující pouze parasporální krystaly imobilizované v inertním nosiči, 20-80g proteinových krystalů v 1 kg/l přípravku), nicméně i produkty (*Cry* proteiny) geneticky modifikovaných kmenů *Bt.* je nutno (obecně ekologické hledisko) považovat za rizikové. Na využívání geneticky modifikovaných kmenů *Bt.* a jejich produktů lze mít různý názor, nicméně tento fenomén není možné ignorovat. Zároveň je však nutno konstatovat, že praktické využívání biopreparátů na bázi geneticky modifikovaných kmenů *Bt.* v současnosti i budoucnosti *Bt.* - biopreparátů jednoznačně směřuje k maximální exploataci možností, které genetické manipulace potenciálně nebo již i prakticky poskytují. Konstrukce a komercializace nových kmenů *Bt.* a biopreparátů na jejich bázi je a bude nedílnou součástí praktického využívání tohoto unikátního druhu bioagens.



Larva běláška zelného *P. brassicae*  
usmrčená *Bacillus thuringiensis* subsp.  
*kurstaki*

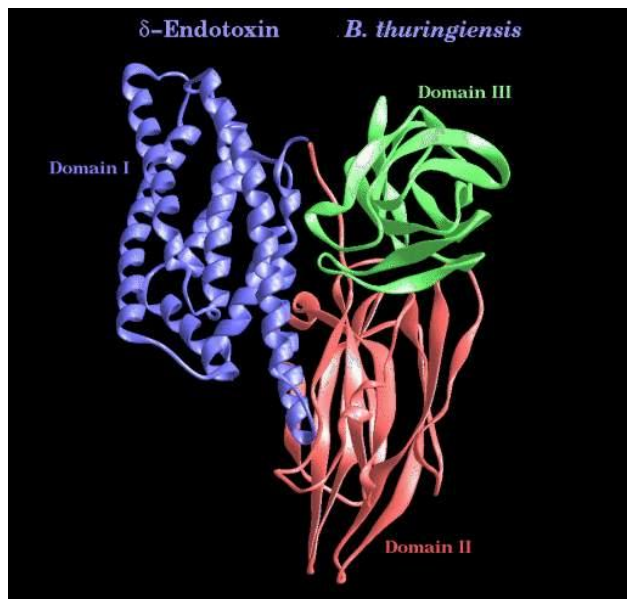
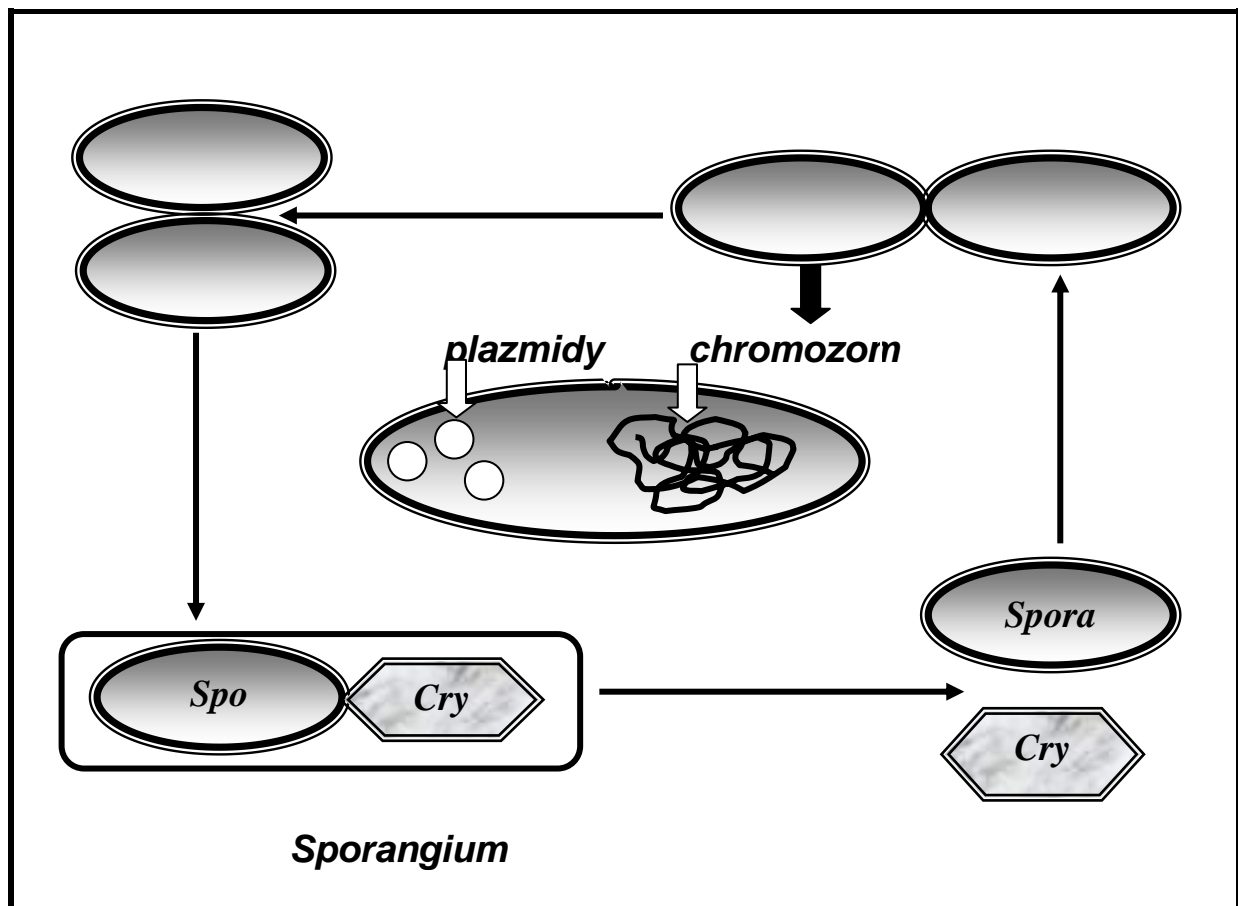


Schéma funkčních domén endotoxinu  
*Bacillus thuringiensis*



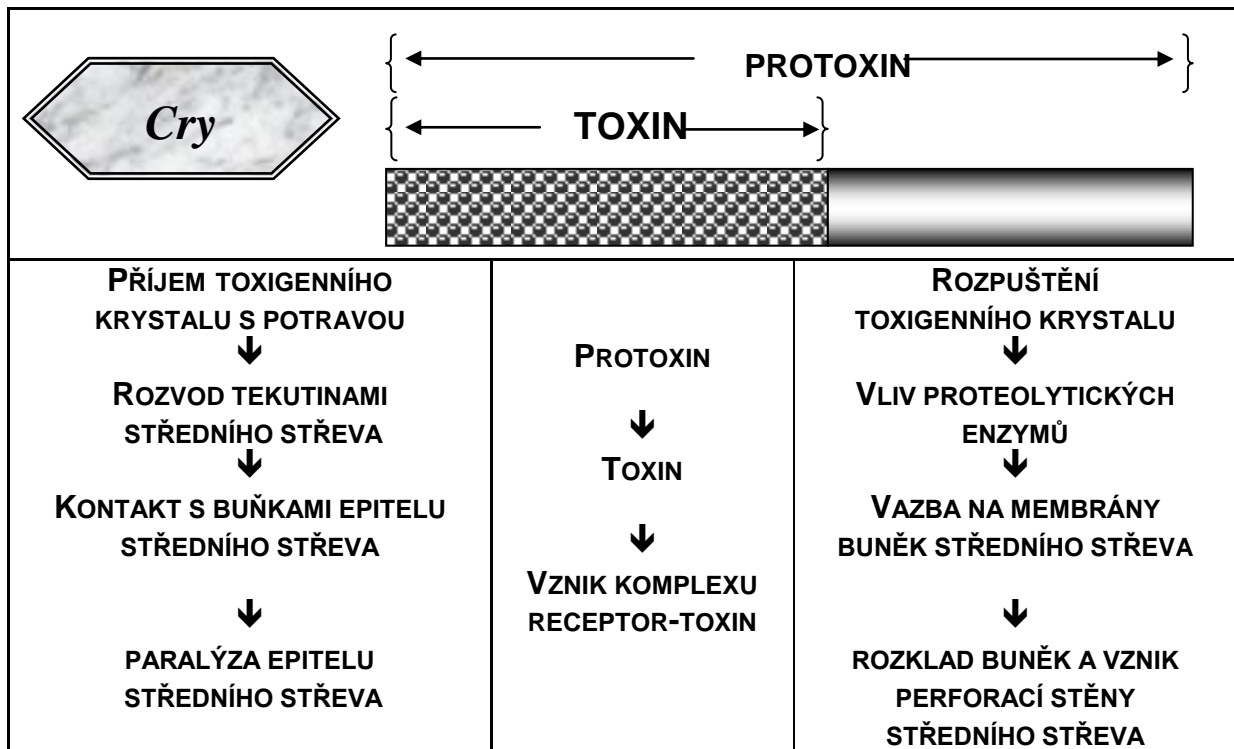
## Přílohy k problematice *Bacillus thuringiensis* a jeho využití v biologické ochraně v ekologickém zemědělství

### SCHÉMA VÝVOJOVÉHO CYKLU *B. thuringiensis*

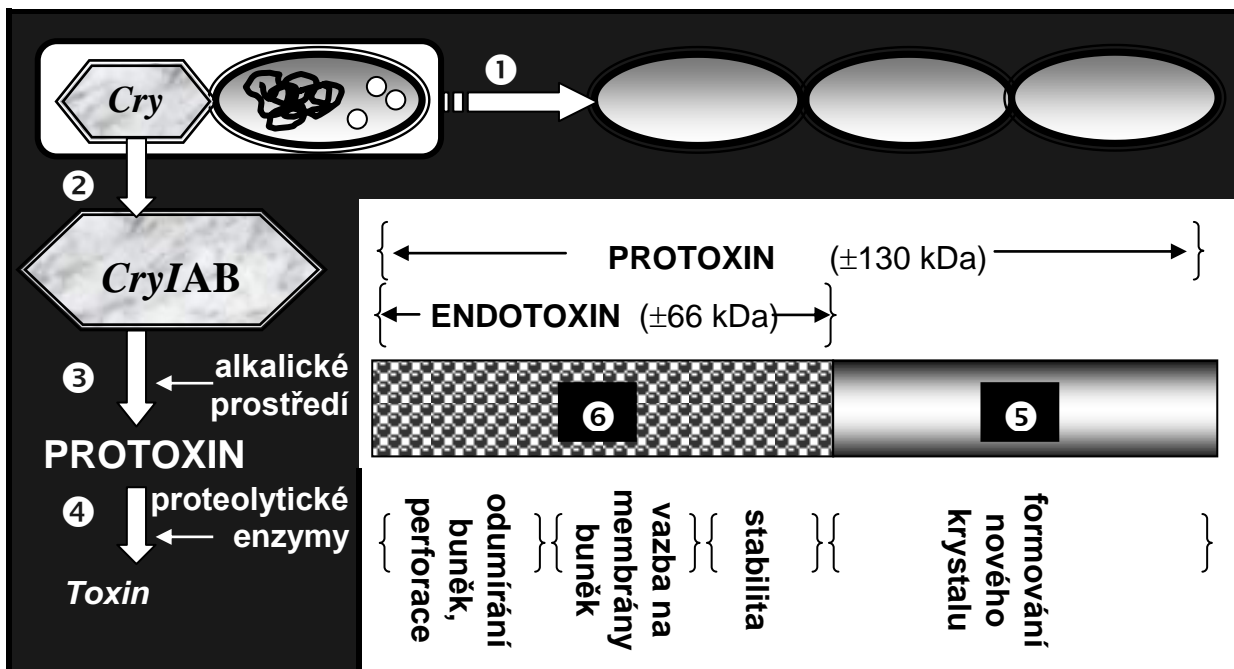


Dormantní sporangium v průběhu aktivace dezintegruje (1) a uvolňuje se vegetativní buňka (*Spora*) a parasporální proteinový krystal (**Cry** - struktura a funkce podrobněji viz schéma č. 3 a 4). Vegetativní buňky klíčí, dělí se (2 a 3) a v průběhu sporulace (4) se z každé spory tvoří nové sporangium obsahující proteinový krystal, který je toxickou složkou *Bt*. Základní vývojový cyklus může být realizován jak v systému *in vivo* (parazitická verze uvnitř těla hmyzího hostitele, podrobněji schéma 2 a 3), tak i v systému *in vitro* (saprofytické verze - výroba biopreparátů na bázi *Bt*.)

RŮZNÉ MECHANIZMU ÚČINKŮ TOXICKÝCH PROTEINŮ KRYSTALU *Bacillus thuringiensis*



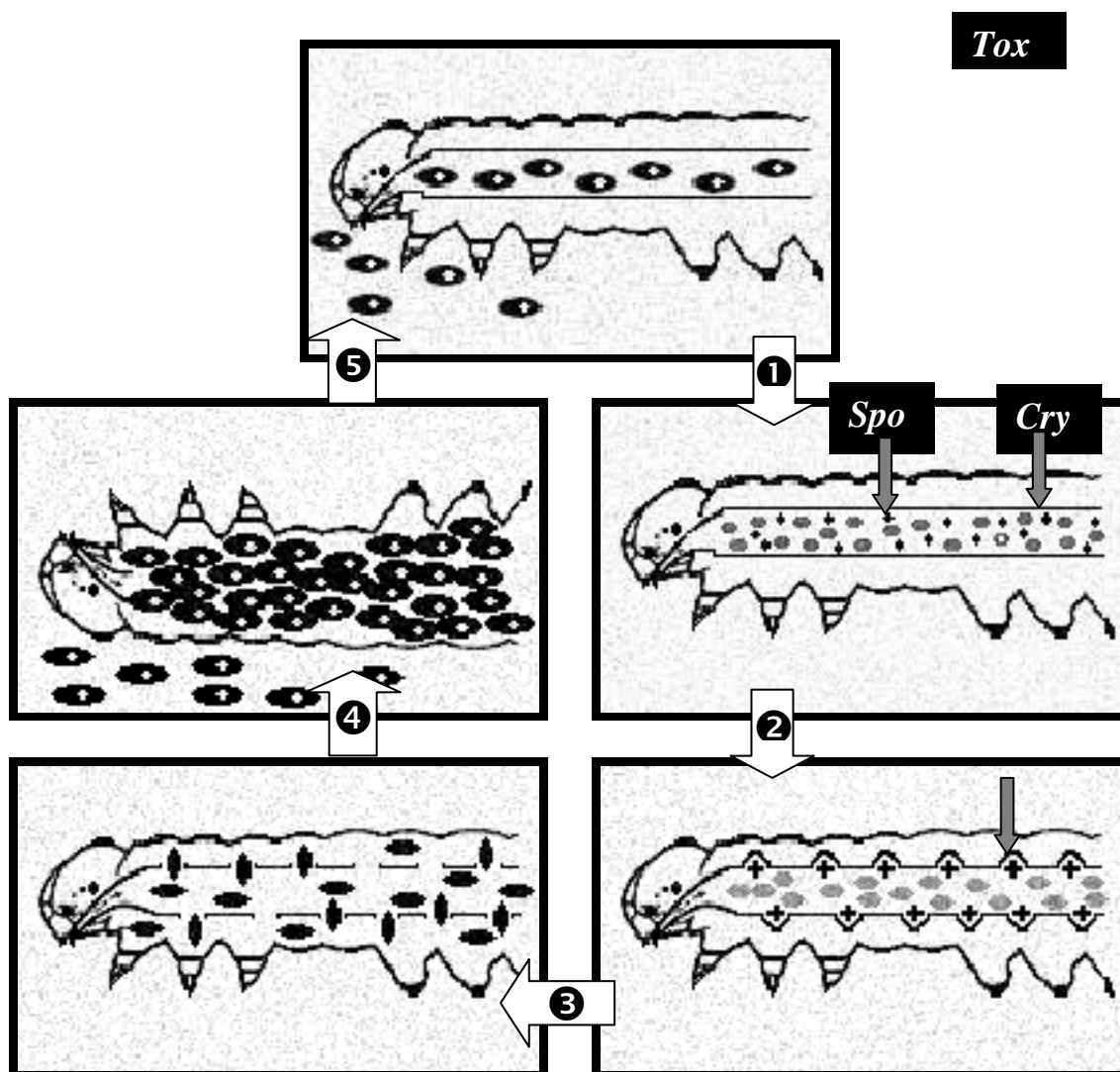
FUNKČNÍ DOMÉNY PARASPORÁLNÍHO KRYSTALU A PRŮBĚH AKTIVACE TOXINŮ *Bacillus thuringiensis* (příklad krystalu *CryIAB* - *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*)



V zaživacím traktu hostitele dochází k dezintegraci sporangia *Bt* a uvolnění vegetativní buňky (1) a toxigenního krystalu (2). V alkalickém prostředí středního střeva je uvolňován protoxin (3 a 5+6), který je vlivem proteolytických enzymů dále štěpen na toxický endotoxin (4). Endotoxin (6) tvoří integrované skupiny

aminokyselin ( $\pm 220$  aminokyselin na funkční doménu), které plní specifické funkce v interakci s buňkami epitelu středního střeva hostitele)

**PARAZITICKÝ VÝVOJOVÝ CYKLUS ENTOMOPATOGENNÍ BAKTERIE *Bacillus thuringiensis*:**



*Bt* proniká do těla hostitele spolu s potravou. V předním střevě dochází k rozpadu sporangii (1) a uvolňují se spory (*Spo*) a intracelulární proteinové krystaly (*Cry*), které jsou následně rozpouštěny na protoxiny a toxiny. Specifické toxiny (*Tox*) se váží na receptory buněk středního střeva (2) a indukují jejich postupnou paralýzu, rozklad a vznik perforací v epitelu středního střeva (3). Perforacemi ve střevě pronikají vegetativní spory do tělní dutiny a způsobují usmrcení hostitele v důsledku septikémie. V usmrceném hostiteli dochází k tvorbě nové generace sporangii (4), která po uvolnění do prostředí mohou iniciovat nový vývojový cyklus (5) (některé další aspekty procesu patogeneze *Bt.* viz schéma 4)

**PŘEHLED A CHARAKTERISTIKA NĚKTERÝCH BIOINSEKTICIDŮ NA BÁZI *B. thuringiensis* REGISTROVANÝCH PRO ÚČELY OCHRANY ROSTLIN**

Název přípravku	Kmen <i>Bt.</i>	Aktivita	Výrobce	Poznámka
ABLE	<i>kurstaki</i>	<i>Lepidoptera</i> <sup>1</sup>	CERTIS, USA	-
AGREE	<i>aizawai</i>	<i>Lepidoptera</i>	CERTIS, USA	-
BIOBIT <sup>2</sup>	HD1- <i>kurstaki</i>	<i>Lepidoptera</i>	ABBOTT Laboratories	Transkonjug.
BACTIMOS	<i>israeliensis</i>	<i>Diptera</i>	ABBOTT Lab.	-
BACTOSPINE	<i>kurstaki</i>	<i>Lepidoptera</i>	ABBOTT Lab.	-
CONDOR	<i>kurstaki</i>	<i>Lepidoptera</i>	ECOGEN Inc.	Transkonjug.
COSTAR	<i>kurstaki</i>	<i>Lepidoptera</i>	CERTIS, USA	-
CRYMAX	<i>kurstaki</i>	<i>Lepidoptera</i>	ECOGEN Inc.	Rekombin. <i>Bt.</i>
CUTLASS	<i>kurstaki</i>	<i>Lepidoptera</i>	ECOGEN Inc.	Transkonjug.
DESIGNE	<i>aizawai</i>	<i>Lepidoptera</i>	CERTIS, USA	Transkonjug.
DIPEL	HD1- <i>kurstaki</i>	<i>Lepidoptera</i>	ABBOTT Lab.	
FOIL	<i>kurstaki</i>	<i>Lep. / Col.</i>	ECOGEN Inc.	Transkonjug.
FORAY	HD1- <i>kurstaki</i>	<i>Lepidoptera</i>	ABBOTT Laboratories	-
FLORBAC	<i>aizawai</i>	<i>Lepidoptera</i>	ABBOTT Laboratories	-
FUTURA	<i>kurstaki</i>	<i>Lepidoptera</i>	ABBOTT Laboratories	-
GNATROL	<i>israeliensis</i>	<i>Diptera</i>	ABBOTT Laboratories	-
JAVELIN	HD1- <i>kurstaki</i>	<i>Lepidoptera</i>	CERTIS, USA	-
LEPINOX	<i>kurstaki</i>	<i>Lepidoptera</i>	ECOGEN Inc.	Rekombin. <i>Bt.</i>
MATTCH	<i>Pseudomonas</i>	<i>Lepidoptera</i>	MYCOGEN Corp.	Enkapsul. <i>Cry</i>
MOLESTAR	<i>kurstaki</i>	<i>Lepidoptera</i>	UNITED AGRI PRODUCTS	-
MTRAK	<i>Pseudomonas</i>	<i>Coleoptera</i>	MYCOGEN Corp.	Enkapsul. <i>Cry</i>
MVP	<i>Pseudomonas</i>	<i>Lepidoptera</i>	MYCOGEN Corp.	Enkapsul. <i>Cry</i>
NOVODOR	<i>tenebrionis</i> <sup>3</sup>	<i>Coleoptera</i>	ABBOTT Laboratories	-
RAVEN	<i>kurstaki</i>	<i>Lep. / Col.</i>	ECOGEN Inc.	Rekombin. <i>Bt.</i>
STEWARD	HD1- <i>kurstaki</i>	<i>Lepidoptera</i>	CERTIS, USA	-
THURICIDE	HD1- <i>kurstaki</i>	<i>Lepidoptera</i>	CERTIS, USA	-
TRIDENT	<i>tenebrionis</i>	<i>Coleoptera</i>	CERTIS, USA	-
VAULT	HD1- <i>kurstaki</i>	<i>Lepidoptera</i>	CERTIS, USA	-
VECTOBAC	<i>israeliensis</i>	<i>Diptera</i>	ABBOTT Laboratories	-
XENTARI	<i>aizawai</i>	<i>Lepidoptera</i>	ABBOTT Laboratories	-

Zvýrazněné řádky – biopreparáty dostupné a registrované v České republice

<sup>1</sup> *Lepidoptera* - larvy motýlů; *Diptera* - larvy dvoukřídlého hmyzu, *Coleoptera* - larvy brouků

<sup>2</sup> Ve vystínovaných řádcích jsou uvedeny přípravky na bázi *Bt.*, které jsou registrovány v České republice (1999)

<sup>3</sup> *tenebrionis* = subspecies *morrisoni*