



URZĄD
PATENTOWY
PRL

Patent dodatkowy
do patentu nr ———

Zgłoszono: 87 03 18 (P. 264694)

Pierwszeństwo: 86 03 21 Stany Zjednoczone
Ameryki

Zgłoszenie ogłoszono: 88 03 31

Opis patentowy opublikowano: 1990 01 31

Int. Cl.⁴ A01N 63/00



Twórcy wynalazku: Corinna Herrnsstadt, George G. Soares

Uprawniony z patentu: Mycogen Corporation,
San Diego (Stany Zjednoczone Ameryki)

Środek owadobójczy

Przedmiotem wynalazku jest środek owadobójczy aktywny wobec *Anthonomus grandis*, *Leptinotarsa decemlineata*, *Hypera postica* i *Diabrotica longicornis*.

Wiadomo, że *Bacillus thuringiensis* (Bt) wytwarza toksynę owadobójczą zwaną δ -endotoksyną. Jest ona syntetyzowana przez przetrwalnikujące komórki Bt. Toksyna, po jej połknięciu w krystalicznej postaci przez wrażliwą na jej działanie larwę owada, ulega przekształceniu przez proteazy soków trawiennych owada w związek biologicznie czynny. Pierwszym celem ataku toksyny są komórki tkanki nabłonkowej jelit owada, które ulegają szybkiemu zniszczeniu.

Opisane spektrum działania Bt obejmuje owady gatunków *Lepidoptera*, z których wiele jest głównymi szkodnikami w rolnictwie i leśnictwie. To spektrum działania obejmuje także owady rzędu *Diptera*, takie jak doskwierze, komary i muchy (patrz: Couch, T.L., (1980/ „Mosquito Pathogenicity of *Bacillus thuringiensis* var. *israeliensis*“, *Developments in Industrial Microbiology* 22: 61-76; Beegle, C.C., /1978/ „Use of Entomogenous Bacteria in Agroecosystems“, *Developments in Industrial Microbiology* 20: 97-104). Krieg i inni., *Z. ang. Ent.* /1983/ 96: 500-508 opisują izolat Bt, nazwany *Bacillus Thuringiensis* var. *tenebrionis*, ponoć aktywny wobec dwóch chrząszczy z rzędu *Coleoptera*, a mianowicie *Leptinotarsa decemlineata* i *Agelastica alni*.

W zgłoszeniu patentowym St. Zjedn. Am. nr seryjny 714 790 ujawniono nowy izolat Bt aktywny wobec *Coleoptera*. Odkryto jednak, że nie wszystkie *Coleoptera* są nań wrażliwe, co potwierdzają dane przedstawione dalej w tabeli 1. W cytowanym zgłoszeniu nie ujawniono jednak działania tego izolatu wobec *Anthonomus grandis*, *Leptinotarsa decemlineata*, *Hypera postica* i *Diabrotica longicornis*.

Anthonomus grandis (kwiecień bawełnowiec) jest jednym z najbardziej rozpowszechnionych szkodników w rolnictwie. Występuje on na wszystkich głównych obszarach uprawy bawełny w Ameryce Centralnej i Południowej i w Stanach Zjednoczonych Ameryki, za wyjątkiem części obszaru Kalifornii. Gdziekolwiek występuje, jest on głównym szkodnikiem bawełny. Uszkodzenia bawełny powodują zarówno dorosłe osobniki, jak i larwy oraz gąsienice. Dorosłe osobniki wgryzają się w łuski i torebki nasienne, bądź nakłuwają je, i za pomocą długich ryjków żywią się

tkanką znajdującą się wewnątrz łusek i torebek nasiennych bawełny, powodując odpadanie łusek lub więdnienie i usychanie roślin. Ten sposób odżywiania się szkodników albo powoduje bezpośrednie zniszczenie kwiatów, albo zmniejszenie zawartości włókien w torebkach nasiennych bawełny. Straty powodowane przez tego szkodnika są ogromne i muszą być ograniczone. W 1982 r. wartość strat bawełny spowodowanych przez tego szkodnika oszacowano na 429 milionów dolarów, a oczekuje się, że będą one coraz większe.

Obecnie do zwalczania *Anthonomus grandis* stosuje się chemiczne środki owadobójcze oraz środki bakteryjne. Stwarza to szereg znanych trudności i nie jest całkiem skuteczne. Istnieje wielkie zapotrzebowanie na środki alternatywne, które mogłyby uzupełnić gamę dotychczas stosowanych środków do zwalczania *Anthonomus grandis* lub zastąpić te z nich, które utraciły skuteczność działania, między innymi z uwagi na uodpornienie się szkodników.

Leptinotarsa decemlineata (stonka ziemniaczana, CPB) jest najważniejszym w skali światowej szkodnikiem ziemniaków, powodującym ich defoliację. Szczególne problemy szkodnik ten stwarza północnej części Stanów Zjednoczonych Ameryki, w Europie i w Związku Radzieckim. W Stanach Zjednoczonych Ameryki jest to główny szkodnik ziemniaków na wszystkich obszarach uprawy ziemniaka, z wyjątkiem Kalifornii. Ten obszar uprawy ziemniaka obejmuje 303000 ha. Stonka ziemniaczana jest także poważnym szkodnikiem upraw oberżyny, pomidora i pieprzu.

Zarówno osobniki dorosłe, jak i larwy stonki żerują na liściach. Na większości obszarów co roku pojawiają się dwie do trzech generacji tego szkodnika. Gdy się go nie zwalcza, powoduje on poważną defoliację uprawy, często zjadając wszystkie nadziemne części roślin-gospodarzy.

Do zwalczania stonki ziemniaczanej stosuje się chemiczne środki owadobójcze, mają one jednak tę wadę, że szkodniki szybko uodporniają się na działanie nowych środków. Zwykle dla zwalczania stonki stosuje się 2-10 zabiegów, w zależności od poziomu odporności owadów na działanie środka, gęstości występowania szkodnika i liczby jego generacji rocznie. Na niektórych obszarach udokumentowano całkowitą odporność stonki na wszystkie dostępne środki owadobójcze, a zwłaszcza na obszarze Long Island. Uniemożliwia to praktycznie uprawę ziemniaka na tym obszarze. Wszystko to wskazuje na pilną potrzebę znalezienia nowych środków do zwalczania stonki ziemniaczanej, zwłaszcza środków o zupełnie innym sposobie działania niż środki dotychczas stosowane.

Hypera postica (ryjkowiec uszkadzający lucernę i koniczynę) i blisko z nim spokrewniony *Hypera brunneipennis* są najważniejszymi owadami-szkodnikami upraw lucerny w Stanach Zjednoczonych Ameryki i w 1984 r. zaatakowały obszar 1,27 milionów hektarów upraw w tym kraju. Na zwalczanie tych szkodników w samych Stanach Zjednoczonych Ameryki wydaje się około 15 milionów dolarów. W południowo-wschodniej części Stanów Zjednoczonych Ameryki przeważa *Hypera brunneipennis*. Gorące miesiące letnie spędza on w stadium spoczynkowym (hibernacji). Pod każdym innym względem jest on identyczny z *Hypera postica*, występującym głównie na pozostałym obszarze Stanów Zjednoczonych Ameryki.

Największe uszkodzenie powodują larwy ryjkowca. Żerujące na szczytach rosnących roślin lucerny, larwy wyjadają tkankę liści między nerwami powodując zahamowanie rozwoju i zmniejszenie wzrastania roślin, co w konsekwencji odbija się na plonach. Poważny atak tych szkodników może zniszczyć cały zbiór siana. Dorosłe osobniki, również żerujące na liściach, powodują dodatkowe, lecz mniejsze, straty.

W skutecznym zwalczaniu ryjkowców *Hypera* główną rolę odgrywają chemiczne środki owadobójcze. Istnieje jednak szereg trudności, związanych z ich stosowaniem. Po pierwsze, szereg bardzo skutecznych środków owadobójczych do zwalczania *Hypera* jest wysoce toksyczny dla ludzi i innych ssaków i ich sprzedaż podlega często wielu ograniczeniom. Toksyczne pozostałości w sianie sprzedawanym na paszę inwentarza żywego stanowi dodatkowe zagrożenie. Drugi problem stanowi toksyczność wobec pszczoł, gdyż pszczoły są wrażliwe na pewne środki owadobójcze stosowane do zwalczania ryjkowców *Hypera*. Ponieważ lucerna jest w Stanach Zjednoczonych Ameryki głównym źródłem nektaru dla prowadzonych na wielką skalę pasiek, stosowanie środków owadobójczych wykazujących toksyczność wobec pszczoł jest niezgodne z potrzebami producentów miodu. Po trzecie owady będące pasożytami i drapieżnikami pomagającymi w zwalczaniu populacji mniejszych szkodników lucerny (mszyce, skoczki, gąsienice) są bardzo wrażliwe

na wszystkie środki owadobójcze obecnie stosowane do zwalczania *Hypera*. Zmniejszenie liczby pożytecznych owadów może spowodować wzrost populacji tych mniejszych szkodników i w konsekwencji konieczność stosowania dodatkowych ilości środków owadobójczych.

Około 3,75 milionów hektarów upraw kukurydzy w Stanach Zjednoczonych Ameryki jest zaatakowana przez gatunki *Diabrotica*, takie jak występująca na północy *Diabrotica longicornis*, występująca na południu *Diabrotica undecimpunctata* i występująca na zachodzie Stanów Zjednoczonych Ameryki *Diabrotica virgifera*. Przebywające w glebie larwy tych gatunków *Diabrotica* żerują na korzeniach kukurydzy, powodując wylęganie roślin kukurydzy. Prowadzi to oczywiście do zmniejszenia plonów lub obumierania roślin. Żerujące na populacji szyjek słupków kolb kukurydzy dorosłe osobniki *Diabrotica* powodują zmniejszenie zapylania, a tym samym zmniejszenie wydajności ziarna kukurydzy na roślinę. Ponadto dorosłe osobniki i larwy *D. undecimpunctata* atakują uprawy roślin dyniowatych (ogórków, dyni, melonów, itp.), wiele warzyw i przemysłowych upraw polowych, jak również ogrody przydomowe.

Zwalczanie *Diabrotica* prowadzono metodami hodowlanymi, takimi jak zmienopolowość i stosowanie dużego nawożenia azotem w celu stymulowania wzrostu systemu korzeniowego roślin przybyszowych, jednak dla uzyskania pożądanego stopnia zwalczania szkodników głównie polega na stosowaniu chemicznych środków owadobójczych. Środki owadobójcze stosuje się na powierzchni gleby lub wprowadza się je do gleby. Główną wadą stosowania tych chemicznych środków owadobójczych jest to, że rozwijają one odporność u traktowanych nimi populacji owadów.

Obecnie nieoczekiwanie stwierdzono, że doskonałe zdolności zwalczające *Anthrenus grandis*, *Leptinotarsa decemlineata*, *Hypera postica* i *Diabrotica longicornis* wykazuje środek owadobójczy według wynalazku. Cechą tego środka jest to, że jako substancję czynną zawiera szczep *Bacillus thuringiensis* san diego NRRL B-15939 lub jego toksyczne spory i/lub kryształ.

Substancja czynna środka według wynalazku działa jako trucizna żołądkowa, a nie jako substancja porażająca układ nerwowy.

Izolat *Bacillus thuringiensis* stanowiący substancję czynną środka według wynalazku, orkeśniany jako B.t.sd., ma unikalną parasporalną postać (kryształ), która pod mikroskopem z kontrastem fazowym ma ciemną barwę i płaską, kwadratową konfigurację.

Próbkę szczepu *B. thuringiensis* san diego zdeponowano w stałej kolekcji Northern Regional Research Laboratory, U. S. Departament of Agriculture, Peoria, Illinois, Stany Zjednoczone Ameryki 27 lutego 1985 r., gdzie jest ona dostępna pod nr NRRL B-15939. Zdeponowany szczep będzie publicznie dostępny po udzieleniu patentu, w którego opisie został ujawniony. Jest on również dostępny w przypadku, gdy żąda tego prawo patentowe kraju, w którym złożono odpowiednie zgłoszenia patentowe. Nie należy jednak rozumieć, że dostępność zdeponowanego szczepu stanowi licencję na praktyczne wykorzystanie niniejszego wynalazku bez naruszenia praw patentowych.

Hodowlę szczepu *B. thuringiensis* san diego, NRRL B-15939 można prowadzić, stosując znane pożywki i sposoby fermentacji. Po zakończeniu cyklu fermentacji bakterie można zbierać, oddzielając najpierw w znany sposób od brzezki fermentacyjnej spory i kryształ Bt. Z odzyskanych sporów i kryształów Bt można sporządzać zwilżalne proszki, ciekłe koncentraty, granulaty lub inne preparaty, dodając znane adjuwanty, takie jak środki powierzchniowo czynne, środki dyspergujące, obojętne nośniki i inne składniki ułatwiające operowanie środkiem i jego stosowanie wobec zwalczanych szkodników. Sposoby sporządzania takich preparatów i ich stosowania są znane w technice i używane w przypadku szczepu *B. thuringiensis* (HD-1), aktywnego wobec *Lepidoptera*, np. ich gąsienice.

Preparaty środka według wynalazku można rozpylać lub stosować nalistnie w celu zwalczania roślinożernych chrząszczy, lub też sporządzać nęcące granulaty, zawierające środek nęcący oraz spory i kryształ B. t. sd. i stosować je do gleby. Preparaty środka według wynalazku zawierające B. t. sd. można także stosować do zaprawiania nasion lub do traktowania nimi korzeni bądź całych roślin w późniejszych etapach rozwoju uprawy.

Ponieważ kwiecień bawełnowiec i stonka ziemniaczana nie występują w Kalifornii, próby biologiczne prowadzono na chrząszczach *Pyrrhalta luteola* z rodziny stonkowatych. Dorosłe

osobniki i larwy tego gatunku kontaktowano z liśćmi rośliny-gospodarza potraktowanymi preparatami środka według wynalazku zawierającymi spory *B. t. sd*/kryształ w ilości 10^4 równoważników spor na 1 cm^2 powierzchni liścia. Śmiertelność wyniosła ponad 90%. Natomiast traktowanie tych owadów działającym specyficznym na *Lepidoptera* środkiem zawierającym 10^6 równoważników spor szczepu *Bacillus thuringiensis* HD-1 w 1 cm^2 daje śmiertelność poniżej 5%.

B. t. sd. wykazuje znaczną aktywność wobec larw ryjkowca *Hypera brunneipennis* i *Diabrotica undecimpunctata*. Spory i kryształ szczepu *B. thuringiensis* san diego NRRL B-15939 bada się pod kątem działania bójkowego wobec różnych owadów, stosując następujący sposób postępowania.

Próby działania wobec *Diabrotica undecimpunctata* prowadzi się rozpylając preparaty zawierające spory i kryształ lub oczyszczone kryształ, na krążki wycięte z liści odpowiednich roślin-gospodarzy. Próby działania wobec *Aedes aegypti* prowadzi się dodając preparaty zawierające spory i kryształ *B. t. sd.* do wody zawierającej larwy tego owada. Wszystkie inne próby prowadzi się wprowadzając preparaty zawierające spory i/lub kryształ lub oczyszczone kryształ do odpowiedniej standardowej mieszaniny spożywanej przez badane owady.

Próby działania wobec stonki ziemniaczanej i kwieciaka bawełnowca prowadzi się następująco.

A. Sporządza się preparaty zawierające spory i/lub kryształ *B. t. sd.* w różnych stężeniach. W roztworach tych preparatów zanurza się liście ziemniaka, suszy się je w ciągu 1 godziny na powietrzu i zakaża larwami stonki ziemniaczanej po pierwszej wylince. Każdą dawkę bada się na 20 larwach z czterema powtórzeniami. Śmiertelność określa się po 48 godzinach. Wartość LC_{50} określa się za pomocą analizy probitowej. Uzyskuje się w ten sposób wartość LC_{50} wynoszącą $7,6 \cdot 10^6$ spor/ml roztworu. LC_{50} określa stężenie śmiertelne, powodujące śmierć 50% larw.

B. Sporządza się preparaty, zawierające spory i/lub kryształ *B. t. sd.* i wprowadza się je do standardowego pożywienia kwieciaka bawełnowca. Do pożywienia wprowadza się larwy kwieciaka bawełnowca po pierwszej wylince i określa się śmiertelność po 48 godzinach. Każdą dawkę *B. t. sd.* bada się na 20 larwach z czterema powtórzeniami. Wartości LC_{50} określa się metodą analizy probitowej (Finney D. J., 1971, Probit Analysis, 3d ed. Cambridge University Press, Cambridge). Określona w ten sposób wartość LC_{50} wynosi $4,65 \cdot 10^5$ spor/ml pożywienia.

Aktywność *B. t. sd.* wobec ryjkowców *Hypera* bada się następująco. Sporządza się preparaty, zawierające spory i/lub kryształ *B. t. sd.* w różnych stężeniach. W roztworach preparatów zanurza się pędy lucerny i suszy się je w ciągu 15 minut. Każdy pęd umieszcza się następnie w małej fiolce z wodą, wprowadza się na liście larwy ryjkowca i całość umieszcza się w komorze hodowlanej. Każdą dawkę bada się na 20 larwach po pierwszej wylince, z trzema powtórzeniami. Po 96 godzinach najwyższa badana dawka, $7,6 \cdot 10^7$ spor/ml roztworu, powoduje śmierć 80% larw. Rozwój larw ryjkowca, które przeżyły ulega zatrzymaniu i larwy te nie żerują. Niższe stężenia wywołują tylko niewielką śmiertelność, ale powodują znaczne zahamowanie żerowania. Jest prawdopodobne, że te larwy o zahamowanym żerowaniu nie przeżyją w warunkach polowych do stanu dojrzałego.

Aktywność *B. t. sd.* wobec *Diabrotica undecimpunctata* bada się następująco. Sporządza się preparaty zawierające spory i/lub kryształ *B. t. sd.* w różnych stężeniach. Wykiełkowane ziarna kukurydzy zanurza się w roztworach preparatów i suszy na powietrzu w ciągu 15 minut. Każde wykiełkowane ziarno umieszcza się na szalce Petriego, zawierającej wyjałowioną cienką warstwę wilgotnego piasku i na każdym ziarnie umieszcza się 10 larw *Diabrotica* po pierwszej wylince. Każde stężenie bada się na 20 larwach po pierwszej wylince, z trzykrotnym powtórzeniem. Po 96 godzinach 50% larw traktowanych najwyższą dawką ($1 \cdot 10^{10}$ spor/ml roztworu) umiera, a larwy, które przeżyły, nie żerują.

Próby aktywności wobec *Diabrotica undecimpunctata*, *Leptinotarsa decemlineata* i *Pyrrhalta luteola* prowadzi się rozpylając preparaty zawierające spory i/lub kryształ lub oczyszczone kryształ na krążkach z liści odpowiednich roślin-gospodarzy. Próby aktywności wobec *Aedes aegypti* prowadzi się, dodając preparat zawierający spory i/lub kryształ do wody zawierającej larwy. Wszystkie inne próby prowadzi się wprowadzając preparaty zawierające spory i/lub kryształ lub oczyszczone kryształ do odpowiedniej mieszaniny stanowiącej pożywienie badanego owada. Aktywność owadobójką klasyfikuje się od słabej (+) do bardzo silnej (++++) . Wyniki próby przedstawia tabela, w której skrót „L” oznacza larwy, a „A” osobniki dorosłe.

T a b e l a 1
Bacillus thuringiensis san diego

Rząd	Rodzina	Gatunek	Stadium rozwoju owada	Aktywność
Coleoptera	Chrysomelidae	Diabrotica undecimpunctata	A L	— ++
		Haltica tombacina	A, L	+++
		Leptinotarsa decemlineata	L	+++
		Pyrrhalta luteola	A, L	++++
	Curculionidae	Anthonomus grandis	A L	+++ ++++
		Otiorhynchus sulcatus	L	++
		Hypera brunneipennis	L	+++
	Dermestidae	Attagenus megatoma	L	—
	Ptinidae	Gibbium psyllodes	A	—
	Tenebrionidae	Tenebrio molitor	L	++
		Tribolium castaneum	A, L	—
Diptera	Culicidae	Aedes aegypti	L	—
Lepidoptera	Noctuidae	Spodoptera exigua	L	—
		Trichoplusia ni	L	—

Środek według wynalazku i wytwarzanie jego substancji czynnej ilustruje poniższy przykład.

Przykład. Próbkę hodowli szczepu *B. thuringiensis* san diego stosuje się do zaszczepienia pożywki LB o następującym składzie:

Trypton	10 g
Ekstrakt drożdży	5 g
NaCl	5 g
5N NaOH	0,6 ml
Woda	1000 ml

Podobnie jak w standardowych próbach mikrobiologicznych pożywkę tę wyjaławia się przed zaszczepieniem, a szczepienie prowadzi się zachowując warunki aseptyczne.

Dobre wyniki uzyskuje się postępując następująco. Szereg kolb Erlenmeyera o pojemności 150 ml, zawierających jałową pożywkę PWYE (pepton 5,0%; ekstrakt drożdży 0,1%; NaCl 0,5% w 1 litrze wody, pH nastawione na 7,5%) zaszczepia się z prowadzonej na szalce Petriego hodowli *B. thuringiensis* M-7, NRRL B-15939. Kolby inkubuje się w ciągu nocy na wstrząsarce obrotowej (200 obrotów/minutę) w temperaturze 30°C. Z tak otrzymanej hodowli wyjściowej pobiera się 7,5 ml i zaszczepia nimi 300 ml pożywki LB w kolbie o pojemności 2 litrów. Kolby zawierające pożywkę LB inkubuje się w takich samych warunkach jak hodowlę wyjściową, ale zbioru dokonuje się po 4 dniach. Taki sposób postępowania można łatwo przeprowadzić w dużej skali i w dużych fermentatorach.

Spory i kryształy Bt, otrzymane w wyniku opisanej wyżej fermentacji, można wyodrębnić w znany sposób. Często zebraną brzecznię fermentacyjną rozdziela się w znany sposób, np. przez wirowanie.

Z a s t r z e ż e n i e p a t e n t o w e

Środek owadobójczy do zwalczania, zwłaszcza *Athonomus grandis*, *Leptinotarsa decemlineata*, *Hypera postica* i *Diabrotica longicornis*, zawierający substancję czynną oraz nośniki i/lub adjuwanty, **znamienny tym**, że jako substancję czynną zawiera szczep *Bacillus thuringiensis* san diego NRRL B-15939 lub jego toksyczne spory i/lub kryształy.