

**Wpływ metabolitów wytwarzanych przez entomopatogeny grzyb
Conidiobolus coronatus na wybrane procesy fizjologiczne
stawonogów.**

Autoreferat rozprawy doktorskiej

Michalina Kazek

**Praca doktorska wykonana
w Zakładzie Fizjologii
pod kierunkiem
Prof. dr hab. Mieczysławy I. Boguś**

Recenzenci:

Dr hab. Małgorzata Cytryńska, prof. nadzw. UMCS
Zakład Immunologii
Wydział Biologii i Biotechnologii
Uniwersytet Marie Curie-Skłodowskiej
w Lublinie

Prof. dr hab. Grzegorz Rosiński
Zakład Fizjologii i Biologii Rozwoju Zwierząt
Uniwersytet im. Adama Mickiewicza
w Poznaniu

Warszawa 2017

Owady stanowią najliczniejszą i najszerzej rozpowszechnioną grupą zwierząt na świecie. Poza pożytecznymi istnieje szereg owadów uważanych za szkodniki. Obecnie poszukuje się naturalnych oraz bezpiecznych metod ograniczania liczebności szkodników. Grzyby entomopatogenne mają wielki potencjał w biologicznej kontroli populacji owadów szkodliwych oraz są doskonałym źródłem pozyskiwania nowej klasy bioinsektycydów.

Celem pracy było poznanie mechanizmów działania dwóch metabolitów grzyba *Conidiobolus coronatus*: alkoholu benzyłowego oraz dodekanolu, na wybrane procesy fizjologiczne stawonogów.

Materiałem do badań był kosmopolityczny glebowy grzyb *Conidiobolus coronatus*, (Entomophthorales), należący do klasy Zygomycetes o wysokim potencjale owadobójczym i znacznej selektywności w infekowaniu. Do doświadczeń wykorzystano również następujące gatunki stawonogów: *Galleria mellonella* (Lepidoptera), *Caliphora vicina* (Diptera), *Caliphora vomitoria* (Diptera), *Aedes aegypti* (Diptera), *Blatta orientalis* (Blattodea), oraz *Ixodes ricinus* (Ixodida). Badania prowadzono także na linii komórkowej Sf9 oraz hemocytach pochodzących z larw *G. mellonella* oraz *C. vicina*.

W ramach badań przetestowano aktywność owadobójczą 77 związków zidentyfikowanych uprzednio jako metabolity *C. coronatus*. Skuteczność związków została przetestowana na 2 gatunkach much (*C. vicina* oraz *C. vomitoria*) poprzez topikalne nakropienie owadom (larwom oraz imago) 1 μ l etanolu zawierającego 50 μ g lub 100 μ g badanej substancji. Wybór dawki doświadczalnej badanych metabolitów został tak dobrany aby stężenie związków było mniej więcej równe dawkom substancji aktywnych jakie stosowane są w preparatach owadobójczych dostępnych na rynku. Po analizie uzyskanych wyników do dalszych badań wytypowano dwa związki: alkohol benzyłowy oraz dodekanol. Działanie tych związków przetestowano również na innych gatunkach stawonogów. Alkohol benzyłowy okazał się najskuteczniejszy w uśmiercaniu dorosłych osobników *G. mellonella* natomiast dodekanol powodował najwyższą śmiertelność wśród larw komarów *A. aegypti*.

Szczegółowo przeanalizowano działanie alkoholu benzyłowego i dodekanolu na dwa gatunki owadów: *G. mellonella* oraz *C. vicina*. Główny nacisk położono na zbadanie wpływu obu metabolitów na mechanizmy obronne owadów przed patogenami. Przebadano zmiany

w składzie wolnych kwasów tłuszczowych (WKT) obecnych na kutikuli owadów oraz zmiany w morfologii i zachowaniu komórek immunokompetentnych (hemocytów). Sprawdzono także czy efekt wywierany przez badane substancje związany jest z mechanizmem stresu oksydacyjnego oraz jaki szlak programowanej śmierci komórkowej zostaje aktywowany po ich zastosowaniu.

Analiza chromatograficzna lipidów kutikularnych wykazała istotne zmiany ilościowe i jakościowe w profilu WKT u *G. mellonella* i *C. vicina* po kontakcie owadów z grzybem oraz po podaniu owadom alkoholu benzyłowego i dodekanolu. Badania histologiczne larw *G. mellonella* oraz *C. vicina*, nie wykazały występowania apoptozy u owadów potraktowanych badanymi substancjami. Z badań przeprowadzonych na hemocytach larw *G. mellonella* potraktowanych alkoholem benzyłowym lub dodekanolem wynika, że hemocyty kierowane są na szlak nekrozy. W przypadku larw *G. mellonella* zainfekowanych grzybem *C. coronatus* niewielka ilość hemocytów wydaje się być kierowana na szlak apoptozy. Ponadto alkohol benzyłowy oraz dodekanol wykazały negatywny wpływ na wszystkie testowane typy komórek: linię Sf9, hemocyty *G. mellonella* oraz hemocyty *C. vicina*, jednakże sposób działania tych dwóch związków wydaje się być odmienny. Dla linii komórkowej Sf9 został wykonany test WST mierzący żywotność / proliferację komórek. Uzyskane wyniki sugerują, że bardziej toksycznym związkiem, który skuteczniej zabija komórki owadzie jest dodekanol. Ponadto hemolimfa larw *G. mellonella* po podaniu topikalnie testowanych związków lub po kontakcie owadów z grzybem *C. coronatus*, została przetestowana w kierunku procesów związanych ze stresem oksydacyjnym. Doświadczenia te wykazały istotne zmiany w aktywności enzymów peroksydazy glutationowej (GP) i reduktazy glutationowej (GR) oraz zmiany w ilości dialdehydu malonowego (MDA)

Podsumowując, oba badane związki zidentyfikowane jako metabolity entomopatogennego grzyba *C. coronatus*, działają na owady w sposób zróżnicowany, uzależniony od gatunku. Metabolity te wykazują negatywne oddziaływanie na mechanizmy obronne owadów co sugeruje, że mogą odgrywać istotną rolę w procesie uśmiercania owadów zaatakowanych przez *C. coronatus*. Wysoka aktywność owadobójcza obu związków w połączeniu z brakiem szkodliwego oddziaływania na kręgowce (alkohol benzyłowy oraz



dodekanał dopuszczone są do użytku jako dodatki do żywności) daje szansę na stworzenie na ich bazie selektywnie działającego i skutecznego preparatu owadobójczego.