

„Wpływ metabolitów entomopatogenicznego grzyba *Conidiobolus coronatus*: kwasu oktanowego, kwasu 2-oktenowego oraz 2,6-dimetylofenolu na wybrane procesy fizjologiczne *Galleria mellonella* i *Lucilia sericata*”

Autoreferat rozprawy doktorskiej

Agata Kaczmarek

**Praca doktorska wykonana
w Zakładzie Molekularnych Interakcji w Układzie Pasożyt-Żywiciel
pod kierunkiem
Prof. dr hab. Mieczysławy I. Boguś**

Recenzenci:

Dr hab. Agnieszka Zdybicka-Barabas
Zakład Immunologii
Wydział Biologii i Biotechnologii
Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej
w Lublinie

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

Owady są szeroko rozpowszechnione w środowisku. Wywierają zarówno pozytywny, jak i negatywny wpływ na ekosystem i gospodarkę człowieka. Najczęstszą metodę eliminacji owadów szkodliwych są chemiczne środki ochrony roślin. Ich użycie wiąże się z wysoką skutecznością działania, ale nie jest jednak pozbawione wad. Najważniejszą wadą jest ich niska wybiórczość działania. Użycie chemicznych pestycydów negatywnie wpływa na ekosystemy ograniczając bioróżnorodność, jak również zaburza funkcjonowanie poszczególnych gatunków. Dlatego też, jako alternatywę dla konwencjonalnych pestycydów, rozważa się użycie metabolitów entomopatogennych organizmów. Wśród tej grupy występują bakterie, grzyby, nicienie i wirusy. Najbardziej popularne są komercyjne preparaty oparte o metabolity *Bacillus thuringiensis*. W ostatnich latach większą uwagę przywiązuje się do zastosowania grzybów owadobójczych, szczególnie z rodzin Deuteromycetes i Zygomycetes. Komercyjnie wykorzystywane są preparaty zawierające *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, *Verticillium lecanii*, *Paecilomyces fumoroseus*, *Metarhizium flavoviridae* oraz *Nomuraea rileyi*. Mechanizm porażania owadów przez grzyby pasożytnicze jest procesem kilkuetapowym. Pierwszym etapem infekcji jest penetracja strzępek inwazyjnych przez kutikulę. Następnie strzępki przedostają się do jamy ciała i tam rozprzestrzeniają się penetrując narządy wewnętrzne. Inwazji może towarzyszyć uwalnianie metabolitów toksycznych dla owada, co prowadzi do szybkiej śmierci osobnika.

Wcześniejsze badania prowadzone z wykorzystaniem chromatografii gazowej sprzężonej ze spektrometrią mas wykazały obecność 63 związków w filtracie pohodowlanym entomopatogennego grzyba *Conidiobolus coronatus*. Aktywność owadobójcza tych związków została sprawdzona wobec dwóch owadów – *Lucilia sericata* i *Musca domestica*. Na podstawie tych wyników wybrano 3 najbardziej aktywne związki – kwas oktanowy, 2,6-dimetylofenol i kwas 2-oktenowy. W dalszej części niniejszej pracy sprawdzono aktywność owadobójczą wybranych metabolitów wobec 3 gatunków stawonogów – *Aedes aegypti*, *Ixodes ricinus* i *Blatta orientalis*. Badania wykazały najwyższą aktywność owadobójczą 2,6-dimetylofenolu wobec nimf kleszczy *I. ricinus* (80% śmiertelności po 24 godz. od podania) i wobec larw komarów *A. aegypti* (85% śmiertelności po 48 godz. inkubacji).

Oceniono również wpływ kwasu oktanowego, 2,6-dimetylofenolu i kwasu 2-oktenowego na larwy *Galleria mellonella* i *L. sericata*. Związkami toksycznymi dla obu

gatunków były kwas 2-oktenowy i 2,6-dimetlofenol. Podanie owadom kwasu 2-oktenowego skutkowało wysoką śmiertelnością, natomiast 2,6-dimetylofenol zaburzał morfogenezę powodując zmniejszenie ilości osobników przechodzących wylinkę imaginalną.

Dla larw oraz imago *L. sericata* i *G. mellonella* wyznaczono parametr LD50 i LD100 dla badanych związków. Wskaźniki te pozwoliły na określenie toksyczności kwasu oktanowego, 2,6-dimetylofenolu i kwasu 2-oktenowego według skali GHS (Globally Harmonized System, Tabela 15). Toksyczność ostrą wykazano po podaniu 2,6-dimetylofenolu larwom i imago *L. sericata*. Wykazano również toksyczny efekt kwasu oktanowego na larwy tego gatunku.

W ramach prowadzonych badań sprawdzono wpływ kwasu oktanowego, 2,6-dimetylofenolu i kwasu 2-oktenowego na skład ilościowy, jak i jakościowy wolnych kwasów tłuszczowych występujących na powierzchni kutikuli. U badanych owadów zaobserwowano pojawienie się kwasu C5:0 po podaniu kwasu 2-oktenowego w dawce odpowiadającej LD100 zarówno u larw, jak i imago. Wykazano również destrukcyjny wpływ badanych związków na komórki immunokompetentne. Podanie kwasu 2-oktenowego wywołuje proces apoptozy w hemocytach. Z kolei aplikacja 2,6-dimetylofenolu kieruje komórki na szlak nekrozy. Po podaniu nienasyconego kwasu tłuszczowego wykazano wzrost aktywności kaspaz w hemocytach. Widoczny jest również wzrost tlenowych uszkodzeń DNA.

Ostatnim obszarem pracy było sprawdzenie wpływu infekcji grzybowej na występowanie procesu apoptozy w hemocytach *G. mellonella*. W ramach badań stwierdzono, że infekcji *C. coronatus* towarzyszy zarówno występowanie procesu apoptozy, jak i nekrozy. Wykonane badania wykazały aktywację kaspaz podczas procesu zarażania. Wykazano zarówno obecność tych białek w obrazie mikroskopowym, jak również zaobserwowano ich zwiększoną aktywność. Badania poszczególnych klas białek wykazały zwiększoną aktywność kaspazy 8 i 9. Nie zaobserwowano zwiększonej aktywności kaspazy 3. Wzrost aktywności kaspazy 9 wiąże się z zaburzeniem funkcji mitochondrium. W ramach pracy stwierdzono zmniejszony potencjał błonowy tego organellum. Spadek ten jest kluczowy w procesie apoptozy. Badania wykazały, że infekcji towarzyszy translokacja cytochromu c. Białko to jest kluczowe w szlaku wewnętrznym aktywacji apoptozy. Jednym z czynników wpływających niszcząco na komórki jest występowanie stresu oksydacyjnego. Zwiększona ilość



reaktywnych form tlenu powoduje oksydacyjne zmiany w DNA czy lipidach. W ramach wykonanych badań stwierdzono zwiększoną ilość biomarkera oksydacyjnych uszkodzeń kwasu deoksyrybonukleinowego – 8-OHdG. Stanem analogicznym do stresu oksydacyjnego jest stres nitrozolowy. Wzrost stężenia tlenku azotu występuje podczas infekcji. Do uwolnienia NO dochodzi podczas bakteryjnej infekcji móla woskowego. Wyniki przedstawione w tej pracy wykazały wzrost zawartości NO w hemolimfie owadów zainfekowanych grzybem *C. coronatus*.