



Grzyby patogenne jako źródło insektycydów

Mieczysława I. Boguś

Instytut Parazytologii
Polska Akademia Nauk
Warszawa

Pathogenic fungi as a source of insecticides

Summary

The potential of fungal pathogens for the control of insect pests has been recognized since the late 19th century. Lethal infection of insect host involves the following steps: (i) attachment of the pathogen to the host surfaces, (ii) penetration of the host cuticle by infection hyphae or germinating conidia, (iii) invasion of host haemocoel and internal organs by fungal hyphae. Host death results from the cumulative effect of mechanical damage and enzymatic digestion of insect tissues, production of mycotoxins and/or nutrient exhaustion by the parasite.

Penetration of host cuticles is achieved through a combination of enzymatic and mechanical methods. A number of cuticle degrading enzymes, including proteases, lipases and chitinases, are produced during penetration. Since proteins may account for up to 70% of the cuticle, proteases play a major role in the penetration process. The correlation between pathogenicity and enzyme activity remains unclear.

Many entomopathogenic fungi produce toxic metabolites: (1) nonpeptide toxins, (2) linear and cyclic peptide toxins and (3) protein toxins. Some of these compounds have been identified in mycosed insects, but their role in disease development remains unclear. Destruxins, the best known mycotoxins produced by entomopathogenic fungi, inhibit mitochondrial ATPase, secretion of fluid by Malpighian tubules, disturb the function of calcium channels which leads to tetanic paralysis as well as suppress host defense. However, the knowledge of the mechanisms of fungal pathogenesis in insects is still fragmentary.

Adres do korespondencji

Mieczysława I. Boguś,
Instytut Parazytologii,
Polska Akademia Nauk,
ul. Twarda 51/55,
00-818 Warszawa.

biotechnologia

3 (50) 33–46 2000

Key words:

pathogenic fungi, mycotoxins.

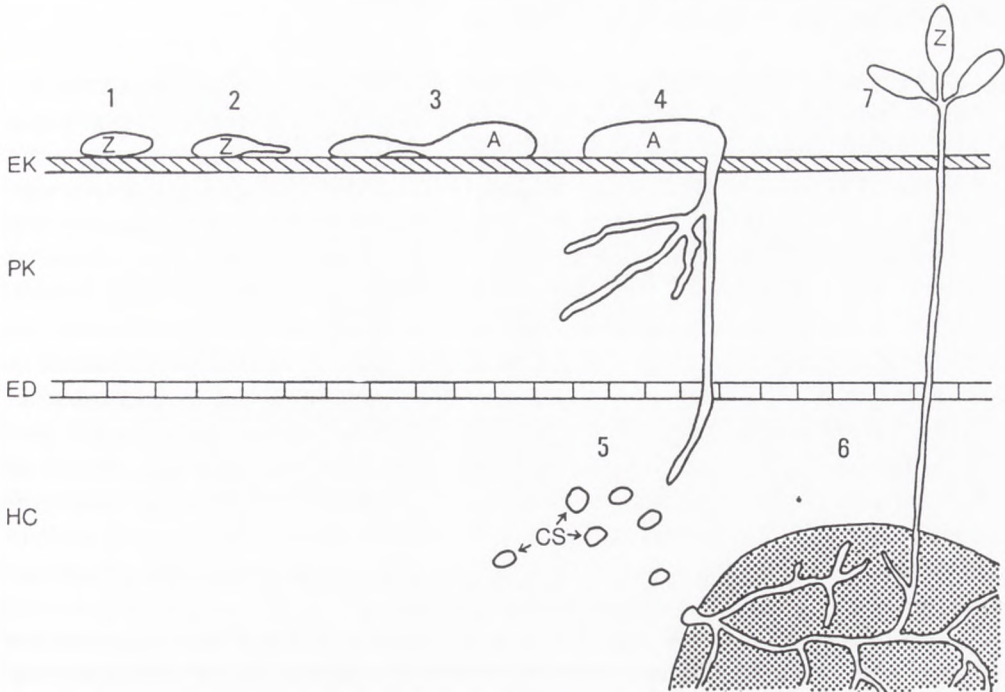
1. Wstęp

Grzyby patogenne są jednym z naturalnych wrogów owadów. Sporadycznie pojawiające się, spektakularne epizootcje owadów wywołane przez patogenne grzyby, już dawno nasunęły myśl o możliwości wykorzystania grzybów do walki z owadami powodującymi straty gospodarcze lub stanowiącymi bezpośrednio bądź pośrednio zagrożenie dla zdrowia ludzi. Ludwik Pasteur dwa lata poświęcił badaniom etiologii „muskardyny”, grzybicy powodowanej przez gatunki *Metarhizium* i *Beveria*, i w 1874 r. zaproponował użycie entomopatogennych mikroorganizmów do walki ze szkodnikami winorośli (1). Pierwsze próby wykorzystania grzybów patogennych do walki ze szkodnikami upraw miały miejsce pod koniec XIX w. na Ukrainie, gdzie powstała fabryka, w której produkowano zarodniki *Metarhizium anisopiae*. Z nieznanych powodów produkcji zaprzestano po kilku latach (1). Dynamiczny rozwój przemysłu chemicznego w XX w., oferującego skuteczne i stosunkowo tanie środki owadobójcze, spowodował długotrwały spadek zainteresowania biologicznymi metodami ograniczania liczebności populacji szkodników. Dopiero narastająca świadomość potencjalnych skutków zmian środowiska naturalnego wywołanych przez nadmierne, wieloletnie stosowanie chemicznych insektycydów, a także rosnąca odporność owadów na klasyczne pestycydy, ponownie zwróciły uwagę na grzyby entomopatogenne. Mimo intensywnie prowadzonych w ostatnich latach badań nad mechanizmem porażania owadów przez grzyby, wiedza na ten temat jest nadal fragmentaryczna.

2. Mechanizm porażania owadów przez grzyby entomopatogenne

Letalne porażenie owada przez grzyb patogenny odbywa się w kilku etapach: a) kontakt owada z inwazyjną formą patogena (zarodniki lub strzępki), b) przerwanie przez kiełkujące zarodniki bądź strzępki inwazyjne powłok ciała (lub w zależności od lokalizacji wrót infekcji: kutikularnej wyściółki jelita, tchawek, czy też układu rozrodczego), c) inwazja i penetracja jamy ciała gospodarza oraz jego narządów wewnętrznych, d) destrukcja ciała gospodarza poprzez uszkodzenia mechaniczne, produkcję i uwalnianie mykotoksyn bądź wyczerpanie rezerw pokarmowych żywiciela. Po śmierci gospodarza na jego ciele często (choć nie zawsze) następuje saprofityczny rozwój grzyba zakończony wytworzeniem wegetatywnych lub generatywnych struktur służących do reprodukcji (rys. 1).

Dla większości grzybów entomopatogennych przerwanie powłok ciała żywiciela jest warunkiem niezbędnym do zaopatrzenia się w źródło pokarmu. Kutikula owada stanowi jednak nie tylko barierę oddzielającą grzyb od bogatej w substancje odżywcze jamy ciała, lecz również sama stanowi źródło substancji pokarmowych gdyż w 70% składa się z białek, a w skład pozostałych 30% wchodzi: chityna, lipidy i kwasy tłuszczowe (2). Chociaż sam przebieg penetracji kutikuli bywa odmienny u przed-



Rys. 1. Schemat przebiegu infekcji grzybowej u owadów:

1) zarodek grzyba patogennego osiada na kutikuli owada, 2) kielkowanie zarodka, 3) wytwarzanie appressorium, 4) przerwanie powłok ciała żywiciela, 5) wytworzenie ciał strzępkowych, 6) zasiedlenie przez grzyb narządów wewnętrznych żywiciela, 7) saprofityczny rozwój grzyba i wytworzenie przez niego zarodków.

Z – zarodek, A – appressorium, CS – ciało strzępkowe, EK – epikutikula, PK – prokutikula, ED – epiderma, HC – hemocel.

stawicieli różnych gatunków grzybów, zawsze biorą w nim udział dwa elementy: oddziaływania mechaniczne struktury inwazyjnej i enzymatyczna degradacja kutikuli.

Inwazję rozpoczyna adhezja strzępki lub zarodka do epikutikuli (zewnętrznej warstwy kutikuli). Adhezja zarodków odbywa się za pośrednictwem śluzu lub niespecyficznych sił hydrofobowych (3,4). Warunkiem niezbędnym do kielkowanie zarodków jest wysoka wilgotność. Inwazja kutikuli gospodarza poprzedzona jest u niektórych gatunków grzybów utworzeniem struktury zwanej appressorium (tzw. przylgi). Appressorium jest strukturą wielokomórkową wytwarzaną przez kielkujący zarodek dającą grzybowi oparcie mechaniczne potrzebne przy przeciskaniu się strzępki inwazyjnej przez warstwy kutikuli (rys. 1).

3. Rola enzymów grzybowych w infekcji

Wrastanie strzępki inwazyjnej w kutikulę związane jest z jej enzymatyczną degradacją. Początkowo enzymy uwalniane są na terenie appressorium. Dominującą rolę spośród enzymów produkowanych przez grzyby entomopatogenne odgrywiają proteazy. Całkowita degradacja białek kutikuli owadziej wymaga synergistycznego działania licznych endo- i egzoproteaz. Dotychczas dokładnie przebadane zostały jedynie proteazy *M. anisopliae* i, w znacznie mniejszym zakresie, *Beaveria bassiana*.

M. anisopliae wytwarza 3 klasy endoproteaz: proteinazę 1 (Pr1) podobną do subtylizyny, metaloproteinazę podobną do termolizyny i trypsynopodobne proteazy serynowe (5). Grzyb ten wytwarza co najmniej dwie subtylizyny oznaczone jako Pr1a (29 kDa) i Pr1b (31,5 kDa). Obie subtylizyny mają podobne właściwości fizykochemiczne i wykazują podobną specyficzność wobec aminokwasów zawierających grupę hydrofobową przy drugim atomie węgla (fenyloalanina, metionina, leucyna). W przeprowadzonej charakterystyce klonu cDNA wykazano, że Pr1a jest syntetyzowana w postaci dużej cząsteczki prekursorowej (40,3 kDa). W wykonanej analizie sekwencji aminokwasów wykazano znaczne podobieństwa z innymi proteazami serynowymi zaliczanymi do subclassy subtylizyn (5).

Pr1 produkowana jest w dużych ilościach podczas formowania appressorium oraz przez strzępki penetracyjne (6). Enzymy Pr1 hydrolizują szeroki zakres substratów takich jak kazeina, elastyna, albumina bydłęca, kolagen, lecz najbardziej wydajnie przebiega hydroliza białek kutikuli owadziej (4,7). Subtylizyny prawdopodobnie odgrywiają podstawową rolę w patogenezie ponieważ specyficzna inhibicja tych enzymów opóźnia pojawienie się symptomów infekcji u zarażonych owadów (7). Obecność Pr1 wykazano w kutikuli owadów zainfekowanych *M. anisopliae* (8).

Metaloproteaza produkowana przez *M. anisopliae* rozszczepia te same wiązania peptydowe co i Pr1. Enzym ten został jednak zaliczony do klasy metaloproteaz ponieważ jego aktywność jest hamowana przez inhibitory specyficzne dla tej grupy proteaz. W dalszych badaniach wykazano, że metaloproteaza *M. anisopliae* występuje w postaci 3 izoenzymów (5,9).

Pr2 jest kwaśną proteazą serynową o podobnej do trypsyny aktywności pierwszorzędowej skierowanej przeciwko argininie i lizynie. Występuje w kilku izoformach. Dwa główne izoenzymy: 30 kDa i 27 kDa wykazują zaledwie 56% homologii co sugeruje, że są produktami różnych genów (5). Obecność Pr2 w kutikuli zainfekowanych owadów została potwierdzona metodami immunohistochemicznymi (4). Pr2 jest jedną z 3 trypsynopodobnych proteaz serynowych zidentyfikowanych w filtratach postinkubacyjnych *M. anisopliae*. Ilość trypsynopodobnych proteaz produkowanych przez ten grzyb, jak się wydaje, może być większa (4). W filtratach postinkubacyjnych stwierdzono ponadto obecność Pr4, trypsynopodobnej proteazy cysteinowej o masie 26,7 kDa (10). Efektywność działania Pr2 i Pr4 jest znacznie niższa niż Pr1. Przypuszcza się, że rola tych dwóch enzymów polega na regulacji Pr1, a nie na degradowaniu kutikuli owadziej (10). W filtratach *M. anisopliae* odkryto również Pr3

(11). Enzym ten nie został jednak dotąd scharakteryzowany i jego rola w procesie infekcji grzybowej nie jest poznana.

Podczas wzrostu *M. anisopliae* na kutikuli owadziej grzyb ten produkuje również egzopeptydazy: aminopeptydazę, dipeptydylopeptydazę i karboksypeptydazę. Aminopeptydaza występuje w formie wielu izoenzymów, ma szerokie spektrum działania chociaż najaktywniej hydrolizuje peptydy po stronie karboksylowej reszt alaniny. Dipetydylopeptydaza posiada masę cząsteczkową 74 kDa i uwalnia końcowe dwupeptydy hydrolizując peptydy po stronie karboksylowej reszt proliny (12). Z kolei karboksypeptydaza o masie cząsteczkowej 30 kDa hydrolizuje peptydy po stronie aminowej reszt aminokwasów aromatycznych lub posiadających duży alifatyczny łańcuch boczny (9).

Przypuszcza się, że o stopniu zjadliwości grzyba w głównej mierze decyduje ilość i rodzaj produkowanych przez ten grzyb proteaz. Przypuszczenie to potwierdza wysoki poziom produkcji proteaz w trakcie infekcji, jak również obniżenie zjadliwości obserwowane u mutantów wykazujących deficyt proteaz (13).

W procesie penetracji kutikuli owadziej przez struktury inwazyjne grzyba istotną rolę odgrywają również enzymy chitynolityczne. Chityna wchodząca w skład kutikuli degradowana jest przez chitynazy, które rozszczepiają łańcuchy tego wielocukru na oligomery. Te zaś są z kolei rozszczepiane przez N-acetyloglukozoaminidazę (NAG-azę) na monomery N-acetyloglukozoaminy. Obecność chitynaz stwierdzono u większości przebadanych grzybów entomopatogennych. Dotychczas jednak scharakteryzowano jedynie dwie chitynazy *M. anisopliae*: 33 kDa endochitynazę i 110 kDa egzochitynazę (14). Z kolei w filtratach postinkubacyjnych kultur *B. bassiana* hodowanych na podłożu zawierającym chitynę jako jedyne źródło węgla i azotu, stwierdzono obecność dwóch NAG-az : NAG-azy 1 o masie 97 kDa i NAG-azy 2 zbudowanej z dwóch podjednostek o masie 64 i 66 kDa (15,16).

Najmniej poznanymi enzymami produkowanymi przez grzyby entomopatogenne są lipazy. Ich rola w procesie inwazji polega na rozpuszczaniu wosków pokrywających kutikulę owadów, a także na hydrolizie lipidów i lipoprotein (17). Niestety nadal brak jest prac dotyczących lipaz izolowanych z grzybów owadobójczych. Wszystkie dotychczas scharakteryzowane lipazy pochodzą z grzybów fitopatogennych należących do przedstawicieli rodzajów *Botrytis*, *Rhizopus*, *Penicillium*, *Rhizomor*, *Aspergillus* i *Geotrichum* (18-20).

4. Rozwój grzyba w ciele żywiciela

Po przerwaniu powłok ciała owada, strzępki inwazyjne dostają się do jamy ciała, gdzie odróżnicowują się i wytwarzają struktury ułatwiające rozprzestrzenianie się w ciele żywiciela. Struktury te w przypadku przedstawicieli *Entomophthorales* przyjmują postać komórek pozbawionych ściany komórkowej i dlatego nazywane są protoplastami. Analogiczne struktury nazywane są ciałami strzępkowymi (*hyphal bodies*)

jeśli, jak to ma miejsce w przypadku *B. bassiana* i *M. anisopliae*, okryte są nie w pełni wykształconą ścianą komórkową. Wówczas gdy zaś przypominają komórki drożdży i są otoczone w pełni ukształtowaną ścianą komórkową, nazywane są blastosporami (6,21). Protoplasty, ciała strzępkowe bądź blastospory docierają wraz z hemolimfą do różnych tkanek i narządów gospodarza. Tam ze struktur służących rozprzestrzenianiu wewnątrz żywiciela wyrastają strzępki grzybni, które następnie zasiedlają narządy wewnętrzne żywiciela. Niektóre grzyby patogenne przerastają narządy gospodarza prowadząc do jego śmierci w wyniku uszkodzeń mechanicznych, a także z powodu wyczerpania rezerw pokarmowych. Inne gatunki grzybów powodują szybką śmierć żywiciela, zanim jeszcze jego narządy wewnętrzne uległy uszkodzeniom. W drugim przypadku śmierć gospodarza powodowana jest przez toksyczne metabolity uwalniane przez patogena. Po śmierci żywiciela jego włókna twardnieją i częstokroć ulegają mumifikacji. W odpowiednich warunkach wilgotności i temperatury, strzępki grzyba wyrastają ponad powierzchnię włókna, a na ich szczycie powstają zarodniki (rys. 1). W ten sposób cykl życiowy grzyba entomopatogenicznego ulega zamknięciu.

5. Toksyny grzybowe

Toksyczne substancje pochodzenia grzybowego są znane już od dawna. Stosunkowo dobrze poznane są jednak wyłącznie mykotoksyny produkowane przez grzyby spotykane w produktach spożywczych i stanowiące z tego powodu istotne zagrożenie dla ludzi i zwierząt hodowlanych (tab. 1). Toksyny te nie mogą być zatem brane pod uwagę jako potencjalne insektycydy, mimo że np. aflatoksyna B1 zabija bardzo efektywnie *Heliothis virescens* (22). Poszukiwania mykotoksyn nadających się do zastosowania jako insektycydy koncentrują się na tych gatunkach grzybów patogennych, które posiadają zdolność do porażania owadów szkodliwych nie stanowiąc jednocześnie zagrożenia dla innych organizmów. Badania prowadzone są głównie na *M. anisopliae*, *B. bassiana*, a w ostatnich latach także na grzybach z rodzaju *Tylopocladium*, *Hirsutella*, oraz na niektórych przedstawicielach *Entomophthorales* (23,24).

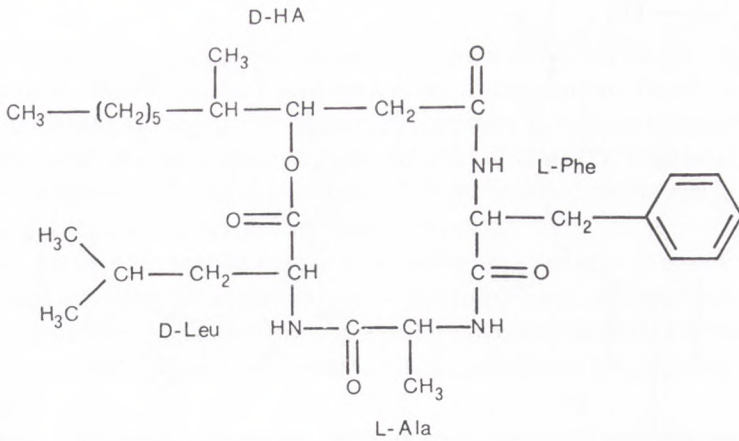
Tabela 1

Zestawienie ważniejszych mykotoksyn produkowanych przez grzyby pleśniowe

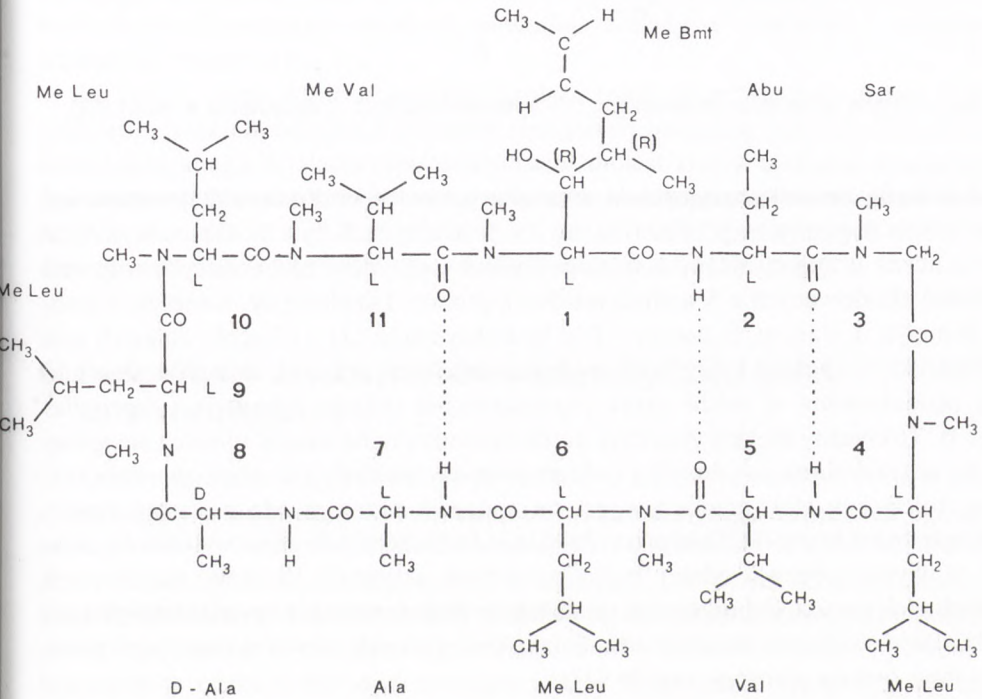
Mykotoksyny 1	Gatunki grzybów produkujących mykotoksyny 2
aflatoksyna B ₁ , B ₂ , G ₁ , G ₂	<i>Aspergillus flavus</i> , <i>A. nomius</i> , <i>A. parasiticus</i>
altenuen (ALT)	<i>Alternaria alternata (tenuis)</i>
alternariol (AOH)	<i>Alternaria alternata (tenuis)</i> , <i>Alt. cucumerina</i> , <i>Alt. dauci</i>
alternariol – eter monometylenowy (AME)	<i>Alternaria alternata (tenuis)</i> , <i>Alt. cucumerina</i> , <i>Alt. dauci</i>
brefeldyna A	<i>Penicillium brefeldianum</i>
citreoviridyna	<i>Penicillium citreoviridae</i> , <i>P. pulvullorum</i> , <i>P. ocrasalmoneum</i> , <i>P. charlesii</i>
citrinina	<i>Aspergillus candidus</i> , <i>A. niveus</i> , <i>A. terreus</i> , <i>Penicillium citreoviride</i> , <i>P. citrinum</i> , <i>P. claviforme</i> , <i>P. expansum</i> , <i>P. fellutanum</i> , <i>P. implicatum</i> , <i>P. jensenii</i> , <i>P. lividum</i> , <i>P. notatum</i> , <i>P. palitans</i> , <i>P. steckii</i> , <i>P. viridicatum</i> , <i>P. verrucosum</i>
8-chlororugulovazyna A	<i>Penicillium islandicum</i>
cyklochlotyna	<i>Penicillium islandicum</i>
destruktyna A	<i>Alternaria brassicae</i> , <i>Metarbizium anisopliae</i>
destruktyna B	<i>Alternaria brassicae</i> , <i>Aspergillus orchaceus</i> , <i>Metarbizium anisopliae</i>
destruktyna B2	<i>Alternaria brassicae</i>
deoksynivalenol (Vomitoxin, DON)	<i>Fusarium culmorum</i> , <i>F. graminearum</i> , <i>F. roseum</i> , <i>F. sambucinum</i> , <i>F. solani var. coeruleum</i> , <i>F. poae</i>
diacetoxyscirpenol (DAS)	<i>Fusarium diversisporum</i> , <i>F. equiset (Giberella intricans)</i> , <i>F. graminearum</i> , <i>F. lateritium</i> , <i>F. sambucinum</i> , <i>F. scirpi</i> , <i>F. semitectum</i> , <i>F. sulphureum</i> , <i>F. tritinctum</i> , <i>F. poae</i>
emodyna	<i>Penicillium islandicum</i>
fumonizyna	<i>Fusarium bygamai</i> , <i>F. moniliforme</i> , <i>F. proliferatum</i>
fusarenon-X	<i>Fusarium equseti</i> , <i>F. culmonarum</i> , <i>F. spirotrichoides</i> , <i>F. graminearum</i> , <i>F. poae</i>
gliotoksyna	<i>Penicillium bilaii</i>
griseofulwina	<i>Penicillium griseofulvum</i>
HT-2 toksyna	<i>Fusarium sporotrichoides</i> , <i>F. culmonarum</i> , <i>F. graminearum</i> , <i>F. poae</i>
kwas cyklopiazonowy	<i>Penicillium cyclopium</i> , <i>P. camemberti</i> , <i>P. commune</i> , <i>P. griseofulvum</i> , <i>Aspergillus flavus</i>
kwas kojcowy	<i>Aspergillus flavus</i>
kwas mykofenolowy	<i>Penicillium brevicompactum</i> , <i>P. requaforti</i>
kwas penicylinowy	<i>Penicillium aurantioviens</i> , <i>P. cyclopium</i> , <i>P. frei</i> , <i>P. viridicatum</i>
kwas tenuazonowy (TA)	<i>Alternaria alternata (tenuis, tenuissima)</i> , <i>Alt. kikuchiana</i> , <i>Alt. longipes</i> , <i>Alt. mali</i> , <i>Aspergillus sp.</i> , <i>Phoma sorghina</i>
luteoskryna	<i>Penicillium islandicum</i>

1	2
moniliformina	<i>Fusarium avenaceum</i> , <i>F. fusariaoides</i> , <i>F. graminearum</i> , <i>F. moniliforme</i> , (<i>Giberella fujikuroi</i>), <i>F. sacchari</i> var. <i>subglutinas</i> (<i>F. moniliforme</i> var. <i>subglutinas</i>)
neosolanol (NEO)	<i>F. spirotrichoides</i> , <i>F. poae</i>
nivalenol (NIV)	<i>Fusarium nivale</i> , <i>F. culmorum</i> , <i>F. poae</i>
ochratoksyna A	<i>Aspergillus alliaceus</i> , <i>A. mellus</i> , <i>A. niger</i> var. <i>niger</i> , <i>A. orbaceus</i> , <i>A. ostianus</i> , <i>A. petrakii</i> , <i>A. sclerotium</i> , <i>A. sulphureus</i> , <i>Eurotium herbariorum</i> , <i>Penicillium verucosum</i> var. <i>cyclopium</i> , <i>P. viridicatum</i>
oosporeina	<i>Penicillium pboenicium</i> , <i>Beaveria bassiana</i>
patulina	<i>Aspergillus clavatus</i> , <i>A. giganteus</i> , <i>A. terreus</i> , <i>Byssochlamys nivea</i> (<i>Paecilomyces varioti</i>), <i>Penicillium chrysogenum</i> , <i>P. claviforme</i> , <i>P. cyaneofulvum</i> , <i>P. cyclopium</i> , <i>P. divergens</i> , <i>P. equinum</i> (terrestre), <i>P. granulatatum</i> , <i>P. griseofulvum</i> , <i>P. lanosum</i> , <i>P. lapidosum</i> , <i>P. leucopus</i> , <i>P. mellinii</i> , <i>P. novae-zeelandiae</i> , <i>P. patulum</i> (<i>urticae</i> , <i>griseofulvum</i>), <i>P. roqueforti</i>
penitrem A (Tremortin A)	<i>Penicillium crustosum</i> , <i>P. melanoconidium</i> , <i>P. commune</i>
PR toksyna	<i>Penicillium roqueforti</i>
roquefortyna C	<i>Penicillium roqueforti</i> , <i>P. chrysogenum</i> , <i>P. crustosum</i> , <i>P. expansum</i> , <i>P. griseofulvin</i> , <i>P. birsutum</i> , <i>P. bordei</i> , <i>P. melanoconidium</i>
rubratoksyna B	<i>Penicillium purpogenum</i> , <i>P. rubrum</i>
kwas sekalonowy D	<i>Aspergillus aculeatus</i> , <i>Penicillium oxalicum</i>
sterigmatocistyna	<i>Aspergillus aurantiobrunneus</i> , <i>A. nidulans</i> , <i>A. quadrilineatus</i> , <i>A. ustus</i> , <i>A. varicolor</i> , <i>A. versicolor</i> , <i>Bipolaris sorokiniana</i>
T-2 toksyna	<i>Fusarium culmorum</i> (<i>roseum</i>), <i>F. graminearum</i> , <i>F. incarnatum</i> , <i>F. poae</i> , <i>F. solani</i> , <i>F. sporotrichoides</i> , <i>F. tricinum</i> , <i>Trichoderma lignorum</i>
trichotecyna	<i>Trichotecium roseum</i>
verruculogen	<i>Penicillium simplicissimum</i>
verruculotoksyna	<i>Penicillium verruculosum</i>
viridicatum toksyna	<i>Penicillium brasilianum</i>
viomelleina	<i>Penicillium freii</i> , <i>P. cyclopium</i> , <i>P. viridicatum</i>
wortmanina	<i>Fusarium oxysporum</i> , <i>F. sambucinum</i> , <i>Myrothecium roridum</i> , <i>Penicillium wortmanni</i>
xanthomegnina	<i>Penicillium freii</i> , <i>P. cyclopium</i> , <i>P. viridicatum</i>
zearaleon (ZEN)	<i>Fusarium avenaceum</i> , <i>F. acuminatum</i> , <i>F. anthobpibulum</i> , <i>F. culmorum</i> , <i>F. equiseti</i> , <i>F. gibbosum</i> , <i>F. lateritium</i> , <i>F. moniliforme</i> , <i>F. nivale</i> , <i>F. oxysporum</i> , <i>F. roseum</i> (<i>F. graminearum</i> , <i>Giberella zeae</i>), <i>F. sambucinum</i> , <i>F. semitectum</i> , <i>F. solanum</i> , <i>F. sporotrichoides</i> , <i>F. tricinum</i>

Na podstawie: (23, 39-43)

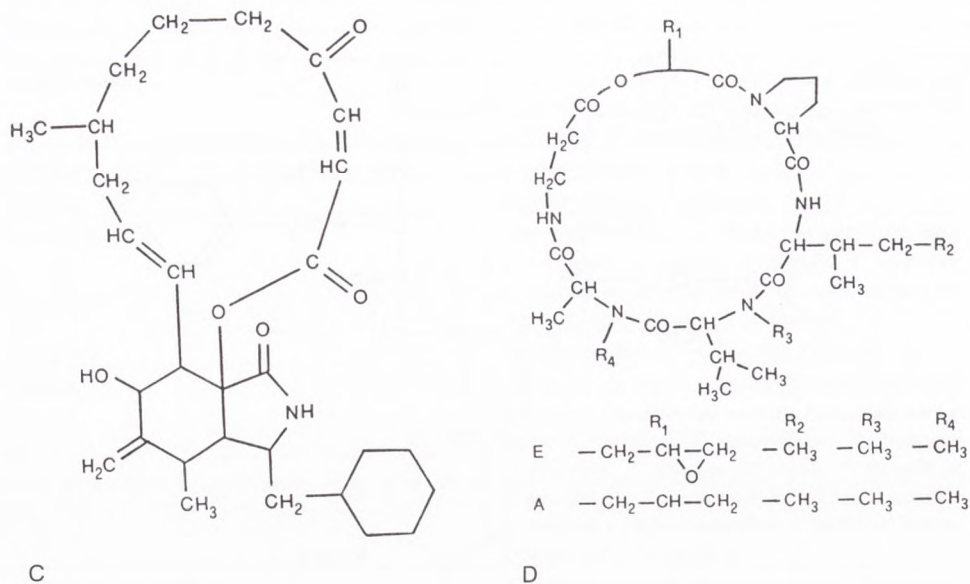


A



B

Rys. 2. Wzory strukturalne mykotoksyn: A – beaverolid L, B – cyklosporyna A.



Rys. 2. Wzory strukturalne mykotoksyn: C – cytochalazyna B, D – destruktyna A oraz E (21).

Z filtratów postinkubacyjnych *M. anisopliae* już w 1962 r. Kodaira (25) wyizolował dwie toksyczne substancje: destruktynę A i destruktynę B (rys. 2). Destruktyny stanowią liczną grupę cyklicznych depsipeptydów (peptydów zawierających wiązania estrowe) zbudowanych z 5 aminokwasów: L-proliny, L-izoleucyny, N-metylo-L-waliny, N-metylo-L-alaniny, β -alaniny i D- α -hydroksykwasu (21). Obecnie znanych jest 19 destruktyn, spośród których 17 produkowanych jest przez *M. anisopliae*. Destruktyny produkowane są także przez przedstawicieli rodzaju *Alternaria* i *Aspergillus* (tab. 1). Toksyczny efekt wywierany przez destruktyny na owady ujawnia się głównie po wstrzyknięciu ich do jamy ciała zwierzęcia. Niekiedy też, choć znacznie rzadziej, toksyczny efekt widoczny jest po spożyciu przez owada pokarmu zawierającego destruktyny (6). Toksyczne działanie destruktyn polega na wywołaniu paraliżu w wyniku bezpośredniej bądź pośredniej aktywacji kanałów wapniowych w mięśniach owada. Zaburzeniom ulega także: funkcjonowanie cewek Malpighiego, wydzielanie ekdyzonu (hormonu linienia) przez gruczoły prorakalne, fagocytoza oraz inne reakcje obronne owada (21).

B. bassiana również produkuje cykliczne depsipeptydy o wspólnej nazwie beaverolidy (rys. 2). Obecnie wiadomo, że w skład beaverolidów wchodzi 15 związków. Nie wywierają one jednak efektu toksycznego po podaniu owadom, silnie natomiast stymulują ich odpowiedź immunologiczną (21).

Z grzybów należących do rodzaju *Tolypocladium* wyizolowano 4 rodzaje związków: tolypinę o nadal nie ustalonej strukturze produkowaną przez *T. cylindrosporium* i *T. inflatum*, tolypocynę – kwas hydroksamowy (26), który choć sam nie wywiera bezpośredniego efektu toksycznego, odgrywa ważną rolę w procesie patogenezy

(23) oraz dwie grupy liniowych, toksycznych peptydów, takich jak leucynostatyny produkowane przez *T. geodes* i *Paecilomyces* oraz efrageptyny. Do efrageptyn należy 6 związków wyizolowanych z *T. niveum*. Efrageptynę D cechuje wysoka skuteczność w zwalczaniu stonki ziemniaczanej metodą opryskową (27). Ponieważ efrageptyny są silnymi inhibitorami mitochondrialnej ATPazy, związki te nie mogą być dopuszczone do stosowania w warunkach polowych (23).

Grzyby entomopatogenne należące do rodzajów: *Beaveria*, *Verticillium* i *Tolypocladium* produkują również cyklosporyny – hydrofobowe, cykliczne undekapeptydy (rys. 2). Najbardziej znana jest cyklosporyna A używana jako lek immunosupresyjny w transplantologii. Związek ten wykazuje silne działanie toksyczne wobec larw komarów (28).

Jednym z licznych związków biologicznie czynnych produkowanych przez *M. anisopliae* są 2 cytochalazyny: B i D. W warunkach laboratoryjnych cytochalazyny hamują powstawanie filamentów aktynowych. Dodanie cytochalazyny B do hodowanych *in vitro* hemocytów owadów powoduje zmiany w morfologii i dystrybucji włókienek aktyny (21).

W 1995 r. doniesiono o pomyślnej izolacji toksycznego białka o masie 15 kDa z filtratów postinkubacyjnych *Hirsutella thompsonii*, patogena roztoczy (29). Mechanizm toksycznego działania hirsutelliny nadal nie jest znany. Białkowe toksyny produkowane są również przez inne grzyby entomopatogenne. Na przykład kultury *B. sulfurescens* zawierają kilka białek o masie ponad 100 kDa toksycznych wobec larw *Galleria mellonella* i nie wykazujących aktywności proteolitycznej (23).

6. Perspektywy użycia grzybów patogennych do walki ze szkodnikami

Grzyby patogenne są już obecnie stosowane w niektórych krajach bądź w postaci znajdujących się w obrocie biopreparatów, bądź w wyniku introdukcji egzotycznych gatunków. Dostępne w handlu biopreparaty produkowane są na bazie *B. bassiana*, *M. anisopliae*, *Verticillium lecanii* i *H. thompsonii*. W byłym ZSSR otrzymywano Boverin skuteczny w zwalczaniu oprzędzików, stonki ziemniaczanej owocówek. Podobny biopreparat wytwarzany jest w Chinach (30). Również Zakłady POLFA w Pabianicach w czasach PRL opatentowały własny biopreparat stworzony na bazie *B. bassiana* (31). W Danii i Wielkiej Brytanii produkowane są na bazie *V. lecanii* 2 preparaty do zwalczania mszyc i mączlika szklarniowego: Vertalec i Mycotal. W Brazylii z *M. anisopliae* wytwarzane są preparaty o nazwach handlowych Metaquino i Metabiol zaś w USA dopuszczono do rejestracji Mycar zawierający *H. thompsonii* skuteczny w zwalczaniu szpecieli (30,32).

Na podstawie doświadczeń zgromadzonych w wyniku stosowania grzybów patogennych w różnych krajach widać, że najwyższą skuteczność wykazują *B. bassiana* i *M. anisopliae*. W Polsce uzyskano dobre wyniki w zwalczaniu za pomocą *B. bassiana*

i *Paecilomyces farinosus* płaszczyńca burakowego, chrabąszcza majowego i stonki ziemniaczanej. W Stanach Zjednoczonych, Brazylii i Australii stosowano z powodzeniem *B. bassiana* do walki z mącznikami, przyłżeńcami, czerwcami, mszycami, roztozczami, kwiecakiem bawełnowcem, omacnicą prosowianką, pędrakami i zmienikiem ziemniaczkiem. Skuteczne wobec muchy domowej, szarańczy pustynnej i niektórych gatunków pieników, jak się okazało, jest *M. anisopliae* (30). Lista gatunków szkodliwych stawonogów ulegających infekcjom powodowanym przez grzyby z rodzaju *Beaveria* bądź *Metarhizium* z każdym rokiem ulega wydłużeniu. Do listy tej zostały ostatnio dopisane kleszcze i mucha tse-tse (33). Również i inne grzyby patogene są stosowane do zwalczania szkodników. *Aschersonia aleyrodis* na początku XX wieku używana była do ograniczania liczebności białych muszek. W ostatnich latach z powodzeniem stosowano ją w Holandii do ochrony upraw szklarniowych (32).

Klasyczna strategia biologicznej kontroli szkodników za pomocą grzybów entomopatogennych polega na wprowadzeniu nowego, egzotycznego gatunku grzyba (bądź odmiany o podwyższonej wirulencji), dotychczas nie spotykanego na danym obszarze geograficznym. Udana introdukcja grzybów entomopatogennych na nowych terenach dotyczy przedstawicieli *Entomophthorales*: *Entomophthora praxibuli* oraz *Zoophthora radicans*, która została sprowadzona z Izraela do Australii w celu zwalczania mszycy żerującej na lucernie. Nie wszystkie udane introdukcje były zamierzone. Grzyb *Entomophaga mamaiga*, „zawleczony” z Japonii do Stanów Zjednoczonych przed ponad osiemdziesięciu laty, jak się okazało, był skuteczny w ograniczaniu liczebności populacji brudnicy nieparki, groźnego szkodnika lasów (32,34). Wielu badaczy intensywnie poszukuje nowych gatunków grzybów entomopatogennych co owocuje znaczną liczbą doniesień w literaturze fachowej.

Należy się jednak zastanowić, czy wprowadzanie nowych, egzotycznych gatunków grzybów patogennych jest strategią całkowicie bezpieczną. Czy stan obecnej wiedzy pozwala na wykluczenie niebezpieczeństwa zaburzenia równowagi biologicznej istniejącej w danym ekosystemie, do którego zamierzamy wprowadzić obcy gatunek grzyba patogennego? Spektakularna niekiedy skuteczność w zwalczaniu szkodników nie może zwalniać od obowiązku bardzo dokładnego przebadania każdego grzyba patogennego. Również stosowanie biopreparatów zawierających żywe zarodniki bądź fragmenty grzybni nie jest całkowicie bezpieczne. Biopreparaty dostępne na rynku w postaci proszków, zawiesin wodnych lub emulsji wodno-olejowych zawierają żywe i zdolne do inwazji komórki grzybów *B. bassiana*, *M. anisopliae*, *Verticillium lecanii* i *H. thompsonii*. Nie wolno zapominać, że są to grzyby wysoce patogene, o bardzo szerokim spektrum działania i o niskiej specyficzności wobec żywicieli. Powszechne przekonanie, utrzymujące się przez wiele dziesięcioleci, że grzyby te zdolne są wyłącznie do porażania stawonogów nie znajduje potwierdzenia w faktach. Doniesienie o infekcji płuc żółwi wywołanych przez *B. bassiana* pochodzi z 1955 r. (35). W czasopismach medycznych pojawiają się w ostatnich latach opisy nietypowych i fatalnych w skutkach infekcji wywoływanych u ludzi z obniżoną spraw-

nością układu immunologicznego (chorzy na AIDS, narkomani, pacjenci otrzymujący leki immunosupresyjne) przez przedstawicieli *Entomophthorales* uważanych dotąd za grzyby o bardzo wysokiej wybiórczości w stosunku do żywicieli (36,37). Również *M. anisopliae* może powodować poważne mykozy u ludzi : w 1997 r. grzyb ten został wyizolowany z zainfekowanego oka (38).

Przy opracowywaniu nowej generacji bezpiecznych i skutecznych insektycydów pochodzenia grzybowego, należy zrezygnować z produkcji biopreparatów zawierających żywe komórki grzybów patogennych na rzecz izolacji toksycznych metabolitów. Metabolity te muszą być poddane bardzo szczegółowym badaniom toksykologicznym w celu wyselekcjonowania związków o wysokiej skuteczności w zwalczaniu szkodników przy jednoczesnym braku negatywnych oddziaływań na inne organizmy.

Literatura

1. Ferron P., (1985), *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology*, Eds. L. I. Gilbert, G. Kerkut., Pergamon Press, Oxford, vol. 9, 313-346.
2. Samuels R. I., Paterson I. C., (1995), *Comp. Biochem. Physiol.*, 110B, 661-669.
3. Charnley A. K., (1994), VIth International Colloquium on Invertebrate Pathology and Microbial Control, Montpellier, vol. 1, 292-297.
4. Charnley A.K. (1994) VIth International Colloquium on Invertebrate Pathology and Microbial Control, Montpellier, vol. 1, 31-37.
5. S. Leger R. J., (1995), *Can. J. Botany*, 73(Suppl.1), 1119-1125.
6. Clarkson J. M., Charnley A. K., (1996), *Trends in Microbiology*, 4(5), 197-203.
7. S. Leger R. J., Durrans P. K., Cooper R. M., Charnley A. K., (1988), *J. Invertebr. Pathol.*, 52, 285-294.
8. Goettel M. S., S. Leger R. J., Rizzo N. W., Staples R. C., Roberts D. W., (1989), *J. Gen. Microbiol.*, 135, 2233-2239.
9. S. Leger R. J., Bidochka M. J., Charnley A. K., (1994), *Arch. Biochem. Biophys.*, 313, 1-7.
10. Cole C. J., Charnley A. K., Cooper R. M., (1993), *FEMS Microbiol. Lett.*, 113, 189-196.
11. S. Leger R. J., Cooper R. M., Charnley A. K., (1987), *Arch. Biochem. Biophys.*, 258, 121-131.
12. S. Leger R. J., Cooper R. M., Charnley A. K., (1993), *J. Gen. Microbiol.*, 139, 237-243.
13. Bidochka M. J., Khachatourians G. G., (1990), *J. Invertebr. Pathol.*, 56, 362-370.
14. S. Leger R. J., Cooper R. M., Charnley A. K., (1991), *J. Invertebrate Pathol.*, 58, 415-426.
15. Bidochka M. J., Khachatourians G. G., (1992), *Can. J. Microbiol.*, 39, 6-12.
16. Bidochka M. J., Tong K. I., Khachatourians G. G., (1992), *Can. J. Microbiol.*, 39, 40-45.
17. S. Leger R. J., Charnley A. K., Cooper R. M., (1986), *J. Invertebrate Pathol.*, 48, 85-95.
18. Kawasaki L., Farres A., Aguirre J., (1995), *Experimental Mycology*, 19, 81-85.
19. Baillargeon M. W., McCarthy S. G., (1992), *Lipids*, 26(10), 831-836.
20. Commenil P., Belinheri L., Sancholle M., Dehorter B., (1995), *Lipids*, 30(4), 351-356.
21. Vilcinskas A., Götz P., (1999), *Advances in Parasitology*, vol. 43, 267-313.
22. Gadauskas R. T., Davis N. D., Diener U. L., (1967), *J. Invertebrate Pathol.*, 9, 132-133.
23. Khachatourians G. G., (1996), *The Mycota VI: Human and Animal Relationships*, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, 331-362.
24. Urbańczyk M. J., Zabża A., Bałazy S., Peczyńska-Czoch W., (1992), *J. Invertebr. Pathol.*, 59, 250-257.
25. Kodaira Y., (1962), *Agric. Biol. Chem.*, 26, 36-42.
26. Jegorov A., Matha V., Husak M., Kratochvil B., Stuchlik J., Sedmera P., Havlicek V., (1993), *J. Chem. Soc. Dalton Trans.*, 1, 1287-1293.
27. Krasnoff S. B., Gupta S. B., S. Leger R. J., Renwick J. A. A., Roberts D. W., (1991), *J. Invertebr. Pathol.*, 58, 180-188.

28. Weiser J., Matha V., (1988), *J. Invertebrate Pathol.*, 51, 92-93.
29. Mazet I., Vey A., (1995), *Microbiology*, 141, 1343-1348.
30. Boczek J., (1992), *Niechemiczne metody zwalczania szkodników roślin*, SGGW, Warszawa.
31. Bajan C., Kmitowa K., Mierzejewska E., (1994), VIth International Colloquium on Invertebrate Pathology and Microbial Control, Montpellier, vol. 1, 300-301.
32. Gillespie A. T., (1988), *Fungi in Biological Control System*, Manchester University Press, Manchester, New York, 37-61.
33. Kaaya G. P., Mwangi E. N., Ouna E. A., (1996), *J. Invert. Pathol.*, 67, 15-20.
34. Zimmermann G., (1994), VIth International Colloquium on Invertebrate Pathology and Microbial Control, Montpellier, vol. 1, 67-73.
35. Gonzales-Cabo J. F., Espejo-Serrano J., Barcena-Asensio M. C., (1955), *Mycoses*, 38, 167-169.
36. Jaffey P. B., Haque A. K., El-Zaatari M., Pasarell L., McGinnis M. R., (1990), *Arch. Pathol. Lab. Med.*, 114, 1276-1278.
37. Walker S. D., Clark R. V., King C. T., Humphries J. E., Lytle L. S., Butkus D. E., (1992), *Am. J. Clin. Pathol.*, 98, 559-564.
38. de Garcia M. C., Arboleda M. L., Barraquer F., Grose E., (1997), *J. Med. Vet. Mycol.*, 35(5), 361-363.
39. Reiss J., (1998), *Schimmelpilze. Lebensweise, Nutzen, Schaden, Bekämpfung*, Springer Verlag, Berlin.
40. Smith J. E., (1997), *Aflatoxins*, in: *Handbook of Plant and Fungal Toxicants*, Ed. D'Mello J. P. F., CRC Press Boca Raton, New York, 269-285.
41. Abramson D., (1997), *Toxicants of the genus Penicillium*, in: *Handbook of Plant and Fungal Toxicants*, Ed. D'Mello J. P. F., CRC Press Boca Raton, New York, 303-317.
42. Panigrahi S., (1997), *Alternaria toxins*, in: *Handbook of Plant and Fungal Toxicants*, Ed. D'Mello J. P. F., CRC Press Boca Raton, New York, 319-337.
43. D'Mello J. P. F., Porter A. M. C., Placinta C. M., (1997), *Fusarium mycotoxins*, in: *Handbook of Plant and Fungal Toxicants*, Ed. D'Mello J. P. F., CRC Press Boca Raton, New York, 287-301.