

Nicienie entomopatogeniczne stosowane do ochrony upraw



Paulina Kramarz

Termin „biologiczna kontrola” opisuje sytuację, kiedy do obniżenia liczebności szkodników używa się ich naturalnych wrogów, na przykład drapieżników, pasożytów, parazytoidów czy też patogenów (wirusów bądź bakterii).

W ostatnich latach coraz częściej do ochrony upraw (czyli do biologicznej kontroli ich szkodników) stosuje się nicienie atakujące owady, czyli tak zwane nicienie entomopatogeniczne (EPN). Przy czym do najpowszechniej używanych należą przedstawiciele dwóch rodzin z rzędu *Rhabditida* (nadrodzina *Rhabditoidea*): *Steinernematidae* Chitwood i Chitwood 1937 oraz *Heterorhabditidae* Poinar 1976. Nicienie te są obligatoryjnymi i letalnymi parazytoidami owadów, a naturalnym środowiskiem życia prawie wszystkich gatunków jest gleba. Dlatego też żerują one z reguły na larwach (np. gąsienicach motyli czy też larwach ryjkowców) lub na postaciach dorosłych owadów zamieszkujących to środowisko.

W swoim artykule chciałam przybliżyć czytelnikom ciekawą biologię tych dwóch rodzin nicieni, w której na szczególną uwagę zasługuje ich symbiotyczny związek z saprofitycznymi bakteriami.

OGÓLNA BIOLOGIA

Prawie cały cykl życiowy nicieni entomopatogenicznych przebiega w ciele owada. Po infekcji uwalniają one symbiotyczne bakterie, które zabijają gospodarza, namnażają się, rozkładając i żywiąc się jego tkankami, które wraz z samymi bakteriami stanowią pożywkę dla nicieni. Jedyną wolno żyjącą formą EPN jest ich trzecie stadium, opisywane jako larwa typu dauer (DL), a u tych grup nazywane też stadium infekcyjnym. Larwy dauer nie pobierają pokarmu, ich rozwój jest zahamowany, obserwuje się zmniejszony poziom metabolizmu, a w jelitach pojawiają się granule, prawdopodobnie zawierające rezerwy pokarmu. W tkankach DL stwierdzono również podwyższony poziom białek opiekuńczych (HSP), pełniących funkcje obronne i naprawcze w komórkach, a także podwyższoną aktywność dysmutazy ponadtlenkowej, co czyni je mniej podatnymi na stres oksydacyjny. Forma dauer może przetrwać bez pokarmu do kilku miesięcy i w tym stadium nicienie są rozpylane w celu zwalczania niepożądanych owadów.

POSZUKIWANIE GOSPODARZA

W trakcie poszukiwania gospodarza nicienie kierują się zmysłem chemicznym, reagując na różnego rodzaju wydzieliny owadów, takie jak ich odchody, bakterie symbiotyczne, zawartość jelita, gradient chemiczny wytworzony przez obecność owada, a także stężenie CO₂ i temperatura. U EPN wyróżnia się dwie główne strategie poszukiwania gospodarza:

■ „Siedź i czekaj” (np. *Steinernema carpocapsae*, *Steinernema scapterisci*): nicienie wykazujące ten typ strategii są mało ruchliwe, ale jednocześnie potrafią, stojąc na ogonie, wyciągnąć prawie całe (95%) swoje ciało. Taka pozycja umożliwia im przyczepienie się do przechodzącego potencjalnego gospodarza. Ciekawym rodzajem zachowania związanym z tą strategią jest tak zwane „falowanie ciałem”, to jest machanie ciałem w momencie jego maksymalnego wyciągnięcia. Gatunki te wykazują też zdolność do skakania.

Jednocześnie nicienie z tej grupy słabo reagują na wydzielane przez gospodarza substancje chemiczne, a nawet na jego obecność, dopóki owad nie znajdzie się w ich bezpośrednim sąsiedztwie. Ponieważ nie we wszystkich miejscach profilu glebowego mają one możliwość wyciągania ciała, dlatego też najczęściej spotyka się je do głębokości 1 cm, gdzie gleba ma najmniej zbitą strukturę. Powoduje to silną rytmikę dobową ich aktywności, gdyż na przykład w czasie wysokiej temperatury zewnętrznej schodzą niżej, gdzie nie są w stanie polować.

■ „Aktywne poszukiwanie” (np. *Steinernema glaseri*, *Heterorhabditis bacteriophora*): nicienie z tej grupy są ruchliwe, zazwyczaj nie wyciągają swojego ciała, jak również nie przyczepiają się do gospodarza, ale ponieważ są bardzo mobilne, mają znacznie większe spektrum gospodarzy. Gatunki aktywnie poszukujące potrafią „falować ciałem”, ale nie są w stanie stanąć na końcu ogona. W przeciwieństwie do poprzedniej grupy, nicienie te można znaleźć w całym profilu glebowym i dlatego też wykazują one słabą rytmikę dobową.

Różne strategie poszukiwania implikują różny dobór gospodarzy pod względem ich biologii. I tak, „siedzące i czekające” nicienie za gospodarzy mają głównie owady mobilne, żyjące w górnej warstwie gleby. Dlatego też na przykład *Steinernema carpocapsae* ma stosunkowo równomierne rozmieszczenie horyzontalne, w ślad za podobnym rozmieszczeniem gospodarzy. Natomiast aktywnie poszukujące nicienie są najbardziej skuteczne w stosunku do owadów

gospodarzy, żerujących w okolicach lub na samym korzeniu i innych podziemnych częściach roślin. W związku z tym rozmieszczenie na przykład *Heterorhabditis bacteriophora* jest wysoce niejednorodne.

Wśród EPN występują również gatunki z pośrednią strategią poszukiwania gospodarza, jak choćby *Steinernema feltiae*, zdolny zarówno do znalezienia mobilnych, jak i osiadłych gospodarzy. Sam sposób poszukiwania gospodarza powinien mieć kluczowe znaczenie w momencie, gdy dobiera się go jako środek biologicznej kontroli przeciwko jakiemuś gatunkowi owada.

CO PÓŹNIEJ?

Do organizmu gospodarza DL dostają się przede wszystkim przez jego naturalne otwory w ciele: otwór gębowy, odbyty, przetchlinki. Nicienie z grupy *Heterorhabditidae* dodatkowo wykorzystują ząb dorsalny do przerwania błon międzysegmentalnych i w ten sposób również infekują owady. Po przedostaniu się do jelita, uszkadzając je mechanicznie oraz za pomocą enzymów proteolitycznych, nicienie niszczy tkanki jelita środkowego, by dotrzeć do hemocelu. Tam uwalniają ze swoich jelit bakterie symbiotyczne, które wydzielając toksyny, lipopolisacharydy oraz egzoenzymy (proteazy, lipazy, lecytynazę), zabijają gospodarza. Jego hemolimfa i rozłożone tkanki wraz z samymi bakteriami stanowią bogate źródło pokarmu dla rozmnażających się w szybkim tempie nicieni. Owad ginie w ciągu 24–48 godzin.

W ciele gospodarza DL lineją do czwartego stadium i osiągają dojrzałość płciową w ciągu dwóch (*Steinernematidae*) lub trzech dni (*Heterorhabditidae*). W tym czasie nicienie przechodzą trzy pokolenia, wśród których produkowane są również larwy typu dauer, gromadzące się w ciele gospodarza aż do momentu jego całkowitego zjedzenia (kilkanaście dni), kiedy to uwalniane są do zewnętrznego środowiska. Przypuszcza się, że niekorzystne warunki środowiskowe, w tym również zima, nicienie z obydwu grup przeżywają w ciałach swoich gospodarzy.

We wszystkich pokoleniach *Steinernematidae* występują obie płcie, a jaja produkowane przez trzecie pokolenie rozwijają się na drodze tak zwanej *endotokia matricida*. Proces ten polega na rozwoju jaj wewnątrz jajników matki, przy czym pierwsze stadia larwalne żywią się ciałem matki, co prowadzi do jej śmierci. Larwy tej grupy nie przechodzą do stadium DL, dopóki nie wydostaną się z ciała matki.

Natomiast u *Heterorhabditidae* pierwsze pokolenie jest hermafrodytyczne i produkuje ono trzy rodzaje osobników: formy heteroseksualne, samozapładniające się (hermafrodytyczne) samice oraz larwy dauer. Zarówno u osobników z pierwszego, jak i drugiego pokolenia część komórek jajowych przechodzi proces *endotokia matricida*, ale w przeciwieństwie do *Steiner-*

nematidae larwy rozwijają się w formę DL dopiero po opuszczeniu ciała matki. W przypadku trzeciego pokolenia (o składzie takim, jak drugie) wszystkie komórki jajowe rozwijają się do drugiego stadium larwalnego w ciele matki (czyli zachodzi proces *endotokia matricida*), które następnie przechodzą w DL.

SYMBIOZA Z BAKTERIAMI

Entomopatogeniczne nicienie z grupy *Rhabditidae* prawdopodobnie ewoluowały z form wolno żyjących. Niektóre inne gatunki z tej grupy żyją w swoistym związku z owadami – jako formy dauer dostają się do wnętrza jego ciała albo poprzez jego naturalne otwory, albo też są przez niego zjadane. We wnętrzu ciała pozostają nieaktywne do momentu śmierci gospodarza i inwazji jego ciała przez saprofityczne bakterie. Wówczas DJ rozpoczynają rozwój i namnażanie się na owych bakteriach. Naukowcy sugerują, że EPN powstały właśnie z takich, tak zwanych nicieni nekromenicznych. Podobna symbioza nie została jak na razie opisana dla innych grup nicieni. Godny podkreślenia jest fakt, że rodziny *Steinernematidae* i *Heterorhabditidae* są stosunkowo słabo spokrewnione, a ich symbiotyczny związek z bakteriami wyewoluował niezależnie, co oznacza, że wszelkie podobieństwa biologii obydwu rodzin wynikają jedynie z konwergencji.

Bakterie będące w symbiozie z nicieniami grupy *Steinernematidae* należą do rodzaju *Xenorhabdus*, w przypadku *Heterorhabditidae* są to wykazujące bioluminescencję bakterie z rodzaju *Photorhabdus*. Oba rodzaje należą do bakterii Gram-ujemnych z grupy *Enterobacteriaceae*. Dany gatunek nicienia jest związany z jednym gatunkiem bakterii, ale dany gatunek bakterii może być związany z więcej niż jednym gatunkiem nicienia.

Bakterie uwolnione przez nicienie zabijają gospodarza albo za pomocą toksyn, albo też powodując stan zapalny (posocznicę), w zależności od wrażliwości gospodarza oraz szczepu bakterii, po czym rozpoczynają fazę szybkiego wzrostu. Niektóre ze szczepów są bardzo zjadliwe – wystarczy 10 komórek wstrzykniętych do hemocelu, by zabić owada (*Galleria mellonella* czy też *Manduca sexta*). Również w sztucznych, płynnych pożywkach oba rodzaje produkują substancje silnie toksyczne dla owadów. Obecnie trwają prace nad wykorzystaniem tych toksyn jako naturalnych insektycydów. Jednocześnie, jak do tej pory nie ma doniesień o znalezieniu wolno żyjących *Xenorhabdus* spp. czy też *Photorhabdus* spp. Zakłada się, że nie mogą one występować bez symbiozy z nicieniami, gdyż wyizolowane są zdolne przeżyć jedynie w wysterylizowanej glebie z dodatkiem substancji odżywczych.

Po przejściu z fazy szybkiego wzrostu w fazę stacjonarną bakterie zaczynają produkować lipazy i proteazy oraz cały szereg antybakteryjnych i grzy-



Fot 1. Potencjalnymi gospodarzami nicieni entomopatenogenicznych mogą być larwy ryjkowców: *Hylobius excavatus* (szeliniak czarny), zdjęcie górne; *Liparus glabrirostris* (rozpucz lepiężnikowiec) zdjęcie środkowe oraz żuków: *Cetonia aurata* (kruszczyca złotawka), zdjęcie dolne (fot. Ryszard Laskowski)

bobóczych substancji. Zwłoki owada, wypełnione bakteriami i nicieniami, zachowują swój kształt i nie rozpadają się zapewne właśnie dzięki owym substancjom. Stwierdzono również, że prawdopodobnie bakterie wydzielają jakiś sygnał powodujący, że zwłoki gospodarza z namnażającymi się nicieniami nie są zjadane przez zwierzęta saprofagiczne, na przykład mrówki.

Choć wirulencja nicieni jest poznana słabiej niż ich bakteryjnych symbiontów, wiadomo, że stadia dauer wydzielają proteazy niszczące antybakteryjną ochronę zainfekowanych larw. Przykładowo, znaczenie kompleksu *Steinernema glaseri*/*Xenorhabdus poinarii* potwierdzono w następujący sposób: infekcja gąsienic *Galleria mellonella* albo *S. glaseri* albo *X. poinarii* nie powodowała śmierci żadnego z gospodarzy, natomiast kompleks: 1 nicien i 115 komórek bakteryjnych prowadził do śmierci około 75% zainfekowanych gąsienic.

OBRONA GOSPODARZA

Owady rozwinęły wiele sposobów, behawioralnych i fizjologicznych, by bronić się przed nicieniami, to jest by zredukować możliwość bycia znalezionym przez nicienie, przyczepienia się nicieni do ich ciała czy też samej infekcji. Jednym ze sposobów są zmiany w zachowaniu. I tak, u niektórych gatunków obserwuje się zwiększoną defekację, by uchronić się przed infekcją poprzez odbyt (larwy żuków, *Scarabaeidae*), obniżone wydzielanie CO₂, o którym wiadomo, że stanowi chemiczny sygnał dla nicieni o obecności gospodarza, izolowanie zabitych przez nicienie osobników, by uniknąć infekcji pozostałych osobników w gnieździe (termity), agresywne iskanie się lub też mechanizmy unikania, aby zredukować infekcje nicieniami (larwy żuków).

Ponieważ jedną z dróg infekcji jest otwór gębowy, może on być chroniony różnymi strukturami, jak filtry (larwy sprzążków, *Elateridae*) lub jest on po prostu za wąski (np. owady ze ssącym typem aparatu gębowego). Natomiast odbyt może być otoczony mięśniami albo innymi strukturami uniemożliwiającymi penetrację przez nicienie, a tchawki są chronione przez błonę (larwy sprzążków), sitowate płytki (larwy żuków) czy też są na tyle wąskie, że nicienie nie są w stanie przez nie wejść (larwy motyli, *Lepidoptera*).

Po infekcji nicienie mogą być zwalczane przez hemocyty zamykające parazytoidy w specjalnych kapsułach, które następnie podlegają procesowi melanizacji. Jednak niektóre gatunki nicieni są pokryte substancjami hamującymi obronę immunologiczną gospodarza, a także niszczącymi hemocyty. Dlatego też mogą one uciekać z takich kapsuł, zachowując pełne zdolności inwazyjne. Natomiast przeciwko bakteriom owady produkują różnego rodzaju substancje antybakteryjne, mogą też być fagocytowane.

BIOGEOGRAFIA I BIORÓŻNORODNOŚĆ

Steinernematidae występują na całym świecie z wyjątkiem Arktyki. W obrębie rodzaju *Steinernema* dwa gatunki, *Steinernema carpocapsae* i *Steinernema feltiae*, występują na całym świecie, natomiast inne gatunki mają bardziej lokalne występowanie, choć wiele nich, początkowo uznawanych za lokalne, znajdowanych jest w coraz to nowych miejscach. Wykazują one większą bioróżnorodność niż rodzina *Heterorhabdidae*.

W przypadku *Heterorhabdidae* najbardziej rozpowszechniony gatunek z tej grupy, *H. bacteriophora*, został stwierdzony w obydwu Amerykach, Europie, Australii i Azji. W przeciwieństwie do niego *H. zelandica* i *H. marelatus* występują jedynie w Nowej Zelandii i w Oregonie (USA) odpowiednio.

PODSUMOWANIE

Zastosowanie EPN do biologicznej ochrony roślin budzi wiele kontrowersji. Z jednej strony, podstawową przeszkodą w ich używaniu jest fakt, że wiele gatunków charakteryzuje szeroki zakres gospodarzy, stanowiąc zagrożenie dla pożytecznych owadów. Jednocześnie do ochrony roślin mogą być wybierane jedynie wąsko wyspecjalizowane gatunki, jak na przykład *S. scapterisci*, pasożytujący wyłącznie na turkuciach z rodzaju *Scapteriscus* spp. Co więcej, nawet nicienie o szerokim zakresie gospodarzy są często rozmieszczone nierównomiernie, a populacje EPN stosunkowo szybko po zastosowaniu osiągają liczebności normalne dla dzikich populacji. Poza tym, wymagania środowiskowe, włączając w to rozmieszczenie gospodarzy, wilgotność, czynniki edaficzne i inne powodują utrzymywanie populacji ENP na niskim poziomie. Dlatego też uboczne wpływy wprowadzenia EPN do środowiska mogą być zaniechwalne.

Należy jednak podkreślić, że wybór ENP jako środka alternatywnego do pestycydów powinien być poprzedzony rzetelnymi badaniami ekologicznymi, obejmującymi ewentualne długotrwałe skutki ich wprowadzenia do środowiska, w tym przede wszystkim gatunków, które nie są rodzime dla miejsca stosowania. Jest to szczególnie ważne w świetle najnowszych badań, wskazujących na zagrożenie wielu środowisk i ekosystemów przez obce, zawleczone gatunki.

Dr Paulina Kramarz

Adiunkt w Zakładzie Ekotoksykologii Instytutu Nauk o Środowisku Uniwersytetu Jagiellońskiego. Zainteresowania badawcze: ekologia, ekotoksykologia bezkręgowców glebowych, biologiczna kontrola, biologia ewolucyjna, wpływ substancji toksycznych (metali ciężkich i pestycydów) na bezkręgowce glebowe.



Fot. 2 Nicienie entomopatenogeniczne mogą być używane do zwalczania szkodnika pasiek, *Galleria mellonella* (mól woskowy), zdjęcie górne: larwa i poczwarka, zdjęcie środkowe: postać dorosła. Na zdjęciu dolnym *Gryllotalpa* sp. (turkuć), szkodnik upraw, którego wszystkie stadia są wrażliwe na nicienie entomopatenogeniczne (fot. Ryszard Laskowski).