

MACIEJ A. PSZCZÓŁKOWSKI

# Fizjologiczne mechanizmy oddziaływania insektycydów z grupy agonistów ekdysteroidów na larwy owadów z rzędu *Lepidoptera*

Physiological Mechanisms Dealing Influence of Insecticide of Agonist Ekdysteroid Group on *Lepidoptera* Larvas

## Wstęp

Jest rzeczą ogólnie znaną, że rozwój szkodliwych owadów leśnych z rzędu *Lepidoptera* (podobnie zresztą, jak i innych owadów) zachodzi dzięki zmianom w stężeniu hormonów w hemolimfie [1]. Z drugiej strony potencjalne zagrożenie dla środowiska naturalnego, w tym — bezpośrednio dla człowieka, jakie związane jest ze stosowaniem wysoce toksycznych pestycydów stanowiło i nadal stanowi bodziec do poszukiwań środków ochrony roślin łagodnych dla środowiska. Dlatego już we wczesnych latach sześćdziesiątych podjęto prace badawcze zmierzające do wykorzystania w tym celu analogów<sup>1</sup> hormonów owadzich. Stosunkowo niedawno, bo na przełomie lat osiemdziesiątych i dziewięćdziesiątych, zwrócono uwagę na możliwość użycia w ochronie roślin agonistów sterydów owadzich [2]. Początkowo podjęto badania nad pochodną hydrazyny o nazwie kodowej RH 5849, następnie zaś wykryto tebufenozyd (RH 5992), znany również pod nazwą Mimic. Jest to uważany za przyjazny dla środowiska pestycyd, oddziałujący przede wszystkim na liściożerne larwy *Lepidoptera*. Ze względu na to, że zastosowanie agonistów ekdysteroidów w ochronie lasu prawdopodobnie będzie zyskiwać na znaczeniu w najbliższych latach — wydaje się celowe przedstawienie mechanizmów działania tych związków na

<sup>1</sup> Zasadniczo należy rozróżniać następujące terminy: 'analog hormonu' — jest to związek chemiczny o aktywności biologicznej podobnej lub takiej samej jak jego fizjologiczny odpowiednik i mający podobną budowę chemiczną cząsteczki oraz 'hormonomimetyk' — związek chemiczny o aktywności biologicznej imitowanego hormonu, ale o innej budowie chemicznej cząsteczki. Jeśli jesteśmy pewni, że stosowany związek chemiczny łączy się w organizmie owada z receptorem dla imitowanego hormonu, to niezależnie od budowy chemicznej tego związku używamy terminu 'agonista' — jeśli połączenie to ma charakter odwracalny lub 'antagonista' — jeśli połączenie to jest nieodwracalne i uniemożliwia prawidłowe funkcjonowanie receptora.

organizm owadów. W wyniku stosowania agonistów ekdysteroidów, zaburzeniu podlegają procesy fizjologiczne związane z żerowaniem i z linieniem larw owadów. W niniejszej pracy zostanie omówiony wpływ tych związków na przebieg żerowania i linienia u owadów. Zrozumienie tych procesów wymaga jednak poznania podstawowych reguł hormonalnej regulacji rozwoju owadów z tego rzędu.

## **Hormony regulujące procesy rozwojowe u larw *Lepidoptera***

Ze względu na chemiczną budowę cząsteczki hormony owadzie można podzielić na trzy grupy [3]. Dwie pierwsze, podobnie, jak ma to miejsce u kręgowców, stanowią sterydy (konkretnie — ekdysteroidy) oraz hormony białkowe (peptydy). Ponadto u owadów występują specyficzne hormony juwenilne, które są pochodnymi terpenów. Ekdysteroidy są produkowane i uwalniane przez gruczoły protorakalne pod wpływem peptydowego hormonu protorakalnego produkowanego przez mózg. Biologicznie aktywnym ekdysteroidem jest u owadów 20-hydroksyekdyzon. Źródłem hormonu juwenilnego są *corpora allata* (ciała przyległe) — niewielkie gruczoły położone w sąsiedztwie mózgu. Hormon juwenilny produkowany jest pod wpływem specyficznego peptydu mózgowego. W hormonalnej regulacji linienia biorą ponadto udział trzy inne peptydy, produkowane i uwalniane przez różne części układu nerwowego. Są to: hormon wylinkowy, CAP (cardioactive peptide) oraz bursykon.

## **Zarys hormonalnej regulacji żerowania u *Lepidoptera***

Rozwój *Lepidoptera* przebiega etapami, które oddzielone są linieniem, czyli zrzuceniem starej kutikuli oraz syntezą nowej. Pomiędzy linieniami larwa żeruje. U *Lepidoptera* hormonalna regulacja żerowania nie jest należycie poznana. Niemniej, u zdecydowanej większości poznanych gatunków obserwuje się dwie fazy żerowania: obligatoryjną i fakultatywną. Pierwsza trwa od kilku do kilkunastu dni po ostatnim linieniu larwalno-larwalnym i jest niezbędna dla późniejszego przepoczwarczenia się larwy. Faza żerowania fakultatywnego następuje po fazie obligatoryjnej i jej rola nie jest w pełni poznana. Uważa się, że przynajmniej u ostatniego stadium larwalnego (wówczas larwa zjada najwięcej pokarmu) zachowanie owada związane jest z działaniem dwóch hormonów: 20-hydroksyekdyzonu i hormonu juwenilnego. Według obecnie panujących poglądów żerowanie w fazie obligatoryjnej stymulowane jest wysokim poziomem hormonu juwenilnego w hemolimfie. Można przedłużyć tę fazę żerowania podając wówczas owadowi analogi hormonów juwenilnych. Pod koniec fazy obligatoryjnej stężenie hormonu juwenilnego spada a podanie analogów hormonów juwenilnych nie stymuluje żerowania. Dlatego sądzi się, że w tym momencie hormon juwenilny nie pełni już roli regulacyjnej w stosunku do większości procesów fizjologicznych związanych z żerowaniem. Poziom 20-hydroksyekdyzonu w fazie obligatoryjnej jest bardzo niski i — jak dotąd — nie postuluje się żadnej roli 20-E w regulacji żerowania w tej fazie.

Drugi okres żerowania — faza fakultatywna — charakteryzuje się brakiem hormonu juwenilnego w hemolimfie. Pod koniec tej fazy natomiast obserwuje się niewielki wzrost stężenia ekdysteroidów, który zbiega się z zaprzestaniem żerowania i podjęciem wielu zachowań związanych z przygotowaniem się owada do przepoczwarczenia. Mogą to być:

oczyszczenie jelita, poszukiwanie miejsca do przepoczwarczenia, budowa kokonu, zagrzebywanie się w podłożu itp. Panuje powszechny pogląd, że właśnie podwyższony poziom ekdysteroidów w tym czasie powoduje przerwanie żerowania fakultatywnego [4].

Rola ekdysteroidów w regulacji wzorców zachowania związanych z przygotowaniem się do przepoczwarczenia nadal nie jest jednoznacznie określona, niemniej jednak wzorce owe nie występują, jeśli wcześniej nie pojawi się 20-hydroksyekdyzon w hemolimfie. Wspomniane podwyższenie stężenia ekdysteroidów w hemolimfie owadów trwa krótko — po kilku godzinach 20-E znika z hemolimfy. Niemniej, skutkiem jego działania jest zmiana programu rozwojowego owada z larwalnego na poczwarkowy. Począwszy od tego momentu rozwój owada jest zdeterminowany w kierunku linienia do stadium poczwarki i nie ma czynników wewnętrznych lub zewnętrznych, które mogłyby tę tendencję odwrócić. Ogólnie rzecz biorąc — podwyższenie poziomu ekdysteroidów w okresie żerowania fakultatywnego jest dla organizmu owada sygnałem do zaprzestania żerowania i przejścia (w ciągu kilku dni) w stadium poczwarki. Hormonalna regulacja żerowania w stadiach larwalnych młodszych niż ostatnie — jest słabo poznana.

### **Zarys hormonalnej regulacji linienia u *Lepidoptera***

W hormonalnej regulacji linienia biorą udział 20-hydroksyekdyzon oraz trzy rodzaje peptydów: hormon wylinkowy, CAP (cardioactive peptide) i bursykon. Pomiedzy momentem, w którym program rozwojowy larwy uległ zmianie a momentem, w którym rozpoczyna się linienie, poziom 20-hydroksyekdyzonu w hemolimfie jest znowu niski. Dopiero na dobę przed linieniem stężenie 20-hydroksyekdyzonu rośnie [5]. Wzrostowi temu towarzyszy również przejawianie się pewnych specyficznych wzorców zachowania poprzedzających linienie, przede wszystkim jednak, stymuluje on syntezę warstwy nowej kutikuli, która zakłada się pod starą. Obie warstwy oddzielone są od siebie przestrzenią wypełnioną płynem wylinkowym. Płyn ten później trawi starą kutikulę, po czym jest wchłaniany wraz z produktami trawienia, które owad wykorzystuje do budowy nowej kutikuli.

Zjawisko oddzielania się dwóch warstw kutikuli nosi nazwę apolizy i manifestuje się odsunięciem kapsułki głowowej przez larwę. Jednak zarówno zakończenie procesów związanych z syntezą nowej kutikuli, tj. wchłonięcie płynu wylinkowego oraz rozpoczęcie utwardzania niektórych części nowego oskórka, jak i samo linienie — to znaczy opuszczenie przez owada starej kutikuli — wymagają spadku stężenia 20-hydroksyekdyzonu w hemolimfie. Spadek ten uruchamia syntezę i uwalnianie peptydowego hormonu wylinkowego z układu nerwowego do hemolimfy. Dopiero ten ostatni czynnik powoduje podjęcie przez owada zachowań związanych z linieniem: specyficznych ruchów mięśni i opuszczenie starej kutikuli. Obecność hormonu wylinkowego w hemolimfie stymuluje także uwolnienie CAP oraz bursykonu, które umożliwiają rozprostowanie nowej, pofałdowanej kutikuli oraz jej późniejsze całkowite utwardzenie i ściemnienie. Reasumując: zainicjowanie linienia i proces syntezy nowej kutikuli u owadów wymaga wzrostu stężenia 20-hydroksyekdyzonu, ale dla zrzucenia starej i prawidłowego utwardzenia nowej kutikuli niezbędny jest spadek stężenia tego hormonu w hemolimfie i pojawienie się odpowiednich hormonów peptydowych.

## **Biologiczne właściwości insektycydów z grupy agonistów ekdysteroidów**

Zarówno RH 5849 jak i tebufenozyd należą do związków oddziałujących przede wszystkim drogą żołądkową, ale działanie kontaktowe także ma miejsce. Niezależnie jednak od drogi, jaką trafiają do organizmu owada — utrzymują się w hemolimfie dość długo. U zbadanych owadów okres 50% zaniku tych związków w hemolimfie oscyluje wokół 5 godzin [6]. Tymczasem dla 20-hydroksyekdyzonu okres ten wynosi kilkanaście - kilkadziesiąt minut [7]. Tak duże różnice spowodowane są faktem, że mimo iż agoniści ekdysteroidów łączą się z receptorami dla tych hormonów, to mają zupełnie inną budowę cząsteczki. Wskutek tego nie są rozpoznawane i rozkładane przez enzymy zawarte w tkankach owadów, odpowiedzialne za szybki rozkład ekdysteroidów podczas rozwoju larwy. Zatem określona dawka RH 5849 lub tebufenozydu, pobrana przez larwę wraz z pokarmem utrzymuje się w organizmie larwy dostatecznie długo, aby wyrzucić efekt fizjologiczny.

Agoniści ekdysteroidów działają na te same tkanki docelowe, co endogenne ekdysteroidy, przede wszystkim na układ nerwowy i kutikulę. Sądzi się, że po połączeniu się z receptorem dla ekdysteroidów, RH 5849 i RH 5992 łączą się z genomem komórki docelowej i — podobnie jak 20-E — uruchamiają ekspresję odpowiednich genów. Stwierdzono również, że w komórkach kutikuli (a także i innych tkanek) u niektórych *Lepidoptera* RH 5849 i RH 5992 oraz ekdysteroidy pobudzają ekspresję tych samych genów [8]. Dlatego uważa się, że RH 5849 i RH 5992 już na poziomie molekularnym działają tak, jak 20-hydroksyekdyzon. Ponieważ zaś receptory ekdysteroidów są różne u różnych rzędów owadów — RH 5849 i RH 5992 cechują się selektywnością działania: pobudzają prawie wyłącznie receptory owadów z rzędu *Lepidoptera* [9].

### **Wpływ insektycydów z grupy agonistów ekdysteroidów na procesy fizjologiczne związane z żerowaniem i linieniem u *Lepidoptera***

W trakcie żerowania larwy omawiane związki zostają pobrane z pokarmem i ulegają wchłonięciu w jelicie owada. Następnie pojawiają się w jego hemolimfie. Od tej chwili działają na tkanki docelowe dla 20-hydroksyekdyzonu. U larw ostatniego stadium larwalnego agoniści ekdysteroidów, imitując działanie 20-E, przerywają żerowanie fakultatywne i powodują przyspieszenie syntezy nowej kutikuli [9]. Wiadomo, że syntetyzowana pod wpływem RH 5849 i RH 5992 swym składem chemicznym przypomina kutikulę normalnie wytwarzaną przez owady, ale ma inną strukturę, przez co zmieniają się jej właściwości mechaniczne [10,11]. W wyniku działania agonistów ekdysteroidów apoliza, a wraz z nią odsunięcie kapsułki głowowej u larwy, zachodzi wcześniej niż zwykle. W tym momencie, podczas normalnego rozwoju larwy, poziom 20-hydroksyekdyzonu opada, co powoduje wchłonięcie płynu wylinkowego i stymuluje układ nerwowy owada do uwolnienia hormonu wylinkowego oraz opuszczenia starej kutikuli [5].

U larwy traktowanej RH 5849 lub RH 5992 stężenie tych związków w hemolimfie utrzymuje się na wysokim poziomie i — imitując podwyższony poziom 20-hydroksyekdyzonu — nie dopuszcza do zakończenia procesów związanych z syntezą nowej kutikuli oraz

do uwolnienia hormonu wylinkowego do hemolimfy [9]. Płyn wylinkowy nie zostaje wchłonięty, jego właściwości enzymatyczne zostają zaburzone i nie dochodzi do strawienia starej kutikuli [11]. Wskutek braku hormonu wylinkowego w hemolimfie nie dochodzi także do pobudzenia odpowiednich mięśni, jak również nie wydziela się CAP i bursykon. W rezultacie nie dochodzi ani do utwardzenia się nowej kutikuli ani do podjęcia przez owada specyficznego zachowania związanego z opuszczaniem starego oskórka. Traktowany owad — chociaż wcześniej rozpoczął syntezę nowego oskórka — zdycha uwięziony w starej kutikuli, której nie zdołał zrzucić.

Mechanizm działania RH 5849 i RH 5992 na młode stadia larwalne jest nadal niejasny, m.in. ze względu na fakt, że niewiele wiadomo na temat hormonalnej regulacji żerowania u larw młodych stadiów larwalnych. Niemniej, po podaniu tych agonistów drogą żołądkową, obserwuje się zmniejszenie intensywności żerowania oraz przedwczesne linienie do następnego stadium. [10]. Zarówno w przypadku larw młodych, jak i larw ostatniego stadium przedwczesne linienie prawie zawsze kończy się śmiercią owada.

### **Perspektywy stosowania insektycydów z grupy agonistów ekdysteroidów w leśnictwie**

Wydaje się, że w najbliższych latach będziemy obserwować coraz większe zainteresowanie pestycydami łagodnymi dla środowiska. Wiązać się to będzie m.in. z koniecznością dostosowania polskich przepisów w zakresie ochrony lasu do odpowiednich norm zachodnioeuropejskich. Wydaje się, że Mimic (tebufenazyd) spełnia warunki, jakim powinien odpowiadać pestycyd łagodny dla środowiska. Jego wysoka specyficzność i selektywne działanie na *Lepidoptera* gwarantuje niewielki wpływ na pożyteczne błonkówki, na przykład na pszczoły [9]. Również negatywne efekty oddziaływania tebufenozydu na inne bezkręgowce (n.p. skorupiaki) są znikome w porównaniu z efektami acylomocznikowych inhibitorów syntezy chityny, takich, jak na przykład Dimilin. Ponadto wydaje się, że działanie Dimilinu na larwy owadów jest opóźnione w porównaniu z działaniem agonistów ekdysteroidów.

W przypadku zastosowania preparatu Mimic larwa szybciej przerywa żerowanie i przyspiesza linienie, zmniejszając tym samym wyrządzone szkody. Mimo, iż w badaniach nad mechanizmem działania agonistów ekdysteroidów obserwuje się stały postęp, wciąż niewiele jest danych dotyczących wpływu tych związków na fizjologię owadów leśnych. Jak dotąd takie badania przeprowadzono przede wszystkim na owadach pożytecznych oraz na szkodnikach upraw i szkodnikach magazynowych (m.in. *Spodoptera littoralis*, *Spodoptera exigua*, *Spodoptera exempta*, *Bombyx mori*, *Galleria mellonella*, *Plodia interpunctella*, *Manduca sexta*) [10, 6, 12, 13, 14, 2] Wydaje się uzasadnione podjęcie analogicznych badań na gatunkach owadów leśnych, których populacje będą ograniczane za pomocą tego typu insektycydów.

Ponadto, zarówno RH 5849, jak i RH 5992 stanowią znakomite narzędzie w rękach fizjologa owadów. Podstawową techniką badawczą w endokrynologii owadów jest podawanie analogów hormonów. Obserwacja efektów takiego zabiegu pozwala wnioskować o roli imitowanego hormonu. Rola naturalnego 20-hydroksyekdyzonu wciąż nie jest należyście poznana, gdyż sztucznie aplikowany 20-E rozkładany jest przez owada zanim zdąży

zadziałać na tkanki docelowe. Aby podanie 20-hydroksyekdyzonu odniosło skutek, stosowano niekiedy specjalne techniki aplikacji, które poważnie zakłócały fizjologię owada i — niekiedy — maskowały efekt podanego hormonu. Zastosowanie niesteroidowych agonistów ekdysteroidów (do których należą RH 5849 i RH 5992) jest wolne od tych niedogodności i prawdopodobnie będzie stanowić punkt zwrotny w badaniach nad rolą ekdysteroidów u owadów z rzędu *Lepidoptera*, w tym również szkodników lasów.

## Literatura

1. **Cymborowski B.** 1984: Endokrynologia owadów. PWN Warszawa.
2. **Wing K. D., Slawecki, R.A., Carlson, G.R.** 1988: RH 5849, a nonsteroidal ecdysone agonist: effects on larval *Lepidoptera*. *Science* 241, 470–472.
3. **Migula P.** 1990 Podstawy fizjologii owadów. Wydawnictwo Uniwersytetu Śląskiego. Katowice.
4. **Sehnal F.** 1989: Hormonal role of ecdysteroids in insect larvae and during metamorphosis. W: "Ecdysone. From Chemistry to Mode of Action" (red. J. Koolman). Georg Thieme Verlag. Stuttgart, New York, s. 271–278.
5. **Truman J.W.** 1985: Hormonal control of ecdysis. W: "Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology (red. G.A.Kerkut i L.I. Gilbert). Pergamon Press. Oxford, New York, Toronto, Sydney, Paris, Frankfurt. Vol.8. s. 413-440.
6. **Smagghe, G., Degheele D.** 1993: Toxicity, pharmacokinetics and metabolism of the first nonsteroidal ecdysteroid agonist RH 5849 on *Spodoptera exempta* (Walker), *Spodoptera exiqua* (Huebner) and *Leptinotarsa decemlineata* (Say). *Pestic. Biochem. Physiol.* 46:149–160.
7. **Koolman J., Karlson P.** 1985: Regulation of ecdysteroid titer: degradation. W: "Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology (red. G.A.Kerkut i L.I.Gilbert). Pergamon Press. Oxford, New York, Toronto, Sydney, Paris, Frankfurt. Vol.7. s. 343–362.
8. **Palli S.R., Primavera, M., Tomkins, W., Lambert, D., Retnakaran, A.** 1995: Age-specific effects of a non-steroidal ecdysteroid agonist, RH 5992, on the spruce budworm, *Choristoneura fumiferana* (*Lepidoptera: Tortricidae*). *Eur.J.Entomol.* 92, 325–332.
9. The Mimic Manual. Rohm and Haas, Canada Inc., 1995.
10. **Smagghe G., Degheele D.** 1992: Effects of RH 5849, the first Nonsteroidal Agonist, on larvae of *Spodoptera littoralis* (Boisd.) (*Lepidoptera: Noctuidae*). *Arch. Insect Biochem Physiol.* 21, 119–128.
11. **Quack, S., Fretl, A., Spindler-Barth, M., Spindler, K-D.** 1995: Receptor affinities and biological responses of nonsteroidal ecdysteroid agonist on the epithelial cell line from *Chironomus tentans* (*Diptera: Chironomidae*.) *Eur. J Entomol.* 92, 341–347.

12. **Kiuchi, M.** 1990. Effects of an insect growth regulator, RH 5849, on the larval molt and larval-pupal metamorphosis of the silkworm, *Bombyx mori*. Abstracts of the Seventh International Congress of Pesticide Chemistry, Hamburg.
13. **Muszyńska-Pytel, M., Mikołajczyk, P., Pszczołkowski, M., Cymborowski, B.**, 1992. Juvenilizing effect of ecdysone mimic RH 5849 in *Galleria mellonella* larvae. *Experientia* 48, 1013–1017.
14. **Silhacek, D.L., Oberlander H., Porcheron P.** 1990. Action of RH 5849, a nonsteroidal ecdysteroid mimic on *Plodia interpunctella* (Huebner) *in vivo* and *in vitro*. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 15, 201–212.