

Henryk Malinowski¹

Reakcja chrząszczy szeliniaka sosnowca (*Hylobius abietis* L.) na insektycydy z grupy neonicotynoidów (chloronikotynyli) i fenylopirazoli

Response of adult large pine weevils (*Hylobius abietis* L.) to neonicotinoids (chloronicotinyls) and fenylpirazoles insecticides

Abstract. The responses (knock-down and mortality) were studied of large pine weevil (*Hylobius abietis* L.) adults to selected insecticides with different mechanisms of action, such as neonicotinoids (clothianidin, acetamiprid); acting on the nicotinic receptors of acetylcholine (ACh), and fenylpirazoles (fipronil); interfering with gamma butyric acid (GABA) receptors. Taking into account the speed of insect decay the order of effectiveness was as follows: the most effective insecticides were those that interfered with GABA receptors and second best insecticides acted on nicotinic receptors of ACh.

Key words: activity of insecticides, responses of insects to insecticides

1. Wprowadzenie

W ochronie lasu przed szkodliwymi owadami stosuje się insektycydy o różnych mechanizmach działania (Malinowski 2003). Między innymi stosuje się substancje działające na układ nerwowy owadów. Można tu wyróżnić następujące grupy insektycydów:

- blokujące enzym acetylocholinoesterazę (AChE) w komórkach nerwowych owadów (insektycydy fosforoorganiczne i karbaminiany),
- blokujące kanały sodowe błon komórek nerwowych (insektycydy z grupy pyretroidów),
- działające na nikotynowe receptory acetylcholiny (ACh) jako agoniści (insektycydy z grupy neonicotynoidów),
- działające na receptory kwasu γ -aminomasłowego (GABA) jako antagoniści (insektycydy z grupy fenylopirazoli).

W literaturze opisano już reakcje chrząszczy szeliniaka sosnowca na insektycydy blokujące enzym AChE i kanały sodowe błon komórek nerwowych (Malinowski 1994, 1995) oraz porównano te reakcje w zależności od zastosowanego insektycydu (Malinowski 2010, w

druku), natomiast mechanizmy działania dwóch ostatnich grup insektycydów nie były dotychczas opisane, gdyż są one aktualnie wprowadzane do ochrony lasu (insektycydy neonicotynowe) lub znajdują się w fazie badań (insektycydy fenylopirazolowe).

Zrozumienie mechanizmów działania na owady nowych insektycydów, wprowadzanych do ochrony lasu lub badanych, wymaga przypomnienia funkcjonowania układu nerwowego, którego podstawową jednostką są komórki nerwowe – neurony, zakończone wypustkami plazmatycznymi – aksonami, pełniącymi rolę w kontaktowaniu się z innymi neuronami. Pomędzy poszczególnymi komórkami nerwowymi występują synapsy, umożliwiające przekazywanie impulsów nerwowych w organizmie. W synapsach impulsy nerwowe są przekazywane za pomocą specjalnego neurotransmitera – acetylcholiny (ACh), która jest neuroprzekaznikiem pobudzającym w centralnym układzie nerwowym, natomiast kwas γ -aminomasłowy (GABA) należy do mediatorów hamujących rozprzestrzenianie się bodźca w neuronie odbiorczym.

Przyłączenie się cząsteczek GABA do synaptycznego receptora otwiera wewnętrzny kanał chlorkowy

¹ Instytut Badawczy Leśnictwa, Zakład Ochrony Lasu, Sękocin Stary, ul. Braci Leśnej 3, 05-090 Raszyn, Fax +48227150557, e-mail H.Malinowski@ibles.waw.pl

(Bloomquist 2001), co powoduje zwiększenie przenikania jonów chlorkowych do wnętrza komórki, w wyniku czego następuje hiperpolaryzacja błony i wygaszenie impulsu. Insektycydy z grupy fenylopirazoli, jak np. fipronil, działając jako antagoniści (związki, łącząc się z receptorem zastępują właściwą substancję, nie wywołują jednak jej reakcji), zajmują miejsce GABA w jego receptorze i nie dopuszczają do otwarcia kanału chlorkowego. Zakłóca to przenikanie jonów chlorkowych do wnętrza komórki i wygaszenie bodźca. Obrazem zatrucia tym insektycydem jest początkowo nadwzbudzenie, a następnie paraliż i unicestwienie organizmu.

W cholinergicznym komórkach nerwowych owadów, które stanowią główny cel insektycydów neonicotynoidowych (chloronikotynili), wyróżnia się trzy rodzaje receptorów ACh: nikotynowe, muskarynowe i charakterystyczne dla owadów receptory muskarynowo-nikotynowe (nazwy receptorów pochodzą od silnej ich wrażliwości na działanie alkaloidów: nikotyny i muskaryny). Nikotyna, jeden z najstarszych insektycydów, działa na organizm owada jako agonista ACh, czyli substancja, która łącząc się z receptorem zastępuje ACh i wywołuje jej reakcję (Nauen et al. 2001). Oznacza to, że alkaloid ten po wnikięciu do organizmu owada konkuruje z ACh i zastępuje ten neuroprzekaznik w jego białkowych receptorach nikotynowych i nikotynowo-muskarynowych. Jednakże, w odróżnieniu od ACh, nikotyna po wywołaniu impulsu nie ulega rozkładowi. W związku z tym przekazywanie impulsów nerwowych jest zaburzone. Skutkiem działania nikotyny jest nadobudliwość neuronów postsynaptycznych, objawiająca się drgawkami i konwulsjami, prowadzącymi do zabicia organizmu. Identycznym mechanizmem działania na owady charakteryzują się wprowadzane w ostatnich latach do stosowania insektycydy, strukturalnie i funkcjonalnie zbliżone do nikotyny, dlatego zwane są neonicotynoidami (ze względu na budowę chemiczną zwane również chloronikotynylami). Do tej grupy należą: acetamipryd (Mospilan 20 SP), chlotianidyna (Apacz 50 WG) i inne.

Reakcja owadów na wymienione grupy insektycydów, wyrażona szybkością porażania i zamierania, może być różna w zależności od miejsca ich działania w układzie nerwowym. Reakcja zależy również od budowy molekularnej substancji aktywnej i mechanizmów jej detoksykacji w organizmie. W praktycznej ocenie skuteczności działania insektycydów za najważniejszy wskaźnik ich przydatności uważa się zwykle uzyskany procent śmiertelności zwalczanej populacji owadów. Mało prowadzi się obserwacji dotyczących zachowania się owadów po zatruciu insektycydami. Rozeznanie zachowania jest istotne przy ocenie skuteczności nowych środków w okresie wprowadzania ich do

stosowania, nie tylko z poznawczego punktu widzenia. Dane te będą stanowić punkt odniesienia przy monitorowaniu reakcji owadów po wielu latach stosowania insektycydów. Owady mogą bowiem zmieniać swój behavior pod wpływem wielokrotnego ich traktowania środkami ochrony roślin, pozwalając im na przeżycie zabiegów.

Celem przeprowadzonych badań było określenie szybkości porażania i zamierania owadów przy kontakcie z insektycydami działającymi na różne miejsca układu nerwowego. W pracy uwzględniono wprowadzane ostatnio do stosowania w ochronie lasu lub badane insektycydy z grupy neonicotynoidów i fenylopirazoli.

2. Materiały i metody

Badania wykonano w warunkach laboratoryjnych na chrząszczach szeliniaka sosnowca *Hylobius abietis* L. (samce + samice), zbieranych z rowków chwytnych w nadleśnictwach Smardzewice i Spała. Określano porażenie i śmiertelność owadów eksponowanych na insektycydy działające na różne miejsca w układzie nerwowym. Były to następujące grupy chemiczne:

a) insektycydy z grupy neonicotynoidów działające na nikotynowe receptory acetylocholino (agoniści): chlotianidyna (Apacz 50 WG o zawartości 500 g/kg substancji aktywnej), acetamipryd (Mospilan 20 SP o zawartości 200 g/l substancji aktywnej),

b) insektycydy z grupy fenylopirazoli działające na receptory kwasu γ -aminomasłowego (antagoniści): fipronil (Regent 200 S.C. o zawartości 200 g/l substancji aktywnej).

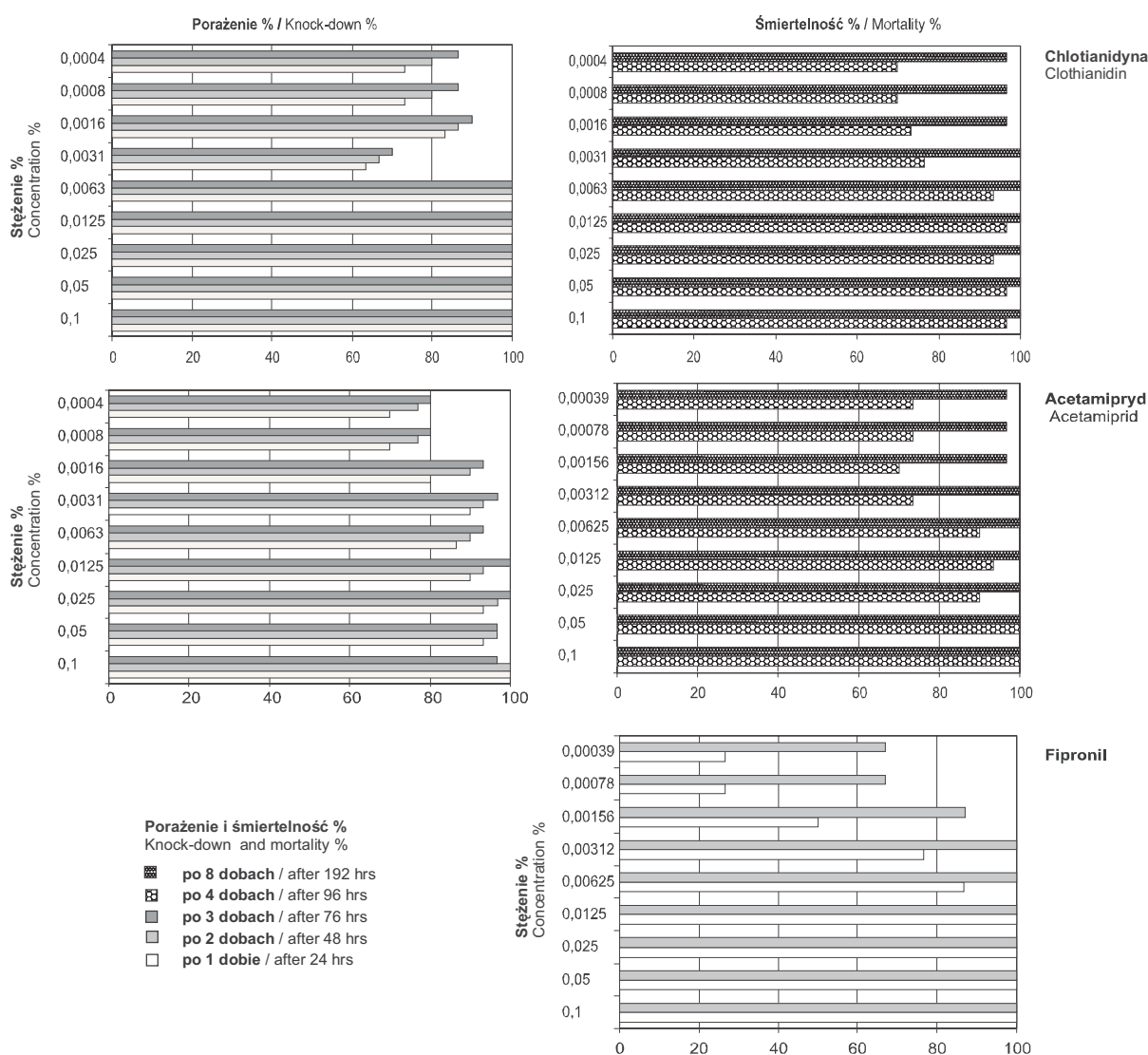
W celu porównania reakcji owadów stosowano metodę kontaktowo-żołądkową (kontaktu stałego przez stopy i drogi pokarmowe) i jednakowe stężenia badanych insektycydów. Gałązki sosnowe długości około 10 cm i średnicy około 0,5 cm zanurzano w ciągu około 5 sekund w emulsjach wodnych insektycydów i po przesuszeniu umieszczano w płytkach Petriego o średnicy 15 cm, do których wkładano następnie chrząszcze szeliniaka. Każdy insektycyd badano w 9 stężeniach, obniżających się w postępie geometrycznym z zastosowaniem współczynnika 0,5. Najwyższe stężenie wynosiło 0,1% substancji aktywnej, najniższe – 0,0004%. Na każde stężenie eksponowano 30 owadów (2 powtórzenia po 15 osobników). Porażenie i śmiertelność chrząszczy kontrolowano codziennie w ciągu 8 dób ekspozycji, a wyniki wyrażono w procentach. Jako porażone uznawano owady leżące na grzbiecie lub na boku i wykonujące nieskoordynowane ruchy kończynami. Za martwe przyjmowano owady leżące na grzbiecie lub pozostające w normalnej pozycji, lecz

nieruchome (nie wykazujące przy dotyku igłą preparacyjną żadnych oznak życia).

3. Wyniki i ich omówienie

Porażenie i śmiertelność chrząszczy szeliniaka sosnowca eksponowanych na traktowane chlotianidyną i acetamiprydem gałązki sosnowe ilustruje rycina 1. Reakcja owadów, wyrażona szybkością porażania i zamierania, na oba badane insektycydy była podobna. Obserwacje wykonane po 1 dobie ekspozycji wykazały, że owady uległy jedynie porażeniu, które w wyższych stężeniach (0,1–0,0063%) wynosiło 100% (chlotia-

nidyna) lub 88–100% (acetamipryd), a w niższych (0,0031–0,0004%) przy obu insektycydach kształtowało się na poziomie 60–90%. Należy podkreślić, że po 1 dobie ekspozycji owadów na badane insektycydy nie obserwowano w ogóle osobników martwych. Zbliżony obraz porażenia owadów utrzymywał się w ciągu następnych 2 dób, a po 3 dobach ekspozycji zamierały tylko pojedyncze osobniki. Dalsze obserwacje wykazały, że porażone badanymi insektycydami owady zamierały dopiero po 4 dobach ekspozycji. W wyższych dawkach, po 4 dobach ekspozycji, przy obu insektycydach śmiertelność osiągnęła poziom 90–100%, w niższych – ok. 70%. Dodać należy, że owady eksponowane na traktowane wyższymi stężeniami insektycydów



Rycina 1. Porażenie i śmiertelność chrząszczy szeliniaka sosnowca eksponowanych na gałązkach sosnowych traktowanych chlotianidyną, acetamiprydem lub fipronilem (metoda kontaktowo-żołądkowa)

Figure 1. Knock-down and mortality of large pine weevil beetles exposed to pine twigs treated with clothianidin, acetamiprid or fipronil (contact and stomach method)

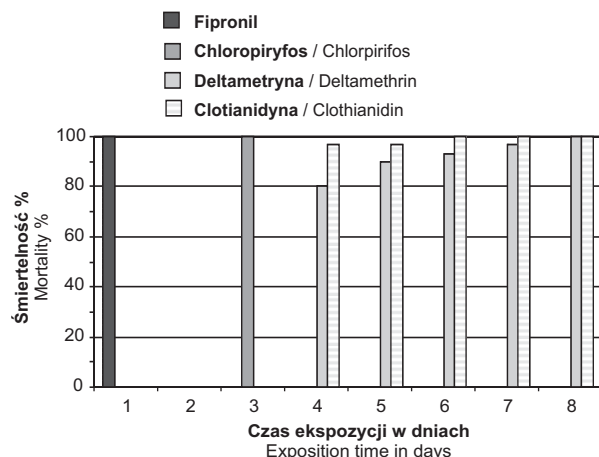
gałązki sosnowe ulegały w krótkim okresie czasu porażeniu w wyniku kontaktowego działania środka i nie podejmowały próby zjadania kory. Przy niższych stężeniach obserwowano objawy niewielkiego żerowania. W tym przypadku owady ulegały porażeniu w wyniku sukcesywnego pobierania insektycydu zarówno przez kontakt, jak i drogą pokarmową.

Po 8. dobach obserwowano przy wyższych stężeniach obu insektycydów (0,1–0,0031%) 100% śmiertelności owadów, przy niższych (0,0031–0,0004%) – 98% śmiertelności. Z doświadczeń tych wynika, że porażenie chrząszczy szeliniaka sosnowca insektycydami z grupy neonikotynoidów, działających na nikotynowe receptory ACh, następuje szybko i taki stan utrzymuje się przez 4 doby. Następnie owady stopniowo zamierają, osiągając maksymalny efekt (około 100% śmiertelności) po 8 dobach, niezależnie od zastosowanego stężenia badanych insektycydów. Porównując działanie obu insektycydów neonikotynoidowych na chrząszcze szeliniaka można stwierdzić, że charakteryzują się one zbliżoną, bardzo wysoką aktywnością owadobójczą.

W trakcie wcześniejszych badań (Malinowski 1995) obserwowano podobną reakcję w przypadku ekspozycji chrząszczy szeliniaka sosnowca na gałązki sosnowe traktowane insektycydami z grupy pyretroidów, deltametryną i cypermetryną, których mechanizm działania polega na blokowaniu kanałów jonowych, odpowiedzialnych za transport jonów sodu w komórkach nerwowych. Po zastosowaniu insektycydów pyretroidowych również przez około 4 doby obserwowano tylko nieliczne przypadki przejścia owadów ze stanu porażenia w stan letalny. Zamieranie owadów w większym stopniu obserwowano po 4 dobach i było ono zależne od stężenia. Z cytowanych badań wynika również, że reakcja owadów na insektycydy z grupy związków fosforoorganicznych i karbaminianów, blokujące aktywność acetylocholinoesterazy, jest szybsza niż na insektycydy z grupy neonikotynoidów i pyretroidów. W

przypadku insektycydu fosforoorganicznego – chlorpiryfosu po 3 dobach ekspozycji śmiertelność owadów w najwyższym stężeniu (0,1%) wynosiła 100%, przy najniższym (0,0125%) – 60%, a po 6 dobach uzyskano śmiertelność na poziomie 100% przy wszystkich badanych stężeniach. Podobne wyniki, jeżeli chodzi o szybkość zamierania owadów, uzyskano w przypadku karbosulfanu, ale w stężeniach 10-krotnie wyższych.

Chrząszcze szeliniaka sosnowca eksponowane na gałązki sosnowe traktowane insektycydem z grupy fenylpirazoli – fipronilem, działającym na receptory kwasu γ -aminomasłowego w komórkach nerwowych – w stężeniach identycznych jak w przypadku insektycydów neonikotynoidowych – zamierały już po jednej dobie (ryc. 1). Przy wyższych stężeniach fipronilu (0,1, 0,05, 0,025 i 0,0125%) śmiertelność chrząszczy wyniosła 100%, przy niższych – 25–85%. Po 2 dobach śmiertelność owadów przy niższych stężeniach wzrosła do poziomu 70–100%. Z obserwacji tych wynika, że reakcja chrząszczy szeliniaka na insektycyd fenylpirazolowy – fipronil, była całkowicie odmienna od ich reakcji na omawiane wcześniej grupy insektycydów. Reakcja chrząszczy szeliniaka sosnowca na fipronil, działający na receptory kwasu γ -aminomasłowego, była podobna do reakcji chrząszczy stonki ziemniaczanej (*Leptinotarsa decemlineata* Say) na lindan (insektycyd należący do grupy związków chloroorganicznych) w początkowym okresie po wprowadzeniu tego insektycydu do stosowania w latach 60. minionego stulecia. Należy wyjaśnić, że mechanizm działania lindanu na owady jest analogiczny jak mechanizm działania fipronilu (Bloomquist 2001). Potraktowane bardzo niskimi dawkami lindanu chrząszcze stonki ziemniaczanej zamierały w ciągu 2–3 godzin. Po kilku latach stosowania tego insektycydu zachowanie owadów uległo zmianie. Chrząszcze stonki ziemniaczanej potraktowane wielokrotnie wyższymi niż w okresie początkowym dawkami lindanu zamierały dopiero po kilku dniach (Bakuniak et al. 1979). Przykład ten dowodzi koniecz-



Rycina 4. Szybkość zamierania chrząszczy szeliniaka sosnowca eksponowanych na gałązkach sosnowych traktowanych insektycydami o różnych mechanizmach działania w stężeniu 0,1%. Dane dotyczące chlorpiryfosu i deltametryny zaczerpnięto z pracy Malinowskiego (1994)

Figure 4. Comparison of the speed of large pine weevil beetles mortality exposed to pine twigs treated with insecticides of different mechanism of action at 0,1% concentration. Date concerning insecticides chlorpirifos and deltamethrin were taken from work by Malinowski (1994)

ności określania różnych reakcji owadów na insektycydy, a nie tylko śmiertelności, przy monitorowaniu skuteczności działania stosowanych środków.

Chrząszcze, z uwagi na otaczającą ich ciało powłokę chitynową, na ogół reagują wolniej na kontakt z insektycydami niż larwy. Nie znane są natomiast różnice w zachowaniu się chrząszczy przy kontakcie z insektycydami o różnych mechanizmach działania. Informacje te mogą być istotne przy monitorowaniu skuteczności działania insektycydu po wielu latach jego stosowania.

Szybkość zamierania chrząszczy szeliniaka sosnowca eksponowanych na gałązkach sosnowych traktowanych insektycydami o różnych mechanizmach działania ilustruje rycina 2. Biorąc pod uwagę czas ekspozycji oraz zastosowane stężenie na poziomie 0,1% można badane grupy insektycydów uszeregować następująco: najszybciej działają insektycydy blokujące receptory kwasu γ -aminomasłowego, na drugim miejscu należy wymienić insektycydy blokujące enzym acetylocholinoesterazę, na trzecim miejscu – najwolniej działające dwie pozostałe grupy insektycydów: współdziałające z nikotynowymi receptorami acetylocholino i blokujące kanały jonowe odpowiedzialne za transport jonów sodu.

Literatura

- Bakuniak E., Malinowski H., Kroczyński J. 1979. Poziom wrażliwości stonki ziemniaczanej (*Leptinotarsa decemlineata* Say) na stosowane insektycydy, badane w latach 1968-1977, w: Entomologia i intensyfikacja rolnictwa. Warszawa, PWN: 183–188.
- Bloomquist J. R. 2001. GABA and glutamate receptors as biological sites for insecticide action. w: Biochemical Sites of Insecticide Action and Resistance (red. I. Ishaaya) Berlin, Springer: 17 – 42.
- Malinowski H. 1994. Zachowanie się owadów po zatruciu insektycydami o różnych mechanizmach działania. Materiały 34 Sesji Naukowej Instytutu Ochrony Roślin w Poznaniu, cz. I: 237– 244.
- Malinowski H. 1995. Oddziaływanie insektycydów na szkodliwe owady leśne. II. Reakcja chrząszczy szeliniaka sosnowca (*Hylobius abietis* L.) na insektycydy przy różnych sposobach intoksykacji. *Prace Instytutu Badawczego Leśnictwa*, Ser. A, 785: 43–57.
- Malinowski H. 2003. Mechanizmy działania insektycydów na tkankę docelową owadów. *Sylvan* 4: 38–51.
- Malinowski H. 2010. Mechanizmy działania insektycydów a reakcja chrząszczy szeliniaka sosnowca (*Hylobius abietis* L.). *Progress in Plant protection / Postępy w Ochronie Roślin*, 50: (w druku).
- Nauen R., Ebbinghaus-Kintscher U., Elbert A., Jeschke P., Tietjen K. 2001. Acetylcholine receptors as sites for developing neonicotinoid insecticides. w: Biochemical Sites of Insecticide Action and Resistance (red. I. Ishaaya). Berlin, Springer: 77–106.
- Zlotkin E. 2001. Insecticides affecting voltage-gated ion channels. w: Biochemical Sites of Insecticide Action and Resistance. (red. I. Ishaaya). Berlin, Springer: 43–76.