



Zróżnicowanie grup funkcjonalnych grzybów entomopatogenicznych

Stanisław Bałazy

Zakład Badań Środowiska Rolniczego i Leśnego
Polska Akademia Nauk, Poznań

Functional differentiation of entomopathogenic fungi

Summary

Entomopathogenic fungi are an interesting object of research due to their great potential for biological control of plant pests and medically important arthropods. As a group, they play an important role in arthropod population density regulation processes together with predators, parasites and other microbial pathogens. A number of species have been selected to be applied in biopesticide technological production. The majority of species known in Poland represent the order of the entomophthorales within *Zygomycotina* and the hyphomycetous anamorphs of *Ascomycotina*. Apart from their taxonomical diversity they show strong functional differentiation resulting from enzymatic and toxic activity against their hosts and immunological response of the latter. These phenomena may be considerably modified by environmental conditions. Some aspects of these relationships were discussed and greater attention to their significance for pharmacological and other biotechnologies is suggested.

Key words:

entomopathogenic fungi, host selectivity, enzymes, toxins, significance for biotechnology.

Adres do korespondencji

Stanisław Bałazy,
Zakład Badań Środowiska
Rolniczego i Leśnego,
Polska Akademia Nauk,
ul. Bukowska 19,
60-809 Poznań;
e-mail:
balazy@man.poznan.pl

1. Wstęp

Grzyby entomopatogeniczne stanowią stosunkowo niewielką grupę około 3000 poznanych dotychczas gatunków, które zdolne są infekować żywe stawonogi i wywoływać u nich procesy chorobowe. Są one reprezentowane w większości klas układu systematycznego grzybów, ale w jednostkach taksonomicznych niższych rang (rząd, rodzina) występują zazwyczaj wraz z gatun-

kami saproficznymi, fitopatogenicznymi oraz zoopatogenicznymi względem zwierząt innych niż stawonogi. Choć opracowanie to poświęcone będzie głównie entomopatogenicznemu grzybom bytującym w środowiskach lądowych, to jednak podkreślić trzeba, że olbrzymia większość poznanych dotychczas gatunków preferuje ekosystemy silnie uwilgotnione, a szereg grup – zwłaszcza spośród wyróżnianych do niedawna tzw. grzybów niższych (pragrzyby – *Archimycetes* i glonowce – *Phycomycetes*) związanych jest wyłącznie z różnymi rodzajami zbiorników wodnych.

Wszystkie odniesienia taksonomiczne w dalszej części tekstu stosowane będą według układu systematycznego grzybów przedstawionego w *Encyklopedii biologicznej* (t. IV, 1998; 164), wydanej przez Agencję Publicystyczno-Wydawniczą OPRES – Kraków, zmieniając jedynie w randze typu końcówkę „-mycetes” na „-mycotina” – używaną w piśmiennictwie międzynarodowym.

Wśród grzybów skoczkowych (*Chytridiomycotina*) rodzina *Coelomomycetaceae* w rzędzie *Blastocladales* obejmuje pasożyty wewnętrzne owadów wodnych, głównie larw komarów. Gatunki wyspecjalizowanych entomopatogenów tworzą rząd owadomorkowców (*Entomophthorales*) należący do grzybów sprzężniakowych (*Zygomycotina*). Występują one w różnych środowiskach i tylko nieliczne spośród nich pasożytują w niższych bezkręgowcach, glonach, grzybach i roślinach naczyniowych, czasem jednak wykazując również słabe właściwości chorobotwórcze względem owadów albo zwierząt kręgowych (1) lub prowadzą saprofityczny tryb życia. Przedstawiciele rzędu *Trichomycetales* są endosymbiontami związanymi z przewodami pokarmowymi stanowogów. Wśród grzybów workowych (*Ascomycotina*) taksonem zawierającym wyłącznie obligatoryjnie biotroficzne formy symbiontów związanych ze stawonogami jest rząd owadorostowców *Laboulbeniales*, grupujący ponad 1500 poznanych dotychczas gatunków. Rozwijają się one egzogenicznie na owadach lub roztoczach, zagłębiając się tzw. komórką bazalną w powierzchniową warstwę oskórka, ponad którym wyrastają kilku- do kilkusetkomórkowe, małe plechy bardzo zróżnicowane morfologicznie (2,3). Niewielką i słabo dotychczas poznaną rodzinę *Ascospaeraceae*, zaliczną do rzędu pleśniakowców (*Eurotiales*), tworzą patogeny pszczoły miodnej oraz kilkunastu gatunków dziko żyjących błonkówek pszczołowych (*Apidae*), rozwijające się w ich gniazdach. W tym samym typie grzybów kilkaset gatunków patogenów stawonogów zalicznych do rodzajów *Cordyceps*, *Hypocrella* i *Torribiella*, zgrupowanych jest w rzędzie *Hypocreales*, rodzinie *Cordycipitaceae*, zwanej maczuznikowatymi. Kilka gatunków z rodzaju *Cordyceps* rozwija się w podziemnych owocnikach grzybów z rzędu jeleniakowców (*Elaphomycetales*). W innych rzędach grzybów workowych gatunki entomopatogeniczne notowane są sporadycznie, natomiast powszechne jest wśród mikologów przekonanie, że należy do nich również większość zarażających stawonogi gatunków grzybów wyższych, u których znane są tylko formy zarodnikowania konidialnego (tzw. anamorfy), w związku z czym są one grupowane w umownie wydzielonym typie grzybów mitosporowych (dotychczas powszechnie nazywanych grzybami niedoskonałymi) – *Deuteromycotina*. Zalicza się do niego wiele spośród najpowszechniej spotykanych grzybów owadobójczych (np.

z rodzaju *Beauveria*, *Metarhizium*, *Nomuraea*, *Paecilomyces*, *Verticillium* i in.) – co do których istnieją przypuszczenia, że ich formy workowe (tzw. teleomorfy), reprezentowane być powinny w rzędach drobnoworkowców (*Microascales*), pleśniakowców (*Eurotiales*), otocznicowców (*Pyrenulales*) oraz gruzlakowców (*Hypocreales*). Wiadomo również, że poznane dotychczas anamorfy wielu workowców z rodzaju *Cordyceps* i *Torubiella* reprezentują cechy grzybów mitosporowych z rodzajów *Acanthomyces*, *Gibellula*, *Hirsutella*, *Paecilomyces*, *Polycephalomyces* i pokrewnych, natomiast formy konidialne *Hypocrella* zgrupowane są w rodzaju *Aschersonia* o jasno zabarwionych pyknidach. W takim rozumieniu olbrzymia większość grzybowych patogenów bezkręgowców mieści się w typie grzybów workowych. W klasie grzybów podstawkowych (*Basidiomycotina*) ukształtowały się szczególne formy symbiotycznych stosunków pomiędzy pluskwiakami z grupy czerwców (*Coccoidea*), a grzybami z rzędu *Sep-tobasidiales*, nazwanymi z tej przyczyny czerwco-grzybowcami. Polegają one na infekowaniu przez grzyba części osobników i rozwoju obfitej grzybni na koloniach tych owadów żyjących na pniach i gałęziach drzew. Grzybnia chroni owady przed entomofagami zwierzęcymi, a osobniki młodego ich pokolenia rozprzestrzeniają zarodniki grzybów. Natomiast zainfekowane i nie osiągnące dojrzałości płciowej – lecz nie obumierające przedwcześnie – osobniki czerwców pośredniczą w dostarczaniu pokarmu rozwijającej się grzybni.

Od momentu pierwszego, naukowo udokumentowanego, rozpoznania chorobotwórczego charakteru związków pomiędzy grzybem *Beauveria bassiana* a gąsienicami jedwabnika morwowego (*Bombyx mori*) (4) upłynęło już niemal 170 lat i na podstawie uzyskanych wyników przeprowadzonych w tym czasie badań wykazano powszechność tych zjawisk w przyrodzie, niezwykle silne zróżnicowanie składu gatunkowego patogenów grzybowych oraz uwarunkowań i przebiegu procesu chorobowego. Warto w tym miejscu podkreślić, że poczynając od lat sześćdziesiątych ubiegłego stulecia w badaniach tych nieprzerwanie uczestniczyli Polacy, wnosząc duży wkład do poznania zarówno różnorodności omawianych grup grzybów i ich taksonomii, jak i znaczenia dla regulacji biocenotycznej stawonogów oraz możliwości wykorzystania w biologicznej walce ze szkodnikami upraw rolnych i lasów. Niemal kompletną bibliografię ich osiągnięć do połowy XX w. zestawił Lipa (5).

W dalszych rozważaniach uwzględniane będą tylko gatunki występujące w środowiskach lądowych, których formy pasożytnictwa prowadzą do ograniczania populacji zarażanych przez nie stawonogów.

Pomimo pejoratywnego w stosunku do grzybów entomopatogenicznych wydzźwięku odkrycia Bassiego (4), dalsze badania nad tą grupą patogenów doprowadziły do ukształtowania opinii o nich jako o organizmach generalnie pożytecznych dla człowieka. Stało się tak głównie dzięki stwierdzeniu częstych przypadków epizoocji powodowanych zwłaszcza przez różne gatunki owadomorkowców (*Entomophaga aulicae*, *E. grylli*, *Zoophthora radicans*, *Tarichium gamme*, *Entomophthora muscae*, *E. culicis*, *Z. neoaphidis* i in.) w populacjach ważnych gospodarczo szkodników upraw rolnych i lasów, jak również owadów uciążliwych lub niebezpiecznych dla zdrowia

człowieka, (zwłaszcza wielu gatunków muchówek przenoszących chorobotwórcze mikroorganizmy wśród ludzi i zwierząt hodowlanych). W rezultacie grzyby te postrzegane były jako doskonały środek do zwalczania tych owadów.

2. Stan rozpoznania krajowych grzybów entomopatogenicznych

Skład gatunkowy oraz rola grzybów entomopatogenicznych w lądowych ekosystemach Polski rozpoznane są dość dobrze, jakkolwiek nierównomiernie w poszczególnych regionach kraju. Z analizy piśmiennictwa i opracowanych zbiorów terenowych wynika, że ogólna liczba gatunków owadomorkowców, gruzłakowców i grzybów mitosporowych wynosi około 200 gatunków (tab. 1), z czego ponad 90% stanowią patogeny owadów. Ponad połowę z tej liczby stanowią gatunki rzadko spotykane lub okazyjnie tylko zarażające owady, wobec czego ich znaczenie gospodarcze jest niewielkie. Ponieważ w warunkach naszego kraju głównym powodem zainteresowania nauki grzybami entomopatogenicznymi jest wykorzystanie ich w biologicznej walce ze szkodnikami roślin uprawnych oraz lasów, wobec tego największe znaczenie zwykło się przypisywać bądź patogenom powodującym epidemiczne choroby w ich populacjach, bądź też powszechnie występującym i zdolnym zarażać dużą liczbę gospodarczo ważnych gatunków szkodliwych. W tabeli 2 zawarto listę patogenów grzybowych potencjalnie najbardziej efektywnych w procesach naturalnego ograniczania populacji gatunków szkodliwych. Równocześnie jednakże pamiętać należy, że stosunkowo duża liczba gatunków mono- lub oligofagicznych związana jest ze stawonogami uważanymi za pożyteczne z punktu widzenia gospodarczych potrzeb człowieka, oraz – że gatunki polifagiczne – takie jak przedstawiciele rodzajów *Beauveria*, *Metarhizium*, *Paecilomyces*, *Verticillium* oraz *Batkoa apiculata* – rozwijać się mogą również kosztem tych stawonogów pożytecznych (tab. 3), co obniża ocenę ich roli jako czynników ograniczających szkody w uprawach. Ponadto około 50 znanych w kraju gatunków patogenów grzybowych rozwija się głównie lub wyłącznie na saprofagicznych lub roślinożernych stawonogach, którym nie przypisuje się jakiegoś szczególnego znaczenia gospodarczego, a które odgrywają jednakże dużą rolę w transformacji materii organicznej oraz w procesach glebotwórczych, i z tych przyczyn ograniczanie ich liczebności i różnorodności jest niepożądane.

Tabela 1

Entomopatogeniczne grzyby znane z Polski

Rodzaj	Występowanie			
	epizootyczne	częste	rzadkie	okazyjne
<i>Acremonium*</i>			1	
<i>Akanthomyces</i>				2
<i>Aphanocladium</i>			1	
<i>Aspergillus</i>			2	2
<i>Basidiobolus**</i>		1		
<i>Batkoa</i>		2	1	
<i>Beauveria</i>		2		
<i>Cladosporium*</i>		2		
<i>Conidiobolus</i>	2	1	6	1
<i>Cordyceps</i>	2		~8	
<i>Cylindrocarpon*</i>				2
<i>Entomophaga</i>	6	2		
<i>Entomophthora</i>	5	1	1	1
<i>Eryniopsis</i>		1	1	
<i>Fusarium*</i>		2	2	3
<i>Gibellula</i>		2		
<i>Harposporium*</i>				1
<i>Hirsutella</i>	4	3	6	4
<i>Hymenostilbe</i>				2
<i>Isaria*</i>				1
<i>Metarhizium</i>		1	3	1
<i>Mucor*</i>		2	1	1
<i>Myrothecium**</i>				1
<i>Neozygites</i>	1	1	3	2
<i>Nomuraea</i>			1	
<i>Paecilomyces</i>	2	1	1	1
<i>Paraisaria</i>		1		
<i>Scopulariopsis*</i>		2	1	
<i>Sesquicillium*</i>			1	
<i>Tarichium</i>	3	2	4	16
<i>Tilachlidiopsis</i>		1		1
<i>Torrubiella</i>			1	
<i>Tolypodadium</i>		1		
<i>Verticillium</i>		2	3	2
<i>Zoophthora</i>	11	22	9	10
Razem	36	55	57	54
OGÓŁEM			202	

* właściwości entomopatogeniczne nie dla wszystkich szczepów potwierdzone,

** właściwości entomopatogeniczne stwierdzone tylko w próbach laboratoryjnych.

Grzyby entomopatogeniczne o największym znaczeniu dla ochrony roślin w Polsce

<i>Batkoa apiculata</i>	<i>Nomuraea rileyi</i>
<i>B. major</i>	<i>Paecilomyces farinosus</i>
<i>Beauveria bassiana</i>	<i>P. fumoso-roseus</i>
<i>B. brongniartii</i>	<i>Tarichium megaspermum</i>
<i>Conidiobolus obscurus</i>	<i>T. sphaerospermum*</i>
<i>Cordyceps gracilis</i>	<i>T. punctatum*</i>
<i>C. militaris</i>	<i>Verticillium lecanii</i>
<i>Entomophaga aulice*</i>	<i>V. lefroyi</i>
<i>Ent. diprionis</i>	<i>V. species unidentified</i>
<i>Ent. grylli*</i>	<i>Zoophthora (Furia) gammae</i>
<i>Ent. tentredinis</i>	<i>Z. (F.) virescens</i>
<i>Entomophthora muscae</i>	<i>Z. (Neopandora) blunckii</i>
<i>E. planchoniana</i>	<i>Z. (N.) poloniae majoris</i>
<i>E. schizophorae</i>	<i>Z. (N.) neoaphidis</i>
<i>Hirsutella aphidis</i>	<i>Z. (N.) nouryi</i>
<i>H. gigantea</i>	<i>Z. (Zoophthora) anglica</i>
<i>H. subulata</i>	<i>Z. (Z.) arginis</i>
<i>H. thompsonii</i>	<i>Z. (Z.) bialowiezensis</i>
<i>Metarhizium anisopliae</i>	<i>Z. (Z.) occidentalis</i>
<i>Neozygites floridana</i>	<i>Z. (Z.) petchii</i>
<i>N. fresenii</i>	<i>Z. (Z.) phalloides</i>
<i>N. parvispora</i>	<i>Z. (Z.) radicans</i>

Prawdopodobnie około 25 innych gatunków dotychczas słabo zbadanych może mieć podobne znaczenie.

* gatunki zbiorowe.

3. Specjalizacja pasożytnicza

W odniesieniu do omawianej grupy patogenów grzybowych dość szeroko rozpowszechnione jest mniemanie, jakoby termin „entomopatogeniczny” oznaczał rzeczywistą lub przynajmniej potencjalną chorobotwórczość względem każdego owada. W rzeczywistości żadnemu spośród poznanych dotychczas gatunków grzybów nie można przypisać atrybutu chorobotwórczego powinowactwa nawet do pojedynczych przedstawicieli każdej spośród jednostek systematycznych rangi rodziny czy rzędu w obrębie gromady owadów. Olbrzymia ich większość charakteryzuje się wyraźną i często bardzo daleko posuniętą wybiórczością gospodarza, czy kręgu zakażanych gospodarzy. Tak np. skoczogonki (*Collembola*) niezmiernie rzadko podlegają infekcjom grzybami owadobójczymi, pomimo że tworzą bogate liczebnie i zazwyczaj wielogatunkowe zgrupowania w środowiskach obfitujących w zarodniki polifagicznych grzybów entomopatogennych (np. ściółka leśna, bogate w materię organiczną powierzchniowe poziomy głęby, żerowiska owadów pod korą drzew itp.). Wy-

Wybrane przykłady mikoz pożytecznych stawonogów

<p>Blonkówki pasożytnicze <i>Hymenoptera – Parasitica</i> <i>Batkoa major</i> <i>Beauveria bassiana</i> <i>Hirsutella serphi n.sp.</i> <i>Paecilomyces farinosus</i> <i>Verticillium lecanii</i> <i>Zoophthora Neop. dacnusa</i> <i>Z. Zoophth. ichneumonis</i> <i>Z. Zoophth. cf. lanceolata</i></p> <p>Mrówki <i>Hymenoptera – Formicoidea</i> <i>Aegeritella</i> spp. <i>Batkoa apiculata</i> <i>Beauveria bassiana</i> <i>Cordyceps myrmecophila</i> <i>Zoophthora Neop. myrmecophaga</i></p> <p>Chrzążcze biegaczowate <i>Coleoptera – Carabidae</i> <i>Beauveria bassiana</i> <i>Cordyceps entomorrhiza</i> <i>Hirsutella cf. eleutheratorum</i> <i>Paecilomyces farinosus</i> <i>Metarbizium anisopliae</i> <i>Verticillium lecanii</i></p> <p>Inne chrząszcze drapieżne <i>Beauveria bassiana</i> <i>B. brongniartii</i> <i>Hirsutella sp. I</i> <i>Hirsutella sp. II</i> <i>Paecilomyces farinosus</i> <i>P. fumosoroseus</i> <i>Paecilomyces sp. I</i> <i>Paecilomyces sp. II</i> <i>Metarbizium anisopliae</i> <i>Verticillium lecanii</i> <i>Verticillium sp.</i></p>	<p>Pajęczaki (<i>Arachnida</i>) – pająki właściwe (<i>Araneae</i>) <i>Aphanocladium album</i> <i>Beauveria bassiana</i> <i>B. brongniartii</i> <i>Gibellula leiopus</i> <i>G. pulchra</i> <i>Hymenostilbe araneorum</i> <i>Hirsutella araneorum</i> <i>Paecilomyces farinosus</i> <i>Verticillium araneorum</i> <i>V. lecanii</i> <i>Verticillium sp.</i></p> <p>Kosarze – <i>Opiliones</i> <i>B. bassiana</i> <i>Eutomophaga batkoi</i> <i>Paecilomyces farinosus</i> <i>Zoophthora Neop. phalangicida</i> <i>Metarbizium anisopliae</i> <i>Verticillium lamellicola</i> <i>V. lecanii</i></p> <p>Drapieżne roztocze – <i>Acari</i> <i>Aphanocladium album</i> <i>Beauveria bassiana</i> <i>B. brongniartii</i> <i>Conidiobolus chlapowskii</i> <i>Hirsutella gregis</i> <i>H. haptospora</i> <i>H. nodulosa</i> <i>H. rostrata</i> <i>Tarichium sp. ok. 10 gat.</i> <i>Verticillium lamellicola</i> <i>V. lecanii</i> <i>V. psalliotae</i> <i>Zoophthora Neop. cf. dacnusa</i></p>
---	--

gatunki specyficznie związane z grupą wyróżniono pogrubioną czcionką.

razem tego, że warunki otoczenia w wysokim stopniu sprzyjają rozwojowi tych grzybów, są liczne przypadki mikoz innych owadów powodowane przez gatunki *Beauveria* spp., *Hirsutella* spp., *Metarbizium anisopliae*, *Paecilomyces* spp., *Verticillium* spp. i inne oraz obfite ich zarodnikowanie w tych środowiskach. Równie skąpe są donie-

sienia o chorobach skoczogonek (6) powodowanych przez owadomorkowce. Do rzadkości należą przypadki notowania gatunku *Beauveria bassiana* na mszycach, na których powszechnie spotyka się dużą stosunkowo liczbę oligofagicznych owadomorkowców i strzępczaka *Hirsutella aphidis* oraz słabo wybiórcze strzępczaki z kompleksu *Verticillium lecanii*. Natomiast owadomork *Zoophthora* (sg. *Zoophthora*) *aphidis*, jak się wydaje, jest monofagiem tylko na gatunkach mszyc z rodzaju *Anoecia* na dereniach (7). Wąsko oligofagiczny gatunek *Zoophthora* (sg. *Neopandora*) *lipai* zakaża tylko około pięciu gatunków chrząszczy z rodzajów *Rhagonycha*, *Cantharis* i *Malthinus*, z rodziny omomiłkowatych (*Cantharidae*), pomimo że w okresie jego rozwoju pojawia się powszechnie w miejscach jego występowania przynajmniej około 20 gatunków pokrewnych, a wśród nich najpospolitszy *Cantharis fusca*, którego osobniki nie ulegają infekcji. Podobnie maczużnik *Cordyceps entomorrhiza* znajdujący się tylko na osobnikach chrząszczy z rodzajów *Calosoma* i *Carabus* chociaż na badanych stanowiskach występuje bogata fauna innych biegaczowatych, natomiast grzyb ten zaraża również drapieżne pluskwiaki z rodzaju *Himacerus* (8). Przykładów podobnych przytoczyć można bardzo wiele. Ogólną informację o zakresach gospodarzy krajowych grzybów entomopatogenicznych zawarto w tabeli 4, z zastrzeżeniem jednakże, że dla około 50% uwzględnionych w niej gatunków rzadko spotykanych dane te mogą ulegać zmianom w wyniku późniejszych badań. Z drugiej strony, niektóre gatunki o szerokich spektrach potencjalnych gospodarzy zdolne są zarażać również inne bezkręgowce (roztocze, pająki), a także zwierzęta kręgowce i człowieka (jak np. owadomorki *Basidiobolus haptosporus* czy *Conidiobolus coronatus*, strzępczaki *Aspergillus flavus*, *A. fumigatus*, *A. parasiticus* i *Beauveria bassiana*).

Tabela 4

Zakresy zakażanych gospodarzy przez grzyby entomopatogeniczne występujące w Polsce

Monofagi	Polifagi
<i>Conidiobolus gustafssoni</i>	<i>Conidiobolus coronatus</i>
<i>Zoophthora Furia ellisiana</i>	<i>Batkoa apiculata</i>
<i>Z. Zoophthora radicans</i>	<i>Batkoa major</i>
<i>Z. Z. aphidis</i>	<i>Aspergillus</i> sp.
<i>Z. Z. arginis</i>	<i>A. fumigatus</i>
<i>Z. Z. elateridipbaga</i>	<i>Aspergillus</i> sp.
<i>Z. Z. forficulae</i>	<i>Beauveria bassiana</i>
<i>Z. Z. giardii</i>	<i>B. brongniartii</i> * (2 gat. ?)
<i>Z. Z. phyttonomi</i>	<i>Nomuraea rileyi</i>
<i>Hirsutella lecanicola</i>	<i>Metarbizium anisopliae</i>
<i>Ascospaera apis</i>	<i>Paecilomyces farinosus</i>
<i>Cordyceps clavulata</i>	<i>P. fumoso-roseus</i>
<i>C. entomorrhiza</i>	<i>Verticillium lefroyi</i>
<i>C. spbaecocephala</i>	<i>V. lecanii</i>
	<i>Verticillium</i> sp. (nie oznaczony)
oraz 50 gatunków niewystarczająco rozpoznanych	oraz 3 gatunki niewystarczająco rozpoznane

Tabela 4 cd.

Oligofagi	
gospodarze w zakresie rodziny	gospodarze w zakresie rzędu
<i>Conidiobolus destruens</i>	<i>Conidiobolus osmodes</i>
<i>C. obscurus</i>	<i>C. thromboides</i>
<i>Entomophthora muscae</i>	<i>Batkoa papillata</i>
<i>Entomophaga aulicae</i> (gat. zbiorowy)	<i>Zoophthora. Erynia variabilis</i>
<i>E. batkoi</i>	<i>Z. Neopandora ithacensis</i>
<i>E. grylli</i> (gat. zbiorowy)	<i>Z. N. muscivora</i>
<i>E. culicis</i>	<i>Z. N. neoaphidis</i>
<i>E. planchoniana</i>	<i>Z. Zoophthora aphrophorae</i>
<i>E. schizopora</i>	<i>Gibellula leiopius</i>
<i>Eryniopsis caroliniana</i>	<i>G. pulchra</i>
<i>Neozygites fresenii</i>	<i>Hirsutella nodulosa</i>
<i>N. floridana</i>	<i>H. kirchneri</i>
<i>Zoophthora. Erynia conica</i>	<i>H. thompsonii</i>
<i>Z. E. aquatica</i>	
<i>Z. F. gammae</i>	oraz 4 gatunki niewystarczająco rozpoznane
<i>Z. Furia sciarae</i>	
<i>Z. F. virescens</i>	Entomopatogeny akcydentalne
<i>Z. Neopandora dipterigena</i>	
<i>Z. N. echinospora</i>	<i>Conidiobolus macrosporus</i>
<i>Z. N. lipai</i>	<i>Entomophaga conglomerata</i>
<i>Z. Zoophthora bialowiezensis</i>	<i>Basidiobolus ranarum</i>
<i>Hirsutella sphaeridis</i>	<i>Mucor hiemalis</i>
<i>H. subulata</i>	<i>Acremonium larvarum</i>
<i>Cordyceps militaris</i>	<i>Aphanocladium album</i>
<i>C. tuberculata</i>	<i>Fusarium avenaceum</i>
	<i>F. lateritium</i>
oraz 21 gatunków niewystarczająco rozpoznanych	<i>Fusarium</i> sp. (nie oznaczony)
	<i>Verticillium araneorum</i>
	<i>V. lamellicola</i>
	<i>V. psalliotae</i>
	oraz 10 gatunków niewystarczająco rozpoznanych

Prezentowane dotychczas w piśmiennictwie próby klasyfikacji grup grzybowych powodujących choroby stawonogów na podstawie rozpoznania procesów infekcji i opanowywania przez patogena tkanek zakażanego gospodarza pojawiły się w kilku wariantach na początku drugiej połowy bieżącego stulecia i w większości nawiązywały one do schematów stosowanych w medycynie i fitopatologii (9-11). Szczególnie duży wpływ na ich powstanie wywarło dzieło Gäumannna *Pflanzliche Infektionslehre* (12), w którym autor przedstawił całą różnorodność i złożoność powiązań patogenów roślin z zakażanymi gospodarzami oraz środowiskowe uwarunkowania wywołanych przez nie procesów chorobowych, podkreślając różnice in-

terpretacyjne czy nomenklaturowe pomiędzy ujęciami stosowanymi w medycynie i fitopatologii. Nawiązując do tych rozważań Batko (10) przedstawił podział grzybów entomopatogenicznych na pasożyty właściwe i fakultatywne. W pierwszej grupie wydzielił on dwie podgrupy – mianowicie „pasożyty właściwe nieobligatoryjne” zaliczając do nich „większość owadomorków (*Endomophthoraceae*)”, oraz „pasożyty obligatoryjne” – wśród których wymienił owadorostowce (*Laboulbeniales*) i czerwogrzybowce (*Septobasidiales*). W grupie drugiej „pasożytów fakultatywnych *sensu lato*” wydzielił podgrupę „saprofitów o tendencjach pasożytniczych” bliską pojęciowo organizmom roślinnym określanym terminem „parasitic saprophyte” (13) – skupiającą gatunki, które nie wytworzyły samodzielnych mechanizmów infekcji, wykazywały ograniczone zdolności do generalizacji infekcji oraz całkowity niemal brak wybiórczości gospodarza (określony przez autora jako „powinowactwo losowe”). W drugiej natomiast podgrupie „pasożytów fakultatywnych *sensu stricto*” umieścił on gatunki z natury pasożytnicze, dysponujące samodzielnym mechanizmem infekcji, lecz charakteryzujące się zdolnością do normalnego rozwoju również w warunkach saprobiotycznych, w tym na sztucznych pożywkach mineralnych; grupę tę egzemplifikuje autor powszechnie spotykanymi na owadach przedstawicielami rodzajów *Beauveria*, *Metarhizium*, *Hirsutella* i in.

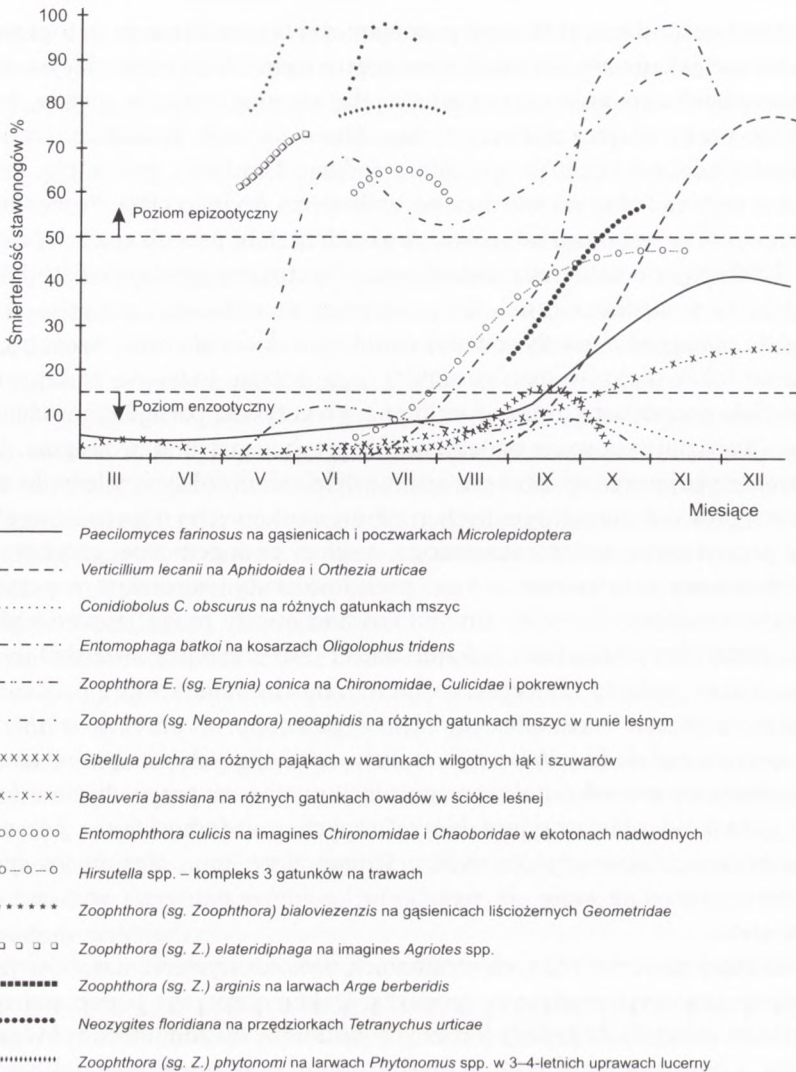
W swym fundamentalnym dziele *Pilzkrankheiten bei Insekten* (11) Müller-Kögler znacznie bardziej zgeneralizował klasyfikację patogenów, traktując jako pasożyty obligatoryjne wszystkie entomopatogeniczne grzyby niższe – w tym owadomorkowce – oraz owadobójcze grzyby workowe wraz z ich anamorfami i grzybami mitosporowymi włączonymi przez Batko do „pasożytów fakultatywnych *sensu stricto*”, natomiast jako pasożyty fakultatywne potraktował tylko grzyby o cechach „saprofitów o tendencjach pasożytniczych” (w ujęciu Batki). Z jego rozważań o *Laboulbeniales* i *Septobasidiales* wynika natomiast, że skłaniał się uznać je raczej za nie szkodzące owadom symbionty.

W późniejszym okresie podejmowane były próby uściślenia lub modyfikowania zasad różnicowania grup patogenów grzybowych, lecz dotychczas nie opracowano uniwersalnej i powszechnie akceptowanej ich klasyfikacji. Trzeba przy tym podkreślić, że wyodrębniane grupy patogenów – poza nielicznymi wyjątkami – nie wykazują wyraźnego związku ani z układem systematycznym grzybów, ani z zakresami zakażanych gospodarzy. Różne kategorie pasożytów „rozrzucone są” niejako w jednostkach taksonomicznych zawierających zarówno formy zoopasożytnicze, jak fitopatogeniczne i saprofityczne, a obok ściśle wybiórczych monofagów występują blisko z nimi spokrewnione oligo- lub polifagi. Jednakże w okresie formułowania przez obu cytowanych autorów opinii o zgrupowaniach entomopatogenicznych grzybów, stan wiedzy wskazywał na większą ich zwartość i podobieństwo biologii w obrębie jednostek systematycznych. Jednakże na podstawie uzyskanych wyników w przeprowadzonych w tym okresie badaniach sformułowano potwierdzoną później prawidłowość, że wzrastającej selektywności patogenów w zakresie doboru gospodarza towarzyszył wzrost infekcyjności oraz wydłużenie się okresu od momentu infek-

cji do śmierci gospodarza (14), czyli pasożytniczej fazy w rozwoju patogena. Szczepły słabo wyspecjalizowanych patogenów, często nawet nie dysponujących możliwościami samodzielnego pokonania bariery jaką stanowi oskórek owada, lecz infekujących go przez miejsca skaleczone (np. *Mucor hiemalis*, *Penicillium brevi-compactum*, prawdopodobnie niektóre gatunki z rodzaju *Fusarium*), powodują śmierć gospodarza w wyniku toksemii wkrótce po wniknięciu do jego ciała. Proces ten odbywa się często przy współdziałaniu również akcydentalnie przenikających bakterii, po czym – konkurując o substrat z saprofitami – patogeny grzybowe zarodnikują już na początku fazy saprotroficznej, nie powodując mumifikacji ciała gospodarza. Do tej kategorii patogenów należy również owadomerek *Conidiobolus coronatus*, a prawdopodobnie także niektóre inne gatunki z tego rodzaju uważane za saprofity. Mumifikacja ciała gospodarza przez wypełnienie go grzybnią patogena uważana jest za jedną z najbardziej typowych oznak chorób grzybowych u stawonogów. U gatunków charakteryzujących się intensywnym wydzielaniem toksyn (należy do nich większość szczepów entomopatogenicznych grzybów workowych i mitosporowych) następuje ona zazwyczaj po śmierci stawonoga, a sploty endogenicznej grzybni stanowią często ich twory przetrwalne – tzw. pseudoskleroty. Natomiast w przypadkach dużej liczby owadomorkowców zmumifikowane owady mogą jeszcze wykonywać agonalne ruchy skrzydłami lub czułkami, nawet jeśli grzyb przytwierdził je już ryzoidami do jakichś podłoży czy części roślin (np. muchy śmietkowate porażone przez *Entomophthora muscae* – complex, sprężyki *Agriotes* spp. – przez *Zoophthora elateridiphaga*, mszyce i wiele in.). Wskazuje to, że w rozwoju tych patogenów faza biotroficzna wydłuża się niemal do okresu sporulacji grzyba. W przypadkach infekcji niektórych gatunków obligatoryjnie biotroficznych owadomorków – jak np. *Entomophaga kansana*, *Entomophthora weberi*, *Strongwellsea* spp., *Massospora* spp. – żyjący jeszcze gospodarz staje się wektorem konidiów patogena wytwarzanych na własnym ciele.

Można tutaj mówić o różnych strategiach wykorzystywania zasobów pokarmowych zakumulowanych w ciele gospodarza. Dokumentowane badaniami ostatnich dziesięcioleci obrazy patogenezu u różnych gatunków owadomorkowców pozostają w zgodzie z hipotezą Batki (14), w myśl której grzyby te ewoluują, jak się wydaje, w kierunku wytworzenia form wysoce wyspecjalizowanego pasożytnictwa nieletalnego. W praktyce oznacza to rozwój w kierunku „oszczędnej” – lub raczej bardziej racjonalnej – eksploatacji zasobów potencjalnych gospodarzy; w odniesieniu do fitopatogenów element ten wielokrotnie podkreślał Gäumann (12). Zakresy gospodarki większości gatunków entomopatogenicznych workowców oraz ich anamorf – zwłaszcza *Hirsutella*, *Gibellula*, *Aschersonia* i pokrewnych – są na ogół również bardzo ograniczone.

Patogeny bardziej selektywne pod względem doboru gospodarzy charakteryzują się w większości wyższym potencjałem epizootologicznym (rys. 1), który najsilniej uwidacznia się u monofagicznych lub wąskooligofagicznych owadomorków, zwłaszcza w rodzaju *Entomophaga* oraz podrodzaju *Zoophthora* w rodzaju *Zoophthora*. Przy-



Rys. 1. Pojawy niektórych gatunków grzybów entomopatogennych w sezonie wegetacyjnym wyrażone śmiertelnością gospodarza.

padki chorób powodowanych przez entomopatogenne gatunki z rodzaju *Conidiobolus* oraz przez grzyby mitosporowe utrzymują się na poziomie 2-3% rzadko przekraczając 10% w odniesieniu do bezwzględnej gęstości populacji gospodarzy. Selektywność poszczególnych gatunków lub szczepów w zakresie doboru gospodarzy stanowi tylko jeden spośród elementów składających się na obraz chorobotwórczej specjalizacji. Większość z nich ujawniana jest dopiero w wyniku szczegółowych analiz przebiegu poszczególnych faz procesu chorobowego i wiąże się ze środowiskowy-

mi oraz biochemicznymi jego uwarunkowaniami, głównie poprzez enzymatyczną i toksyczną aktywność patogenów i immunologiczne reakcje gospodarzy.

4. Infekcja

Proces chorobowy zaistnieć może tylko w warunkach środowiskowych umożliwiających aktywny rozwój patogena. Rozpoczyna się on w momencie bezpośredniego kontaktu jednostki infekcyjnej patogena (którymi są najczęściej zarodnik, strzępka kielkowa lub apresorium) z ciałem stawonoga, zwanego gospodarzem. Nie oznacza to jednak, że w każdym przypadku takiego kontaktu dochodzi do rozwoju choroby. Z zebranych informacji dotyczących czynników warunkujących przyczepność grzybów entomopatogenicznych do ich gospodarzy (15) wynika, że składniki chemiczne obecne na powierzchni i w zewnętrznych warstwach zarówno ściany komórkowej zarodnika jak i oskórka powierzchniowego gospodarza pośredniczą w interakcjach pomiędzy zarodnikiem a oskórkiem poprzez złożone systemy rozpoznawania substratów. Dzięki nim początkowo, często tylko akcydentalny, wynikający ze zjawisk elektrostatycznych lub hydrofobowych kontakt powierzchniowy, może być ze strony patogena wzmacniany przez wydzielanie substancji lepkich i specyficznych związków biologicznie aktywnych – jak np. kwasy organiczne, glikoproteiny czy enzymy. Zmieniają one chemizm lipidów epikutularnych ścian komórkowych lub struktury oskórka, co przy równoczesnym wytwarzaniu morfoanatomicznych struktur grzybniowych, jak strzępki kielkowe, apresoria, wyrostki infekcyjne, ułatwiają penetrację patogena do hemocelu (16). U gatunku *Metarhizium anisopliae* stwierdzono istnienie specyficznego mechanizmu przekazywania sygnałów za pośrednictwem białek G i cykazy adenylanowej (17). W przypadkach grzybowych chorób owadów udział enzymów w procesie infekcji rozpoznany został w pierwszej połowie XX w., przy czym pierwotnie główną rolę przypisywano enzymom chitynolitycznym. Dopiero pełniejsze rozpoznania składu chemicznego oskórka owadów oraz w przeprowadzonych badaniach enzymatycznej aktywności licznych gatunków grzybów entomopatogenicznych poczynając od lat siedemdziesiątych (18-26) wykazano kompleksowy charakter oddziaływania różnych enzymów i innych związków biologicznie czynnych w procesie chorobowym, odpowiednio do pojawiających się barier ochronnych i reakcji odpornościowych gospodarza (27-29). Pierwszą barierą chroniącą gospodarza przed infekcją patogenów są zazwyczaj woski epikutularne oskórka powierzchniowego, stanowiące mieszaniny węglowodorów, kwasów tłuszczowych, triacylgliceroli, estrów i alkoholi. Już około połowy lat pięćdziesiątych stwierdzono, że wchodzące w ich skład kwasy tłuszczowe, zwłaszcza o krótkich łańcuchach węglowych – jak np. kwasy sorbowy, walerianowy, kaprylowy, pelargonowy – są toksyczne dla grzybów lub ograniczają ich kiełkowanie i wzrost (30, 31), natomiast niektóre wyższe kwasy tłuszczowe – zwłaszcza kwas oleinowy – działają stymulująco na rozwój grzybni (32). Lecuona i wsp. (24) stwierdzili, że węglo-

wodory występujące w woskach epikutylarnych gąsienic *Ostrinia nubilalis* są bardzo podatne na degradację powodowaną przez grzyby *B. bassiana* i *B. brongniartii*. W ciągu sześciu godzin po naniesieniu zarodników na oskórek larw ilości izolowanych węglowodorów uległy zmniejszeniu 6,6-krotnemu w przypadku pierwszego gatunku i 8,8-krotnemu w przypadku drugiego. Substancje śluzowate zarodników niektórych gatunków grzybów entomopatogenicznych, wydzielane jeszcze przed kiełkowaniem na oskórku owadów, zawierają esterazy oraz enzymy lipolityczne, proteolityczne i chitynolityczne modyfikujące skład chemiczny napowierzchniowych warstw oskórka. Bidochka i Khachatourians (33) wykazali, że niektóre kwasy organiczne – w tym również wytwarzane przez grzyb *B. bassiana* – powodowały degradację oskórka w stopniu wyższym niż kwas solny czy siarkowy. Potraktowanie tymi kwasami oskórka owadów testowych przed infekcją zarodnikami wymienionego gatunku grzyba powodowało przyspieszenie śmierci osobników zarażanych, wyrażające skróceniem czasu LT_{50} średnio z 7,33 do 3,88 dni w przypadku kwasu cytrynowego oraz z 13,28 do 5,08 dni w przypadku kwasu szczawiowego, podczas gdy kwas solny nie spowodował zmian w stosunku do próby kontrolnej. Także z badań prowadzonych przez innych autorów wynika, że kwasy organiczne oraz nadtlenek wodoru, wytwarzane w inicjalnych fazach kontaktu konidiów z gospodarzem, mogą przyczynić się do zmiękczenia oskórka i ułatwiać przenikanie strzępki kiełkowej. St. Leger i wsp. (34) określili strukturę nukleotydu nazwanego *starvation stress gene* (SSGA) mającego wiele cech wspólnych z białkami ścian komórkowych grzyba *Metarhizium anisopliae* z klasy hydrofobin. Wtórne elementy jego budowy chemicznej wykazują podobieństwo do niskocząsteczkowych toksyn i aglutynin. Przypuszcza się, że pod wpływem niedoboru składników pokarmowych w okresie tworzenia apesoriów mogą one wspomagać działanie enzymów degradujących komponenty epikutyki.

Enzymom proteolitycznym, lipolitycznym i chitynolitycznym przypisuje się największe znaczenie w procesie infekcji. Tak np. według St. Legera (35) głównym determinantem patogeniczności grzyba *Metarhizium anisopliae*, jak się wydaje, jest proteaza oznaczona symbolem Pr1 – zwana również chymoelastazą. Wskazuje na to duża produkcja oraz towarzyszący jej wysoki stopień degradacji oskórka owadów. Pr1 jest endoproteazą serynową; wykazuje ona szerokie spektrum aktywności w odniesieniu do szeregu protein (kazeina, elastyna, albumina z surowicy wołowej, kolagen) oraz do oskórka owadów. W testach prowadzonych na oskórku *Manduca sexta* dodatek łatwo przyswajalnych składników pokarmowych (np. alaniny) stymulował wzrost grzybni *M. anisopliae*, ale hamował przerastanie strzępek przez epikutylę oraz syntezę Pr1. Podobne proteazy uzyskano z filtratów pochodzących innych grzybów entomopatogenicznych – np. *Aschersonia aleyrodis*, *Beauveria bassiana*, *Nomuraea rileyi*, *Verticillium lecanii* i in. Liczne są wśród nich izoenzymy kwaśne, podobne pod względem pierwotnej specyficzności do Pr1, lecz nie degradują one elastyny. Proteaza wytwarzana przez szczep *B. bassiana* (36) wykazywała duże podobieństwo do Pr1, lecz była znacznie mniej aktywna w stosunku do albuminy z surowicy

wołowej i kolagenu. Na podstawie badań hydrolizy substratów ekstracelularne proteazy grzybów entomopatogenicznych mogą być klasyfikowane jako elastazy lub kolagenazy. Kolagenazę wytwarzają również szczepy owadomorka *Conidiobolus obscurus* – patogena mszyc. Bidochka i Khachatourians (37) uważają, że adsorpcja proteaz na proteinach oskórka owadów zabezpiecza raczej powierzchnię, przez którą nastąpić może przerastanie grzybni niż głęboka dyfuzja enzymu. Większość badaczy uważa, że aktywność proteolityczna poszczególnych szczepów grzybów entomopatogenicznych jest skorelowana z ich wirulencją, podczas gdy w odniesieniu do aktywności lipolitycznej i chitynolitycznej stanowiska są rozbieżne.

Pochodne rozkładu protein przez Pr1 peptydy są w dalszych etapach degradowane przez aminopeptydazę N oraz postprolinową aminopeptydazę IV wytwarzane przez *M. anisopliae*, służąc grzybowi jako substancja pokarmowa. Glikozydazy biorą udział w przechwytywaniu substancji odżywczych z hemolimfy natomiast w tym samym czasie proteiny mogą funkcjonować jako toksyny. Przypuszcza się również, że enzymy patogena mogą być włączane do detoksykacji chemicznej obrony gospodarza lub zakłócać wewnętrzną równowagę jego systemu fenoloksydazy oraz koncentracji hormonów. Wobec wielości czynników warunkujących metabolizm stawonogów oraz dużego zróżnicowania przebiegu procesu chorobowego w przypadkach infekcji, zjawiska te są jeszcze niewystarczająco rozpoznane. Doskonalone w szybkim tempie techniki analityczne umożliwiają jednakże rozpoznawanie roli różnych enzymów i innych metabolitów w tych procesach, co znajduje swój wyraz w lawinowo narastającym w ostatnich latach piśmiennictwie.

St. Leger i wsp. (26), badając zmienność alozymów u 120 szczepów *Metarhizium* spp. z różnych gatunków gospodarzy i z kilku regionów geograficznych wyodrębnili 48 genotypowych grup izolatów. Ich zróżnicowanie – zdaniem autorów – wskazuje na istnienie w obrębie szczepów dotychczas określanych jako *M. anisopliae* 5 odmian oraz 2 nie opisanych i na podstawie morfologii nie odróżnialnych gatunków. W pewnych zakresach podobieństwa genetyczne wykazują zbieżność z regionalnym pochodzeniem szczepów. Tego rodzaju analizy mogą być przydatne dla uściślenia taksonomii grzybów entomopatogenicznych, co w odniesieniu do gatunków *Beauveria bassiana* i *Tolypocladium* spp. sugerują również Rakotonirainy i wsp. (38), a do workowca *Ascospaera apis* Gilliam i Lorenz (39).

5. Aktywność toksyczna patogenów grzybowych

Enzymatyczna perforacja oskórka i przeniknięcie grzybni do jamy ciała gospodarza rozpoczyna postinfekcyjną fazę rozwoju patogena. Wewnątrz gospodarza grzybnia rozwija się bądź w postaci strzępkowej zwłaszcza u słabych, okolicznościowych patogenów, lub w formie blastospor albo ciał strzępkowych. W fazie opanowywania przez grzybnię tkanek i organów gospodarza najwięcej uwagi poświęca się peptydom cyklicznym i depsypteptom. Do najlepiej rozpoznanych należą cy-

klodepsypeptydy wytwarzane przez strzępczaki *B. bassiana* i *M. anisopliae*. Beauverycyna i bassianolid są silnymi antybiotykami i mają właściwości jonoforetyczne (40). Bassianolid w ilości 1-6 µg powodował utratę zdolności poruszania się przez gąsienice *Heliothis zea*, podczas gdy beauverycyna nie wykazywała efektu toksycznego w podobnych dawkach i nie stwierdzono jej obecności w zakażonych gąsienicach. Depsypeptydy *M. anisopliae* określa się ogólną nazwą destruksyn. Nie wykazują one właściwości antybiotycznych i jonoforetycznych, natomiast wiele z nich działa toksycznie na gąsienice motyli i dorosłe muchówki. W prowadzonych od połowy lat osiemdziesiątych badaniach (22,41,42) wykazano, że destruktyny A, B i E, z których ostatnia jest najsilniej toksyczna, w bardzo niskich nawet stężeniach powodowały obumieranie larw komarów oraz imagines *Drosophila* sp. i *Musca* sp. U gąsienic *Galleria mellonella* oraz w komórkach *Bombyx mori* i *Lymantria dispar* hodowanych *in vitro* wywoływały zmiany w jądrach komórkowych, degradację mitochondriów, powiększenie objętości reticulum plazmatycznego oraz zmiany w hemocytach granulowanych, które spełniają szczególną rolę w kształtowaniu odporności komórkowej gospodarza. W warunkach *in vitro* mykotoksyny te powodowały łatwiejsze przerastanie strzępek z granulom enkapsularnych, co oznacza, że mogą one spełniać funkcję immunomodulatorów. Niskie dozy destruksyn zdolne są ograniczać syntezę RNA i DNA oraz białek, jak również replikację wirusów w hodowanych hemocytach owadów. U infekowanych gąsienic powodowały one objawy tężcowe i paraliż mięśni, co najprawdopodobniej wywołane było depolaryzacją błon komórkowych w wyniku otwarcia kanałów przepływowych wapnia (26). U dorosłych much *Calliphora vicina* destruksyny powodowały zwiększenie aktywności osobników w ciągu kilku dni po infekcji i bardzo silne ograniczenie pobierania pokarmu. Dotychczas zidentyfikowano ponad 20 różnych destruksyn, a niektóre spośród nich wytwarzane są również przez inne gatunki grzybów.

Ważną grupą depsypeptydów są cyklosporyny (cykliczne undekapeptydy), wytwarzane przez wiele mikroorganizmów, w tym także grzybów entomopatogennych w rodzajów *Beauveria*, *Tolyposcladium*, *Verticillium* i innych (43). Związki te charakteryzują się działaniem immunosupresyjnym, obniżając reakcje obronne gospodarza wobec patogena. Niskie dawki cyklosporyny wytwarzanej przez *Tolyposcladium inflatum* powodowały śmierć komarów. W ostatnich latach stwierdzono, że w hemolimfie *Galleria mellonella* występują białka o ciężarze cząsteczkowym ok. 80 i 200 kDa zwane lipoforynami, posiadające zdolność wiązania cyklosporyny A i magazynowania jej w ciele tłuszczowym (44).

Stosunkowo niedawno wydzielone zostały z grzybni *Tolyposcladium niveum* efrapeptyny, których skład chemiczny określili Krasnoff i wsp. (45). Związki te znane były od początku lat siedemdziesiątych jako silne inhibitory ATPaz bakteryjnych, mitochondrialnych i chloroplastowych w różnych organizmach. Podawane peroralnie z pokarmem przedziorkom *Tetranychus urticae*, larwom i chrząszczom *Leptinotarsa decemlineata* oraz gąsienicom *Spodoptera eridania* i *Heliothis virescens* wykazywały silny efekt toksyczny w ilościach od 100 do 1000 ppm, natomiast testowane na inhibi-

cję ATPazy mitochondrialnej grzybów *M. anisopliae* i *T. niveum* oraz muchy domowej wykazały ponad 95-procentowe ograniczenie jej aktywności w stężeniach 1 µg.

Poza stwierdzonymi lub przypuszczalnymi przypadkami toksycznego oddziaływania niektórych enzymów grzybowych na owady, tylko nieliczne inne związki wysokocząsteczkowe wykazują właściwości trujące. Do takich należą wytwarzana przez gatunek *Hirsutella thompsonii* hirsutellina A oraz stwierdzona w filtratach z hodowli *Beauveria sulfurescens* glikoproteina z oligomannozydowymi łańcuchami węglowodanowymi (46,47).

Stosunkowo liczne gatunki grzybów mitosporowych, w zasadzie saprofitycznych, lecz okazyjnie zarażających owady (*Fusarium* spp., *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus*), wytwarzają aflatoksyny (40). U owadów mogą one powodować zmniejszenie wymiarów ciała, ograniczenie płodności lub sterylność i opóźnienie przepotwarzania. Według badań Drummond i Pinnock (48) obumieranie czerwców *Saccharicoccus sacchari* powodowały szczepy *A. parasiticus* zarówno wytwarzające, jak i nie wytwarzające aflatoksyn, ale przypuszcza się, że związki te mogą być czynnikami synergistycznymi w procesach chorobowych.

6. Odporność na infekcję i zjawiska immunologiczne

Istotnymi elementami procesu chorobowego już od wczesnych faz infekcji stawonogów przez patogeniczne mikroorganizmy są reakcje obronne i odpornościowe gospodarzy. Wspomniane strukturalne bariery w oskórku i ekskrecje chemiczne na jego powierzchni istnieją i funkcjonują niezależnie od występowania i rodzajów patogenów w środowisku. Potencjalną zdolność do pokonania tych barier określa się jako infekcyjność i dzieli ona mikroorganizmy na patogeniczne i niepatogeniczne względem określonego gospodarza. Cecha ta jest jednakże silnie modyfikowana przez wiele czynników zewnętrznych, z których najważniejszymi są temperatura, wilgotność, insolacja, chemizm i obecność mikroorganizmów antagonistycznych w otoczeniu. Pokonanie tych barier rozpoczyna fazę generalizacji patogena wewnątrz gospodarza, której towarzyszą mniej lub bardziej specyficzne reakcje obronne. Vey i Götz (49) wyróżniają wśród nich fagocytozę, enkapsulację komórkową, melanizację oraz chemiczne reakcje detoksykacyjne.

Fagocytoza ma miejsce w środowisku płynnym jamy ciała gospodarza jeśli grzyby rozwijają się w formie blastospor. Polega ona na pochłanianiu ciał obcych, w tym zwłaszcza blastospor lub odcinków strzępek patogena przez kilka rodzajów krwinek zwanych fagocytami. Shi-Yih Hung i Boucias (50) przebadali szczegółowo reakcję fagocytarną gąsienic *Spodoptera exigua* na zakażenie blastosporami *B. bassiana*, wyrażając przypuszczenie, że pochłonięte przez granulocyty i plazmocyty blastosporę patogena stanowią ogniska infekcyjne wewnątrz gospodarza. Pozwala ona zazwyczaj wyeliminować tylko bardzo słabe patogeny o niewielkiej zdolności namnażania się wewnątrz gospodarza. Zjawiska enkapsulacji komórkowej rozpoznane zo-

stały w wielu przypadkach infekcji grzybowych. Polegają one na otaczaniu struktur grzybninowych grubymi warstwami hemocytów, często z wypełnieniem przestrzeni międzykomórkowych polisacharydami lub kolagenem, w wyniku czego tworzone są granulomy o kształtach zbliżonych do subsferycznych lub owoidalnych, z grzybnią „zamkniętą” w ich wnętrzach. W poszczególnych warstwach granulom występować mogą hemocyty zróżnicowane morfologicznie. W przypadkach typowych grzybów entomopatogenicznych otoczone w granulomach blastospori lub strzępki zachowują zdolność wzrostu i wytwarzania toksyn, które z kolei obniżają potencjał odpornościowy gospodarza (51). Melanizacja jest efektem działania fenoloxydaz, poprzez transformację związków fenolowych w melaniny. Przemiany te zachodzą zwykle równoległe z enkapsulacją hemocytową prowadząc do melanizacji granulom, jednakże znane są przypadki tworzenia kapsuł melaninowych na elementach grzybni również bez bezpośredniego udziału hemocytów (52). Chociaż wiadomo, że melaniny ograniczają wytwarzanie enzymów przez drobnoustroje oraz mają właściwości fungistatyczne, to jednak w przypadkach infekcji powodowanych przez wirulentne szczepy grzybów entomopatogenicznych zazwyczaj nie zapobiegają rozwojowi choroby.

Wobec stwierdzenia, że metabolity grzybów entomopatogenicznych obniżają (53) efekty odpornościowych reakcji gospodarzy, w ostatnich kilkunastu latach powstały wątpliwości, czy cykliczne depsyptydy w tym zwłaszcza destruksyny działają bezpośrednio toksycznie na gospodarza, czy też – podobnie jak cyklosporyny – blokują jego zdolności do przeciwstawiania się rozwojowi patogena (45).

7. Wykorzystanie grzybów entomopatogenicznych w biotechnologiach

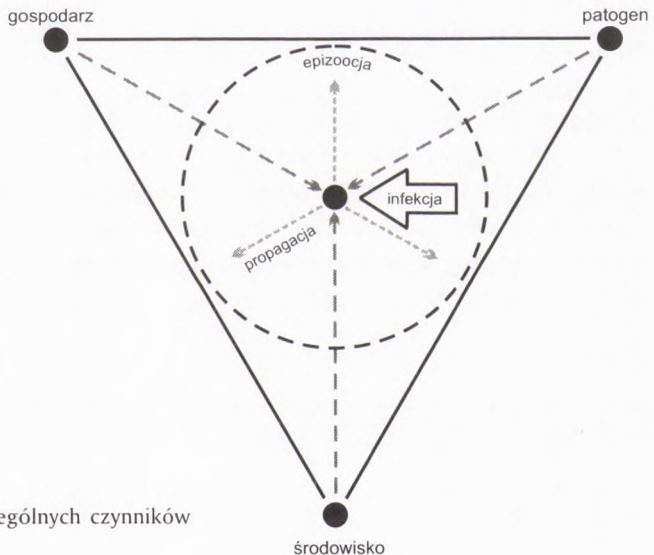
W przedstawionych nielicznych tylko przykładach biochemicznych uwarunkowań procesu chorobowego w przypadkach grzybowych infekcji stawonogów wskazuje się z jednej strony na znacznie większą różnorodność biologiczną patogenów niż wynikałoby to tylko z rozpoznawanych na podstawie morfologicznego zróżnicowania gatunków patogenów, a z drugiej na olbrzymią plastyczność zarówno patogenów jak i gospodarzy we wzajemnych oddziaływaniach. Aspekty biochemiczne nie są jednakże jedynymi czynnikami warunkującymi możliwość zaistnienia procesu chorobowego lub jej brak. Podatność chorobowa gospodarza determinowana jest przez jego stan fizjologiczny, zróżnicowanie wrażliwości poszczególnych stadiów rozwojowych, bariery ochronne, reakcje odpornościowe, charakter zgrupowań oraz biologiczną różnorodność w środowisku. Ze strony patogena warunkami koniecznymi są – infekcyjność i agresywność w stosunku do gospodarza, odpowiednio wysoki potencjał reprodukcyjny, specjalizacja pasożytnicza obejmująca również czasowe – fenologiczne – dostosowanie okresu sporulacji do pojawu wrażliwych na infekcję osobników gospodarza oraz odpowiednio wysoka tolerancja na zmienność warunków zewnętrznych. Uwarunkowania środowiskowe przejawiają się głównie poprzez czasowo-przestrzen-

ne zróżnicowanie czynników mikroklimatycznych, wpływ na stan fizjologiczny gospodarza i patogena – również poprzez oddziaływania synergistyczne, jak np. infekcje mieszane, niedobór pokarmu, przesuszenie środowiska, uszkodzenia tkanek gospodarza przez drapieżców i pasożyty – oraz sposoby i drogi rozprzestrzeniania materiału infekcyjnego. Według tego schematu (rys. 2) kształtowana była – do niedawna jedyna – koncepcja wykorzystania patogenicznych grzybów w praktyce, zwłaszcza rolniczej.

Wobec nieuchronnej konieczności zwiększania stopnia integracji różnych zabiegów – zarówno ochronnych jak i agrotechnicznych – celem ograniczania szkód w uprawach (54), aktualnie mówić już można o przynajmniej trzech różnych sposobach, które mogą być stosowane łącznie lub zamiennie. Są nimi mianowicie:

- przedstawiony już, o charakterze ogniskowego inicjowania epizootji, który zresztą funkcjonuje również w układach naturalnych;
- masowe, wielkopowierzchniowe zagęszczanie biotechnologicznie wytworzonego w formie biopestycydów materiału infekcyjnego w zagrożonych uprawach;
- wprowadzanie naturalnych względnie biotechnologicznie modyfikowanych substancji czynnych, wzorowanych na rozpoznanych elementach procesu chorobowego u stawonogów – aktualnie w fazie prac badawczych;
- stwarzanie warunków środowiskowych sprzyjających utrzymaniu dużej różnorodności patogenów przez ochronę ich ostoi i kształtowanie zróżnicowanych struktur krajobrazowych na obszarach rolniczych.

W przeciwieństwie do dwóch pierwszych koncepcji zakładających wykorzystanie tylko nielicznych gatunków patogenów wysoce wirulentnych lub o szerokich spektrach zakażanych gospodarzy, dwie ostatnie zmierzają do wykorzystania całych zespołów gatunków, których utrzymanie w krajobrazie jest możliwe.



Rys. 2. Oddziaływanie poszczególnych czynników w procesie chorobowym.

Grzyby entomopatogeniczne są jednakże przedmiotem zainteresowania nauki nie tylko ze względu na ich rolę w procesach biocenotycznej regulacji populacji stawonogów oraz jako źródeł i wzorców biosyntezy środków do zwalczania szkodliwych stawonogów. Specyfika i różnorodność ich biochemicznych oddziaływań z owadami oraz bogactwo wytwarzanych substancji biologicznie czynnych stanowi przyczynę zainteresowania nimi również farmakologii i nauk medycznych. Wprawdzie dotychczas z grzybów tych wydzielono niezbyt dużą liczbę antybiotyków, są jednakże wśród nich substancje o bardzo specyficznym działaniu, jak chociażby ograniczająca wzrost guzów nowotworowych i syntezę RNA kordycepina (55,56), czy wspomniane cyklosporyny. Z licznych opracowań wiadomo, że niektóre gatunki maczuźników były od wieków stosowane w celach leczniczych (57,58). Ponieważ tylko niewielka liczba gatunków grzybów entomopatogenicznych poddawana była dotychczas szczegółowym badaniom biochemicznym ukierunkowanym na aspekty farmakologiczne, można oczekiwać, że grupa ta kryje w sobie jeszcze duże nie rozpoznane zasoby środków przydatnych dla medycyny, a najprawdopodobniej również dla niemedycznych biotechnologii (59).

Poszerzanie studiów nad fizjologią, biochemią i genetyką grzybów entomopatogenicznych ma jeszcze jeden niezmiernie ważny wymiar zarówno naukowy jak i praktyczny. Uzyskiwane przy zastosowaniu najnowszych technik badawczych bardzo dogłębne rozpoznania struktur morfoanatomicznych i genetycznych oraz procesów fizjologicznych dostarczają wielu danych pozwalających weryfikować i korygować stosowane dotychczas klasyfikacje taksonomiczne tych oraz pokrewnych organizmów, grupowanych w przeszłości głównie na podstawie podobieństw morfologii i ontogenezy. Dzięki temu cechy takie jak skład i elektroforetyczna mobilność enzymów, czy zwłaszcza oparte na PCR analizy zgrupowań według podobieństwa sekwencji kwasów nukleinowych, zyskują rangę kryteriów taksonomicznych pozwalających określić rzeczywiste genetyczne pokrewieństwo szczepów, gatunków oraz ich zgrupowań. Obok szeroko już stosowanego doskonalenia systemów klasyfikacyjnych organizmów, wyniki tych badań mają perspektywicznie olbrzymie znaczenie praktyczne dla inżynierii genetycznej, a grzyby entomopatogeniczne stanowią bardzo atrakcyjne obiekty takich badań. Dla ich właściwego rozwoju konieczne jest jednakże stworzenie warunków do podejmowania zintegrowanych, na wzór niektórych ośrodków zachodnich, wielodyscyplinarnych programów badawczych, jakie przy aktualnie istniejących zasadach finansowania badań w Polsce nie mogą być realizowane, ze szkodą dla wykorzystania dotychczasowych osiągnięć.

Literatura

1. Bałazy S., (1993), *Flora of Poland. Fungi (Mycota)*, 24, Entomophthorales, 356, Pol. Acad. Sci., W. Szafer Institute of Botany, Kraków.
2. Scheloske H. W., (1969), *Parasitol. Schriftenr.*, 126, 1-176.
3. Majewski T., (1994), *The Laboulbeniales of Poland*, Polish Botanical Studies, 7, 466, Pol. Acad. Sci., W. Szafer Institute of Botany, Kraków.

4. Bassi A., (1835), *Del mal del segno, calcinaccio o moscardino, malattia che affligge i bachi da sta e sul modo di liberarne le bigattaje onche le pin infestate*, Parte prima. Teoria. Orcesi, Lodi, XI + 67.
5. Lipa J. J., (1963), *Prace Nauk. Inst. Ochr. Rośl.*, 5 (1), 3-100.
6. Steenberg T., Eilenberg J., Bresciani J., (1996), *J. Invertebr. Pathol.*, 68, 99-100.
7. Remaudière G., Hennebert G. L., (1980), *Mycotaxon*, 11, 269-321.
8. Bałazy S., (1986), *Acta Mycol.*, 18, 231-238.
9. Müller-Kögler E., Huger A., (1960), *Z. Angew. Entomol.*, 45, 421-429.
10. Batko A., (1961), *Specjalizacja pasożytnicza grzybów owadobójczych a ich zastosowanie w biologicznej metodzie ochrony roślin (maszynopis)*.
11. Müller-Kögler E., (1965), *Pilzkrankheiten bei Insekten*, 444, Paul Parey, Berlin und Hamburg.
12. Gäumann E., (1951), *Pflanzliche Infektionslehre*, 681 pp., Birkhäuser, Basel.
13. Carpenter J. R., (1956), *An ecological glossary*, 306, Hafner Publ. Co., New York.
14. Batko A., (1974), *Ewolucja biologiczna. Szkice teoretyczne i metodologiczne*, red. Nowiński C., 209-305, Ossolonicum, Wrocław-Warszawa-Kraków-Gdańsk.
15. Boucias D.G., Pendland J. C., (1991), *The fungal spore and disease initiation in plant and animals*, Eds. Cole G. T., Hoch H. C. J., 101-127, Plenum Press, New York.
16. St. Leger R. J., Goettel M., Roberts D. W., Staples R. C., (1991), *J. Invertebr. Pathol.*, 58, 168-179.
17. St. Leger R. J., Butt T. M., Goettel M. S., Staples R. C., Roberts D. W., (1989), *Exp. Mycol.*, 13, 274-288.
18. Leopold H., Samšinakova A., Mišikova S., (1973), *Zbl. Bakt. Abt. II, Bd. 128*, 31-41.
19. Lokey K. H., (1980), *Comp. Biochem. Physiol.*, 65, 457-462.
20. Blomquists G. J., Nelson D. R., Mertxe De Renobables J., (1987), *Arch. Insects Biochem. Physiol.*, 6, 227-265.
21. St. Leger R. J., Roberts D. W., Staples R. C., (1990), *Arch. Microbiol.*, 154, 518-520.
22. Samuels R. M., Reynolds S. E., Charnley A. K., (1988), *Comp. Biochem. Physiol.*, C, 90, 403-412.
23. Charnley A. K., S. Leger R. J., (1991), *The role of cuticle degrading enzymes in fungal pathogenesis in insects*, Eds. Cole G. T., Hoch H. C., 267-286, Plenum Press, New York.
24. Lecuona R., Riba G., Cassier P., Clement J. L., (1991), *J. Invertebr. Pathol.*, 58, 10-18.
25. Gupta S. C., Leathers T. D., El-Sayed G. N., Ignoffo C. M., (1992), *Exp. Mycol.*, 16, 132-137.
26. St. Leger R. J., May B., Allee L. L., Frank D.C., Staples R. C., Roberts D. W., (1992), *J. Invertebr. Pathol.*, 60, 89-101.
27. Dumas C., Robert P., Pais M., Vey A., Quiot J. M., (1994), *Comp. Biochem. Physiol.*, C, 108, 195-203.
28. Smith R. J., Grula E. A., (1982), *J. Invertebr. Pathol.*, 39, 15-22.
29. Dunphy G. B., Nolan R. A., (1982), *J. Invertebr. Pathol.*, 39, 81-92.
30. Butt T. M., (1990), *Vth Intern. Colloq. Invertebr. Pathol. Microb. Control., Proc. Abstr. Adelaide*, 121-124.
31. Szafranek B., Synak E., Maliński E., Nawrot J., Sosnowska D., Winiecki Z., Szafranek J., (1997), *Insects – chemical, physiological and environmental aspects*, Eds. Konopińska D., Goldsworthy G., Nachman R., Nawrot J., Orchard I., Rosiński D., 26-38, University of Wrocław.
32. St. Leger R. J., Staples R. C., Roberts D. W., (1992), *Gene*, 120, 119-124.
33. Urbańczyk M. J., Zabża A., Bałazy S., Peczyńska-Czoch W., (1992), *J. Invertebr. Pathol.*, 59, 250-257.
34. Bidochka M. J., Khachatourians G. G., (1991), *J. Invertebr. Pathol.*, 58, 106-117.
35. St. Leger R. J., (1990), *Vth Intern. Colloq. Invertebr. Pathol. Microb. Control., Proc. Abstr., Adelaide*, 308-312.
36. Bidochka M. J., Khachatourians G. G., (1987), *Appl. Environm. Microbiol.*, 1679-1684.
37. Bidochka M. J., Khachatourians G. G., (1994), *J. Invertebr. Pathol.*, 63, 7-13.
38. Rakotonirainy M. S., Dutertre M., Brygos Y., Riba G., (1991), *J. Invertebr. Pathol.*, 57, 17-22.
39. Gilliam M., Lorenz B. L., (1993), *Apidologie*, 24, 19-23.
40. Charnley A. K., (1990), *Vth Intern. Colloq. Invertebr. Pathol. Microb. Control., Proc. Abstr., Adelaide*, 303-307.
41. Vey A., Quiot J. M., Vago C., (1987), *C. R. Acad. Sci. Paris*, t. 304, Ser. III, (9), 229-234.
42. Vey A., Quiot J. M., (1989), *Canad. J. Microbiol.*, 35, 1000-1008.

43. Jegorov A., Matha V., Weiser J., (1990), *Microbios-Letters*, 45 (178), 65-69.
44. Vilcinskas A., Kopacek P., Jegorov A., Vey A., Matha V., (1997), *Comp. Biochem. Physiol. – C*, 117 (1), 41-45.
45. Krasnoff S. B., Gupta S., S. Leger R. J., Renwick J. A. A., Roberts D. W., (1991), *Invertebr. Pathol.*, 58, 180-188.
46. Mollier P., Lagnel J., Fournet B., Aïoun A., Riba G., (1994), *J. Invertebr. Pathol.*, 64, 200-207.
47. Vey A., Quiot J. M., Mazet I., McCoy C. W., (1993), *J. Invertebr. Pathol.*, 61, 131-137.
48. Drummond J., Pinnock D. E., (1990), *J. Invertebr. Pathol.*, 55, 332-336.
49. Vey A., Götz P., (1986), *Hemocytic and humoral immunity in arthropods*, Ed. Gupta A.P., 4, 89-115, J. Wiley and Sons. Inc.
50. Shi-Yich Hung, Boucias D. G., (1992), *J. Invertebr. Pathol.*, 60, 152-158.
51. Vey A., Quiot J. M., Vago C., Farques J., (1985), *C. R. Acad. Sci. Paris*, t. 300, Ser. III, (17), 647-651.
52. Butt T. M., Wraight S. P., Galaini-Wraight S., Humber R. A., Roberts D. W., Soper R. S., (1988), *J. Invertebr. Pathol.*, 52, 49-56.
53. Huxham I. M., Lackie A. M., McCorkindale N. J., (1989), *J. Insect Physiol.*, 35, 97-105.
54. Lipa J. J., (1998), *Wiad. Entomol.*, 17 (Suppl.), 51-77.
55. Mahy B. W., Cex N. J., Armstrong S. J., Barry R. D., (1973), *Nature New Biology*, 243, (127), 172-174.
56. Jagger D. V., Kredich N. M., Guarino A. J., (1961), *Cancer Res.*, 21, 216-220.
57. Catlerigae R., Srinivasan K. S., Maiti P. C., (1957), *J. Amer. Pharm. Assoc., Sci. Ed.*, 46, 114-118.
58. Kobayasi Y., Shimizu D., (1963), *Bull. Nat. Sci. Mus.*, 6 (3), 286-314.
59. Gloer J. B., (1997), *The Mycota, IV. Environmental and Microbial Relationships*, Eds. Wicklow D.T., Söderström J.K., 249-268, Springer Verlag, Berlin-Heidelberg.