

Toksyczne metabolity wytwarzane przez pasożytniczy grzyb *Conidiobolus coronatus**

Toxic metabolites produced by parasitic fungus *Conidiobolus coronatus*

Wioletta Wieloch

Praca doktorska wykonana w Instytucie Parazytologii im. W. Stefańskiego PAN w Warszawie i obroniona 15 maja 2007 r.

Promotor: Prof. dr hab. Mieczysława Boguś

Recenzenci: Prof. dr hab. Teresa Jakubowicz

Prof. dr hab. Halina Wędrychowicz

ABSTRACT. Naturally occurring entomopathogens are important regulatory factors of insect populations. Among them are entomopathogenic fungi. The invasion of insects by parasitic fungi occurs through penetration of the host integument. Death of the host is a result of tissue destruction, exhaustion of nutrients or the production of toxins.

Conidiobolus coronatus (*Entomophthorales*) is a saprophytic soil fungus that kills insects by releasing toxins inside insect body, before the invasion of host's organs and tissues by fungal hyphae. It is pathogenic to a number of insects and could be relatively easily propagated in laboratory conditions. The fungus is an interesting object to study and might be the source of new insecticidal substances as well.

The main aim of the study was isolation and characterisation of active compounds produced by *C. coronatus*.

In experimental surveys of interactions between insects and entomopathogenic fungi it is important to establish simple and reliable method of quantification of fungal pathogenicity towards insects, and to choose right insect target as well. Four methods were tested on two species — *Galleria mellonella* and *Dendrolimus pini*: (1) immersing larvae in conidial suspension; (2) deposition of the conidia on the cuticle; (3) injection into hemocoel, and (4) exposure to fungal colony. Exposition of *G. mellonella* larvae to fungal colony was chosen, as the best method to quantify *C. coronatus* pathogenicity, reflecting possible contact of insects with fungal spores in nature. *D. pini* larvae were not chosen for further experiments. Dark colour of their body disables the estimation of fungal infection progress.

The fungus produces an array of enzymes regarded as necessary in efficient penetration of insect cuticle: proteases, chitinases and lipases, which degrade the components of the integument. The activity of those enzymes was measured in mycelial homogenates and in post incubation media. In homogenates the activity of elastase, *N*-acetylglucosaminidase (NAGase) and lipase was denoted. The homogenate had no chymotrypsin and chitinase activity. In the incubation media the activity of five examined enzymes was present. Elastase and NAGase activities were much higher than those of three other enzymes.

The long term observation of four colonies in laboratory conditions from one transfer to another revealed differences in the ability to kill *G. mellonella* larvae. The colonies reduced pathogenicity during several transfers and then relapsed into higher level of pathogenicity again. The fluctuations were more or less regular and appeared through two-year duration of the experiment. The nature of this fluctuation is unknown and no similar phenomenon was observed elsewhere. To elicit the possible background of instability of fungal cultures towards *G. mellonella*, a genetic analysis was performed on colonies derived from primary conidia, containing several dozen of nuclei, and microconidia, which are formed on the surface of primary conidia and containing a maximum several nuclei. Both analyses: DNA Fingerprinting and Amplified Fragments Length Polymorphism (AFLP) revealed that colonies isolated from primary conidia or microconidia differ in the genetic profile. The genetic differences reflect the differences in the pathogenicity trait. Genetic analysis of colonies derived from microconidia proved that nuclei differ genetically, which means that *C. coronatus* mycelium is heterokaryotic.

A chromatographic separation of fungal homogenate proteins did not succeed. Better possibility gave the separation of proteins released by fungus to minimal medium. By two step high pressure liquid chromatography: size exclusion and ion exchange four proteins were separated to homogeneity, according to SDS-PAGE. Two of them in the size 14.5 kDa and 36 kDa were moderately pathogenic to *G. mellonella* larvae in the dose of 1µg per larva (20% and 10% of pathogenicity, respectively), and exhibited no enzymatic activity. Third protein was a 33-34 kDa elastase with no pathogenic effect. The last protein in the size 36-37 kDa was pathogenic to the larvae (20%) and exhibited elastolytic and chitinolytic activities. Further experiments will elicit the mode of actions on cell cultures of those four isolated proteins.

Key words: *Conidiobolus cornatus*, entomopathogenic fungi, *Galleria mellonella*, mycotoxins

Streszczenie

Występujące w naturze entomopatogeny są istotnym czynnikiem regulującym liczebność populacji owadów. Wśród entomopatogenów ważną rolę odgrywają grzyby owadobójcze. Grzyby te wykazują zdolność do porażania swych żywicieli poprzez penetrację kutikuli. Grzyby owadobójcze mogą uśmiercać owady na trzy sposoby: wyczerpując rezerwy pokarmowe żywiciela, uszkadzając przez rozrastające się strzępki narządy wewnętrzne oraz wydzielając toksyczne substancje.

Conidiobolus coronatus (Entomophthorales) jest saprofitycznym grzybem glebowym zdolnym do infekowania owadów z różnych grup taksonomicznych. Poraża on owady wytwarzając substancje toksyczne, które powodują śmierć żywiciela, zanim strzępki grzybowe zasiedlą jego narządy i tkanki. Ze względu na swój potencjał owadobójczy *C. coronatus* może posłużyć jako źródło nowych insektycydów. Grzyb ten jest ciekawym obiektem badawczym, stosunkowo łatwym w hodowli laboratoryjnej, ale nadal słabo poznanym.

Głównym celem niniejszej pracy było wyizolowanie białkowych związków biologicznie czynnych wytwarzanych przez *C. coronatus*.

W badaniach dotyczących złożonych relacji zachodzących pomiędzy owadami a grzybami owadobójczymi, ważne jest opracowanie prostej i skutecznej metody określania zdolności badanych grzybów do infekowania owadów, oraz wybrania odpowiedniego gatunku owada. W niniejszej pracy testowane były dwa gatunki owadów (*Galleria mellonella* i *Dendrolimus pini*) oraz cztery metody infekowania owadów: (1) zanurzanie larw w zawieszynie zarodników,

(2) nakraplanie zawiesiny zarodników bezpośrednio na kutikulę owadów, (3) wstrzykiwanie zawiesiny zarodników do jamy ciała owadów oraz (4) ekspozycja larw na zarodnikujące kolonie grzybowe. Do dalszych badań wybrano metodę ekspozycji larw *G. mellonella* na zarodnikujące kolonie grzybowe, jako skuteczną, łatwą w ocenie i najbardziej zbliżoną do naturalnych sposobów zarażania owadów tym grzybem. U larw *D. pini*, z powodu charakterystycznego ciemnego ubarwienia, trudno było określić stopień zaawansowania infekcji grzybowej.

Aby przedostać się do hemocelu owada grzyb musi pokonać barierę, jaką jest kutikula. Grzyby entomopatogenne wytwarzają szereg enzymów degradujących składniki kutikuli: proteaz, chitynaz i lipaz. Aktywność tych enzymów sprawdzano zarówno w homogenatach grzybowych *C. coronatus*, jak i w mediach postinkubacyjnych.

W homogenacie z grzybni *C. coronatus* odnotowano obecność elastazy, *N*-acetyloglukozaminidazy (NAGazy) i lipazy. Homogenat nie wykazywał aktywności chymotrypsyny i chitynazy. W mediach postinkubacyjnych odnotowano aktywność wszystkich pięciu badanych enzymów. Największą aktywność wykazywała elastaza i NAGaza.

Długotrwałe, dwuletnie obserwacje patogeniczności czterech kolonii *C. coronatus* w hodowli laboratoryjnej wykazały, że grzyb ten nie zachowuje stałego poziomu patogeniczności w ciągu kolejnych pasażów. Zjawisko spadku i ponownego wzrostu patogeniczności powtarzało się cyklicznie, zarówno w zimie jak i w lecie, w mniej lub bardziej regularnych cyklach kilkutygodniowych. Taka zaskakująca obserwacja nie była do tej pory odnotowana u żadne-

go spośród badanych gatunków grzybów opisywanych w literaturze.

W związku z niestabilnością kolonii w hodowlach laboratoryjnych, aby wyjaśnić podłoże tych zmian, przeprowadzono analizę genetyczną kolonii uzyskanych z zarodników pierwszorzędowych, które zawierają po kilkadziesiąt jąder, i mikrozarodników, które tworzą się na powierzchni zarodnika pierwszorzędowego, i do których przepływa cytoplazma zawierająca tylko kilka jąder komórkowych. Przeprowadzona analiza DNA Fingerprinting, jak i AFLP wykazała, że kolonie wykazują różnice genetyczne. Różnice te są także skorelowane z poziomem patogeniczności poszczególnych kolonii. Z badań genetycznych kolonii mikrozarodnikowych można wywnioskować, że różnice genetyczne występują na poziomie poszczególnych jąder komórkowych, co oznacza, że zarówno grzybnia *C. coronatus*, jak i wytwarzane przez nią zarodniki, są heterokariotyczne.

W niniejszej pracy próby uzyskania czystych, toksycznych frakcji z homogenatu grzybowego nie powiodły się. Natomiast frakcjono-

wanie białek uwolnionych do ubożego medium postinkubacyjnego za pomocą HPLC (kombinacja sączenia molekularnego i chromatografii jonowymiennej) pozwoliło na uzyskanie czterech, elektroforetycznie czystych, białek o masach ok.: 14,5 kDa, 33-34 kDa, 36 kDa i 36-37 kDa.

Białka: 14,5 kDa oraz 36 kDa nie wykazywały żadnej aktywności enzymatycznej w zakresie pięciu badanych enzymów. Oba białka charakteryzowały się niską toksycznością wobec larw *G. mellonella*, uśmiercając 20% i 10% owadów, którym wstrzyknięto 1 µg danego białka. Białko 33-34 kDa wykazywało aktywność elastolityczną, lecz nie było toksyczne dla larw. Natomiast białko o masie 36-37 kDa, było toksyczne dla larw, powodując 20% śmiertelności oraz wykazywało aktywność elastolityczną i chitynolityczną.

Dalsze badania pozwolą określić sposób działania na poziomie komórkowym zidentyfikowanych w tej pracy substancji wytwarzanych przez *C. coronatus*.