

Bakterie zasocjowane z owadami (symbionty) mają ważne znaczenie dla ewolucji owadów i/lub ich nawyków żywieniowych. Mogą uczestniczyć m.in. w : a) oddziaływaniu roślina – owad, b) detoksykacji ksenobiotyków czy w c) rozwoju odporności owadziego gospodarza na insektycyd. Owady mogą również wykorzystywać enzymy pochodzące od mikroorganizmów, aby uniknąć inhibitorów proteaz, syntetyzowanych przez rośliny w odpowiedzi na żerowanie owada. Związek pomiędzy owadem a jego mikrobiomem jest mało poznany dla wielu gatunków owadów, w tym skrzypionki zbożowej (*Oulema melanopus*, Coleoptera, Chrysomelidae) – ważnego szkodnika zbóż. Zarówno osobniki dorosłe jak i larwy żerując uszkadzają rośliny zbóż. Stosowanie insektycydów z różnych grup chemicznych jest główną metodą kontrolowania populacji skrzypionki zbożowej. Jednak ochrona chemiczna stosowana obecnie i w przyszłości może nie być tak skuteczna jak dawniej. Intensywne i częste stosowanie tych samych organicznych pestycydów może prowadzić do rozwoju odporności owada na insektycydy. Istnieje zatem potrzeba poszukiwania alternatywnych, bardziej przyjaznych dla środowiska metod zwalczania szkodników owadzich.

Celem projektu jest:

- Sprawdzenie stopnia odporności skrzypionki na insektycydy.
- Oznaczenie symbiontów odpowiedzialnych za rozwój odporności skrzypionki na insektycydy (bakterie rozkładające insektycydy).
- Analiza zmian społeczności bakteryjnej larw skrzypionek po potraktowaniu insektycydem.
- Sprawdzenie czy bakterie związane ze skrzypionką biorą udział w adaptacji swojego owadziego gospodarza wobec roślinnych inhibitorów proteaz.

Udział bakterii związanych ze skrzypionkami w adaptacji na insektycydy czy inhibitory proteaz jest nieznan. Dlatego zaplanowano następujące zadania, mające na celu zrozumienie roli symbiontów skrzypionek w detoksykacji szkodliwych substancji dla ich owadziego gospodarza.

- a) Analiza wpływu insektycydu na larwy skrzypionek (z naturalną mikroflorą jelitową lub ze zredukowaną ilością bakterii). Larwy będą traktowane: a) odpowiednią substancją czynną insektycydu, b) tylko antybiotykiem, c) antybiotykiem, następnie substancją czynną insektycydu, d) wodą (kontrola). Zostanie określona przeżywalność owadów.
- b) Zostanie wykonana identyfikacja bakterii, których wzrost na pożywkach będzie obserwowany po potraktowaniu insektycydem. Dodatkowo, potencjalny rozkład substancji czynnych insektycydu przez wybrane najlepiej rosnące bakterie zostanie oceniony za pomocą analizy GC- i LC-MS/MS (w zależności od substancji czynnej insektycydu).
- c) Sprawdzenie jak traktowanie insektycydem wpływa na społeczność bakteryjną związaną ze skrzypionkami. Larwy skrzypionek będą traktowane różnymi dawkami wybranych substancji czynnych insektycydu (woda - kontrola). DNA wyizolowany z jelit owadów będzie poddany analizie sekwencji 16S rRNA (z wykorzystaniem NGS) w celu identyfikacji bakterii związanych ze skrzypionkami po potraktowaniu substancją aktywną insektycydu.
- d) Sprawdzenie, czy skrzypionki wykorzystują enzymy związane z bakteriami, aby uniknąć szkodliwego działania inhibitorów proteaz. Owady zostaną potraktowane antybiotykami (woda-kontrola), następnie wybranymi inhibitorami proteaz. Profil aktywności proteolitycznej zostanie sprawdzony przy użyciu: FITC-casein assay oraz *in-gel* protease assay.
- e) Analiza filogenetyczna i statystyczna uzyskanych wyników.

Wyjaśnienie udziału mikroflory owadów w rozkładzie ksenobiotyków, w tym syntetycznych związków organicznych ma bardzo duże znaczenie. Uzyskane w ramach projektu wyniki mogą w przyszłości stanowić podstawę do opracowania nowych metod zwalczania szkodników owadzich, w tym skrzypionek poprzez manipulowanie ich mikroflorą jelitową. Mogą również wpłynąć na redukcję ilości stosowanych insektycydów, zanieczyszczenia środowiska i szkodliwego działania na owady nie będące przedmiotem zwalczania. Proponowane badania mogą mieć istotny wpływ na takie dyscypliny i obszary badawcze jak rolnictwo, entomologia, ochrona roślin i środowiska.