

# Efekt odporności na nicianie entomopatogeniczne a skład mikrobioty jelitowej na przykładzie larw owadów z rodziny Scarabaeidae

Ewa Sajnaga<sup>1\*</sup>; Marcin Skowronek<sup>1</sup>; Agnieszka Kalwasińska<sup>2</sup>; Magdalena Lis<sup>1</sup>; Waldemar Kazimierzczak<sup>1</sup>; Monika Elżbieta Jach<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Katedra Biomedycyny i Nauk o Środowisku KUL Lublin; <sup>2</sup> Katedra Mikrobiologii Środowiskowej i Biotechnologii UMK, Toruń; <sup>3</sup> Katedra Biologii Molekularnej KUL, Lublin

## Streszczenie

W oparciu o hipotezę, że skład mikrobioty żywiciela może mieć związek z cechą odporności na nicianie entomopatogeniczne (EPN), porównaliśmy mikrobiotę bakteryjną jelita środkowego larw odpornych na EPN i larw kontrolnych dwóch gatunków chrząszczy stosując sekwencjonowanie nanoporowe.

Mikrobiota bakteryjna jelita środkowego osobników odpornych w stosunku do kontroli wykazywała niższy lub niezmienny wskaźnik bioróżnorodności w przypadku, odpowiednio, *Amphimallon solstitiale* i *Melolontha melolontha*. U obydwu badanych gatunków stwierdzono także różnice w strukturze społeczności bakteryjnej jelita, co dotyczyło głównie zmian w ilości niektórych rodzajów bakterii.

Przeprowadzane badania mają charakter wstępny i wymagają kontynuacji, jednak wskazują na przydatność analiz metataksonomicznych do badania związków między mikrobiotą owadów a odpornością na EPN, co w przyszłości może zaowocować opracowaniem lepszych metod biokontroli szkodliwych owadów.

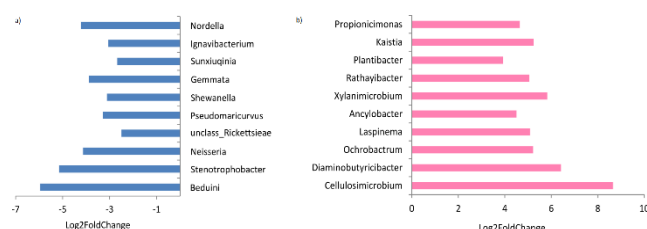
## Materiały i metody

W pracy porównywano skład mikrobioty jelitowej grupy owadów kontrolnych z wyselekcjonowaną grupą owadów niewrażliwą na nicianie. Larwy owadów pochodziły z regionu Lubelszczyzny. W laboratorium część losowo wybranych larw poddano ekspozycji na różne gatunki EPN, a osobniki które nie uległy zakażeniu stanowiły grupę odporną na EPN. Larwy, które nie były pooddawane ekspozycji stanowiły grupę kontrolną. Skład mikrobioty jelitowej określono poprzez sekwencjonowanie nanoporowe (GridION X5, Oxford Nanopore Technologies) przeprowadzone w firmie genXone). Analizie poddano fragment genu 16S rRNA zawierający wysoce zmienne domeny V3-V8 o długości ok. 1000 pz.

Analizę bioróżnorodności mikrobioty przeprowadzono za pomocą programów: R phylosec, R vegan i Past. Sieci mikrobiomu konstruowano przy użyciu pakietów igraph, qgraph, vegan i MCL w programie R metodą SparCC, zaś do analizy różnicowej zawartości taksonów zastosowano program DESeq2.

Tabela 1. Analiza mikrobioty guniaka czerwczyka - wskaźniki bioróżnorodności

Wskaźniki	Kontrola	Odporne	Rodzaj statystyki	Wartość	P-wartość
	N=13	N=15			
Sobs	1055	865	t	1.94	0.064
Shannon	4.36	3.53	t	2.82	0.013
Simpson	8.21	6.29	Mann-Whitney U	56	0.059
Evenness	8.79	5.71	Mann-Whitney U	40	0.009



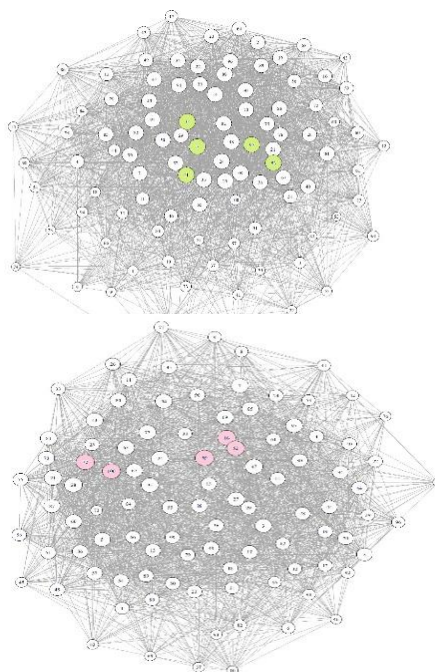
Rys. 2. Analiza mikrobioty guniaka czerwczyka przy użyciu programu DESeq2 – wykresy przedstawiają rodzaje bakterii których ilość była znacząco różna pomiędzy badanymi grupami

## Wstęp

Larwy owadów z rodziny Scarabaeidae są żerującymi w glebie szkodnikami roślin, które zwalczą się m.in. przy użyciu niciania entomopatogenicznych (EPN) jako biopreparatów. Jelito owada jest zasiedlone przez bogatą społeczność mikroorganizmów, która zapewnia szereg korzyści gospodarzowi, w tym ochronę przed patogenami. Symbionty jelitowe wykorzystują do tego celu różne mechanizmy.

Celem pracy było zbadanie czy istnieje związek między składem mikrobioty jelitowej larw a cechą odporności na infekcję przez nicianie entomopatogeniczne (EPN) na przykładzie dwóch gatunków owadów: guniaka czerwczyka (*Amphimallon solstitiale*) i chrabąszcza majowego (*Melolontha melolontha*). Analizie poddano owady kontrole (13 osobników – guniak czerwczyk; 14 - chrabąszcz majowy) oraz odporne na nicianie (15 osobników - guniak czerwczyk; 13 - chrabąszcz majowy) [Sajnaga et al. 2021; Sajnaga et al. 2022]

Praca ta stanowi kontynuację wcześniejszych badań, w której z jelita środkowego chrabąszcza majowego wyizolowano szereg gatunków bakterii wykazujących właściwości antagonistyczne w stosunku do symbiontów bakteryjnych niciania, które następnie zidentyfikowano [Skowronek et al. 2020; Skowronek et al. 2021].



Rys 3. Sieci mikrobioty na poziomie rodzajów dla próbek z guniaka czerwczyka; A – grupa kontrolna; B – grupa odporna na nicianie

## Wyniki

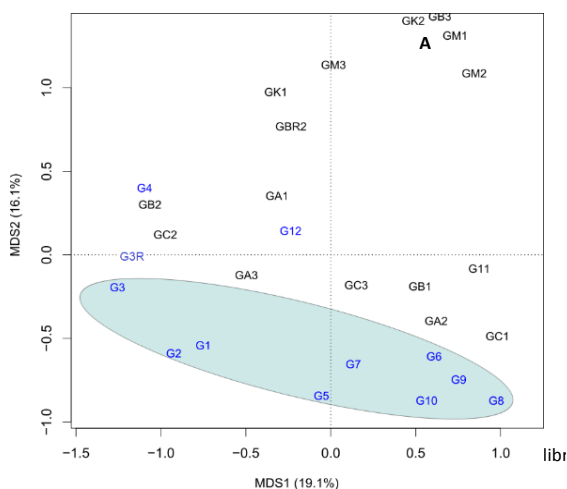
Mikrobiota jelita środkowego grupy larw odpornych na nicianie w porównaniu do larw kontrolnych wykazywała znaczne różnice pod względem bioróżnorodności oraz składu taksonów:

- wskaźniki równocności Shannon-Wiener i Evenness były: 1/ znacząco wyższe w grupie larw kontrolnych niż odpornych na nicianie - w przypadku guniaka czerwczyka (Tabela 1); 2/ nie wykazywały różnic – w przypadku chrabąszcza majowego;
- Analiza PCoA i ANOSIM wyodrębniła grupę larw z grupy kontrolnej, które grupują się razem, co oznacza, że skład ich bakterii jelitowych jest odmienny od pozostałych larw u obydwu badanych gatunków owadów (Rys. 1);
- Analiza DESeq2 wykazała, że grupa larw odpornych na nicianie różniła się zawartością wielu rodzajów bakterii w porównaniu do grupy kontrolnej u obydwu badanych gatunków owadów (Rys. 2);
- Sieci mikrobioty wraz z gatunkami kluczowymi były inne dla każdej z badanej grup owadów u obydwu badanych gatunków owadów (Rys. 3).

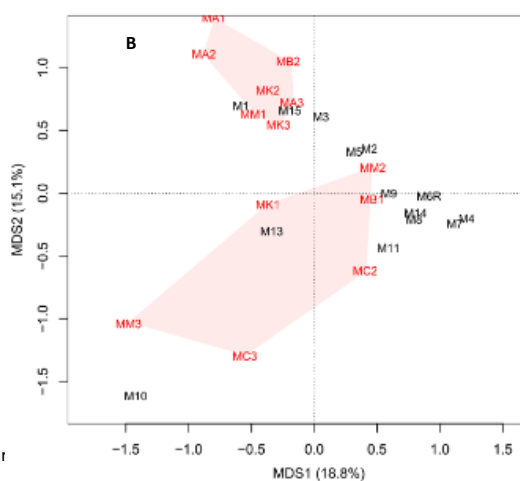
## Conclusions

Mikrobiota jelita środkowego grupy larw odpornych na nicianie różniła się pod względem zawartości niektórych gatunków bakterii w porównaniu do larw kontrolnych i częściowo bioróżnorodności.

- Różnice te mogą stanowić podłoże różnej podatności owadów na infekcję nicianiami;
- Możliwe jest także, że zaobserwowane różnice w składzie mikrobioty są następstwem ekspozycji larw odpornych na nicianie;
- Aby wyjaśnić związek między mikrobiotą jelitową owadów a cechą odporności na owady należy rozszerzyć badania o inne metody, np. testowanie odporności owadów z zastosowaniem antybiotyków w celu eliminacji bakterii jelitowych.



Rys 1. Analiza różnorodności mikrobioty za pomocą PCoA; A - guniak czerwczyk; B – chrabąszcz majowy



## \*Kontakt

Ewa Sajnaga  
Katedra Biomedycyny i Nauk o Środowisku  
Katolicki Uniwersytet Lubelski Jana Pawła II  
Email: esajnaga@kul.pl  
Phone: 81 4545636

## Literatura:

- Skowronek M., Sajnaga E., Pleszczyńska M., Kazimierzczak W., Lis M., Wiater A. 2020. Int. J. Mol. Sciences 21, 580; doi:10.3390/ijms21020580
- Skowronek M., Sajnaga E., Pleszczyńska M., Kazimierzczak W., Lis M., Wiater A. 2021. Int. J. Mol. Sciences, 22, 12005; doi:10.3390/ijms222112005
- Sajnaga E., Skowronek M., Kalwasińska A., Kazimierzczak W., Ferenc K., Lis M., Wiater A. 2021. Pathogens 10, 396; doi:10.3390/pathogens10040396
- Sajnaga E., Skowronek M., Kalwasińska A., Kazimierzczak W., Lis M., Jach ME, Wiater A. 2022. Int. J. Environm. Res. Public Health 19, 3480; doi:10.3390/ijerph19063480

## Granty:

Badania były częściowo finansowane z grantu NCN nr 2016/21/B/NZ9/01865