

Nekrofagiczne chrząszcze z rodzaju grabarz (*Nicrophorus* spp.) swoją nazwę zawdzięczają unikalnemu behawiorowi związanemu z zakopywaniem padlin małych kręgowców (Pukowski, 1933, Ratcliffe, 1996, Scott, 1998). Podczas tego procesu, padlina jest pozbawiana futra lub piór i zabezpieczana za pomocą wydzielin oralnych i analnych cechujących się właściwościami przeciwdrobnoustrojowymi (Arce et al., 2012).

Główną cechą wyróżniającą chrząszcze z rodzaju *Nicrophorus* jest wykształcenie opieki nad potomstwem prowadzonej zarówno przez samca jak i samicę (Pukowski, 1933, Ratcliffe, 1996, Scott, 1998). Opieka odgrywa kluczową rolę dla przeżycia potomstwa, ponieważ w pierwszych dniach rozwoju, larwy nie są w stanie samodzielnie pobierać pokarmu. Samica pozostaje z potomstwem do momentu opuszczenia przez larwy krypty rozrodczej. Samiec opuszcza gniazdo zwykle kilka dni wcześniej (Scott, 1998). W komorze rozrodczej, pomiędzy osobnikami rodzicielskimi, panuje wyraźny podział obowiązków. Samiec przede wszystkim zajmuje się utrzymaniem padliny w odpowiednim stanie oraz ochroną przed ewentualnymi konkurentami. Samica natomiast większość czasu poświęca na przygotowywanie pokarmu oraz karmienie młodych (Smiseth et al., 2005). Rozwój larw ze względu na intensywną opiekę jest bardzo szybki i trwa od pojawienia się larw do przejścia w stadium migrujące, od 6 do 8 dni (Scott, 1998).

Ze względu na złożony behawior rozrodczy grabarze stanowią jeden z organizmów modelowych w ekologii behawioralnej. Mimo dużego zainteresowania tą grupą chrząszczy nadal wiele aspektów fizjologicznych, takich jak np. funkcjonowanie układu odpornościowego oraz ekologicznych m.in. fenologia, nie zostało w pełni wyjaśnionych.

Biorąc pod uwagę ograniczony stan wiedzy odnośnie biologii chrząszczy z rodzaju *Nicrophorus* oraz ich preferencje pokarmowe, poznanie funkcjonowania układu odpornościowego oraz zmian jego aktywności pod wpływem różnych czynników

środowiskowych może mieć podstawowe znaczenie dla zrozumienia ekologii badanych przede mnie chrząszczy. Z tego powodu celem mojej rozprawy doktorskiej jest **analiza rozwojowo-zależnych zmian funkcjonowania układu odpornościowego grabarza *Nicrophorus vespilloides* (1) oraz wpływu czynników środowiskowych charakterystycznych dla okresu zimowego (niska temperatura) na aktywność tego układu (2).**

Aspektem nierozzerwalnie związanym z zimowaniem jest fenologia owadów. Jak dotąd dysponujemy jedynie ogólną wiedzą na temat dynamiki populacji grabarzy w początkowym okresie ich aktywności. Dlatego trzecim celem moich badań było **określenie różnicy we wczesno-sezonowej aktywności lokalnych populacji grabarzy (3).**

Rozwojowo-zależne zmiany w funkcjonowaniu układu odpornościowego *N. vespilloides*

Badania prowadzone z wykorzystaniem innych gatunków owadów wykazały, że w trakcie rozwoju larwalnego aktywność odpowiedzi komórkowej i humoralnej ulega dużym fluktuacjom (Giglio i Giulianini, 2013; Schmid-Hempel, 2003). Temat ten został przeanalizowany w publikacji przeglądowej „Aktywność układu odpornościowego owadów – rozwojowo-zależne zmiany oraz wpływ czynników środowiskowych” będącej częścią rozprawy doktorskiej (Urbański et al., 2016b).

W przypadku chrząszczy z rodzaju *Nicrophorus* postępujące procesy rozkładu oraz rosnąca konkurencja ze strony drobnoustrojów, wymusza skrócenie czasu rozwoju larwalnego, co wpływa na aktywność ich układu odpornościowego. Nie bez znaczenia jest intensyfikacja opieki nad potomstwem w początkowym okresie rozwoju larwalnego oraz aktywność lityczna wydzielin oralnych i analnych zabezpieczających padlinę. Zależności pomiędzy aktywnością układu odpornościowego oraz opieką nad potomstwem sugerują, że wiedza na temat

funkcjonowania układu odpornościowego grabarzy może mieć kluczowe znaczenie dla zrozumienia fizjologicznych podstaw zachowań obserwowanych w krypcie rozrodczej.

W prowadzonych przeze mnie badaniach po raz pierwszy wykazano rozwojowo-zależne zmiany w funkcjonowaniu układu odpornościowego chrząszczy z gatunku *N. vespilloides* (Urbański et al., 2014). W trakcie rozwoju larwalnego zaobserwowałem szybki wzrost aktywności odpowiedzi komórkowej oraz humoralnej oraz wzrost całkowitej liczby hemocytów w hemocelu osobników larwalnych. Najniższa aktywność oksydazy polifenolowej oraz zdolność hemocytów do fagocytozy była obserwowana w pierwszych dniach rozwoju larwalnego (Urbański et al., 2014). Obniżona aktywność układu odpornościowego w początkowej fazie rozwoju może być skorelowana z aktywnością lityczną wydzielin oralnych i analnych osobników rodzicielskich, ponieważ jest ona najwyższa w tym okresie (Arce et al., 2012, Cotter i Kilner, 2010). Sugeruje to, że larwy w pierwszych dniach swojego rozwoju inwestują wszystkie dostępne zasoby w szybki wzrost (Urbański et al., 2014). W przypadku dalszych stadiów rozwojowych grabarzy uzyskałem wyniki podobne do obserwacji innych autorów (Chernysh et al., 1995, Shi i Sun, 2010). Poczwaraki cechowały się obniżoną zdolnością hemocytów do fagocytozy, co prawdopodobnie związane było z apoptozą hemocytów podczas metamorfozy oraz ich zaangażowaniem w proces remodelingu tkankowego (Urbański et al., 2014). Niska aktywność odpowiedzi komórkowej, w tym stadium, prawdopodobnie była rekompensowana wysoką aktywnością oksydazy polifenolowej. U osobników dorosłych stwierdzono najniższą aktywność zarówno odpowiedzi komórkowej jak i humoralnej, co może być skorelowane z silniejszym wykształceniem barier fizycznych. Na uwagę zasługują również wyniki związane ze zmianami morfologii hemocytów w trakcie trwania rozwoju larwalnego jak i w późniejszych stadiach rozwojowych, bowiem sukcesywny wzrost długości filopodiów hemocytów, będący

wyznacznikiem zdolności hemocytów do adhezji, odzwierciedlał wzrost liczby hemocytów uczestniczących w procesie fagocytozy (Urbański et al., 2014).

Wpływ niskiej temperatury na funkcjonowanie układu odpornościowego *N. vespilloides*

Oprócz poznania wpływu zmieniających się warunków siedliskowych w krypcie rozrodczej, równie ważne jest zrozumienie wpływu innych czynników środowiskowych na funkcjonowanie układu odpornościowego, w szczególności czynników charakterystycznych dla okresu zimowego. Dlatego kolejnym etapem moim badań było zbadanie wpływu niskiej temperatury na aktywność poszczególnych mechanizmów odpornościowych *N. vespilloides*.

W badaniach tych, po raz pierwszy, zbadany został wpływ warunków stresowych charakterystycznych dla okresu zimowego na funkcjonowanie układu odpornościowego chrząszczy, stanowiących najliczniejszy rząd owadów.

Wyniki moich badań wskazują, że niska temperatury wpływ na funkcjonowanie układu odpornościowego grabarzy, jednakże w odmienny sposób, gdy warunki stresowe indukowane są w warunkach laboratoryjnych oraz gdy osobniki do badań pozyskiwane są w trakcie zimowania ze środowiska naturalnego (Urbański et al., 2016a). Największe zmiany obserwowane były w przypadku drugiej grupy osobników. W trakcie okresu zimowego zaobserwowałem wzrost aktywności oksydazy polifenolowej oraz zdolności hemocytów do fagocytozy pomimo spadku ich liczebności. U osobników tych odnotowałem również procentowe zmiany w liczebności poszczególnych typów hemocytów (Urbański et al., 2016a). Ponadto osobniki hodowane w warunkach imitujących okres poprzedzający zimowanie cechowały się wyższym poziomem aktywności odpowiedzi humoralnej niż osobniki hodowane w warunkach charakterystycznych dla okresu letniego. W przypadku osobników tej grupy niska temperatura, niezależnie od długości trwania ekspozycji na ten czynnik stresowy, z reguły nie powodowała zmian

w aktywności odpowiedzi komórkowej i humoralnej. Zarówno w przypadku osobników hodowanych w warunkach letnich jak i pozyskiwanych ze środowiska naturalnego, podczas okresu zimowego zaobserwowałem podziały komórkowe hemocytów, będące najprawdopodobniej wynikiem długotrwałej ekspozycji chrząszczy na czynniki stresowe (Urbański et al., 2016a).

Obserwowane zmiany w aktywności odpowiedzi komórkowej i humoralnej mogą być łączone m.in. ze zjawiskiem hormezy bądź ze wzmożoną syntezą białek (Le Bourg et al., 2009, Vesterlund et al., 2014). Uzyskane przeze mnie wyniki sugerują, że kluczowe znaczenie, dla funkcjonowania układu odpornościowego grabarzy w trakcie trwania zimowania, mogą mieć inne czynniki charakterystyczne dla tego okresu takie jak desykcja, głód czy zmiany fotoperiodu. Nie można również wykluczyć, że stopniowy wzrost aktywności poszczególnych mechanizmów odpornościowych nie jest związany z selekcją naturalną i przeżyciem osobników cechujących się wyższą aktywnością omawianego układu (Urbański et al., 2016a).

Wpływ warunków środowiskowych na funkcjonowanie układu odpornościowego owadów szczegółowo został przedstawiony w artykule „Aktywność układu odpornościowego owadów – rozwojowo-zależne zmiany oraz wpływ czynników środowiskowych” będącym częścią rozprawy doktorskiej (Urbański et al., 2016b).

Różnice we wczesno-sezonowej aktywności lokalnych populacji grabarzy

Ze względu na ciągłą ekspozycję na warunki stresowe, okres zimowy, jest kluczowy dla owadów. Ich przeżywalność może zależeć od wielu czynników między innymi, jak pokazują moje badania, sprawnie funkcjonującego układu odpornościowego. W przypadku chrząszczy z rodzaju *Nicrophorus* wczesno-sezonowa aktywność jest istotna dla kształtowania się relacji międzygatunkowych, bowiem odmienny czas rozpoczęcia aktywności sezonowej jest jednym z

głównych mechanizmów ograniczających negatywny wpływ konkurentów (Kocarek, 2001, Scott, 1998). Grabarze bowiem nie tylko konkurują o zasoby z muchówkami, ale przede wszystkim z innymi przedstawicielami rodzaju *Nicrophorus* (Ohkawara et al., 1998, Suzuki, 2004). Aktualnie posiadamy tylko ogólną wiedzę na temat międzygatunkowych zależności pomiędzy grabarzami w początkowej fazie ich aktywności sezonowej. Dlatego ostatnim celem mojej pracy doktorskiej było określenie różnic we wczesno-sezonowej aktywności chrząszczy z rodzaju *Nicrophorus*. W celu dokładniejszej analizy obserwowanych oddziaływań w badaniach uwzględniono ciągłość pomiędzy siedliskami w obrębie których trwały obserwacje, wielkość padliny oraz płęć przywabianych chrząszczy.

W trakcie trwania obserwacji odnotowałem obecność czterech gatunków grabarzy: *Nicrophorus vespillo*, *N. vespilloides*, *Nicrophorus humator* i *Nicrophorus vestigator* (Urbański i Baraniak, 2015). W przypadku ostatniego gatunku, ze względu na małą liczbę odłowów nie został on uwzględniony w analizach statystycznych. Osobniki zaliczane do dwóch najliczniejszych gatunków (*N. vespillo* i *N. vespilloides*) rozpoczynały swoją aktywność sezonową w tym samym czasie, jednakże szczyt ich aktywności odnotowywany był w innych tygodniach obserwacji. Istotne są również wyniki, dotyczące rozkładu przestrzennego grabarzy (Urbański i Baraniak, 2015). W przypadku, gatunków *N. humator* i *N. vespilloides* doskonale widoczny był efekt krawędziowy (ang. *edge effect*) związany ze zmniejszającą się liczbą osobników wraz z malejącą odległością do krawędzi lasu. Zjawisko to nie było obserwowane w przypadku *N. vespillo* zasiedlającego łąki i murawy. Ponadto w kolejnych tygodniach obserwacji, odnotowałem przesunięcie aktywności tego gatunku w kierunku siedliska leśnego. Prawdopodobnie było to skorelowane ze wzrostem temperatury oraz presji ze strony innych padlinożernych owadów. Różnice w aktywności obserwowanych gatunków widoczne były

również w przypadku dnia, w którym grabarze znajdowały padlinę oraz w preferencjach co do jej wielkości (Urbański i Baraniak, 2015).

Uzyskane przeze mnie wyniki sugerują, że kluczowe dla aktywności lokalnych populacji grabarzy nie jest obecność innych gatunków z rodzaju *Nicrophorus*, ale przede wszystkim dynamika poszczególnych siedlisk po okresie zimowym. Związane jest to m.in. z kształtowaniem się średniej temperatury w pierwszych tygodniach aktywności sezonowej grabarzy (Urbański i Baraniak, 2015).

Podsumowanie

Podsumowując stwierdzam, że najważniejsze wyniki uzyskane w trakcie realizacji badań wchodzących w skład mojej rozprawy doktorskiej to **(1) zaobserwowanie zmian w aktywności odpowiedzi komórkowej i humoralnej w trakcie rozwoju larwalnego chrząszcza *N. vespilloides*, co związane jest m.in. z odmiennymi zdolnościami hemocytów do adhezji; (2) odnotowanie po raz pierwszy u chrząszczy wpływu niskiej temperatury na funkcjonowanie układu odpornościowego oraz odmiennej reakcji układu odpornościowego na ten czynnik stresowy w zależności od warunków hodowlanych; (3) ustalenie różnic w aktywności lokalnych populacji grabarzy w początkowym okresie aktywności sezonowej.**

Podziękowania

Arkadiusz Urbański jest laureatem projektu „Wsparcie stypendialne dla doktorantów na kierunkach uznanych za strategiczne z punktu widzenia rozwoju Wielkopolski” współfinansowanego ze środków Unii Europejskiej w ramach Europejskiego Funduszu Społecznego oraz jest stypendystą Fundacji Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu na rok 2015/2016.

Literatura

- Arce, A., Johnston, P., Smiseth, P. i Rozen, D. (2012) Mechanisms and fitness effects of antibacterial defences in a carrion beetle. *Journal of Evolutionary Biology*, 25, 930-937.
- Chernysh, S., Simonenko, N., Braun, A. i Meister, M. (1995) Developmental variability of the antibacterial response in larvae and pupae of *Calliphora vicina* (Diptera: Calliphoridae) and *Drosophila melanogaster* (Diptera: Drosophilidae). *European Journal of Entomology*, 92, 203-209.
- Cotter, S.C. i Kilner, R.M. (2010) Sexual division of antibacterial resource defence in breeding burying beetles, *Nicrophorus vespilloides*. *Journal of Animal Ecology*, 79, 35-43.
- Giglio, A. i Gulianini P. G. (2013) Phenoloxidase activity among developmental stages and pupal cell types of the ground beetle *Carabus (Chaetocarabus) lefebvrei* Dejean 1826 (Coleoptera, Carabidae). *Journal of Insect Physiology*, 59, 466-474.
- Kocarek, P. (2001) Diurnal activity rhythms and niche differentiation in a carrion beetle assemblage (Coleoptera: Silphidae) in Opava, the Czech Republic. *Biological Rhythm Research*, 32, 431-438.
- Le Bourg, É., Massou, I. i Gobert, V. (2009) Cold stress increases resistance to fungal infection throughout life in *Drosophila melanogaster*. *Biogerontology*, 10, 613-625.
- Ohkawara, K., Suzuki, S. i Katakura, H. (1998) Competitive interaction and niche differentiation among burying beetles (Silphidae, *Nicrophorus*) in Northern Japan. *Entomological Science*, 1, 551-559.
- Pukowski, E. (1933) Ökologische untersuchungen an *Necrophorus* F. *Zoomorphology*, 27, 518-586.
- Ratcliffe, B.C. (1996) Nicrophorine biology. *Bulletin of the University of Nebraska State Museum*, 13, 43-54.

- Scott, M.P. (1998) The ecology and behavior of burying beetles. *Annual Review of Entomology*, 43, 595-618.
- Shi, Z.-H. i Sun, J.-H. (2010) Immunocompetence of the red turpentine beetle, *Dendroctonus valens* LeConte (Coleoptera: Curculionidae, Scolytinae): Variation between developmental stages and sexes in populations in China. *Journal of Insect Physiology*, 56, 1696-1701.
- Smiseth, P.T., Dawson, C., Varley, E. i Moore, A.J. (2005) How do caring parents respond to mate loss? Differential response by males and females. *Animal Behaviour*, 69, 551-559.
- Suzuki, S. (2004) Brood size reduction in *Nicrophorus vespilloides* after usurpation of carrion from *Nicrophorus quadripunctatus* (Coleoptera: Silphidae). *Entomological Science*, 7, 207-210.
- Urbański, A. i Baraniak, E. (2015) Differences in early seasonal activity of three burying beetle species (Coleoptera: Silphidae: *Nicrophorus* F.) in Poland. *The Coleopterists Bulletin*, 69, 283-292.
- Urbański, A., Czarniewska, E., Baraniak, E. i Rosinski, G. (2014) Developmental changes in cellular and humoral responses of the burying beetle *Nicrophorus vespilloides* (Coleoptera, Silphidae). *Journal of Insect Physiology*, 60C, 98-103.
- Urbański, A., Czarniewska, E., Baraniak, E. i Rosiński, G. (2016a) Impact of cold on the immune system of burying beetle, *Nicrophorus vespilloides* (Coleoptera: Silphidae). *Insect Science*, doi: 10.1111/1744-7917.12321
- Urbański, A., Walkowiak K., Baraniak, E i Rosiński G. (2016b) Aktywność układu odpornościowego owadów – rozwojowo-zależne zmiany oraz wpływ czynników środowiskowych. *Postępy Biologii Komórki*, w druku

Vesterlund, S.-R., Lilley, T., Van Ooik, T. i Sorvari, J. (2014) The effect of overwintering temperature on the body energy reserves and phenoloxidase activity of bumblebee *Bombus lucorum* queens. *Insectes Sociaux*, 61, 265-272.