

AUTOREFERAT

I. **Imiona i nazwisko:** Maciej Adam Pszczółkowski

II. **Posiadane dyplomy i stopnie naukowe:**

1. **Dyplom doktora nauk przyrodniczych** w dyscyplinie fizjologia zwierząt,

Zakład Fizjologii Bezkręgowców, Wydział Biologii Uniwersytetu Warszawskiego, 1995

Tytuł rozprawy doktorskiej: *Badania nad rolą ekdysteroidów w rozwoju i zachowaniu się larw dwóch gatunków Lepidoptera: Galleria mellonella i Spodoptera littoralis.*

Promotor: prof. dr hab. Bronisław Cymborowski

2. **Dyplom magistra biologii**, specjalizacja biologia ogólna,

Zakład Fizjologii Bezkręgowców, Wydział Biologii Uniwersytetu Warszawskiego, 1987

Tytuł pracy magisterskiej: *Badania allatotropowej aktywności mózgu larw mola woskowego, Galleria mellonella.*

Promotor: prof. dr hab. Bronisław Cymborowski

III. **Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu**

Associate Research Professor, Department of Agriculture, Missouri State University, Mountain Grove, MO, USA, 2010-obecnie.

Assistant Research Professor, Department of Agriculture, Missouri State University, Mountain Grove, MO, USA, 2006-2010.

Adjunct Faculty, Department of Entomology, Washington State University, Pullman, WA, USA, 2006-obecnie.

Research Assistant Professor, Department of Entomology, Kansas State University, Manhattan, KS, USA, 2005-2006.

Postdoctoral Research Associate, Department of Entomology, Kansas State University, Manhattan, KS, USA, 2003-2005.

Postdoctoral Research Associate, Department of Entomology, Washington State University, Pullman, WA, USA, 1999-2003.

Postdoctoral Research Associate, Department of Life Science, Tsing-Hua University, Taiwan R.O.C, 1997-1999.

Senior Lecturer, Department of Life Science, Tsing-Hua University, Taiwan R.O.C., 1997.

Adiunkt, Zakład Ochrony Lasu, Instytut Badawczy Leśnictwa w Warszawie, 1996 – 1997.

Asystent, Wydział Biologii Uniwersytetu Warszawskiego w Warszawie, 1987 –1996.

IV. Wykaz publikacji stanowiących osiągnięcie naukowe, o którym mowa w art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (dz. u. nr 65, poz. 595 ze zm.)

A) Tytuł osiągnięcia naukowego:

Stymulatory żerowania u larw owocówki jabłkóweczki, *Cydia pomonella* L. (Lepidoptera, Tortricidae): od badań podstawowych do zastosowania w ochronie jabłek

B) Publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego:

Każda notka zawiera następujące informacje: Autorzy, rok wydania, tytuł publikacji, wydawnictwo, tom, strony, impact factor wg bazy Journal Citation Reports (JCR) zgodnie z rokiem opublikowania (IF), punktacja wg. Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego zgodnie z komunikatem Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego w sprawie wykazu czasopism naukowych z 31 grudnia 2014 (MNiSW), pięcioletni impact factor wg bazy JCR (IF_{5Y}) oraz liczbę cytowań wg. Web of Science (WoS), Scopus (Scopus) lub Google Scholar (GS).

Oświadczenia wszystkich współautorów określające indywidualny wkład każdego z nich w powstanie poszczególnych publikacji znajdują się w Załączniku 5.

1. **Pszczolkowski M.A.**, Matos, L., Brown R., and Brown J.J. (2002a). Feeding and development of codling moth, *Cydia pomonella*, (L.) (Lepidoptera: Tortricidae) larvae on apple leaves. *Annals of the Entomological Society of America* 95: 603-607.

IF₂₀₀₂= 0,862
IF_{5Y}= 1,204
MNiSW = 25

Cytowania:
WoS = 9
Scopus = 8
GoogleS = 10

Wkład habilitanta: 62.5% - Idea badań, zaplanowanie i koordynacja prac eksperymentalnych, wykonanie przeważającej części biotestów, analiza otrzymanych wyników, napisanie i rewizja manuskryptu.

2. **Pszczolkowski M.A.**, Matos, L., Zahand. A, and Brown J.J. (2002b). Effect of monosodium glutamate on apple leaf consumption by codling moth larvae. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 103: 91-98.

IF₂₀₀₂ = 0,997
IF_{5Y}= 1,674
MNiSW = 35

Cytowania:
WoS = 12
Scopus = 12
GoogleS = 14

Wkład habilitanta: 62.5% - Idea badań, opracowanie nowatorskiej metodyki biotestów, zaplanowanie i koordynacja prac eksperymentalnych, wykonanie przeważającej części biotestów, analiza otrzymanych wyników, napisanie i rewizja manuskryptu.

3. **Pszczolkowski M.A.** and Brown J.J. (2002). Prospects of monosodium glutamate use for enhancement of spinosad toxicity against the codling moth. *Phytoparasitica* 30: 243-252.

IF₂₀₀₂ = 0,485
IF_{5Y} = 0,767
MNI_{SW} = 20

Cytowania:
WoS = 14
Scopus = 14
GoogleS = 14

Wkład habilitanta: 80% - Idea badań i koncepcja ich ewentualnego zastosowania w praktyce, opracowanie nowatorskiej metodyki biotestów, zaplanowanie i wykonanie prac eksperymentalnych, analiza otrzymanych wyników, napisanie i rewizja manuskryptu.

4. **Pszczolkowski M.A.**, Zahand. A, Bushman S.M, and Brown J.J (2003). Effects of calcium and glutamate receptor agonists on leaf consumption by lepidopteran neonates. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 74: 389-394.

IF₂₀₀₃ = 2,308
IF_{5Y} = 2,848
MNI_{SW} = 25

Cytowania:
WoS = 6
Scopus = 6
GoogleS = 6

Wkład habilitanta: 62.5% - Idea badań, zaplanowanie i koordynacja prac eksperymentalnych, wykonanie przeważającej części biotestów, analiza otrzymanych wyników, napisanie i rewizja manuskryptu.

5. **Pszczolkowski M.A.** and Brown J.J. (2003). Effects of sugars and non-nutritive sugar substitutes on consumption of apple leaves by codling moth neonates. *Phytoparasitica* 31: 283-291.

IF₂₀₀₃ = 0,563
IF_{5Y} = 0,767
MNI_{SW} = 20

Cytowania:
WoS = 5
Scopus = 5
GoogleS = 6

Wkład habilitanta: 80% - Idea badań i koncepcja ich ewentualnego zastosowania w praktyce, opracowanie nowatorskiej metodyki biotestów, zaplanowanie i wykonanie prac eksperymentalnych, analiza otrzymanych wyników, napisanie i rewizja manuskryptu.

6. **Pszczolkowski M.A.** and Brown J.J. (2004). Enhancement of spinosad toxicity to *Cydia pomonella* neonates by monosodium glutamate receptor agonist. *Phytoparasitica* 32: 342-350.

IF₂₀₀₄ = 0,543
IF_{5Y} = 0,767
MNI_{SW} = 20

Cytowania:
WoS = 4
Scopus = 4
GoogleS = 5

Wkład habilitanta: 80% - Idea badań i koncepcja ich ewentualnego zastosowania w praktyce, opracowanie nowatorskiej metodyki biotestów, zaplanowanie i wykonanie prac eksperymentalnych, analiza otrzymanych wyników, napisanie i rewizja manuskryptu.

7. **Pszczolkowski M.A.** and Brown, J.J. (2005). Single experience learning of host fruit selection by lepidopteran larvae. *Physiology and Behavior* 86: 168-175.

IF₂₀₀₅ = 2,183
IF_{5Y} = 3,339
MNiSW = 30

Cytowania:
WoS = 7
Scopus = 6
GoogleS = 13

Wkład habilitanta: 80% - opracowanie koncepcji eksperymentu, wykonanie prac eksperymentalnych, analiza otrzymanych wyników oraz napisanie i rewizja manuskryptu

8. **Pszczolkowski, M.A.**, Brown, J.J. and Ramaswamy, S.B. (2005a). Effect of metabotropic glutamate receptor agonists and signal transduction modulators on feeding by a caterpillar. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* 82: 678-685.

IF₂₀₀₅ = 1,970
IF_{5Y} = 2,848
MNiSW = 25

Cytowania:
WoS = 3
Scopus = 3
GoogleS = 4

Wkład habilitanta: 80% - opracowanie koncepcji eksperymentu, wykonanie prac eksperymentalnych, analiza otrzymanych wyników, napisanie manuskryptu.

9. **Pszczolkowski, M.A.**, Ramaswamy, S.B., Anelli C., and Brown, J.J. (2005b). Effects of L- and D-aminophosphono acids on feeding in neonate codling moth *Cydia pomonella*. *Pestycydy/Pesticides* (4): 43-48.

IF = nie dotyczy
MNiSW = 4

Cytowania:
WoS = praca nie ujęta w bazie danych
Scopus = praca nie ujęta w bazie danych
GoogleS = 1

Wkład habilitanta: 85% - Opracowanie koncepcji pracy i eksperymentów, wykonanie biotestów, analiza otrzymanych wyników, napisanie i rewizja manuskryptu.

10. **Pszczolkowski M.A.** and Brown J.J. (2014) Enhancement of Insecticides Against Codling Moth (Lepidoptera: Tortricidae) With L-Aspartate in Laboratory and Field Experiments. *Journal of Economic Entomology* 107: 1163-1171.

IF₂₀₁₄ = 1,605

IF_{5Y} = 1,781

MNiSW = 35

Cytowania:

WoS = 2

Scopus = 2

GoogleS = 2

Wkład habilitanta: 90% - Opracowanie koncepcji pracy i eksperymentów, koordynacja prac eksperymentalnych, analiza otrzymanych wyników, napisanie i rewizja manuskryptu.

Sumaryczny Impact factor dla publikacji wchodzących w skład osiągnięcia naukowego wg bazy JCR

zgodnie z rokiem opublikowania: **11,516**

pięcioletni: **15,995**

Sumaryczna punktacja MNiSW publikacji wchodzących w skład osiągnięcia naukowego: **239**

Liczba cytowań publikacji wchodzących w skład osiągnięcia naukowego wg baz:

Web of Science: **62**

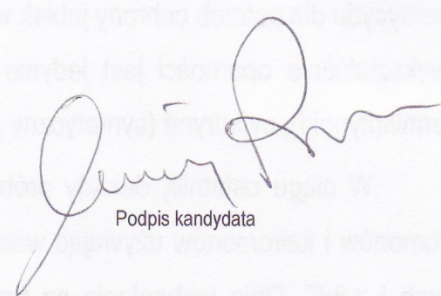
Scopus: **60**

Google Scholar: **75**

Mountain Grove, 65711 MO, USA, 1 grudnia 2015

Miejscowość i data

Podpis kandydata



V. Omówienie celu naukowego ww. prac stanowiących osiągnięcie naukowe i osiągniętych wyników oraz ich wykorzystania w praktyce

Wprowadzenie

Owocówka jabłkowieczka, *Cydia pomonella*, L. (Lepidoptera, Tortricidae) jest poważnym szkodnikiem jabłek, rozprzestrzenionym w całej strefie umiarkowanej. Brak kontroli tego szkodnika skutkuje stratami sięgającymi 80% plonu. W Stanach Zjednoczonych, które produkują około 10% jabłek na świecie straty spowodowane przez owocówkę mogą potencjalnie sięgnąć powyżej 1.5 miliarda dolarów rocznie. Ponieważ stadium inwazyjne owocówki (świeżo wykluta larwa) wgryza się w jabłko wkrótce po opuszczeniu jaja i pozostaje wewnątrz owocu niemal do chwili przepoczwarczenia, rolnicy mają ograniczone opcje kontrolowania populacji tego owada. Historycznie rzecz biorąc młode larwy owocówki były zwalczane przy pomocy oprysków. Głównym (i pozostającym w użyciu przez ponad trzy dekady) insektycydem był tu azinfosmetyl, neurotoksyna będąca pochodną gazów bojowych produkowanych w czasach II wojny światowej. Naturalnie, insektycyd ten wzbudzał uzasadnione obawy co do wpływu na zdrowie robotników rolnych oraz konsumentów. W dodatku, owocówka wykształciła oporność przeciwko azinfosmetylowi: w latach 60-tych ubiegłego wieku do pełnej kontroli owocówki wystarczała dawka 50 gramów na hektar. Trzydzieści lat później potrzeba było powyżej 1.5 kilograma na hektar.

W roku 1996, Kongres i Prezydent Stanów Zjednoczonych zatwierdzili tzw. Food Quality Protection Act, który przewidywał wycofanie z użytku azinfosmetylu do roku 2006. Wobec braku alternatywnych, skutecznych środków ochrony jabłek przed owocówką insektycyd ten pozostał w użyciu do 2013. W Europie azinfosmetyl został wycofany z użytku w 2006, ale na Nowej Zelandii był szeroko używany jeszcze w 2009. W 1999 do ochrony jabłek przed owocówką zaproponowano spinosad (mieszanina spinosyny A i spinosyny D w proporcji 17:3 vol/vol), insektycyd który zakłóca działanie receptorów acetylocholino oraz imituje działanie kwasu γ -aminomasłowego. Moje badania przyczyniły się do zarejestrowania tego insektycydu dla potrzeb ochrony jabłek w stanie Waszyngton, USA. Spinosad stosowany jest coraz częściej i wykształcenie oporności jest jedynie kwestią czasu. Z innych insektycydów stosuje się acetamidrid (neonikotynoid), cyflutrynę (syntetyczny pyretroid) oraz karbaryl (karbaminian).

W ciągu ostatniej dekady próbowano rozwinąć technologie zwalczania owocówki przy pomocy feromonów i kairomonów używając wabików do dezorientacji samców (mating disruption) oraz w strategii „zwab i zabij”. Obie technologie są bardzo przyjazne środowisku. Niestety, obie nie sprawdzają się w

przypadku dużej gęstości populacji szkodnika oraz sąsiadujących małych i średnich plantacji, z których niektóre są traktowane feromonami (lub innymi środkami ochrony roślin), a niektóre nie. Wskutek migracji ciężarnych samic z nietraktowanych sadów do sadów gdzie stosowana jest metoda dezorientacji samców lub strategia „zwab i zabij” lokalne populacje owocówki szybko się odbudowują. Ostatnie badania nad kairomonami w zwalczaniu owocówki są bardziej obiecujące, ale wszystkie metody bazujące na feromonach lub kairomonach są kosztowne, wobec czego metody chemiczne ochrony roślin oparte na opryskach środkami chemicznymi mają jeszcze długą przyszłość w ochronie jabłek przed owocówką jabłkówekczką.

W tej sytuacji potrzebne były (i nadal są) alternatywne metody ochrony jabłek przed owocówką. Mnie zainteresowały metody wykorzystujące znajomość behawioru młodych larw owocówki przejawianego w procesie poszukiwania owocu żywicielskiego. W 1999 wiadomo było, że motyle owocówki (zwłaszcza motyle pierwszej generacji) składają jaja na liściach. Świeżo wykluta larwa musiała zatem jakoś zlokalizować owoc żywicielski a następnie ocenić jego jakość przed podjęciem decyzji o wgrzyzieniu się weń. Wstępne obserwacje, które poczyniłem w 1999 wskazały na dwa istotne fakty. Po pierwsze, młoda larwa zanim wgrzyzie się w jabłko pobiera kęs skórki wraz z niewielkim kawałkiem mięszu, obraca go w narządach gębowych i po pewnym czasie albo połyka albo odrzuca. Tylko w tym pierwszym przypadku dochodzi do wgrzyzienia się w owoc na większą głębokość. Po drugie, stwierdziłem, że młode larwy owocówki potrafią żerować na liściach jabłoni, co było faktem podówczas nieznanym. W tej sytuacji zaplanowałem program badawczy którego celem było zbadanie mechanizmów żerowania larw owocówki na liściach jabłoni i infestacji jabłek oraz znalezienie stymulatorów żerowania które mogłyby zwiększyć skuteczność insektycydów przeciwko owocówce jabłkówekczce tym samym redukując stężenie toksycznych składników aktywnych tychże insektycydów bez zmniejszenia ich wydajności. W tym celu postanowiłem:

1. Scharakteryzować żerowanie larw owocówki na liściach jabłoni oraz zbadać czy można zwiększyć jego tempo
2. Ocenić jakie produkty żywnościowe wykorzystywane w gospodarstwie domowym mogą stymulować żerowanie larw owocówki na liściach jabłoni. (Takie produkty mogą liczyć na znacznie skrócony i uproszczony proces rejestracji do użycia przez Amerykańską Agencję Ochrony Środowiska).
3. Scharakteryzować receptory smakowe larw owocówki używane w żerowaniu na liściach jabłoni

4. Ocenic czy stymulatory żerowania mogą służyć jako substancje wzmacniające insektycydy przeciwko larwom owocówki. W tym celu należało stwierdzić, czy owe stymulatory zachowałyby swoje właściwości pobudzania żerowania w obecności insektycydów i czy – w konsekwencji – obserwowana byłaby większa skuteczność tych insektycydów.
5. Zbadać czy behavior żerowania na liściach jabłoni pełni jakąś rolę w procesie odnajdywania owocu żywicielskiego.
6. Na podstawie zgromadzonych danych zaprojektować lub zaproponować stymulatory żerowania cechujące się maksymalną mocą i odpornością na deszcz
7. Przeprowadzić próby polowe z mieszaninami wybranych stymulatorów żerowania oraz wybranych insektycydów przeciwko owocówce jabłkówekce. Oceną dobroci wybranych stymulatorów miała być redukcja szkód wyrządzonych przez owocówkę jabłkówekce poprzez dodanie stymulatora do insektycydów używanych w rutynowych opryskach sadów jabłkowych.

Metodyka

Badania nad smakiem u gąsienic owocówki jabłkówekki wymagały opracowania od podstaw metodyki eksperymentowania. Konwencjonalne metody analizy tego zmysłu, oparte na metodach elektrofizjologicznych okazały się całkowicie nieadekwatne. Świeżo wykluta larwa ma ok. milimetra długości i jest zbyt delikatna do badań metodami elektrofizjologicznymi. Sporządzenie nieinwazyjnych elektrod kontaktowych jest już dużym wyzwaniem, inwazyjna elektroda odniesienia po prostu zabija larwę. W tej sytuacji posłużyłem się farmakologiczną analizą behawioru żerowania. W tym celu sporządziłem niewielkie areny testowe na szkiełkach podstawowych (4 areny na szkiełko). Przy użyciu obustronnej taśmy samoprzylepnej oraz nakładek używanych w pracach biurowych do wzmacniania dokumentów umocowałem na szkiełkach podstawowych krążki wycięte z liści jabłoni. Do takich aren testowych (każda miała ok. 6 mm średnicy) wprowadzano za pomocą pędzelka z wielbłądziej sierści, po jednej, świeżo wyklutej larwie pierwszego stadium. Areny były następnie przykrywane szkiełkami nakrywkowymi a całość umieszczana w komorze wilgotnej. Szczegóły konstrukcji areny są podane w **Pszczolkowski i Brown (2002); Zał. 2, pkt. IVB, poz. 3**. Larwa żerowała w takiej arenie przez kilka dni, pozostając w znakomitej kondycji aż do czasu wyczerpania się pożywienia. Ta prosta metodyka pozwalała przyuczyć do eksperymentowania niewykwalifikowanych studentów lub pracowników dniówkowych w ciągu zaledwie jednej godziny. Wszystkie

elementy niezbędne do wykonania aren są dostępne w sklepach z artykułami dla szkół lub w supermarketach. Szkiełko z czterema arenami wykonuje się w ciągu kilku minut. W celu uniezależnienia metodyki od sezonu wegetacyjnego i zapewnienia jednolitej jakości pożywienia użyto liści tej samej odmiany jabłoni (Honeycrisp®), w tym samym wieku, pozyskiwanych z drzewek hodowanych w szklarni.

Przeprowadzono kilka rodzajów testów używając wyżej opisanych aren. W testach na indukcję żerowania umieszczano larwę w arenie i rejestrowano ile czasu upłynęło do rozpoczęcia żerowania. W testach na rozwój larw hodowanych wyłącznie na liściach oraz na stymulację żerowania rejestrowano ilość zjedzonego pokarmu po upływie określonego czasu. W tym celu użyto mikroskopu wyposażonego w okular z siatką pomiarową, określając powierzchnię liścia zjedzoną przez larwę. Przy pomocy krzywej kalibracyjnej przeliczano powierzchnię zjedzoną na mikrogramy suchej masy liścia. Przy pomocy takich testów zbadano wpływ rozmaitych substancji chemicznych (cukrów, sztucznych środków słodzących, glutamininu sodu, agonistów i antagonistów receptorów glutaminianowych, substancji modulujących ścieżki sygnałowe, oraz insektycydów) na rozpoczęcie i intensywność żerowania. Areny były też używane w badaniach nad wytrzymałością stymulatorów żerowania na deszcz, dobową dystrybucją intensywności żerowania, toksycznością insektycydów i stymulatorów żerowania, warunkowania i adaptacji sensorycznej larw owocówki oraz farmakologicznej charakterystyce receptorów zaangażowanych w wyczuwanie glutaminianu. Dodatkowo posłużono się bardzo czułymi wagami elektronicznymi oraz transmisyjnym i skaningowym mikroskopem elektronowym.

Na etapie wstępnych badań polowych, przeprowadzonych w prywatnym sadzie w okolicach Pullman, WA, USA, oprócz opisanych już testów na żerowanie wykorzystano precyzyjne opryskiwacze plecakowe, specjalnie zbudowane wieże do symulowania opadów oraz przenośną automatyczną stację meteo. Zaawansowane badania polowe przeprowadzono w gospodarstwie doświadczalnym Missouri Fruit Experiment Station w Mountain Grove, MO, USA. Doświadczenie trwało trzy lata (2010-2012) i zostało przeprowadzone na jabłoniach odmiany Gala szczepionych na podkładce M7A w układzie całowicie losowym. Drzewka były opryskiwane albo mieszanką insektycydów i kwasu asparaginowego (drzewka doświadczalne) albo samym insektycydem (drzewka kontrolne). Do oprysków użyto specjalnie skonstruowanego, precyzyjnego opryskiwacza doświadczalnego ciągniętego za traktorem. Dryft insektycydów i mieszanek był ograniczany płachtami z brezentu.

Jednocześnie monitorowano zmiany w populacji owocówki przy pomocy pułapek typu Delta z wabikami zawierającymi feromon płciowy owocówki (codlemon). Monitoring pozwolił określić czas wylotu owocówki oraz precyzyjnie wybrać czas aplikacji insektycydu (opryski wykonywano 1-2 dni po przekroczeniu ekonomicznego progu szkodliwości wynoszącego pięć samców na pułapkę. Pod koniec pierwszej i drugiej generacji owocówki jabłkówekzki owoce były zbierane, przenoszone do laboratorium, ważone i badane na obecność larw owocówki. Wpływ kwasu asparaginowego oraz mieszanin tego kwasu z wybranymi insektycydami na żerowanie larw owocówki przeprowadzony był w laboratorium przy użyciu wyżej opisanych aren. Takie same areny były użyte w analizie toksykologicznej insektycydów oraz mieszanek insektycydów z kwasem asparaginowym.

W analizie statystycznej wykorzystano porównanie średnich testem ANOVA, testem t Studenta, testem Kruskal-Wallisa lub analizą probitową.

Omówienie uzyskanych wyników

Żerowanie i rozwój owocówki jabłkówekzki na liściach jabłoni

Stwierdzono, że larwy owocówki rozwijają się na pokarmie złożonym wyłącznie z liści jabłoni (**Pszczolkowski i wsp., 2002a; Zał. 2, pkt. IVB, poz. 1**). Dotyczy to zwłaszcza larw pierwszego stadium, z których prawie 75% linieje do drugiego stadium. W ciągu pierwszych 48 godzin żerowania nie zaobserwowano żadnej śmiertelności wśród larw świeżo wyklutych z jaj. Hodowla na liściach obniża zarówno ciężar ciała larw jak i szerokość kapsułki głowowej. Larwy owocówki żerujące na liściach osiągają ostatnie (piąte) stadium larwalne ale zamierają wkrótce po linieniu nie osiągając masy krytycznej niezbędnej do zapoczwarczenia. Ponadto, dieta złożona z liści powoduje degenerację jąder u larw owocówki: obserwowane zmiany w ultrastrukturze jąder przypominają zmiany wywołane w komórkach ssących poddanych deprivacji białkowej. W przypadku larw owocówki, deprivacja białkowa co prawda nie zapobiega formowaniu się samczych gonad, ale jednocześnie uruchamia w nich proces autofagocytozy. Larwy owocówki mogą przeżyć nawet do 16 dni, niemniej jednak nie mają szans na zamknięcie cyklu życiowego.

Z praktycznego punktu widzenia jest istotne wiedzieć, że larwy owocówki mogą przeżyć co najmniej kilka dni bez owoców. Po pierwsze, istnieją przyjazne środowisku insektycydy, n.p. *Bacillus thuringiensis*, które mają mały wpływ na owocówkę, ponieważ muszą być konsumowane przez dłuższy czas. Fakt, że larwy

owocówki mogą żerować na liściach przez ponad dwa tygodnie otwiera nowe perspektywy w ochronie jabłek. Gdyby udało się zdobyć substancję chemiczną zdolną do zatrzymania larw owocówki na liściach i połączyć ją ze stymulatorem żerowania – być może udałoby się zastosować preparaty z *B. thuringiensis* przeciwko owocówce z większą skutecznością. Z teoretycznego punktu widzenia wyniki przytoczone w niniejszym akapicie skłaniają do zadania dwóch następnych pytań. Po drugie - czy larwy owocówki mogą szybować na nici przędnej. Jeśli tak, to nie tylko motyle owocówki, ale także i larwy mogą migrować, być może na duże odległości. Po trzecie – jaka jest biologiczna rola żerowania na liściach. Badania które odpowiedzą na pierwsze i drugie pytanie prowadzone są obecnie w laboratorium habilitanta. Odpowiedź na pytanie trzecie zostanie udzielona w akapicie „Biologiczna rola żerowania larw owocówki na liściach”

W poszukiwaniu stymulatorów żerowania larw owocówki

Przy użyciu opisanych wyżej biotestów zbadano wpływ na żerowanie larw owocówki wywierany przez następujące substancje: fruktozę, maltozę, glukozę, sacharozę, słodzik Sweet'n Low, słodzik Equal® (zawierający aspartam, glukozę, oraz maltodekstrynę), sacharynę, kwaśny winian potasu, ortokrzemian wapnia oraz glutaminian sodu. Spośród tych substancji jedynie słodzik Sweet'n Low (**Pszczolkowski i Brown, 2003; Zał. 2, pkt. IVB, poz. 5**) oraz glutaminian sodu (**Pszczolkowski i wsp., 2002b; Zał. 2, pkt. IVB, poz. 2; Pszczolkowski i Brown, 2002; Zał. 2, pkt. IVB, poz. 3**) przyspieszały żerowanie na liściach oraz zwiększały jego intensywność, wraz ze wzrostem stężenia. Słodzik Sweet'n Low zawiera sacharynę, kwaśny winian potasu oraz ortokrzemian wapnia. Jednak tylko sacharyna ma stymulujący wpływ na żerowanie owocówki na liściach (**Pszczolkowski i Brown, 2003; Zał. 2, pkt. IVB, poz. 5**). Warto zauważyć, że glutaminian sodu wzmacnia konsumpcję liści już przy stężeniach 0.01-0.05 mg/ml (10-50 ppm), podczas gdy sacharyna wywiera taki wpływ dopiero przy stężeniu 500 ppm. Spośród sześciu gatunków zbadanych metodami behavioralnymi larwy owocówki jabłkówek są najbardziej wrażliwe na glutaminian (Pszczolkowski, 2008). Być może jest to adaptacja pokarmowa; skórka jabłka zawiera glutaminian, który dominuje wśród aminokwasów skórki (Magne et al., 1997).

Stymulatory żerowania owadów były dość intensywnie badane w latach 60-tych i 70-tych ubiegłego wieku. Preparaty te, oparte na melasie i ekstraktach z kukurydzy, musiały być stosowane w stężeniach 10 i 50 tysięcy ppm. aby wyrzucić pożądany efekt, wskutek czego ich zastosowanie w ochronie roślin napotkało

ograniczenia natury praktycznej (duże stężenie lepkich substancji utrudnia prawidłowe funkcjonowanie aparatury opryskowej).

W kolejnych badaniach nad stymulatorami żerowania postanowiłem skupić się na glutaminianie sodu i sacharynie. Badania nad glutaminianem sodu pozwoliły stwierdzić czy jest możliwe wzmocnienie insektycydów poprzez dodatek stymulatora żerowania i określić jakie problemy należy rozwiązać przed rozpoczęciem eksperymentów z mieszaninami insektycydów i stymulatorów w warunkach polowych na dużej skale. Stymulujące działanie sacharyny pozwoliło zaprojektować eksperymenty które dały odpowiedź na pytanie „jaka jest biologiczna rola żerowania na liściach”.

Biologiczna rola żerowania larw owocówki na liściach

Już wstępne badania z użyciem glutaminianu sodu wykazały, że w behawiorze żerowania larw owocówki występują pewne elementy adaptacji sensorycznej podobne do adaptacji sensorycznej ssaków. Młode larwy owocówki spożywają więcej tkanki roślinnej traktowanej glutaminianem jeżeli wcześniej eksponowano je na glutaminian (**Pszczolkowski i wsp. 2002b; Zał. 2, pkt. IVB, poz. 2**). Proces ten, zwany sensytyzacją został opisany u szczurów: młode szczury piją więcej wody osłodzonej cukrem jeśli pozwoliło się im napić takiej wody zaraz po porodzie (Myers et al., 1997). Podobieństwa mechanizmów adaptacji sensorycznej larw owocówki i ssaków wykazałem również w badaniach nad warunkowaniem u larw owocówki (**Pszczolkowski i Brown, 2005; Zał. 2, pkt. IVB, poz. 7**). W eksperymentach tych świeżo wyklute larwy były warunkowane poprzez umieszczenie ich w arenach na liściach traktowanych sacharyną. Każdej larwie pozwolono żerować przez 3 godziny. Użyto dwóch rodzajów liści: w pierwszym wariacie były to liście jabłoni, w drugim – liście miłorzębu dwuklapowego (*Ginkgo biloba*). Liście *Ginkgo* mają właściwości emetyczne: larwy owocówki pobierają tkankę tych liści, ale po pewnym czasie zwracają pokarm i przestają jeść. Warunkowane larwy poddano testowi wyboru pomiędzy jabłkami traktowanymi sacharyną a jabłkami traktowanymi rozpuszczalnikiem (woda destylowana z detergentem). Larwy, które żerowały na liściach jabłoni traktowanych sacharyną wgrzyzały się w jabłka traktowane sacharyną. Zjawisko to zwane preferencją indukowaną (Jermy et al., 1968) trwało stosunkowo krótko: już w cztery godziny po warunkowaniu larwy nie odróżniały jabłek traktowanych sacharyną od jabłek kontrolnych. Natomiast larwy warunkowane na liściach *Ginkgo* traktowanych sacharyną unikały jabłek traktowanych tą substancją. To zjawisko, zwane uwarunkowaną niechęcią do smaku (Garcia et al., 1955) było dotychczas znane jedynie u ssaków i ptaków.

Larwy owocówki (podobnie jak ssaki i ptaki) długo kojarzą nieprzyjemny bodziec dostarczany przez liście *Ginkgo* ze smakiem sacharyny. W przypadku owocówki uwarunkowana niechęć do smaku trwa na niezmiennym poziomie przez całe pierwsze stadium, i utrzymuje się nawet po linieniu.

Wyniki eksperymentów z warunkowaniem wyboru owocu żywicielskiego u owocówki mocno sugerują biologiczną rolę jaką pełni żerowanie larw na liściach. Należy zauważyć, że owocówka jabłkówekczka potrafi genetycznie adaptować się do żerowania owocach innych niż jabłka (m.in. wiśniach, czereśniach, brzoskwińkach) i tworzyć z nimi trwałe związki troficzne (Barnes, 1991). Z drugiej strony, wiadomo, że jabłonie i owocówka jabłkówekczka pochodzą z pogranicza dzisiejszych Chin i Kazachstanu (Kuhlmann i Mills, 1999), gdzie do dziś istnieją lasy mieszane dzikich jabłoni i innych drzew. W takich pierwotnych lasach korony różnych gatunkowo drzew przeplatały się ze sobą i młode larwy owocówki prawdopodobnie żerowały na liściach różnych gatunków drzew przed znalezieniem owocu, w który mogłyby się wgryźć. Jest bardzo prawdopodobne, że dwa mechanizmy warunkowania (preferencja indukowana oraz uwarunkowana niechęć do smaku) pomagały (i nadal mogą pomagać) w znalezieniu odpowiedniego owocu żywicielskiego i uniknięciu wgryzienia się w owoc, który mógł zawierać substancje – w dalszej perspektywie - toksyczne. Kombinacja krótkotrwałej preferencji indukowanej i długotrwałej uwarunkowanej niechęci do smaku jest wrecz idealnym mechanizmem wyboru owocu żywicielskiego. Nawet gdy larwa posiadająca preferencję indukowaną do wyboru danego owocu żywicielskiego nie znajdzie go, wkrótce zapomina to doświadczenie i rozpoczyna cały proces poszukiwania żywiciela od nowa. Natomiast larwa, która doświadczyła negatywnych bodźców będzie długo omijała owoce przypominające owe bodźce i wgryzie się w owoc, który z większą dozą prawdopodobieństwa dostarczy wartościowego pokarmu. Owocówka jabłkówekczka dostosowała się do środowiska poprzez kombinację dwóch uzupełniających się mechanizmów wyboru owocu żywicielskiego. W obu przypadkach młode larwy owocówki poprzez żerowanie na liściach gromadzą informację którą następnie używają do oceny jakości owocu żywicielskiego. Uważam, że nasza praca (Pszczolkowski i Brown, 2005; Zał. 2, pkt. IVB, poz. 7) jako pierwsza opisała taką kombinację u gąsienic.

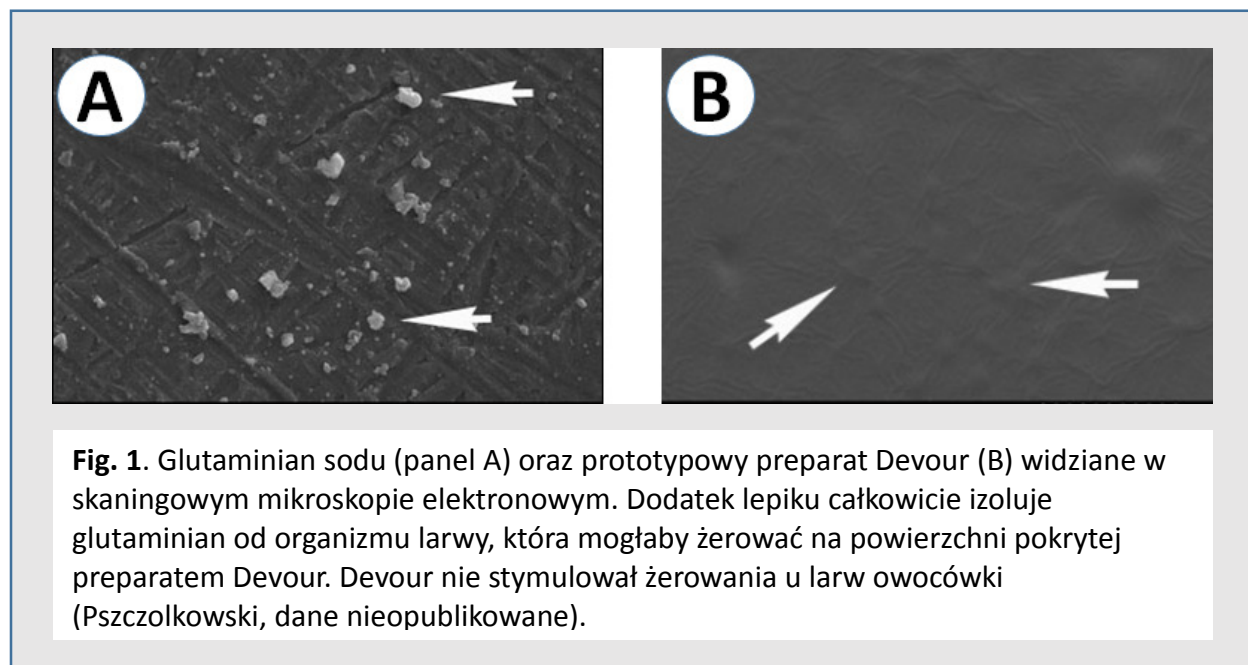
Wstępne badania nad wzmacnianiem insektycydów przy pomocy glutaminianu sodu

W badaniach tych oceniono potencjał glutaminianu sodu do wzmacniania efektywności insektycydu Success DE-105 (22.8% spinosadu) przeciwko larwom owocówki jabłkówekczki (Pszczolkowski i Brown,

2002; Zał. 2, pkt. IVB, poz. 3). Doświadczenia przeprowadzono na liściach i drzewkach odmiany Red Delicious szczepionych na podkładce M7A. W doświadczeniach laboratoryjnych stwierdzono że w stężeniu 12.5 ppm Success DE-105 zabijał ok. 14% larw w ciągu 24 godzin i ok. 57% larw w ciągu 48 godzin. Dodatek 25 ppm glutaminianu sodu podnosił wskaźniki śmiertelności odpowiednio do 44% i 89%. W obecności 25ppm intensywność żerowania larw wzrosła z ok. 135µg/larwę x dzień do ok. 165µg/larwę x dzień czyli o ok. 22% przy zerowej śmiertelności larw. Zauważono również, że Success DE-105 nieznacznie hamował intensywność żerowania, ale dodatek glutaminianu sodu w znacznym stopniu odwracał ten trend.

W badaniach polowych zbadano jak długo glutaminian sodu utrzymuje swoje właściwości stymulatora żerowania oraz jak zmienia się toksyczność preparatu Success DE-105 wraz z upływem czasu w warunkach polowych. W tym celu traktowano *in situ* losowo wybrane pędy jabłoni preparatem Success DE-105 (12.5 ppm), glutaminianem sodu (25 ppm) lub preparatem Success DE-105 (12.5 ppm), z dodatkiem 25 ppm glutaminianu sodu. Liście były zbierane po 1, 3, lub 7 dniach, przenoszone do laboratorium i użyte do testów żerowania i testów toksykologicznych. Jednocześnie monitorowano intensywność opadów przy pomocy skomputeryzowanej przenośnej stacji meteo. Przy braku opadów glutaminian sodu utrzymał swoje stymulujące właściwości przez trzy dni i również przez trzy dni wzmacniał wydajność preparatu Success DE-105. Niestety, zaledwie 10 mm deszczu zneutralizowało stymulujące i wzmacniające działanie glutaminianu sodu (**Pszczolkowski i Brown, 2002; Zał. 2, pkt. IVB, poz. 3).**

Początkowo wydawało się że ustabilizowanie glutaminianu na liściach może rozwiązać słabą odporność glutaminianu na deszcz. Na naszą prośbę firma Willbur-Ellis (San Francisco, CA, USA), wyprodukowała prototypowy preparat zawierający glutaminian sodu i specjalny lepik stabilizujący glutaminian na liściach, tymczasowo nazwany Devour®. Niestety, lepik ten po prostu pokrył glutaminian warstwą, która uniemożliwiła jego detekcję przez larwy owocówki (Fig.1.) W tej sytuacji, zdecydowałem się na farmakologiczną charakteryzację receptorów glutaminianowych zaangażowanych w zmysł smaku u owocówki, w nadziei, że być może uda mi się znaleźć takiego agonistę glutaminianu, który byłby słabo rozpuszczalny w wodzie, ale wciąż stymulowałby żerowanie u owocówki.



Farmakologiczna analiza smaku *umami* u larw owocówki

Umami jest jednym z pięciu podstawowych smaków odczuwanych przez człowieka (pozostałe to słodki, kwaśny, gorzki i słony). Wrażenia smaku *umami* wywoływane jest przez kwas glutaminowy, niektóre nukleotydy, a także szereg produktów żywnościowych jak mięso, grzyby, jarzyny czy sery lub przypraw, np. glutaminian sodu. Kwas glutaminowy jest głównym neuroprzekaźnikiem u kręgowców (Meldrum, 2000). Błonowe receptory kwasu glutaminowego u kręgowców dzielą się na dwie główne klasy: receptory jonotropowe (kanały wapniowe) i receptory metabotropowe (sprzężone z białkami G). Na podstawie analiz farmakologicznych funkcjonalne receptory jonotropowe kręgowców podzielono na trzy klasy: receptory NMDA (pobudzane nie tylko przez kwas glutaminowy ale też, selektywnie, przez kwas N-metylo-D-asparaginowy), receptory AMPA (pobudzane przez glutaminian i kwas α -amino-2,3-dihydro-5-metylo-3-oksoizoksazoloopropionowy) oraz receptory kwasu kainowego (pobudzane przez glutaminian i kwas kainowy). Receptory metabotropowe dzieli się na trzy klasy: grupę I, grupę II i grupę III, z kilkoma podgrupami. Poszczególne grupy metabotropowych receptorów glutaminianu reagują specyficznie na takie substancje chemiczne jak kwas S,3R 1-aminocyklopentano-trans-1,3-dikarboksylowy, kwas (2R,4R)-aminopirolidyno-2,4-dikarboksylowy oraz kwas L-2-amino-4-fosfonomasłowy.

Analiza farmakologiczna żerowania larw owocówki jabłkówekczki miała przede wszystkim pomóc w znalezieniu wodoodpornego związku chemicznego o właściwościach glutaminianu. Dodatkowo jednak dostarczyła informacji o potencjalnym charakterze receptorów glutaminianowych larw owocówki oraz potencjalnych ścieżkach sygnałowych wzbudzanych przez glutaminian sodu u tego owada. Użyto tej samej metodyki jak w eksperymentach nad wpływem glutaminianu czy sacharyny na żerowanie larw owocówki: larwy umieszczano w arenach zawierających liście jabłoni traktowane związkami chemicznymi specyficznymi pobudzającymi receptory glutaminianowe różnych klas u kręgowców, n.p. kwasem N-metylo-D-asparaginowym, który selektywnie pobudza receptor NMDA i obserwowano żerowanie. W podobny sposób badano też wpływ agonistów receptorów metabotropowych, inhibitorów fosfolipazy C oraz fosfodiesterazy 4, aktywatora cykazy adenylowej oraz ich mieszanin. Poniżej (Tabela 1.) podana jest lista badanych substancji wraz ze skrótami nazw które będą stosowane w kontynuacji niniejszego autoreferatu.

Na pierwszym etapie badań zbadano wpływ chlorku wapnia, AMPA, KA, NMDA oraz *trans*-ACPD na czas podjęcia żerowania na liściach oraz na intensywność żerowania (**Pszczolkowski i wsp. 2003; Zał. 2, pkt. IVB, poz. 4**). Okazało się, że jedynie *trans*-ACPD przyspiesza moment podjęcia żerowania przez larwy owocówki i jedynie NMDA oraz chlorek wapnia zwiększają intensywność żerowania. Stymulujący wpływ chlorku wapnia i NMDA został zneutralizowany przez wersenian disodowy, który jako chelator wytrąca jony wapnia. Sugeruje to mocno, że u larw owocówki inicjowanie żerowania pod wpływem substancji *umami* jest modulowane przez glutaminianowe receptory metabotropowe, natomiast zwiększenie ilości pobranego pokarmu modulowane jest przez jonotropowe receptory glutaminianowe typu NMDA.

Następnie zbadano wpływ selektywnych agonistów metabotropowych receptorów glutaminianu (**Pszczolkowski i wsp. 2005a; Zał. 2, pkt. IVB, poz. 8**). Wszystkie przyspieszały żerowanie, jednak stymulujący wpływ każdego z nich był hamowany innym modulatorem ścieżki sygnałowej: wpływ (1S,3R)-ACPD był hamowany inhibitorem fosfolipazy C, wpływ (2R,4R)-APDC był hamowany aktywatorem cykazy adenylowej, a wpływ L-AP4 był hamowany przez inhibitor fosfodiesterazy 4. Sugeruje to mocno, że u larw owocówki występują wszystkie trzy klasy metabotropowych receptorów glutaminianu i każdy z nich używa innej ścieżki sygnałowej. Jednak gdy zbadano wpływ mieszanin glutaminianu sodu oraz modulatorów ścieżki sygnałowej, jedynie NKH 477 znacząco znosił przyspieszający żerowanie wpływ glutaminianu sodu. Sugeruje to, że wyczuwanie glutaminianu sodu u larw owocówki modulowane jest głównie przez ścieżkę sygnałową zależną od 3',5'-cyklicznego adenozyonomonofosforanu.

Tabela 1. Lista substancji chemicznych użytych w analizie farmakologicznej żerowania larw owocówki jabłkówekczki.

Testowana substancja	Skrót nazwy	Funkcja
Chlorek wapnia	CaCl ₂	Źródło jonów wapnia
Wersenian disodowy	EDTA	Czynnik kompleksujący jony wapnia
kwas α-amino-2,3-dihydro-5-metylo-3-oksoizoksazolopropionowy	AMPA	Agonista receptorów glutaminianu typu AMPA
Kwas kainowy	KA	Agonista receptorów glutaminianu typu kainowego
kwas N-metylo-D-asparaginowy	NMDA	Agonista jonotropowych receptorów glutaminianu typu NMDA
kwas (±) -1-aminocyklopentano-trans-1,3-dikarboksylowy	<i>trans</i> -ACPD	Agonista metabotropowych receptorów glutaminianu
kwas S,3R 1-aminocyklopentano-trans-1,3-dikarboksylowy	(1S,3R)-ACPD	Agonista metabotropowych receptorów glutaminianu grupy I
kwas (2R,4R)-aminopirolidyno-2,4-dikarboksylowy	(2R,4R)-APDC	Agonista metabotropowych receptorów glutaminianu grupy II
kwas L-2-amino-4-fosfonomasłowy	L-AP4	Agonista metabotropowych receptorów glutaminianu grupy III
aminosteroid	U 73122	inhibitor fosfolipazy C
pochodna forskoliny	NKH 477	aktywator cyklazy adenylowej
R,S-4-(3-cyklopentylloksy-4-metoksyfenylo)-pirolidyno-2-on	Rolipram	inhibitor fosfodiesterazy 4

Moja sugestia, że w transmisji bodźców smakowych u owada biorą udział receptory glutaminianowe była w owym czasie bardzo nowatorska bowiem analogiczne mechanizmy u kręgowców nie były jeszcze zupełnie znane i opublikowane, a spory co do tego jakie receptory zaangażowane są u człowieka i myszy w

proces smakowania glutamianu trwają do dziś. Dodatkowo, omówione doświadczenia wskazały, że wzmacniaczy insectycydów alternatywnych do glutamianu sodu należy szukać wśród agonistów receptorów NMDA.

Wskazanie substancji alternatywnych dla glutamianu sodu

Na podstawie wyników farmakologicznej analizy żerowania larw owocówki początkowo zaproponowano silnego agonistę receptorów NMDA u kręgowców, kwas *trans*-1-aminocyklobutano-1,3-dikarboksylowy (*trans* ACBD). Związek ten silnie stymulował żerowanie u larw owocówki, utrzymywał swoje właściwości stymulacyjne przez 48 godzin nawet po ekspozycji na 20 mm opadu oraz wzmacniał dwukrotnie efekt spinosadu na larwy owocówki (**Pszczolkowski i Brown, 2004; Zał. 2, pkt. IVB, poz. 6**). Niestety, habilitantowi nie udało się znaleźć firmy, która podjęłaby się produkcji *trans* ACBD na skalę przemysłową. Badania nad wpływem kwasów aminofosfonowych na żerowanie larw owocówki wskazały jednak jeszcze jedną strategię. Stwierdzono, że im cząsteczka kwasu fosfonowego była krótsza, tym bardziej pobudzała żerowanie (**Pszczolkowski i wsp., 2005b.; Zał. 2, pkt. IVB, poz. 9**). Na podstawie tego spostrzeżenia zasugerowałem kwas asparaginowy jako alternatywny stymulator żerowania. Badania laboratoryjne wykazały dobre właściwości kwasu asparaginowego jako stymulatora żerowania (**Pszczolkowski i Brown, 2014; Zał. 2, pkt. IVB, poz. 10**).

Wzmocnienie wybranych insectycydów kwasem asparaginowym w warunkach laboratoryjnych i polowych

W latach 2009-2012 przeprowadzono badania laboratoryjne i polowe nad wzmacnianiem czterech preparatów przeciwko owocówce jabłkówekczce: Carbaryl 80S, Delegate WG, Assail 30 SG oraz Baythroid XL (**Pszczolkowski i Brown, 2014; Zał. 2, pkt. IVB, poz. 10**). Poprzez dodanie kwasu asparaginowego, w testach laboratoryjnych, wzmocniono działanie każdego z tych insectycydów około dziesięciokrotnie. Kwas asparaginowy zachował swoje właściwości stymulujące w obecności insectycydów. W doświadczeniach polowych, dodatek kwasu asparaginowego do insectycydów, w dawce 395 g/ha, zredukował szkody wyrządzone przez owocówkę cztero-, sześć- i siedmiokrotnie (w zależności od roku, w którym przeprowadzono doświadczenie). Jedynie w roku 2011 podczas wylotu drugiej generacji owocówki nie zaobserwowano redukcji szkód po dodaniu kwasu asparaginowego, co zapewne wiązało się z gwałtownymi

opadami deszczu zanotowanymi tuż po oprysku. Co ciekawe, jabłka z drzew opryskanych mieszaninami insektycydów i kwasu asparaginowego były znacznie większe i ważyły więcej niż jabłka z drzew opryskanych wyłącznie insektycydami. Kwas asparaginowy najwyraźniej działa jak płynny nawóz, podobnie do AuxiGro, opartego na glutamininie sodu.

W październiku 2014 habilitantowi udało się zainteresować AgBio Inc., poważną firmę produkującą i rozprowadzającą przyjazne środowisku środki ochrony roślin, współpracą w dziedzinie komercjalizacji wynalazku habilitanta. Na przełomie 2014/2015 habilitant zgłosił wynalazek do opatentowania:

Pszczolkowski M.A. and Brown J.J., Enhancement Of Insecticides Against Codling Moth (Lepidoptera: Tortricidae) with L-Asparate, US Patent Application No. 62/061,625

Podsumowanie i wnioski

1. Larwy owocówki jabłkówekczki, *Cydia pomonella*, L., żerują i rozwijają się na liściach jabłoni. Bodźce smakowe na jakie eksponowane są młode larwy owocówki podczas żerowania na liściach decydują o wyborze owocu żywicielskiego.
2. Żerowanie na liściach można zastymulować przy pomocy glutaminianu sodu, sacharyny, kwasu *trans*-1-aminocyklobutano-1,3- dikarboksylogowego oraz L-asparaginianu. Związki te, dodane do insektycydów zachowują swoje właściwości pobudzania żerowania i podwyższają skuteczność insektycydów w badaniach laboratoryjnych.
3. Analiza behawioralna i farmakologiczna żerowania larw owocówki silnie sugeruje, że glutaminian sodu wyczuwany jest przez larwy owocówki przy pomocy jonotropowych i metabotropowych receptorów dla glutaminianu. Żerowanie prawdopodobnie indukowane jest przez receptory metabotropowe. Glutaminian wzmacnia intensywność żerowania prawdopodobnie poprzez receptory jonotropowe.
4. Agonista jonotropowych receptorów glutaminianowych, L-asparaginian, dodany do insektycydów stosowanych do rutynowych oprysków przeciw owocówce jabłkówekczce podwyższył ich skuteczność dziesięciokrotnie w warunkach laboratoryjnych oraz zmniejszył szkody wywołane przez tego szkodnika od czterech do siedmiu razy w długotrwałym

- eksperymentach polowym. Jabłka z drzew traktowanych mieszaninami insektycydów i L-asparagianu były większe i cięższe niż jabłka opryskane wyłącznie insektycydami.
5. Na podstawie badań opisanych w autoreferacie habilitant wniósł o patent (Pszczolkowski M.A. and Brown J.J., Enhancement Of Insecticides Against Codling Moth (Lepidoptera: Tortricidae) with L-Asparate, US Patent Application No. 62/061,625) a wynalazek przyciągnął uwagę wiodącego dystrybutora przyjaznych środowisku środków ochrony roślin w USA, który zadeklarował chęć komercjalizacji wynalazku.

Piśmiennictwo

- Barnes, M. M. (1991). Codling moth occurrence, host race formation, and damage. In: Tortricid pests: their biology, natural enemies and control. Pp.313-328. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands.
- Garcia, J., Kimeldorf, D. J., and Koelling, R. A. (1955). Conditioned aversion to saccharin resulting from exposure to gamma radiation. *Science* 122: 157-158.
- Jermey, T., Hanson, F. E., and Dethier, V. G. (1968). Induction of Specific Food Preference in Lepidopterous Larvae. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 11: 211-230.
- Kuhlmann, U., and Mills, N. (1999). Exploring the biodiversity of Central Asia to assess specialized parasitoids for biological control of apple pests in Europe and North America. *IOBC wprs Bulletin* 22(7) 1-6.
- Magne, C., Bonenfant-Magne, M. and Audran, J-C. (1997). Nitrogenous indicators of postharvest ripening and senescence in apple fruit (*Malus domestica* Borkh. cv. Granny Smith). *International Journal of Plant Sciences*, 158: 811-817.
- Meldrum, B. S. (2000). Glutamate as a neurotransmitter in the brain: Review of physiology and pathology. *The Journal of Nutrition* 130 (4S Suppl): 1007S–1015S
- Myers, K. P., Arnold, H. M., and Hall, W. G. (1997). Sensitization of ingestive responding in preweanling rats: Time course and specificity. *Behavioral Neuroscience* 111: 413-423.
- Pszczolkowski M.A., Matos, L., Brown R., and Brown J.J. (2002a). Feeding and development of codling moth, *Cydia pomonella*, (L.) (Lepidoptera: Tortricidae) larvae on apple leaves. *Annals of the Entomological Society of America* 95: 603-607.
- Pszczolkowski M.A., Matos, L., Zahand, A, and Brown J.J. (2002b). Effect of monosodium glutamate on apple leaf consumption by codling moth larvae. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 103: 91-98.

- Pszczolkowski M.A. and Brown J.J. (2002). Prospects of monosodium glutamate use for enhancement of spinosad toxicity against the codling moth. *Phytoparasitica* 30: 243-252.
- Pszczolkowski M.A., Zahand. A, Bushman S.M, and Brown J.J (2003). Effects of calcium and glutamate receptor agonists on leaf consumption by lepidopteran neonates. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 74: 389-394.
- Pszczolkowski M.A. and Brown J.J. (2003). Effects of sugars and non-nutritive sugar substitutes on consumption of apple leaves by codling moth neonates. *Phytoparasitica* 31: 283-291.
- Pszczolkowski M.A. and Brown J.J. (2004). Enhancement of spinosad toxicity to *Cydia pomonella* neonates by monosodium glutamate receptor agonist. *Phytoparasitica* 32: 342-350.
- Pszczolkowski M.A. and Brown, J.J. (2005). Single experience learning of host fruit selection by lepidopteran larvae. *Physiology and Behavior* 86: 168-175.
- Pszczolkowski, M.A., Brown, J.J. and Ramaswamy, S.B. (2005a). Effect of metabotropic glutamate receptor agonists and signal transduction modulators on feeding by a caterpillar. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* 82: 678-685.
- Pszczolkowski, M.A., Ramaswamy, S.B., Anelli C., and Brown, J.J. (2005b). Effects of L- and D-aminophosphono acids on feeding in neonate codling moth *Cydia pomonella*. *Pestycydy/Pesticides*, (4), 43-48.
- Pszczolkowski M.A. (2008). Chemoreception of umami in caterpillars. In: Amino Acid Receptor Research. Editors: B.F. Paley and T.E. Warfield. Pp: 379-398. Nova Science Publishers, Inc.
- Pszczolkowski M.A. and Brown J.J. (2014) Enhancement of Insecticides Against Codling Moth (Lepidoptera: Tortricidae) With L-Aspartate in Laboratory and Field Experiments. *Journal of Economic Entomology* 107: 1163-1171.

VI. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowych, dydaktycznych, współpracy naukowej i popularyzacji nauki

Pracę naukową rozpocząłem w roku 1985, jeszcze jako student Wydziału Biologii Uniwersytetu Warszawskiego, jako wolontariusz w Zakładzie Fizjologii Bezkręgowców (ZFB) prowadząc eksperymenty nad rozwojem larw subtropikalnej szkodliwej sówki, *Spodoptera frugiperda*. Prace prowadzone pod kierownictwem dr GRAŻYNY ZIMOWSKIEJ, ówczesnego asystenta w ZFB, koncentrowały się na obserwacji odpowiedzi fizjologicznych osobnika na przegęszczenie populacji i stały się podstawą mojej pierwszej prezentacji na konferencji międzynarodowej (II International Conference On Endocrinological Frontiers In Physiological Insect Ecology) w Szklarskiej Porębie w 1987 oraz mojej pierwszej publikacji. Na ostatnim roku studiów pod kierownictwem Prof. dr hab. BRONISŁAWA CYMBOROWSKIEGO i bezpośrednią opieką dr MAŁGORZATY MUSZYŃSKIEJ-PYTEL wykonałem serię doświadczeń nad allatotropową czynnością mózgu owadów. W trakcie tej praktyki poznałem praktycznie wszystkie metody stosowane w badaniach nad fizjologią owadów, ze szczególnym uwzględnieniem metod radiochemicznych, a uzyskane wyniki umożliwiły mi napisanie pracy magisterskiej pt. „Badania allatotropowej aktywności mózgu larw mola woskowego, *Galleria mellonella*”, którą przedstawiłem w lipcu 1987r. Oryginalnym wkładem w fizjologię owadów, stanowiącym integralną część tej pracy było odkrycie ujemnego sprzężenia zwrotnego pomiędzy poziomem hormonu juwenilnego w hemolimfie larw a produkcją tegoż hormonu moderowaną przez czynniki mózgowce. Moją ambicją było scharakteryzowanie tych czynników. Niestety, pomimo, że zostałem zatrudniony w ZFB w charakterze asystenta (jesień 1987), w zamiarach tych przeszkodziła mi m.in. konieczność odbycia służby wojskowej (1988-89). W 1989 przydzielono mi inny temat badawczy, który koncentrował się na wpływie nowo wynalezionych regulatorów wzrostu owadów na rozwój i zachowanie larw motyli-szkodników. Owe regulatory, pochodne hydrazyny, imitowały działanie ekdysteroidów, idealnie nadając się do badań z pogranicza entomologii stosowanej i fizjologii owadów. W połączeniu z nowoczesnymi metodami oznaczania stężenia ekdysteroidów, klasyczne eksperymenty fizjologiczne z wykorzystaniem hydrazyn, które przeprowadziłem w pierw w zespole z dr. MAŁGORZATĄ MUSZYŃSKĄ-PYTEL i mgr PIOTREM MIKOŁAJCZYKIEM pod kierownictwem Prof. dr hab. BRONISŁAWA CYMBOROWSKIEGO, a później samodzielnie z asystą technika BARBARY KUSZCZAK, dały wyniki, które stały się podstawą kilku publikacji w wiodących czasopismach zagranicznych i później weszły w skład mojej rozprawy doktorskiej.

Niezależnie od badań w dziedzinie endokrynologii owadów, zachęcony przez Prof. dr hab. BRONISŁAWA CYMBOROWSKIEGO, poszerzałem swą wiedzę w dziedzinie rytmów i zegarów biologicznych. Jakkolwiek nigdy nie zostałem chronobiologiem z krwi i kości, znajomość zagadnień związanych z rytmiką dobową i sezonową organizmów żywych została mi wpojona na zawsze i niejednokrotnie uchroniła mnie przed mylną interpretacją wyników w trakcie dalszej pracy naukowej.

Staż i asystentura w Zakładzie Fizjologii Bezkręgowców Uniwersytetu Warszawskiego wprowadziły mnie nie tylko w metodykę badań nad fizjologią owadów. Rozległa sieć socjalna jaką utrzymywali pracownicy tego zakładu ułatwiła mi w znacznej mierze utrzymanie istniejących i nawiązanie nowych znajomości zawodowych praktycznie w każdej liczącej się zagranicznej placówce prowadzącej badania nad fizjologią owadów.

Wyniki interesujących i nowatorskich badań nad agonistami ekdysteroidów będących prototypami insektycydów nowej generacji umożliwiły mi nie tylko opublikowanie znacznej części tychże wyników w recenzowanych czasopismach naukowych jeszcze przed obroną doktoratu, ale i zapewniły mi zatrudnienie w Instytucie Badawczym Leśnictwa po obronie pracy doktorskiej. W IBL zostałem zatrudniony z początkiem 1996 w charakterze adiunkta w Zakładzie Ochrony Lasu. Prowadziłem tam badania nad dobowymi i sezonowymi zmianami wrażliwości owadów na insektycydy. Praca w instytucie branżowym, bardzo atrakcyjna z finansowego punktu widzenia, oferowała jednak ograniczone pole badawcze. Skromnie wyposażone laboratorium, trudności lokalowe, wreszcie – zapowiadana reorganizacja strukturalna oraz nagła propozycja zmiany profilu badań skłoniły mnie do powrotu do badań akademickich. Wobec braku możliwości zatrudnienia w którejkolwiek z warszawskich szkół wyższych, zdecydowałem się na rozeznanie sytuacji za granicą. Pod koniec 1996 instytut INRA Orleans, we Francji wyraził zainteresowanie moimi wcześniejszymi badaniami i zaoferował jednoroczny staż pod koniec 1997. Przypadek zdecydował jednak, że w tym samym czasie, poprzez uczestnictwo w kilku internetowych forach dyskusyjnych z dziedziny entomologii zorientowałem się, że jeden z naukowców tajwańskich, Prof. ANN-SHYN CHIANG z Tsing-Hua University w Hsinchu interesuje się tematyką mojej pracy magisterskiej. Skontaktowałem się z nim i niemal natychmiast otrzymałem zaproszenie do odbycia sześciomiesięcznego stażu w jego laboratorium.

Pobyty na Tajwanie, który rozpoczął się w kwietniu 1997, był prawdopodobnie przełomem w moim życiu zawodowym. Początkowo (od kwietnia do sierpnia 1997) zostałem zatrudniony na Wydziale Nauk Przyrodniczych (Life Science Department) Uniwersytetu Tsing-Hua jako wykładowca. Moim zadaniem było

przekazanie tajwańskim studentom umiejętności czynnego komunikowania się w języku angielskim (studenci dobrze komunikowali się biernym, pisany angielskim) oraz pisanie i redagowanie manuskryptów do publikacji. Jednocześnie prowadziłem badania w dziedzinie topografii mózgu karaczana hawajskiego, *Diploptera punctata*. Owad ten przez lata był - i nadal pozostaje - jednym z modelowych organizmów w badaniach nad aktywnością wydzielniczą i wzrostem ciał przyległych (gruczołów wydzielających hormon juwenilny). Prof. ANN-SHYN CHIANG prowadził badania nad współzależnością produkcji hormonu juwenilnego i podziałów komórkowych ciał przyległych, zapoczątkowane pod koniec lat 80-tych ubiegłego wieku na Uniwersytecie Rutgersa w New Jersey, USA. Jego ambicją było, między innymi, zmapowanie sieci neuronów unerwiających ciała przyległe i zaangażowanych w proliferację ich komórek. W ramach tego projektu zająłem się funkcjonalną analizą owej sieci metodami mikrochirurgicznymi. Zadanie to wymagało opracowania unikalnej metodyki selektywnych przyżyciowych lezji poszczególnych neuronów w mózgu o średnicy ok. dwóch milimetrów. Ten skromny projekt został zakończony pomyślnie w lipcu 1997 a jego wyniki stały się podstawą publikacji w *Journal of Comparative Neurology* (Chiang i wsp. 1999). W tym samym czasie wraz z prof. ANN-SHYN CHIANGIEM opracowałem śmielszy program badawczy zmierzający do zweryfikowania hipotezy czy produkcja hormonu juwenilnego u *Diploptera punctata* jest regulowana przez pozakomórkowy wapń i jonotropowe receptory glutaminianowe. Dotychczas uważano, że produkcja hormonu juwenilnego jest zależna jedynie od wewnątrzkomórkowego wapnia i stymulowana jest neurohormonami peptydowymi. Projekt ten został ufundowany przez tajwańską National Science Council i umożliwił mi przejście na etat naukowo-badawczy.

Odkrycie, że komórki ciała przyległego odpowiadają na stymulację glutaminianem poprzez podniesienie poziomu wapnia w cytozolu było przyczynkiem jednego ze studentów prof. ANN-SHYN CHIANGA, WEI-SHIANG LI, i po raz pierwszy zasugerowało, że istotnie produkcja hormonu juwenilnego może być stymulowana przez ten związek. Moim przyczynkiem było zademonstrowanie, że tak jest w istocie. W tym celu zmodyfikowałem metodę pomiarów aktywności biosyntetycznej ciała przyległego metodą radiochemiczną *in vitro*, którą wcześniej zastosowałem w doświadczeniach na molu woskowym przeprowadzonych na potrzeby swojej pracy magisterskiej. Analiza farmakologiczna aktywności biosyntetycznej ciał przyległych umożliwiła ponadto scharakteryzowanie typu receptorów glutaminianowych odpowiedzialnych za produkcję hormonu juwenilnego. Dominującym okazał się receptor typu NMDA. Wyniki tych doświadczeń zostały opublikowane w *Molecular and Cellular Endocrinology, Insect Biochemistry and*

Molecular Biology oraz *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. Były to pierwsze doniesienia demonstrujące obecność funkcjonalnego receptora NMDA u owadów (Pszczolkowski i wsp. 1999; Chiang i wsp., 2002a; Chiang i wsp. 2002b)

Dodatkowo, zachęcony przez prof. ANN-SHYN CHIANGA, prowadziłem swój oddzielny, nowatorski projekt badawczy nad fizjologiczną odpowiedzią karaczana hawajskiego na stres powodowany niską temperaturą. Stwierdziłem, że owad ten odpowiada na krótkotrwałe chłodzenie niemal całkowitym wstrzymaniem podziałów komórkowych ciała przyległego bez znacznego upośledzenia produkcji hormonu juwenilnego. Praca ta ostatecznie wykazała, że produkcja hormonu juwenilnego nie zależy od podziałów komórkowych ciał przyległych (co wcześniej nie było zupełnie jasne) i – kontynuowana po wyjeździe z Tajwanu - zaowocowała serią publikacji w *Journal of Insect Physiology* (Pszczolkowski i Chiang, 2000; Pszczolkowski i Brown, 2003; Pszczolkowski i Gelman, 2004)

Tajwański staż, początkowo planowany na sześć miesięcy rozciągnął się na ponad dwa lata. Niezwykle owocny z naukowego punktu widzenia, niewątpliwie ustabilizował moją sytuację zawodową. Prof. ANN-SHYN CHIANG zawsze obdarzał mnie daleko posuniętą swobodą w badaniach, a szczodre fundusze rządowe Tajwanu zapewniały wsparcie. Mimo to, wielu z moich tajwańskich kolegów zachęcało mnie do spróbowania sił w USA. W odpowiedzi na listy intencyjne, dostałem ze Stanów Zjednoczonych kilka propozycji odbycia stażu postdoktorskiego. Mając do wyboru University of Georgia, Kansas State University oraz Washington State University - wybrałem ten ostatni.

Staż postdoktorski w Katedrze Entomologii Uniwersytetu Stanu Washington rozpocząłem we wrześniu 1999. Okoliczność, że moim bezpośrednim przełożonym (prof. JOHN J. BROWN) był wiecznie przepracowany kierownik Katedry, postawiła przede mną nowe wyzwanie: w praktyce stałem się kierownikiem pracowni odpowiedzialnym za profil badań i organizację pracy studentów i pracowników technicznych. Ponadto, skromny budżet Katedry (początkowo zapewniono mi fundusze na sześć miesięcy stażu) dostarczył bodźca do eksploracji amerykańskiego systemu finansowania nauki, opartego na znacznie większym współzawodnictwie niż tajwański. Początkowo prof. JOHN J. BROWN planował kontynuację badań nad hydrazynami imitującymi działanie ekdyzonu, ponieważ nasze wcześniejsze prace w tym zakresie ściśle się ze sobą zająbiały. Temat ten okazał się jednak nieatrakcyjny dla potencjalnych sponsorów. Z drugiej strony, organizacje farmerskie oraz legislatura Stanu Waszyngton wykazały zainteresowanie badaniami w zakresie fizjologii smaku owocówki jabłkóweczki, *Cydia pomonella*. Sytuacja farmerów była trudna: jedynym

wiarygodnym środkiem ochrony były opryski organicznym fosforanem, azinfos-metylem, pochodną fosgenu, gazu bojowego używanego w obu wojnach światowych. Wprowadzony do użytku w latach 60-tych w dawce 50 gramów na hektar, wskutek rozwijającej się oporności owocówki, w latach 90-tych okazał się nieskuteczny w dawce aż jednego kilograma na hektar. Alternatywne metody walki z tym szkodnikiem, oparte na stosowaniu wabików feromonowych, były dopiero w powijakach. Insektycydy nowej generacji, mniej szkodliwe dla środowiska, takie jak formułacje patogennej bakterii *Bacillus thuringiensis* czy patogennych wirusów, były mało skuteczne, jako że musiały być spożyte przez larwy w dużych ilościach. W tej sytuacji, zaproponowałem badania podstawowe nad zmysłem smaku u larw owocówki, w nadziei znalezienia albo stymulatorów albo inhibitorów żerowania. Inhibitory mogłyby posłużyć jako środki zniechęcające do wgryzania się w jabłka. Ponieważ większość jaj składana jest przez owocówkę na liściach, stymulatory mogłyby natomiast zachęcić larwy do żerowania tamże, zwiększyć tempo spożywania insektycydów i ich efektywność bez zwiększania dawki toksycznego składnika aktywnego oraz wydłużyć ekspozycję larw na czynniki środowiskowe redukując tym samym negatywny efekt insektycydu na środowisko i zwiększając śmiertelność larw w okresie przed zlokalizowaniem owocu i wgryzieniem się w niego.

Ten ostatni projekt badawczy okazał się wyjątkowo nośny i atrakcyjny dla potencjalnych sponsorów, przyciągając wsparcie finansowe organizacji sadowniczych, stanu Waszyngton i Uniwersytetu Stanu Waszyngton sięgające ponad 160 tys. dolarów USA. Pomysł wzmacniania insektycydów stymulatorami żerowania u szkodliwych gąsienic tam, gdzie uszkodzenie plonu mogło być do pewnego stopnia tolerowane nie był nowy: podobną strategię proponowali w latach 70-tych entomologowie pracujący w Izraelu i w Kenii. Moja zasługą było umieszczenie tej idei w odpowiednim, nowatorskim kontekście oraz zaproponowanie takich badań w odpowiednim czasie i miejscu.

W Katedrze Entomologii Uniwersytetu Stanu Waszyngton spędziłem na stażu postdoktorskim trzy i pół roku, opracowując od podstaw metody i prowadząc badania nad smakiem u gąsienic owocówki jabłkóweczki. Badania, te kontynuuję do dziś.

Obok badań nad owocówką, na Uniwersytecie Stanu Waszyngton kontynuowałem prace nad fizjologią karaczana hawajskiego w odpowiedzi na stres chłodzenia, mapując neurony mózgowie odpowiedzialne za wstrzymanie podziałów komórkowych w ciałach przyległych oraz procesy dokrewne zaangażowane w ten proces (Pszczolkowski i Brown, 2003; Pszczolkowski i Gelman, 2004). Staż postdoktorski na Uniwersytecie Stanu Waszyngton umożliwił mi także sformowanie własnej, choć

nieformalnej grupy badawczej złożonej ze studentów którym zapewniłem opiekę naukową. LUIS MATOS, SANDYE BUSHMAN (obecnie ADAMS), ADAM ZAHAND, być może zarażeni moim optymizmem i zachęciłem do traktowania jako równorzędnych partnerów w badaniach i publikacjach, kontynuowali lub kontynuują karierę akademicką w takich ośrodkach jak Eastern Washington University, University of Wisconsin, Madison, czy University of North Carolina, Greensboro. Koledzy z Katedry Entomologii; prof. ALAN BERRYMAN, prof. WALTER S. SHEPPARD, prof. CAROL ANELLI, niezwykle przyjaźni i bezpośredni, rozwinęli moje zainteresowania mechanizmami ewolucji. Wobec tak stymulującej i twórczej atmosfery postanowiłem przedłużyć swój pobyt i kontynuować badania w USA. W tym celu musiałem uzyskać nowy status imigracyjny.

We wrześniu 2002 prof. SONNY RAMASWAMY zaproponował mi stanowisko stażysty postdoktorskiego w Katedrze Entomologii Uniwersytetu Stanu Kansas, oraz pomoc prawną w uzyskaniu nowej wizej. Ze swej strony prof. JOHN J. BROWN podjął starania o przeniesienie funduszy na badania nad owocówką z Waszyngtonu do Kansas. Kwestie te zostały rozwiązane pomyślnie. Stanowisko postdoka w pracowni prof. RAMASWAMY objąłem w marcu 2003.

Prof. SONNY RAMASWAMY był wówczas zainteresowany kontynuacją badań podstawowych nad owocówką, jak również zainicjowaniem nowych badań zmierzających do scharakteryzowania błonowego receptora hormonu juvenilnego. W tym czasie znano już receptory tego hormonu w jądrze komórkowym, ale ich działanie nie wyjaśniało wszystkich procesów jakie hormon ten uruchamiał w komórkach owadów, zwłaszcza w komórkach nabłonkowych gonad. Oba programy badawcze rozpocząłem w Kansas w kwietniu 2003, a w maju 2003 dodatkowo zacząłem badania nad wyjątkowo interesującym zjawiskiem jakim jest odkładanie dużych ilości hormonu juvenilnego w gruczołach dodatkowych samców motyli.

W badaniach nad owocówką skoncentrowałem się nad rozwiązaniem słabej odporności stymulatorów żerowania na deszcz. Badania te zasugerowały alternatywę: kwas asparaginowy. W Kansas również zakończyłem badania nad wpływem glutaminianu na żerowanie innego szkodnika jabłek, zwojki *Choristoneura rosaceana* i określiłem perspektywy wzmocnienia glutaminianem formułacji *Bacillus thuringiensis* w walce z tym szkodnikiem (Pszczolkowski i wsp. 2004)

Równolegle opracowałem metodykę badań zmierzających do scharakteryzowania błonowego receptora hormonu juvenilnego. W tym celu użyłem motyla z rodziny sówkowatych, *Heliothis virescens*, jako organizmu modelowego. U tego owada dojrzewanie oocytów ma miejsce wyłącznie pod wpływem hormonu

juwenilnego i jego pierwszym etapem jest tzw. patencja, w trakcie której komórki nabłonka, ściśle pokrywające oocyt ulegają skurczeniu otwierając przestrzenie międzykomórkowe i umożliwiając tym samym absorpcję białek z hemolimfy, które później zostaną przekształcone w żółtko. Metodyka, którą opracowałem zawierała procedurę inkubacji oocytów w medium zawierającym hormon juwenilny oraz przyżyciową analizę morfometryczną komórek nabłonka poprzez komputerową obróbkę obrazu cyfrowego (Pszczolkowski i wsp., 2005). Patencję u pluskwiaka *Rhodnius prolixus* badał już w latach 70-tych Kanadyjczyk, prof. KENNETH DAVEY, używając jednakże subiektywnego systemu jednostek umownych. Moja metodyka zapewniła pomiar patencji obiektywnie i z nieosiągalną dotąd rozdzielczością, umożliwiając szybką i wyczerpującą analizę farmakologiczną tego zjawiska i pozwoliła na określenie jakie systemy drugiego przekaźnika i jakie receptory błonowe zaangażowane są w procesie patencji. Moim zdaniem są to receptory sprzężone z białkiem G (Pszczolkowski i wsp., 2005; 2008).

Badania nad badania nad odkładaniem hormonu juwenilnego w gruczołach dodatkowych samców motyli doprowadziły natomiast do odkrycia unikalnego mechanizmu postkoitalnego doboru płciowego i do zasugerowania zupełnie nowej roli hormonu juwenilnego. U niektórych gatunków motyli samce gromadzą hormon juwenilny w gruczołach dodatkowych (hormon ten po raz pierwszy wyizolowano właśnie z gruczołów dodatkowych jedwabnika amerykańskiego *Hyalophora cecropia*.) Jakkolwiek pod koniec lat 80-tych wykazano, że hormon ten jest przekazywany samicy *Hyalophora cecropia* w trakcie kopulacji, rola tego procesu pozostała zupełnie niezrozumiała, bowiem u dorosłych samic tego gatunku hormon juwenilny ani nie pełni żadnej funkcji w rozwoju gonad ani nie modyfikuje behawioru. Prof. SONNY RAMASWAMY wraz ze swym postdokiem dr. YONH-IHL PARKIEM stwierdził, że podobny transfer hormonu juwenilnego może mieć miejsce u *Heliothis virescens*. Ja zadałem sobie pytanie jaka może być rola takiego procesu. W świetle moich badań (Pszczolkowski i wsp., 2006), wydaje się, że u tego gatunku transfer hormonu juwenilnego zapewnia ojcostwo znacznej części samców. Ponieważ samice *Heliothis virescens* są wysoce promiskuitywne i niekiedy kopulują aż z ośmioma samcami, pierwszy samiec zaangażowany w zaloty ma małe szanse pozostawienia po sobie potomków (jego nasienie zostanie po prostu wypompowane z torebki kopulacyjnej samicy przez następców). Tymczasem, jak wykazałem, hormon juwenilny przekazany samicy wraz z nasieniem penetruje przez ścianę torebki kopulacyjnej i poprzez łańcuszek nerwowy i mózg powoduje zwiększoną produkcję endogennego hormonu juwenilnego oraz – w konsekwencji – jaj. Dodatkowy czynnik (prawdopodobnie ekdyzon) przekazany samicy wyłącza na dwa dni produkcję feromonu płciowego. W

wyniku tych procesów samica pozostaje nieatrakcyjna dla innych samców przez 48 godzin, a wyprodukowany w tym czasie kontygent około 300 jaj jest zapładniany przez spermę „pierwszego w kolejce” (Pszczolkowski i wsp., 2006). Tym samym, wykazałem, że hormon sterujący rozwojem owadów i pełniący funkcje gonadotropowe może również funkcjonować jako allohormon, czyli substancja postulowana przez holenderskich zoologów (Koene i terMaat, 2001, 2002) na podstawie badań nad rolą tzw. strzałek miłości u ślimaka winniczka *Helix pomatia*. W ich ujęciu allohormon to substancja przekazywana przez jednego osobnika innemu osobnikowi tego samego gatunku z pominięciem narządów zmysłowych i bezpośrednio wywołująca odpowiedź behawioralną lub fizjologiczną. Warto zauważyć, że transfer allohormonu jest ewidentnie jednym z mechanizmów postkoitalnego doboru płciowego.

Praca w laboratorium prof. RAMASWAMY umożliwiła mi sformowanie drugiego w USA zespołu badawczego złożonego z doktorantów i studentów Wydziału Weterynaryjnego oraz Katedry Entomologii Uniwersytetu Stanu Kansas, ASHLEY PETERSON, EMILY OLSON, CRYSTAL RHINE i ANGELI TUCKER. Pracownia i zespół zostały mi przekazane w czerwcu 2005, w dniu nominowania na stanowisko profesora pomocniczego Katedry Entomologii na tymże uniwersytecie. ASHLEY PETERSON obroniła doktorat w 2007 i pracowała jako lekarz stażysta medycyny porównawczej na Uniwersytecie Texas A&M, aż do swej przedwczesnej śmierci w 2014. EMILY OLSON i CRYSTAL RHINE obroniły doktorat w 2008 i obecnie pracują (także badawczo) w uniwersyteckich i prywatnych klinikach weterynaryjnych w Kansas i Nebrasce. ANGELA TUCKER uzupełniła wykształcenie na Uniwersytecie Stanu Kolorado i w Kansas, uzyskując doktorat w dziedzinie toksykologii owadów. Staż w moim laboratorium był bez wątpienia jednym z istotnych czynników w wyborze kariery życiowej przez tych studentów.

W kwietniu 2006 zaoferowano mi stanowisko profesorskie na świeżo zreorganizowanym Uniwersytecie Stanu Missouri, w Katedrze Rolnictwa, która wkrótce zostanie przekształcona w samodzielny wydział. Stanowisko to przyjąłem, obejmując (w sierpniu 2006) posadę profesora pomocniczego (Research Assistant Professor) w dziedzinie zintegrowanych metod walki ze szkodnikami w uniwersyteckiej stacji badawczej o przeszło stuletniej tradycji i wyspecjalizowanej m.in. w hodowli jabłek. Posada ta umożliwiła mi rozpoczęcie laboratoryjnych i polowych eksperymentów z zastosowaniem kwasu asparaginowego jako dodatku do insektycydów w celu wzmocnienia ich działania przeciwko owocówce jabłkóweczce. Do doświadczeń polowych przydzielono mi sad o powierzchni ponad 1 hektara. Niestety, w początkach kwietnia 2007 temperatura w sadach spadła poniżej -7°C i utrzymała się na tym poziomie przez tydzień. Prawie 90%

jabłek nie przetrwało tego mrozu. W konsekwencji populacje owocówki (nie mogąc znaleźć owoców żywicielskich i kontynuować rozwoju przez sezon 2007) zostały zdziesiątkowane. Prace polowe nad owocówką i insektycydami wzmacnianymi kwasem asparaginowym mogłem podjąć dopiero w 2010, po odbudowaniu się populacji tego szkodnika. Prace polowe zakończyły się sukcesem. Dodatek kwasu asparaginowego do insektycydów zwiększał ich skuteczność a nawet poprawiał jakość owoców.

Obecnie pracowni habilitanta kontynuuje się badania nad stymulatorami i inhibitorami żerowania u larw owocówki, poszukujemy deterrentów przeciwko tym larwom wśród metabolitów wtórnych bylic (*Artemisia*) oraz miłorzębu dwuklapowego (*Ginkgo biloba*), oraz pracujemy nad wabikami dla szkodliwych żuków z rodzaju *Cotinis*.

Badania nad żerowaniem larw owocówki zaowocowały dwoma zgłoszeniami patentowymi.

Od 2008 habilitant pełni rolę redaktora działu (Subject Editor) w redakcji czasopisma naukowego *Environmental Entomology* co łączy się z oceną i recenzowaniem od kilkunastu do kilkudziesięciu prac naukowych rocznie. Habilitant pełni ponadto rolę recenzenta wniosków o granty, prac naukowych kierowanych do czasopism innych niż *Environmental Entomology*, oraz prowadzi służbę identyfikacji owadów szkodliwych dla powiatu Wright, MO, USA. W czasie swojej działalności w Missouri State University wypromował trzech magistrantów, z których dwóch dostało się na studia doktoranckie w Katedrze Entomologii University of Arkansas. Od 2012 wyklada przedmiot „Entomologia stosowana” który rokrocznie przyciąga od 50 do 80 studentów. W 2010 habilitant został promowany do stopnia Associate Research Professor (trzy lata przed typowym terminem promocji) oraz uzyskał status tzw. tenure professor.

Piśmiennictwo

Chiang A-S., Pszczolkowski M.A., Lee C-M., and Wei T-W., (1999). Protocerebral neurons inhibiting proliferation of corpus allatum cells in the cockroach, *Diploptera punctata*. *Journal of Comparative Neurology* 413: 593-602.

Chiang, A-S., Lin, W-Y, Liu, H-P, Pszczolkowski M.A., Fu, T-F, Chiu, S-L., Holbrook, G.L. (2002a). Insect NMDA receptors mediate juvenile hormone biosynthesis. *Proceedings of National Academy of Sciences of the USA* 99: 37-42.

Chiang, A-S., Pszczolkowski M.A., Liu, H-P., and Lin S-C. (2002b). Ionotropic glutamate receptors mediate juvenile hormone synthesis in the cockroach, *Diploptera punctata*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 32: 669-678.

Koene, J. M., & ter Maat, A. (2001). Allohormones: a class of bioactive substances favoured by sexual selection. *Journal of Comparative Physiology A* 187: 323-326.

Koene, J. M., & ter Maat, A. (2002). The distinction between pheromones and allohormones. *Journal of Comparative Physiology A* 188: 163-164.

Pszczolkowski M.A., Lee W-S., Liu H-P., and Chiang A-S., (1999). Glutamate-induced rise in cytosolic calcium concentration stimulates in vitro rates of juvenile hormone biosynthesis in corpus allatum of *Diploptera punctata*. *Molecular and Cellular Endocrinology* 158: 163-171

Pszczolkowski M.A. and Chiang A-S. (2000). Effect of chilling stress on allatal growth and juvenile hormone synthesis in the cockroach, *Diploptera punctata*. *Journal of Insect Physiology* 46: 923-931.

Pszczolkowski M.A and Brown J.J. (2003). Chilling affects allatal cell proliferation via antennae and protocerebral neurons in the cockroach *Diploptera punctata*. *Journal of Insect Physiology* 49: 123-129.

Pszczolkowski M.A. and Gelman D.B. (2004). Chilling stress effects on corpus allatum proliferation in the Hawaiian cockroach, *Diploptera punctata*: a role for ecdysteroids. *Journal of Insect Physiology* 50: 203-208.

Pszczolkowski, M.A., Brunner, J.F., Doerr, M.D., and Brown, J.J. (2004). Enhancement of *Bacillus thuringiensis* with monosodium glutamate against larvae of obliquebanded leafroller (Lep.:Tortricidae). *Journal of Applied Entomology* 128: 474-477.

Pszczolkowski, M.A., Peterson, A., Srinivasan, A. and Ramaswamy, S.B. (2005). Pharmacological analysis of ovarian patency in *Heliothis virescens*. *Journal of Insect Physiology* 51: 445-453.

Pszczolkowski M.A., Tucker, A., Srinivasan, A. and Ramaswamy S.B. (2006). On the functional significance of juvenile hormone in the accessory sex glands of male *Heliothis virescens*. *Journal of Insect Physiology* 52: 786-794.

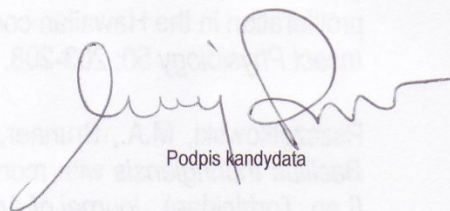
Pszczolkowski, M.A., Olson, E., Rhine, C., Ramaswamy, S.B. (2008). Role for calcium in the development of ovarian patency in *Heliothis virescens*. *Journal of Insect Physiology* 54: 358-366.

VII. Dlaczego ubiegam się o stopień doktora habilitowanego

Jestem podróżującym naukowcem od ponad piętnastu lat i przez ten okres spotkałem wielu polskich emigrantów. W większości są to emigranci „negatywni”, którzy zamknęli polski rozdział swojego życia i wiążą swoją przyszłość wyłącznie z nową ojczyzną. W moim przypadku tak nie jest. Chciałbym dzielić swoje doświadczenie i wiedzę z polskimi naukowcami i studentami w Polsce. Ośrodki akademickie po obu stronach Atlantyku zachęcają indywidualnych naukowców do intensywnej współpracy i wymiany naukowej. Sojusz Atlantycki i inne agencje zrzeszające zarówno USA jak i kraje Wspólnoty Europejskiej asygnują na to coraz więcej środków. Zważywszy postępowanie w tej kwestii, jestem pewny, że otworzą się dla mnie możliwości wykładania i pracy naukowej także w Polsce. Chciałbym być jednak do takiej ewentualności dobrze przygotowany. Uważam, że jako doktor habilitowany mógłbym znacznie skuteczniej służyć swą wiedzą i doświadczeniem polskim ośrodkom akademickim i naukowym niż bez tego stopnia.

Mountain Grove, 65711 MO, USA, 1 grudnia 2015

Miejscowość i data



Podpis kandydata