

„Wpływ ekstraktu z nasion miodli indyjskiej (*Azadirachta indica* A. Juss) na długość i przebieg cyklu życiowego mszycy grochowej (*Acyrtosiphon pisum* H) i wywilżny karłowatej (*Drosophila melanogaster* M)”

Autor: Michał Kuryłek

Klasa: III

Szkoła: LO im. Benedykta w Drohiczyźnie

Opiekun: mgr Małgorzata Głowacka

Streszczenie

Celem pracy było zbadanie wpływu ekstraktu z nasion miodli indyjskiej (*Azadirachta indica* A. Juss), zwanego zwyczajowo neem, na przebieg i długość cyklu życiowego wywilżny karłowatej (*Drosophila melanogaster* M) oraz mszycy grochowej (*Acyrtosiphon pisum* H). Przed wykonaniem doświadczenia postawiona została hipoteza – powyższy ekstrakt spowoduje wydłużenie stadium larwalnego oraz całego cyklu życiowego, a także zmniejszenie liczby składanych jaj przez osobniki obu badanych gatunków, co zostało częściowo potwierdzone po wykonaniu doświadczenia. Zastosowanie ekstraktu powodowało znacznym zmniejszeniem liczby złożonych jaj u obu badanych gatunków oraz wydłużeniem cyklu życiowego wywilżny karłowatej (w wyniku zwiększenia czasu trwania przede wszystkim stadium jaja i poczwarki), często powodując także przerwanie cyklu życiowego. Ekstrakt wpłynął także na cykl życiowy mszycy grochowej. Był on w dużej liczbie przypadków przerywany, przede wszystkim w stadium larwalnym. U osobników, których cykl życiowy nie został przerwany zaobserwowano istotne wydłużenie stadium larwalnego, co skutkowało wydłużeniem całego cyklu życiowego.

Wstęp

Ekstrakt z nasion miodli indyjskiej (*Azadirachta indica* A. Juss) – neem – jest od wieków wykorzystywany w indyjskiej medycynie alternatywnej (ajurwedzie) ze względu na jego właściwości antybakteryjne i przeciugrzybicze (Biswas, 2001). Był on określany w sanskrycie, języku starożytnych Indii, słowem „arista”, co oznacza „doskonały, kompletny”. Skuteczność tego ekstraktu w zmniejszeniu rozrodczości osobników trójczyka gryzącego została potwierdzona pracą wcześniejszych badaczy (Jilani, 1988), dlatego postanowiłem poszerzyć wiedzę na temat jego działania o przypadek mszycy grochowej - szkodnika upraw grochu - oraz wywilżny karłowatej (muszki owocowej), będącej owadem uciążliwym dla człowieka, często spotykanym przy owocach, na których samice składają jaja. Na wybranie do badań właśnie tego ekstraktu miało także wpływ badanie (Naumann, 1994), potwierdzające brak negatywnych skutków jego stosowania na liczebność populacji pszczoły miodnej i innych niezmiernie istotnych owadów zapylających. Mimo tak obiecujących możliwości, preparaty z miodli indyjskiej nie znalazły się w rejestrze środków ochrony roślin dopuszczonych do obrotu zezwoleniem Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi (www.minrol.gov.pl). Dlatego też, za cel pracy obrano zostało zbadanie, jak ekstrakt z nasion miodli indyjskiej (neem) wpłynie na długość i przebieg cyklu życiowego osobników wywilżny karłowatej i mszycy grochowej. Podczas wstępnych obserwacji odnotowane zostało zmniejszenie liczebności osobników wywilżny karłowatej w pobliżu pokrojonych owoców pokropionych tym ekstraktem. Na podstawie obserwacji i własnych spekulacji wysnułem następującą hipotezę: **badany ekstrakt powoduje wydłużenie stadium larwalnego i całego cyklu życiowego osobników wywilżny karłowatej i mszycy grochowej oraz powoduje zmniejszenie liczby składanych przez nie jaj, a tym samym zmniejszenie liczby nowych osobników.** Potwierdzenie powyższej hipotezy stanowiłoby argument za potencjalnym zastosowaniem tego ekstraktu w ochronie upraw grochu zwyczajnego (po przeprowadzeniu dalszych badań) jak i w celu pozbycia się uciążliwych muszek owocowych, spotykanych często przy przetwarzanych w domu owocach.

Materiały i metody

Badania prowadzone były w warunkach domowych w okresie 08.09.2018r. – 26.10.2018r w stałej temperaturze 20°C oraz na świetle dziennym. Organizmami użytymi w doświadczeniu były osobniki wywilżny karłowatej w formie nielotnej oraz mszycy grochowej, zakupione u hodowcy po 300 sztuk każdego gatunku. Stanowiły one wdzięczny obiekt badań ze względu na niewielkie rozmiary, dużą rozrodczość i stosunkowo krótki cykl życiowy. Próbę badawczą i próbę kontrolną stanowiło po 30 osobników każdego gatunku rozdzielonych do szklanych słoików (0,5l) po 5 w jednym (Ryc.1). Ze względu na to, iż badana była, między innymi, długość cyklu życiowego, aby zapobiec zaburzeniom w wynikach, badanie nie było rozpoczynane dla wszystkich osobników jednocześnie, lecz wyklute w danym dniu osobniki przenoszone były na pożywkę tak, aby w każdym słoiku znajdowały się osobniki wyklute jednego dnia (dla każdego słoika dzień ten był zapisywany i od niego liczony był czas trwania doświadczenia). Pożywka dla mszycy grochowej przygotowana została z 0,2 l wody, 0,1 kg mąki ziemniaczanej i 0,1 kg zmielonych liści grochu zwyczajnego (z hodowli doniczkowej grochu Boogie Microgreens). W pożywce dla wywilżny karłowatej zamiast nasion grochu użyte zostały drobno pokrojone jabłka o zbliżonej masie. W każdym słoiku umieszczono 10ml pożywki. W słoikach prób badawczych umieszczono dodatkowo waciki (przyklejone w pobliżu otworu słoika) nasączone 3 ml ekstraktu z nasion miodli indyjskiej firmy Calaya. Czas trwania doświadczenia wynosił 15 dni i zostało ono powtórzone 3 razy. Obserwacje zapisywane były w cyfrowym zeszycie laboratoryjnym codziennie o godzinie 7:00. Obserwacji podlegały:

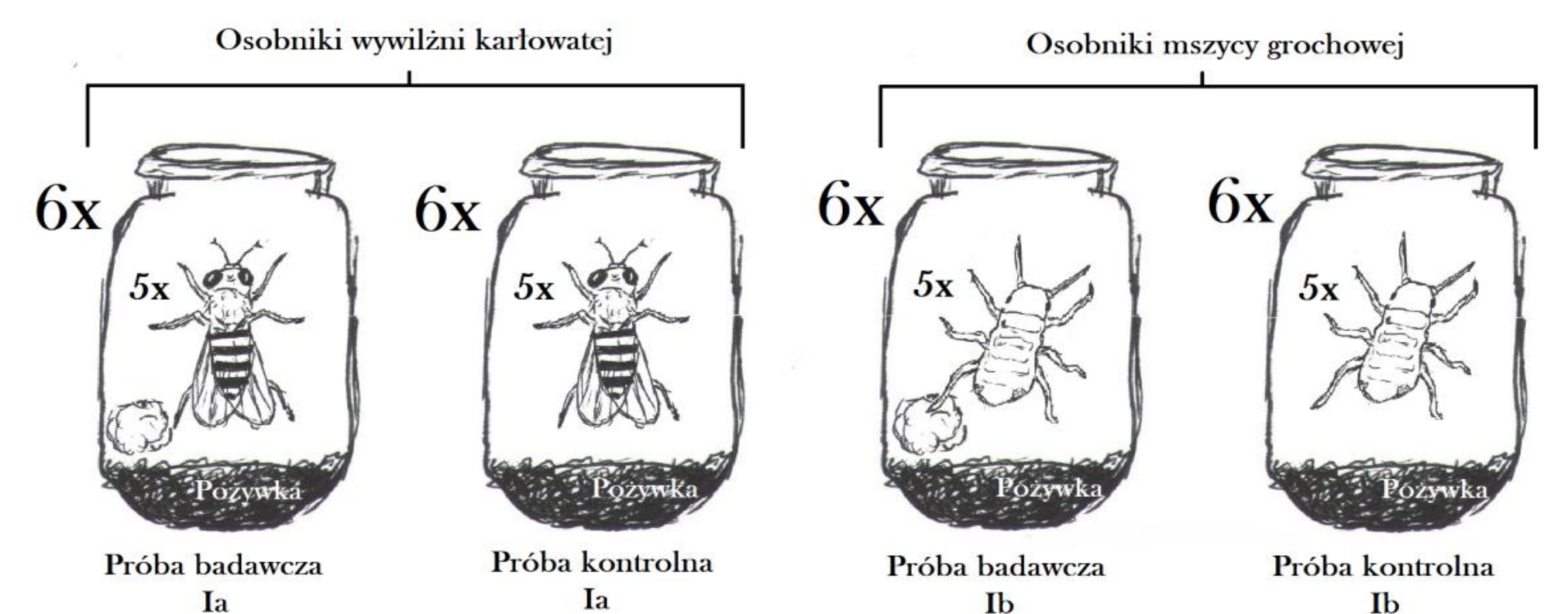
1. Dla wywilżny karłowatej: długość cyklu życiowego (czas od wyklucia osobnika do wyklucia nowych osobników z jaj przez niego złożonych), czas od złożenia jaja do wyklucia, długość stadium larwalnego, długość stadium poczwarki, długość stadium imago, liczba złożonych jaj w jednym słoiku, liczba nowych osobników po zakończeniu doświadczenia;

2. Dla mszycy grochowej: długość cyklu życiowego (czas od wyklucia osobnika do wyklucia nowych osobników z jaj przez niego złożonych), długość stadium larwalnego, długość stadium imago (brak stadium poczwarki), liczba złożonych jaj w jednym słoiku, liczba nowych osobników po zakończeniu doświadczenia.

Otrzymane wartości wyników uśredniono i policzone zostało odchylenie standardowe (Microsoft Office Excel 2013). Nowopowstałe podczas doświadczenia osobniki były podliczane i przenoszone do oddzielnych słoików aby zapobiec ewentualnym pomyłkom podczas określania długości cyklu życiowego.

Tab.1 Systematyka użytych gatunków

Domena: eukarionty	Domena: eukarionty	Domena: eukarionty
Królestwo: zwierzęta	Królestwo: zwierzęta	Królestwo: rośliny
Typ: Stawonogi	Typ: Stawonogi	Kład: rośliny naczyniowe
Gromada: Owady	Gromada: Owady	Kład: rośliny nasienne
Rząd: Pluskwiaki	Rząd: Muchówki	Klasa: okrytonasienne
Podrząd: Piersiodziobe	Podrząd: Muchówki krótkoczułkie	Kład: różowe
Nadrodzina: Mszyce	Rodzina: wywilżankowate	Rząd: mydleńcowe
Rodzina: Mszycowate	Podrodzina: Drosophilinae	Rodzina: meliowate
Podrodzina: Macrosiphinae	Plemię: Drosophilini	Rodzaj: Azadirachta
Rodzaj: Acyrthosiphon	Rodzaj: Drosophila	
Gatunek: mszyca grochowa	Gatunek: wywilżna karłowata	Gatunek: miodla indyjska

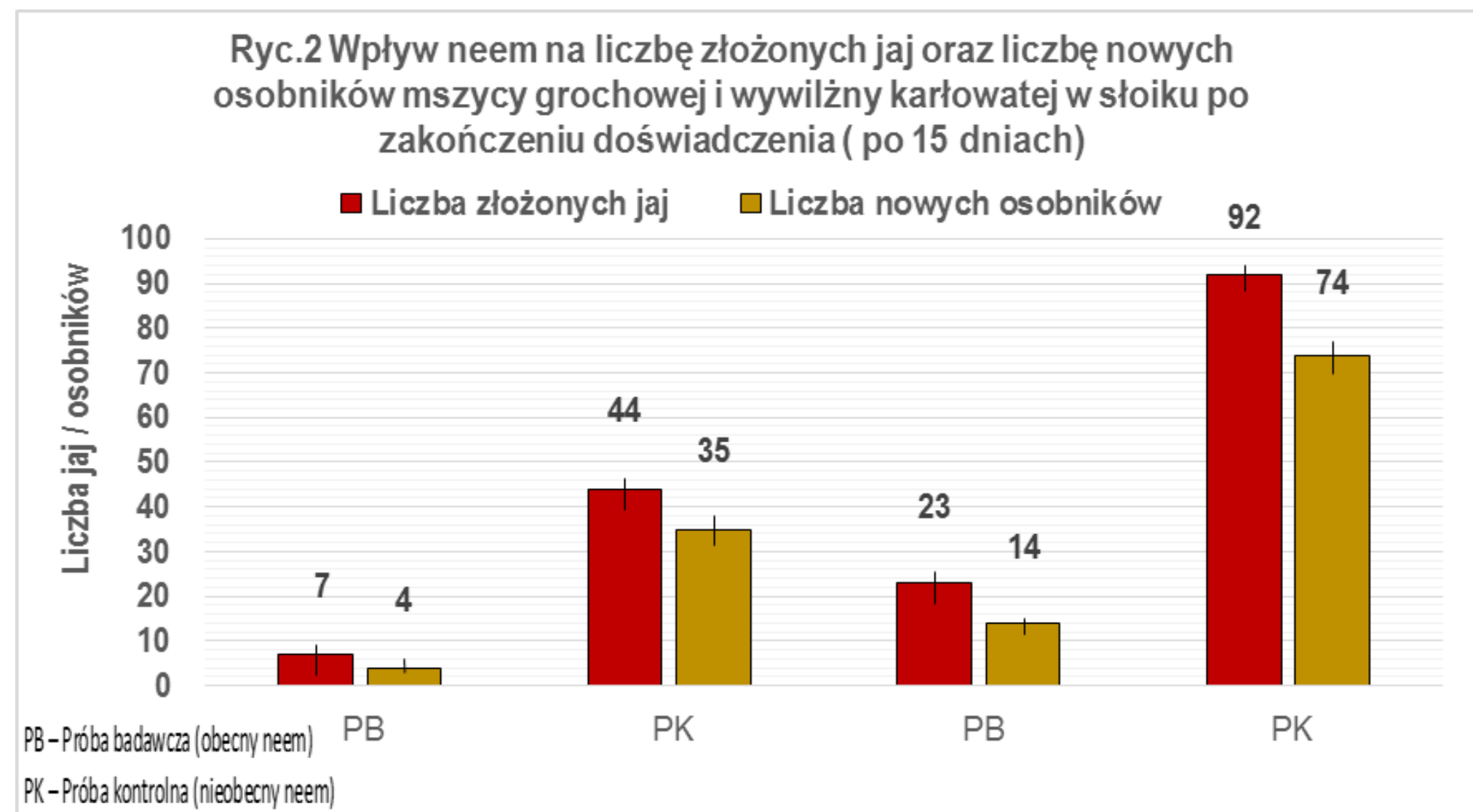


Wacik nasączony 3ml ekstraktu z nasion miodli indyjskiej
Ryc.1 Schemat przeprowadzonego doświadczenia (powtórnego 3 razy)

Wyniki

Ekstrakt z nasion miodli indyjskiej wpłynął na cykl życiowy zarówno wywilżny karłowatej jak i mszycy grochowej:

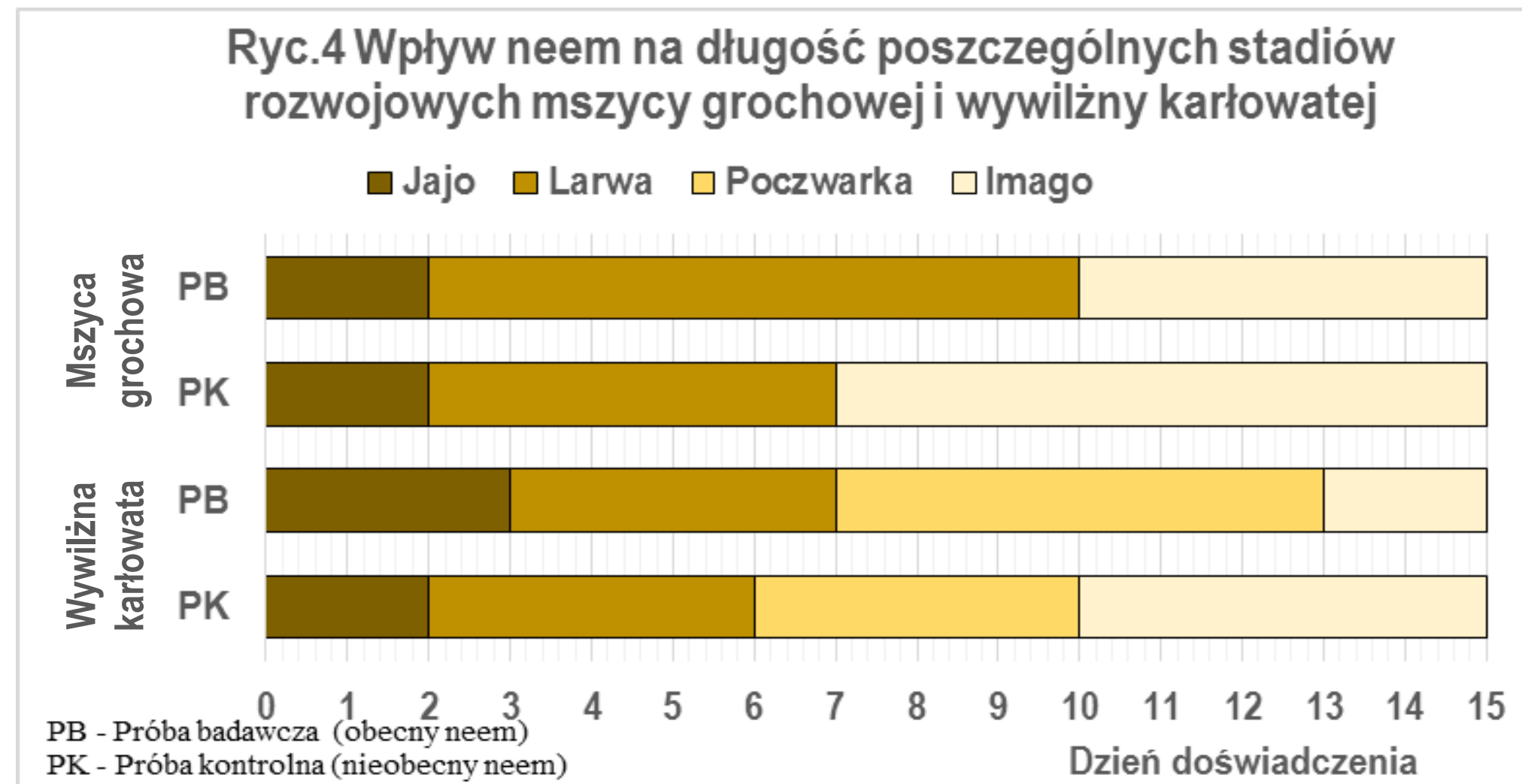
1. Odnotowano znaczący spadek liczby składanych jaj w próbach badawczych oraz spadek liczby nowych osobników po zakończeniu doświadczenia (ryc.2). Ilość składanych jaj w próbach badawczych spadła w stosunku do prób kontrolnych kolejno o: 84% dla wywilżny karłowatej i 75% dla mszycy grochowej. Natomiast liczba nowych osobników spadła o 89% dla wywilżny karłowatej i 81% dla mszycy grochowej. (wartości uśrednione)



2. Ekstrakt spowodował wydłużenie cyklu życiowego obu badanych gatunków (ryc.3) – dla wywilżny karłowatej o 1 dzień (8%), natomiast dla mszycy grochowej o 2 dni (18% - wartości uśrednione).



3. Obecność ekstraktu sprawiła, że zmianie uległa długość poszczególnych stadiów rozwojowych, odmiennie u obu gatunków. U osobników wywilżny karłowatej wydłużeniu uległo stadium jaja (średnio o 1 dzień) oraz poczwarki (średnio o 2 dni). U osobników mszycy grochowej wydłużeniu uległo jedynie stadium larwalne średnio o 3 dni (ryc.4).



4. Podczas doświadczenia w próbach badawczych odnotowano także przypadki przerywania cyklu życiowego u obu badanych gatunków. U wywilżny karłowatej cykl życiowy był przerywany najczęściej w stadium poczwarki, natomiast u mszycy grochowej – w stadium larwalnym, przy czym do przerywania cyklu dochodziło częściej wśród osobników mszycy grochowej. (ryc.5)



Dyskusja

Przeprowadzenie doświadczenia pozwoliło na weryfikację hipotezy i jej częściowe potwierdzenie. Stadium larwalne rzeczywiście zostało znacznie wydłużone w cyklu życiowym mszycy grochowej, natomiast u osobników wywilżny karłowatej najczęściej wydłużeniu ulegało stadium jaja i poczwarki. Cykl życiowy obu gatunków badanych owadów uległ wydłużeniu. Odnotowano także znaczne zmniejszenie liczby nowych osobników po zakończeniu doświadczenia w próbach badawczych. Wpływ na to miało prawdopodobnie kilka czynników. Oprócz bezpośredniego wpływu ekstraktu na zmniejszenie liczby składanych jaj przez osobniki obu badanych gatunków, warto zaznaczyć, iż znaczenie miał także mniejszy udział stadium imago w czasie 15 dni doświadczenia (wynikający z wydłużenia cyklu życiowego), podczas którego dochodziło do składania jaj. Na zmniejszenie liczebności nowych osobników miało także wpływ przerwanie cyklu życiowego u znaczącej liczby osobników obu gatunków (mniejsza ich liczba przystępowała do rozrodu). Chciałbym zaznaczyć, że nie należy porównywać ilości powstałych osobników między osobnikami wywilżny karłowatej a osobnikami mszycy grochowej, gdyż różnica w rozrodczości wynika także z cech gatunkowych.

Powodem opisanego wpływu neem na badane gatunki owadów mogła być zawarta prawdopodobnie w ekstrakcie azadirachtyna. Substancja ta wywołuje podobne efekty (wydłużenie stadium larwalnego, przerywanie cyklu życiowego, zmniejszenie liczby składanych jaj) wśród chrząszczy stonki ziemniaczanej (Kowalska, 2007) – jest w stosunku do nich antyfidantem, wywołującym zaburzenia żywieniowe i rozrodcze. Jej obecność na liściu wywołuje ruchy antyperystaltyczne przewodu pokarmowego owada, co uniemożliwia mu połknięcie pokarmu. Substancja ta wpływa także na stężenie hormonu juvenilnego, podwyższając je, co powoduje wydłużanie stadium larwalnego (Lokanadhan, 2012). Przeprowadzane były w przeszłości także badania, wykazujące negatywny wpływ neem na rozwój osobników kleszcza psiego (*Rhipicephalus sanguineus* L) – ekstrakt powoduje zmniejszenie grubości integumentu (Ribamar, 2017) oraz upośledza rozwój ślinianek (Remedio, 2015). Wskazuje to na wielokierunkowe działanie ekstraktu i na możliwości jego wykorzystania nie tylko jako insektycydów w stosunku do szkodników upraw rolnych, lecz także w celu zwalczania wspomnianego wyżej ektopasożyta.

Ze względu na fakt, iż ekstrakt z nasion miodli indyjskiej spowodował podczas przeprowadzonego przeze mnie doświadczenia:

- znaczące obniżenie liczby składanych jaj przez osobniki obu gatunków (a tym samym liczby nowych osobników po zakończeniu doświadczenia)
- przerwanie cyklu życiowego znaczącej części osobników obu gatunków owadów
- wydłużenie cyklu życiowego obu badanych gatunków owadów

może on znaleźć zastosowanie w życiu codziennym – jego stosowanie w warunkach domowych może znacznie ograniczyć rozwój i wzrost liczby osobników muszki owocowej (wywilżny karłowatej), co ułatwi przechowywanie owoców.

Ponadto, biorąc także pod uwagę potwierdzony pracami wcześniejszych badaczy:

- brak negatywnego wpływu ekstraktu na rozrodczość pszczoły miodnej (i innych kluczowych owadów zapylających) (Naumann, 1994)
 - brak toksycznych właściwości ekstraktu w stosunku do człowieka (Boeke, 2004)
- mogłby on, po przeprowadzeniu dalszych badań, zostać zastosowany jako substytut sztucznych fumigantów przeciw mszycy grochowej. Oprócz tego, ze względu na fakt, iż w indyjskiej medycynie alternatywnej ceni się antybakteryjne i przeciugrzybicze właściwości neem (Arnab Banerjee, 2009), wartościowymi mogłby okazać się dalsze badania nad jego wpływem na grzyby i bakterie wywołujące infekcje roślin uprawnych. Hipotetyczne inne możliwości zastosowania tego ekstraktu w agrokulturze (potencjalne zwalczanie bakterii i grzybów odpowiedzialnych za infekcje roślin), dodatkowo sprawiają, że ekstrakt z miodli indyjskiej może okazać się bardzo cennym środkiem ochrony roślin. Myślę, że należałoby także ustalić jego wpływ na przebieg cyklu życiowego i rozrodczość naturalnych drapieżników mszycy grochowej. Dlatego sugeruję, aby ekstrakt z nasion miodli indyjskiej stanowił przedmiot dalszych badań.

Piśmiennictwo

1. Banerjee A., (2009). Antifungal activities and chemical characterization of Neem leaf extracts on the growth of some selected fungal species in vitro culture medium. *Jasem issn*, Maj 2009. 49-53
2. Biswas K., (2001). Biological activities and medicinal properties of neem (*Azadirachta indica*). *Current Science*. 82(11): 1335-1346.
3. Boeke, S.J., (2004). Safety Evaluation of Neem (*Azadirachta indica*) Derived Pesticides. *Journal of Ethnopharmacology*, 94, 25-41.
4. Jilani G., (1988). Repellent and Growth-Inhibiting Effects of Turmeric Oil, Sweetflag Oil, Neem Oil, and "Margosan-O" on Red Flour Beetle (Coleoptera: Tenebrionidae). *Journal of Economic Entomology*. 81(4):1226-1230.
5. Kowalska J., (2007). Wykorzystanie azadirachtyny w zwalczaniu stonki ziemniaczanej w systemie rolnictwa ekologicznego. *Postępy w Ochronie Roślin*, 47(4); 293-297.
6. Lokanadhan S., (2012). Neem products and their agricultural applications. *JBiopest*. March 2012. 72-76.
7. Naumann K., (1994). Evaluation of the repellent effects of a neem insecticide on foraging honey bees and other pollinators. *Cambridge University Press*. April 1994; 225-230.
8. Remedio R., (2015). Morphological alterations in salivary glands of *Rhipicephalus sanguineus* ticks (Acari: Ixodidae) exposed to neem seed oil with known azadirachtin concentration.
9. Ribamar J., (2017). The effects of neem oil (*Azadirachta indica* A. Juss) enriched with different concentrations of azadirachtin on the integument of semi-engorged *rhipicephalus sanguineus* sensu lato (Acari: Ixodidae) females. *Wiley*. March 2017.