

Uniwersytet Śląski w Katowicach  
Szkola Doktorska w Uniwersytecie Śląskim  
Wydział Nauk Przyrodniczych

ANNA POMPKA

Rozprawa doktorska

**Sprawność detoksykacyjna biedronek owelnicy lucernianki, *Subcoccinella vigintiquatuorpunctata* L., żerujących na roślinach żywicielskich o zróżnicowanej zawartości kadmu i cynku oraz flawonoidów.**

Promotor:

dr hab. Alina Kafel

Katowice, 2025

Składam najserdeczniejsze podziękowania  
Promotorowi – Pani dr hab. Alinie Kafel  
za okazaną pomoc, cenne wskazówki i wsparcie  
w trakcie realizowania niniejszej pracy

## STRESZCZENIE

Ocena sprawności detoksykacyjnej owadów powinna uwzględniać ich wcześniejsze doświadczenia, np. ich historie ekspozycji na metale czy flawonoidy obecne w ich pokarmie. Zróżnicowanie w skażeniu metalami, zwłaszcza w obszarach zdegradowanych aktywnością hutniczą może mieć wieloletnie znaczenie na ich wpływ i kumulację w roślinach żywicielskich niektórych gatunków owadów, które pod wpływem metali mogą różnić się zawartością flawonoidów. Zarówno allelozwiązki takie jak flawonoidy jak i metale, takie kadm czy cynk mogą być wykorzystywane do obrony przed roślinożercami. Innym powszechnie występującym stresorem może być krótkotrwała niedostępność pokarmu, co może mieć znaczenie w zasiedlaniu kolejnych roślin żywicielskich. Niektóre z nich mogą być ważnymi roślinami uprawowymi. Jako obiekt badawczy wybrałam biedronkę owelnicę lucerniankę *Subcoccinella vigintiquatuorpunctata*, która może wywoływać szkody wśród upraw lucerny siewnej *Medicago sativa*. A na początku sezonu wegetacyjnego może zasiedlać inne rośliny, np. lepnicy rozdętą *Silene vulgaris*. Jej odporne ekotypy mogą zasiedlać obszary o dużym skażeniu metalami, jak to jest wokół nieczynnej huty Szopienice w Katowicach. Biedronki owelnicy lucerninki zbierano w ciągu dwóch miesięcy. Larwy zbierano w miesiącu czerwcu, a dorosłe osobniki – w lipcu, z terenu z trzech stanowisk badawczych, oddalonych odpowiednio I – 450 m, II – 250 m, III – 50 m od nieczynnej huty. Jednocześnie z powyższych stanowisk, zebrano także pędy nadziemne lepnicy rozdętej. Następnie dorosłe osobniki hodowano przez 5 dni na liściach lepnicy rozdętej, część z nich poddano bądź nie 1- lub 2-dniowemu okresowi głodu. Natomiast pozostałą część osobników, przeniesiono na sadzonki lucerny siewnej *M. sativa*, i analogicznie hodowano, a potem poddano takim samym okresom głodzenia, jak w przypadku hodowli na lepnicy rozdętej. W pędach nadziemnych roślin lepnicy rozdętej zmierzono zawartość flawonoidów. W pędach nadziemnych roślin lepnicy rozdętej oraz w ciele osobników dorosłych owelnicy lucernianki oznaczono stężenie metali: kadmu i cynku.

Dla tych stanowisk wcześniej ujawniono gradient w stężeniu metali w pędach lepnicy rozdętej. Taka sytuacja pozwoliła na ocenę sprawności systemów obronnych zaangażowanych głównie w ograniczanie stresu antyoksydacyjnego u biedronek, gdy żerowaniu na roślinach o różnym skażeniu metalami a także o zróżnicowanym poziomie flawonoidów przeniesione będą na roślinę uprawną lucernę siewną i czy dodatkowo reakcji krótki okres głodu. W pędach nadziemnych roślin lepnicy rozdętej oraz w ciele

osobników dorosłych owelnicy lucernianki oznaczono stężenie metali: kadmu i cynku. W ciele larw i osobników dorosłych owelnicy lucernianki *S. vigintiquatuorpunctata* dokonano: pomiar stężenia glutationu zredukowanego z użyciem spektrofotometru, a także metody spektrofotometryczne oznaczeń: stężenie białka całkowitego metodą Bradforda, aktywność S-transferazy glutationowej (GST) za pomocą CDNB, poziom całkowitej pojemności antyoksydacyjnej (TAC) z użyciem rodnika ABTS<sup>+</sup>, stężenie dialdehydu malonowego (MDA), proporcja tioli zredukowanych do utlenionych (RSH/RSSR) oraz aktywność  $\gamma$ -glutamylotraspeptydazy (GGT) (tylko u larw). W ciele osobników dorosłych owelnicy lucernianki *S. vigintiquatuorpunctata* pochodzących z hodowli na pędach nadziemnych lepnicy rozdętej *S. vulgaris* (I i II stanowisko, niepoddane i poddane 1- i 2-dniowemu okresowi głodu) dokonano: pomiaru stężeń substratów energetycznych (węglowodany, białko, lipidy, glikogen).

Potwierdzono występowanie gradientu stężeń gdy uwzględniono stężenie metalu w pędach roślin w zależności od ich lokalizacji od nieczynnej huty; wyższe stężenia u roślin ze stanowisk położonych bliżej nieczynnego emitera. W przypadku flawonoidów różnice były niezależne od przedstawionego gradientu metali. Pomimo tego, że takie zróżnicowanie nie wystąpiło u owadów żerujących na roślinach z różnych lokalizacji, zaobserwowano dominowanie różnych składników obrony antyoksydacyjnej między biedronkami żerującymi na pędach lepnicy rozdętej z różnych stanowisk jeśli chodzi o wykorzystanie antyoksydantów drobnocząsteczkowych takich jak glutation lub tioli białkowych. To zróżnicowanie wydaje się że było utrzymywane także u osobników przeniesionych na następną roślinę żywicielską, lucernę. To pokazuje, że wcześniejsza historia ekspozycji na pokarm zróżnicowany zwłaszcza w zawartość metali może mieć znaczenie dla późniejszej sprawności detoksykacyjnej owadów.

**Słowa kluczowe:** *Subcoccinella vigintiquatuorpunctata*, głód, kadm, cynk, flawonoidy, detoksykacja

## ABSTRACT

Assessing the detoxification efficiency of insects should take into account their previous experiences, such as their history of exposure to metals or flavonoids present in their food. Variations in metal contamination, especially in areas degraded by smelting activity, can have long-term implications for their impact and accumulation in the host plants of some insect species. These species, under the influence of metals, may differ in their flavonoid content. Both allelochemicals, such as flavonoids, and metals such as cadmium and zinc, can be used to defend against herbivores. Another common stressor can be the short-term unavailability of food, which can be important in the colonization of subsequent host plants. Some of these host plants may be important crops. I chose the alfalfa ladybug *Subcoccinella vigintiquatuorpunctata* as my research subject, as it can cause damage to alfalfa (*Medicago sativa*) crops. At the beginning of the growing season, it can colonize other plants, such as the inflated catchfly (*Silene vulgaris*). Its resistant ecotypes can colonize areas with high metal contamination, such as the area around the disused Szopienice steelworks in Katowice. Alfalfa ladybugs were collected during two months. Larvae were collected in June, and adults in July, from three study sites, located 450 m, 250 m, and 50 m from the disused emitter, respectively. At the same time, shoots of the inflated catchfly were also collected from these sites. Adults were then reared for 5 days on the leaves of the inflated catchfly; some were subjected to a 1- or 2-day starvation period, or not. The remaining individuals were transferred to *M. sativa* seedlings and cultured similarly, then subjected to the same starvation periods as for the inflated catchfly. Flavonoid content was measured in the above-ground shoots of the inflated catchfly plants. The concentrations of the metals cadmium and zinc were determined in the above-ground shoots of the inflated catchfly plants and in the bodies of adult alfalfa moths.

For these sites, a gradient in metal concentrations was previously detected in the shoots of the inflated catchfly. This situation allowed for the assessment of the efficiency of defence systems primarily involved in reducing antioxidant stress in ladybugs when feeding on plants with varying metal contamination and flavonoid levels, which were transferred to the cultivated plant alfalfa, and whether they additionally responded to a short period of starvation. The concentrations of the metals cadmium and zinc were determined in the above-ground shoots of the inflated catchfly and in the bodies of adult alfalfa beetles. In the bodies of *S. vigintiquatuorpunctata* larvae and adults, the following

measurements were performed: the concentration of reduced glutathione using a spectrofluorometer, and the following spectrophotometric determinations were performed: total protein concentration using the Bradford method, glutathione S-transferase (GST) activity using CDNB, total antioxidant capacity (TAC) using the ABTS<sup>+</sup> radical, malondialdehyde (MDA) concentration, the ratio of reduced to oxidized thiols (RSH/RSSR), and  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase (GGT) activity (only in larvae). In the bodies of the adults of *S. vigintiquatuorpunktata* grown on above-ground shoots of the inflated catchfly *S. vulgaris* (from sites I and II, untreated or subjected to a 1-day and 2-day period of starvation), the following measurements were performed: the concentrations of energy substrates (carbohydrates, protein, lipids, glycogen).

A concentration gradient was confirmed when considering metal concentration in plant shoots depending on their location from the disused smelter; higher concentrations were found in plants from sites closer to the disused emitter. In the case of flavonoids, the differences were independent of the metal gradient presented. Although such differentiation did not occur in insects feeding on plants from different locations, a dominance of different antioxidant defence components was observed between ladybugs feeding on shoots of the inflated catchfly from different locations in terms of the utilization of small-molecule antioxidants such as glutathione or protein thiols. This differentiation appears to be maintained also in individuals transferred to the next host plant, alfalfa. This indicates that a prior history of exposure to food, particularly with varying metal content, may be important for the insects' subsequent detoxification efficiency.

**Keywords:** *Subcoccinella vigintiquatuorpunktata*, starvation, cadmium, zinc, flavonoids, detoxification

## Spis treści

|                                                                                                                                                                                                                                 |           |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>WYKAZ SKRÓTÓW .....</b>                                                                                                                                                                                                      | <b>9</b>  |
| <b>I. WSTĘP.....</b>                                                                                                                                                                                                            | <b>10</b> |
| 1. Roślinożerne owady. ....                                                                                                                                                                                                     | 10        |
| 1.1 Obrona roślin.....                                                                                                                                                                                                          | 12        |
| 1.2 Flawonoidy.....                                                                                                                                                                                                             | 13        |
| 1.3 Wybrane czynniki modyfikujące zawartość flawonoidów w roślinach.....                                                                                                                                                        | 14        |
| 1.4 Wpływ flawonoidów na owady. ....                                                                                                                                                                                            | 15        |
| 2. Metale ciężkie. ....                                                                                                                                                                                                         | 16        |
| 2.1 Źródła metali ciężkich.....                                                                                                                                                                                                 | 17        |
| 2.2. Metale ciężkie w glebie.....                                                                                                                                                                                               | 19        |
| 2.3 Metale ciężkie w roślinach.....                                                                                                                                                                                             | 21        |
| 2.4 Metale ciężkie u owadów. ....                                                                                                                                                                                               | 22        |
| 2.5 Działanie kadmu i cynku na roślinożerne owady.....                                                                                                                                                                          | 23        |
| 3. Głód. ....                                                                                                                                                                                                                   | 26        |
| 4. Systemy obronne wobec wybranych stresorów. ....                                                                                                                                                                              | 28        |
| <b>II. CELE PRACY .....</b>                                                                                                                                                                                                     | <b>31</b> |
| <b>III. MATERIAŁ I METODY .....</b>                                                                                                                                                                                             | <b>33</b> |
| 1. Charakterystyka badanego gatunku. ....                                                                                                                                                                                       | 33        |
| 2. Zbiór oraz hodowla materiału badawczego.....                                                                                                                                                                                 | 33        |
| 3. Oznaczenia wykonane w pędach nadziemnych roślin: lepnicy rozdętej <i>S. vulgaris</i> i lucerny siewnej <i>M. sativa</i> oraz w ciele larw i osobników dorosłych owelnicy lucernianki <i>S. vigintiquatuorpunctata</i> . .... | 35        |
| 4. Opis użytych metod/technik badawczych. ....                                                                                                                                                                                  | 36        |
| 4.1 Stężenie Cd i Zn w pędach roślin i ciele owelnicy lucernianki <i>S. vigintiquatuorpunctata</i> .....                                                                                                                        | 36        |
| 4.2 Stężenie flawonoidów całkowitych w pędach nadziemnych lepnicy rozdętej <i>S. vulgaris</i> i lucerny siewnej <i>M. sativa</i> . ....                                                                                         | 37        |
| 4.3 Pomiary parametrów stresu oksydacyjnego w ciele larw i osobników dorosłych owelnicy lucernianki <i>S. vigintiquatuorpunctata</i> . ....                                                                                     | 38        |
| 4.3.1 Stężenie glutationu zredukowanego (GSH). ....                                                                                                                                                                             | 38        |
| 4.3.2 Pomiar całkowitej pojemności antyoksydacyjnej (TAC).....                                                                                                                                                                  | 38        |
| 4.3.3 Aktywność S-transferazy glutationowej (GST).....                                                                                                                                                                          | 39        |
| 4.3.4 Badanie in vitro GST w obecności wybranych inhibitorów. ....                                                                                                                                                              | 39        |
| 4.3.5 Stężenie dialdehydu malonowego (MDA) – produktu peroksydacji lipidów.                                                                                                                                                     |           |

|       |                                                                                                                                                                                                                                                     |    |
|-------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 4.3.6 | Proporcja tioli zredukowanych do utlenionych (RSH/RSSR).                                                                                                                                                                                            | 40 |
| 4.3.7 | Aktywność enzymu $\gamma$ -glutamylotraspeptydazy (GGT).                                                                                                                                                                                            | 41 |
| 4.3.8 | Stężenie białka całkowitego.                                                                                                                                                                                                                        | 41 |
| 4.4   | Stężenie substratów energetycznych.                                                                                                                                                                                                                 | 42 |
| 5.    | Metody statystyczne.                                                                                                                                                                                                                                | 43 |
| IV.   | WYNIKI.                                                                                                                                                                                                                                             | 44 |
| 1.    | Zawartość metali w pędach nadziemnych lepnicy rozdętej <i>S. vulgaris</i> .                                                                                                                                                                         | 44 |
| 2.    | Zawartość metali w ciele osobników dorosłych owelnicy lucernianki <i>S. vigintiquatuorpunctata</i> .                                                                                                                                                | 46 |
| 3.    | Stężenie flawonoidów całkowitych w pędach nadziemnych roślin: lucerny siewnej <i>M. sativa</i> oraz lepnicy rozdętej <i>S. vulgaris</i> zebranej z trzech różnych odległościach, oddalonych od nieczynnego emitera.                                 | 48 |
| 4.    | Stężenie glutationu zredukowanego (GSH).                                                                                                                                                                                                            | 49 |
| 5.    | Poziom całkowitej pojemności antyoksydacyjnej (TAC).                                                                                                                                                                                                | 53 |
| 6.    | Aktywność S-transferazy glutationowej (GST).                                                                                                                                                                                                        | 58 |
| 7.    | Badanie in vitro GST w obecności wybranych inhibitorów.                                                                                                                                                                                             | 61 |
| 8.    | Stężenie dialdehydu malonowego (MDA) – produktu peroksydacji lipidów.                                                                                                                                                                               | 63 |
| 9.    | Proporcja tioli zredukowanych do utlenionych (RSH/RSSR).                                                                                                                                                                                            | 66 |
| 10.   | Aktywność $\gamma$ -glutamylotraspeptydazy (GGT).                                                                                                                                                                                                   | 69 |
| 11.   | Stężenie białka całkowitego.                                                                                                                                                                                                                        | 70 |
| 12.   | Stężenie substratów energetycznych.                                                                                                                                                                                                                 | 73 |
| V.    | DYSKUSJA.                                                                                                                                                                                                                                           | 77 |
| 1.    | Stężenie metali w lepnicy rozdętej i w ciałach owelnicy lucernianki <i>S. vigintiquatuorpunctata</i> z trzech stanowisk.                                                                                                                            | 77 |
| 2.    | Zawartość flawonoidów w pędach nadziemnych lepnicy rozdętej <i>S. vulgaris</i> z trzech analizowanych stanowisk.                                                                                                                                    | 80 |
| 3.    | Obrona detoksykacyjna owelnicy lucernianki <i>S. vigintiquatuorpunctata</i> żerujących na pędach nadziemnych lepnicy rozdętej <i>S. vulgaris</i> , cechujących się zróżnicowaniem zawartości metali i flawonoidów.                                  | 81 |
| 4.    | Krótkotrwałe okresy głodu u osobników dorosłych owelnicy lucernianki <i>S. vigintiquatuorpunctata</i> po okresie żerowania na lepnicy rozdętej <i>S. vulgaris</i> .                                                                                 | 81 |
| 5.    | Reakcja obronna u osobników owelnicy lucernianki <i>S. vigintiquatuorpunctata</i> hodowanych na lucernie siewnej <i>M. sativa</i> , wcześniej hodowanych na roślinach lepnicy rozdętej <i>S. vulgaris</i> o różnej zawartości metali i flawonoidów. | 83 |
| VI.   | WNIOSKI                                                                                                                                                                                                                                             | 85 |
| VII.  | BIBLIOGRAFIA                                                                                                                                                                                                                                        | 87 |



## WYKAZ SKRÓTÓW

|                         |                                                        |
|-------------------------|--------------------------------------------------------|
| <b>ABTS</b>             | 2,2-azytnobis(3etylobenzotiazolini-6-sulfonian)        |
| <b>ABTS<sup>+</sup></b> | rodnik 2,2-azytnobis(3etylobenzotiazolini-6-sulfonian) |
| <b>GGT</b>              | $\gamma$ -glutamylotraspeptydaza                       |
| <b>GSH</b>              | glutation zredukowany                                  |
| <b>GST</b>              | S-transferaza glutationowa                             |
| <b>MDA</b>              | dialdehyd malonowy                                     |
| <b>RSH</b>              | tiole zredukowane                                      |
| <b>RSSR</b>             | tiole utlenione                                        |
| <b>TAC</b>              | całkowita pojemność antyoksydacyjna                    |

## I. WSTĘP

### 1. Roślinożerne owady.

Jednym z najbardziej zróżnicowanych typów organizmów na ziemi są owady (Zhang i in., 2023). Nowe opracowania metod badawczych, z użyciem bardziej zaawansowanych narzędzi statystycznych oraz uzyskiwaniem coraz to nowych danych, pozwoliły na oszacowanie globalnej różnorodności gatunkowej. Szacuje się, że jest około 5,5 miliona gatunków owadów, a około 1 miliona zostało dotychczas poznanych. Ponad połowa z nich to owady roślinożerne. Nadal nie zbadano jeszcze ok. 80% z nich, zwłaszcza gatunków z rzędów: Coleoptera, Diptera i Hymenoptera. (Stork, 2018; Zhang i in., 2023). Owady roślinożerne są szczególną grupą zwierząt ponieważ, ich zdolności przystosowawcze do zmiennych warunków środowiska, umożliwiają im szybkie rozpraszanie się w agroekosystemach oraz w miarę możliwości zwiększanie liczebności na zasiedlonych nowych terytoriach – dając im przewagę nad innymi grupami zwierząt. (Laštůvka, 2009). Warto zwrócić uwagę na inne czynniki, które mogą mieć znaczenie dla rozprzestrzenienia owadów roślinożernych. Zmiany klimatyczne (dotyczące m.in. wzrostu średniej temperatury rocznej, czy rosnącego niedoboru wody) mogą stanowić duże wyzwanie dla hodowców roślin w przyszłości, gdyż mogą wpływać na występowanie szkodników owadzych. Łagodne zimy mogą zwiększać przeżywalność owadów wrażliwych na mróz. Podwyższona temperatura otoczenia może przyczyniać się do wyższych wskaźników wzrostu i rozmnażania oraz może pomóc w szybszym uzyskaniu minimalnej temperatury lotu (Grace i in., 2019).

Jednymi z czynników abiotycznych, są te związane z pogodą. Stwierdzono bowiem, że wzrost, rozmnażanie i liczebność populacji zależą od ich sezonowej zmienności, co pokazano na przykładzie roślin rosnących w Indiach. Czynniki pogodowe takie, jak: temperatura maksymalna, wieczorna wilgotność względna czy opady deszczu, występujące w określonych sezonach (luty – maj; czerwiec – wrzesień) przyczyniały się do zmian intensywności żerowania głównych grup szkodników drzew moringi olejodajnej *Moringa oleifera* w Indiach. Warto jednak zaznaczyć, wpływ czynników takich, jak temperatura, opady atmosferyczne czy wilgotność względna, mogą może być specyficzny gatunkowo. Na podstawie badań prowadzonych na przedstawicielach z rzędu Lepidoptera, żerujących na uprawach ziemniaka, stwierdzano ich największą liczebność w okresie czerwiec-lipiec, wskazano, że temperatura była znaczącym parametrem

sprzyjającym zwiększeniu liczebności badanej populacji (Thakur i Rawat, 2014; Manikandan i Rengalakshmi, 2024; Saini i in., 2024).

Na aktywność szkodników wpływać może wpływać kompozycja krajobrazu wokół danej uprawy. Zaobserwowano, że u wybranych szkodników polifagicznych, obecność innych, dodatkowych upraw w otoczeniu, może modyfikować ich dynamikę populacji (Sivakoff i in., 2013). Ukształtowanie i zróżnicowanie danego terenu to inne kluczowe cechy warunkujące zamiar zasiedlenia. Zaobserwowano, że udział upraw pszenicy w danym terenie i ich przestrzenna organizacja może być ważnym czynnikiem dla tempa zasiedlenia u mszycy zbożowej *Sitobion avenae* (Ciss i in., 2013).

Kolejny czynnik jakim jest niska jakość rośliny żywicielskiej – wrzосу pospolitego *Calluna vulgaris*, pod względem zmniejszonej zawartości azotu, może prowadzić wśród chrząszczy *Lochmaea suturalis* do obniżonej płodności, zwiększonej śmiertelności w czasie zimowania (Peterson i in., 2024). W innym badaniu zaobserwowano, iż żerowanie 39 gatunków szkodników (w tym 6-ciu uważanych za główne), należące do rzędów: Lepidoptera, Diptera, Orthoptera, Heteroptera, Thysanoptera i Coleoptera w dużej mierze było uzależnione od okresu rozwoju rośliny uprawnej, soi *Glycine max*. Pojawienie się większości z nich odnotowano w fazie spoczynku do momentu zakwitnięcia, a najbardziej znaczący atak owadów – podczas fazy kwitnienia i tworzenia strąków (Biswas 2013). Inny czynnik, wzrost zasolenia (podwyższenie stężenia chlorku sodu w glebie) powodował obniżenie płodności i przeżywalności oraz skrócenie życia w populacjach mszyc *Aphis gossypii* (Jiao i in., 2024).

Ważnym czynnikiem abiotycznym jest stężenie metali w tkankach roślin, do którego odnoszę się w następnym rozdziale.

Charakter uszkodzeń roślin spowodowanych przez szkodniki owadzie może być wieloraki (Biswas 2013). Przykładowo, charakterystycznym objawem żerowania larw ćmy *Spodoptera litura* mogą być nieregularne otwory w liściach oraz wydrążone tunele w łodygach soi *Glycine max*, a larw ćmy *Helicoverpa armigera* – zniekształcone pędy tych roślin (Biswas 2013). Owady mogą uszkadzać rośliny żywicielskie, poprzez gryzienie czy żucie liści, łodygi i korzeni oraz przez wysysanie soków – zwykle rejestrowane ubytki mogą być oznaką ich żerowania. Wśród oznak, ujawniających zaatakowanie roślin przez określone szkodniki mogą być także zmiany barwy liści (np. żółknięcie, czy brązowienie), tworzenie galasów, oprzędów na roślinach żywicielskich (Kumar i Rathor 2020). Owady roślinożerne dodatkowo mogą być wektorami dla

wirusów, bakterii, grzybów, które z kolei mogą wywołać choroby roślin uprawnych (Almeida i Nunneya, 2015; Whitfield, 2015; Grace i in., 2019; Kumar i Rathor, 2020). Opisano już co najmniej kilkuset takich chorób u różnych roślin powodujących znaczne obniżenie jakości plonów (Kumar i Rathor, 2020).

### **1.1 Obrona roślin.**

Rośliny, aby móc efektywnie bronić się przed roślinożercami, wykształciły różne mechanizmy morfologiczne, biochemiczne czy mechaniczne, które mogą oddziaływać na ich odżywianie, wzrost czy przetrwanie (War i in., 2012). Cechy anatomiczne roślin np. zwartość wiechy u sorgo *Sorghum bicolor* także mogą wpływać na liczebność szkodników, które w zależności od gatunku preferują odmienną strukturę wiechy, by zapewnić sobie odpowiednie warunki do wzrostu (Saini i in., 2024). Zainfekowane rośliny przez szkodniki owadzie, mogą stać się łatwiejszym celem inwazji dla szkodników tego samego lub należącego do innego gatunku, z tego względu, że stwierdzono tłumienie mechanizmów obronnych kukurydzy przez poprzedniego szkodnika i tym samym stwarzając ryzyko kolonizacji przez następnego (Oliveira i in., 2024). Indukowane reakcje obronne roślin mogą być wywołane w odpowiedzi na żerowanie roślinożernych owadów. Wyspecjalizowane struktury morfologiczne, które są przykładem mechanicznej ochrony powierzchni roślin np.: włoski, trichomy, ciernie, kolce, grube liście, wytrzymałość. Ważnym czynnikiem który może limitować ilość roślinożerców mogą być wytwarzane wtórne substancje roślinne przez rośliny żywicielskie takich, jak: terpenoidy, alkaloidy, antocyjany, fenole, flawonoidy, lektyny, garbniki, inhibitory proteinaz, enzymy, chininy, kardenolidy, glikozydy irydoidowe czy fitohormony (War i in., 2012; Belete, 2018; War i in., 2018). Wykorzystanie odpowiednich odmian roślin uprawnych wykorzystujących niektóre z tych mechanizmów można wykorzystywać do wpływania na liczebność szkodników (Belete 2018). Wytwarzanie lotnych związków organicznych przez pomidory, mogą służyć na przykład wykorzystania odpowiednich odmian tych roślin, skutecznych w odstraszeniu szkodnika skośnika pomidorowego *Tuta absoluta*, obniżając straty w uszkodzeniach roślin uprawowych (Amegan i in., 2024). Substancje lotne, wytwarzane przez rośliny mogą być pomocne w lokalizacji oraz wyborze rośliny żywicielskiej, lecz także mogą działać odstraszająco na owady roślinożerne. Innym przykładem są związki organiczne wytwarzane przez kukurydzę *Zea mays*, które są wykorzystywane zarówno przez larwy jak i owady dorosłe ćmy *Spodoptera frugiperda* w celu zlokalizowania ich rośliny

żywielskiej, kukurydzy. I tak, substancje takie, jak salicylan metylu i (E)-alfa-bergamonten działają wabiąco do składania jaj, natomiast (E)-4,8-dimethyl-1,3,7-nonatrien – odstrasza, zaś octan geranylu może cechować działanie odstrasza, jak i wabiące, w zależności od matrycy tych substancji (Yactayo-Chang i in., 2021). Zmienność genetyczna u roślin także może wpływać na ich cechy obrony przed roślinożernymi owadami (War i in., 2018). Ważny jest także przykład lucerny siewnej *Medicago sativa*, dla której wykazano indukowaną obronę obecnością roślinożerców (uszkodzeniami 5 lub 7 dni wcześniej przez żerujące larwy ćmy *Spodoptera littoralis*). Obrona ta była związana z podwyższeniem poziomu wybranych saponin i flawonoidów w liściach (Agrell i in., 2003).

## 1.2 Flawonoidy.

Flawonoidy należą do grupy fenolowych roślinnych metabolitów wtórnych, pochodnymi 2-fenilo-benzylo- $\gamma$ -pironu, występujących u roślin zarodnikowych, naczyniowych, ale także u glonów i mszaków (Politycka 2007). Według Wu i wsp. (2023) zidentyfikowano ponad 10 000 różnych związków flawonoidowych. Mogą one brać udział w interakcjach roślin z innymi organizmami (zwierzętami bądź roślinami), a także reakcjach na stresy środowiskowe (Mierziak i in., 2014). Wśród nich wyróżniamy: flawonole, flawony, flawanony, izoflawony, antocyjanidy, flawanole (katechiny i proantocyjanidyny) (Harborne i Williams 2000). Ich struktura chemiczna jest złożona z dwóch pierścieni aromatycznych połączonych trójwęglowym mostkiem o układzie C6-C3-C6. Trójwęglowy mostek łączący pierścienie A i B utworzony jest przez układ wiązania podwójnego między atomami węgla oraz grupę karbonylową, który następnie jest przekształcany w trakcie biosyntezy w zawierający tlen pierścień heterocykliczny – tzw.  $\gamma$ -piron (Marais i in., 2006).

Flawonoidy są wytwarzane w cytozolu komórki (Tanaka i in., 2008). Biogeneza tych związków jest złożonym procesem. Powstają one z prekursorów metabolizmu podstawowego tworzącego dwa szlaki:

- szlak octanowy, gdzie z 3 cząsteczek malonylo-CoA uzyskanych z przemian glukozy powstaje pierścień A
- szlak szikimowy, gdzie erytrozo-4-fosforan oraz fosfoenolopirogronian ulegają przekształceniu w kwas szikimowy, a później w aromatyczne aminokwasy:

fenyloalaninę lub tyrozynę, które ulegają deaminacji tworząc kwas cynamonowy (Winkel-Shirley 2001).

Dalszym etapem biosyntezy związków flawonoidowych jest przemiana kwasu cynamonowego do kwasu parakumarowego, który zaś przekształca się w parakumaroilokoezym A. Podstawowym procesem biosyntezy tychże związków jest cyklizacja parakumaroilokoenzymu A do chalkonu, z którego powstaje flawanon – wyjściowy związek do syntezy pozostałych grup flawonoidów (Winkel 2006).

Flawonoidy mogą spełniać wielorakie role w roślinach. Zgromadzone w wakuolach komórkowych wpływają na barwę kwiatów i owoców, co może być istotne przy wabieniu owadów zapylających (Mol i in., 1998). Jedną z ważniejszych ról jest modulowanie transportu fitohormonu – auksyny (Peer i Murphy 2007). Stwierdzono także działanie allelopatyczne tych związków na inne rośliny. Zaobserwowano bowiem, że ekstrakty przymiotna kanadyjskiego *Conyza canadensis*, zawierające flawonoidy, istotnie hamowały kiełkowanie nasion oraz wzrost siewek mietlicy rozłogowej *Agrostis stolonifera* i sałaty siewnej *Lactuca sativa*. Ponadto zanotowano także zahamowanie wzrostu grzybów chorobotwórczych roślin strączniczka pasożytniczego *Rhizoctonia solani*, co może wskazywać tym samym na funkcje obronną tychże związków (Zhang i in. 2017). Pełnią również funkcję antyoksydacyjną, w roślinach narażonych na szeroki zakres stresorów środowiskowych np. stres fotooksydacyjny (Agati i in., 2020). W przypadku narażenia roślin na stres ultrafioletu-B (UV-B) w połączeniu z egzogennym kwasem  $\gamma$ -aminomasłowym (GABA) (biorący udział m. in. w gromadzeniu metabolitów wtórnych) w kielkach soi *Glycine max*, nastąpił znaczący wzrost flawonoidów, a także aktywność peroksydazy i katalazy oraz zmniejszenie dialdehydu malonowego w porównaniu do kielków, w których zastosowano inhibitory GABA (Gu i in. 2022).

### **1.3 Wybrane czynniki modyfikujące zawartość flawonoidów w roślinach.**

Obecność metali ciężkich w glebie, które z kolei mogą być pobrane przez rośliny, może również wywierać wpływ na występujące u nich flawonoidy. Przykładem jest doświadczenie, w którym badano wpływ 30-dniowego narażenia na różne stężenia kadmu (0; 0,2; 0,4; 0,6 mM) kapusty sitowatej *Brassica juncea* na zawartość flawonoidów. Wyniki wykazały znaczny spadek zawartości flawonoidów w pędach roślin traktowanych 0,6 mM Cd w porównaniu z kontrolą (Kapoor i in., 2014). W badaniu prowadzonym na roślinie *Gynura procumbens* z rodziny Asteraceae, które polegało na porównaniu narażenia metali Cd i Cu na flawonoidy. Zaobserwowano wówczas, że

ekspozycja tych roślin na obydwa metale jednocześnie, spowodowała zmniejszenie produkcji flawonoidów całkowitych w porównaniu z narażeniem na tylko jeden metal (Ibrahim i in., 2017). Stres spowodowany narażeniem roślin na metale ciężkie może także objawiać się wzrostem zawartości flawonoidów. Rośliny paproci *Nephrolepis biserrata* zebranej z obszaru znajdującego się w odległości 20 metrów od terenów przemysłowych porównano z rosnącymi w oddaleniu 10 km od obszarów przemysłowych jako kontrolnymi. Zaobserwowano, że zawartość cynku, ołowiu i miedzi w glebie pobranej w odległości 20 metrów z terenu przemysłowego była znacznie wyższa w porównaniu z glebą kontrolną, oddaloną o 10 km od obszarów przemysłowych. Analiza ujawniła, że w próbkach tych roślin, zebranych z obszaru znajdującego się w odległości 20 metrów od terenów przemysłowych, stężenie flawonoidów całkowitych było wyższe w porównaniu do kontroli (Manan i in., 2015). W innym badaniu analizowano reakcję pomidora *Lycopersicon esculentum* na stres wywołany metalami Cu i Zn. Rośliny te były narażone na różne stężenia tych metali (0, 200, 300, 400, 500 ppm). Zanotowano, że w liściach i korzeniach tych roślin, poddanych działaniu Cu i Zn, akumulacja flawonoidów była większa w porównaniu do roślin kontrolnych. Wzrost ten był wprost proporcjonalny do stężeń metali, a najwyższa akumulacja miała miejsce w liściach w porównaniu do korzeni. Największy efekt zaobserwowano przy stężeniu 500 ppm metali zarówno w liściach, jak i w korzeniach (Badiaa i in., 2020).

#### **1.4 Wpływ flawonoidów na owady.**

Flawonoidy obecne w roślinach, mogą modulować reakcję owadów z roślinami, roślinożerców i zapylaczy. W przypadku pszczoły miodnej *Apis mellifera* w badaniu testu swobodnego lotu, wykazano większą preferencję pożywki zawierającej kwercetynę w porównaniu do kontrolnej, składającej się z wyłącznie z wody i cukru. Takie zachowanie pszczół miodnych może wskazywać na istotne biologiczne znaczenie tego związku dla nich (Liao i in., 2017). Związki te mogą również oddziaływać na procesy trawienne u owadów, co tym samym może stanowić funkcję obronną przeciwko nim. Powodem tego zjawiska jest potencjalne działanie hamujące kluczowych enzymów trawiennych w jelicie środkowym u owadów. Przykładem może być doświadczenie przeprowadzone z udziałem larw owadów z rodziny Noctuidae *Spodoptera litura*. U osobników karmionych pożywką z dodatkiem flawonoidów takich, jak rutyna, kwas chlorogenowy, kwas chinowy, kwas kofeinowy, naringenina, kwercetyna, kemferol, mirycetyna, katechina, kwas ferulowy, nastąpiło zmniejszenie aktywności proteazy serynowej i trypsyny w

porównaniu do larw karmionych pożywką bez flawonoidów (Su i in., 2018). Flawonoidy, obecne w pokarmie, wchodząc z interakcją z hormonami steroidowymi, mogą wpływać na wzrost i rozmnażanie owadów. Inne badania wskazują na możliwy wpływ na linienie, odżywianie czy behawior (Van Loon i in., 2002; Boué i Raina 2003).

Flawonoidy u owadów mogą indukować stres oksydacyjny, przejawiający się zmianą aktywności enzymów detoksykujących. Takie zjawisko zaobserwowano u larw motyli *Earias vittella* (Lepidoptera) i u słonecznicy orzęzówki *Helicoverpa armigera*, gdzie larwy żerowały na diecie z dodatkiem flawonoidu pochodzącego z rośliny z rodziny jasnotowatych *Clerodendrum phlomis*. Zanotowano obniżenie aktywności transferazy glutationowej (GST) w ciele larw dwóch gatunków żerujących na diecie z dodatkiem flawonoidu w porównaniu do larw karmionych pożywką bez flawonoidu (Baskar i in., 2014). Flawonoidy mogą także niwelować stres oksydacyjny. Badania przeprowadzone na wywilżni karłowatej *Drosophila melanogaster* wykazały, że w ciele tych owadów traktowanych jednocześnie kwercetyną i H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> występował niższy stres oksydacyjny niż obecności samego nadtlenu wodoru (Subramanian i in., 2017).

## **2. Metale ciężkie.**

Metale są obecne w środowisku w różnych stężeniach w skale glebotwórczej, glebie, wodzie, powietrzu, czy w materii biologicznej (Stankovic i Stankovic 2013). Od czasu powstania Ziemi prawie wszystkie metale, które występują w środowisku naturalnym są poddawane cyklowi biogeochemicznemu. Zapoczątkowanie rewolucji przemysłowej przyspieszyło ich tempo redystrybucji między poszczególnymi składowymi środowiska, przez dodatkowe procesy powiązane z działaniem człowieka (Garrett 2000). Ogólnie pierwiastki należące do metali ciężkich, można zaliczyć te, które mają gęstość powyżej 5 g/cm<sup>3</sup> lub wysoką masę atomową, są to np.: tytan, wanad, chrom, mangan, żelazo, kobalt, nikiel, miedź, cynk, molibden, srebro, kadm, cyna, platyna, złoto, rtęć, ołów (Rachman i Singh, 2019; Briffa i in., 2020). Poprzez ich wszechstronne zastosowanie m.in. w przemyśle, rolnictwie, medycynie, gospodarstwach domowych są szeroko rozpowszechnione w środowisku (Tchounwou i in., 2012). Pierwiastki te, po ich uwolnieniu, są przez długi czas obecne w środowisku, nie ulegają rozkładowi ani biodegradacji, a niektóre z nich występując podwyższonych stężeniach mogą przejawiać wysoce toksyczne działanie (Wu i in., 2016; Rachman i Singh, 2019; Briffa i in., 2020; Jin i in., 2020). Oprócz tego posiadają zdolność do akumulacji m.in. w glebie, wodzie, powietrzu i w organizmach żywych (Zwolak i in., 2019). Oddziaływanie metali ciężkich



na organizmy żywe może objawiać się zakłócaniem ważnych etapów w różnych cyklach biochemicznych lub metabolicznych (Sarpong i in., 2025). Niektóre metale ciężkie wykazują wysoką toksyczność nawet w bardzo niskich stężeniach – należą do nich: arsen (As), kadm (Cd), chrom (Cr)(VI), rtęć (Hg) i ołów (Pb) (Rachman i Singh, 2019). Metale ciężkie takie, jak: żelazo, mangan, molibden, miedź, nikiel i kobalt w niewielkich ilościach, jako mikroelementy odgrywają m. in. istotną rolę w aktywności metabolicznej roślinach i są niezbędne w pożywieniu dla ludzi i zwierząt (Peralta-Videa i in., 2009; Park i in., 2011; Rachman i Singh, 2019). Metale Cu, Fe, Mn, Zn pełnią ważną rolę w układzie odpornościowym oraz funkcjonowaniu procesów fizjologicznych u organizmów żywych, lecz tylko do określonego poziomu stężenia wymienionych pierwiastków – zagrożenie stanowi przekroczenie pewnej wartości granicznej (Sarpong i in., 2025).

## **2.1 Źródła metali ciężkich.**

Metale są wszechobecne w środowisku naturalnym ze względu na ich nieustanne uwalnianie do otoczenia, zarówno ze źródeł naturalnych, jak i antropogenicznych (Wu i in. 2016). Naturalne źródła to m. in.: aktywność wulkaniczna, parowanie metali z wody i gleby, erozja gleby, wtórne zawieszanie osadów, wietrzenie geologiczne (Briffa i in., 2020). Źródła antropogeniczne, związane są głównie z wydobyciem i przetwarzaniem metali, wytopianiem lub obróbką rud metali, hutnictwem, odlewnictwem, spalaniem paliw kopalnych i produktów ropopochodnych, generowaniem odpadów z gospodarstw domowych, przemysłowych i samochodowych, wysypiskami śmieci, robotami drogowymi, ze stosowaniem nawozów sztucznych, obornika zwierzęcego, oraz pestycydów, zawierających sole metali ciężkich czy insektycydów (Sankhla i Kumar 2019; Briffa i in., 2020; Jin i in., 2020).

Szczególnym rodzajem zanieczyszczeń są tzw. e-odpady, pochodzące z urządzeń elektronicznych i elektrycznych takich, jak m. in. lodówka, telewizor, komputer, pralka, telefon komórkowy, drukarka, klimatyzator, których roczne w krajach rozwiniętych powstaje ponad 5 mln ton, a wskutek szybkiego rozwoju technologii, który doprowadził do poprawy wydajności i jednocześnie skrócenia żywotności produktów – znacznego zwiększenia ilości wyrzucanego sprzętu. Można w nich znaleźć takie metale, jak np. pallad, miedź, aluminium, ind, cynk, złoto, srebro (Osibanjo i Nnorom 2007; Ruan i Xu, 2016). Aby nie obciążać środowiska metalami ciężkimi pochodzącymi od odpadów urządzeń elektronicznych i elektrycznych ważnym aspektem jest ich odpowiednie przetwarzanie. Okazuje się, że jednak większym problemem dla środowiska jest ich

recykling, który szczególnie w krajach rozwijających się i słabo rozwiniętych jest w mniejszym stopniu zaawansowany technologicznie np.: ręczny demontaż urządzeń, otwarte spalanie czy przemywanie kwasem (Ruan i Xu, 2016). W badaniu przeprowadzonym w latach 2006-2010, w południowo-wschodnich Chinach, zaobserwowano wzrost stężenia ołowiu, miedzi i kadmu w ziarnach ryżu, zebranych z pól uprawnych położonych wokół miejscach demontażu e-odpadów niż tych, znajdujących się na innych obszarach, oddalonych o około 50 km (Fu i in., 2013).

Znaczny udział w uwalnianiu metali ciężkich ma przemysł wydobywczy i hutniczy. Przeprowadzone dotychczas badania potwierdziły obecność metali ciężkich w glebach, umiejscowionych wokół hut metali ciężkich. Przykładem są wykryte metale ciężkie takie, jak m. in.: Cu, Zn, Pb, Cr i Cd w wierzchniej warstwie gleby z obszaru górniczego. Przykładem są wykryte metale ciężkie takie, jak m. in.: Cu, Zn, Pb, Cr i Cd w wierzchniej warstwie gleby z obszaru górniczego i hutniczego w pobliżu Sudbury w Kanadzie (Adamo i in., 2002). Następnym przykładem jest obecność metali ciężkich (m. in.: Cr, Cu, Pb i Zn) w glebach w pobliżu kompleksu przemysłowego Port Kembla w Nowej Południowej Walii w Australii, w skład którego wchodzi huta miedzi, huta stali i powiązane gałęzie przemysłu (Martley i in., 2004). W Polsce można wymienić takie miejsca, jak np.: huty miedzi w Głogowie i Legnicy oraz huty cynku w Oławie, w pobliżu których stwierdzono zanieczyszczenie metalami Zn, Cu i Pb w wierzchniej warstwie gleby (Hołtra i Zamorska-Wojdyła 2020). W przypadku obecności uwolnionych metali ciężkich w glebie, ich biodostępność może być bardzo wysoka i mieć negatywny wpływ na jej biologiczne funkcjonowanie, właściwości, żyzność, kondycję oraz na ekosystem (Seraj i Rahman 2018). W badaniach prowadzonych po awarii kopalni pirytu Aznalcóllar w Hiszpanii w ramach skuteczności technik remediacji gleb skażonych cynkiem, miedzią, ołowiem i arsenem stwierdzono że toksyczność tych metali zależy od ich poszczególnych rozpuszczalności, a także od pH gleby. Zaobserwowano wówczas, że przy wyższym pH i wzroście zawartości  $\text{CaCO}_3$  oraz mniejszą rozpuszczalności tych pierwiastków – procesy oczyszczania odnosiły pożądany skutek (García-Carmona i in., 2017). Urbanizacja i uprzemysłowienie w największym stopniu przyczyniają się do zanieczyszczenia metalami ciężkimi wód – są one transportowane z terenów przemysłowych i obszarów miejskich, a następnie gromadzą się w glebie i osadach zbiorników wodnych (Masindi i Muendi 2018). Może stanowić to istotny problem dla organizmów żywych, bytujących w danym środowisku. Przykładem są obserwacje prowadzone w regionie na Słowacji, w którym wcześniej prowadzono działalność

wydobywczą, zawartości pierwiastków takich, jak: Zn, Cd, Cu, Pb, Hg, przekraczały wartości dopuszczalne w glebie, a w przypadku Hg stwierdzono znacznie podwyższone stężenie tego pierwiastka w pędach paproci *Athyrium filix-femina* dominujących na tych terenach oraz traw z rodziny Poaceae (Musilova i in., 2016). Około 40-73% pierwiastków, głównie Pb, Zn, Cd uwalnianych do środowiska w tym m. in. do gleb, nie tylko bezpośrednio z hut, ale też z odpadów hutniczych takich, jak żużle hutnicze, produkty spalania czy odpady poflotacyjne z kopalń (Xu i in., 2021). Badanie rozkładu przestrzennego zawartości metali ciężkich np. w glebie jest przydatne w określaniu wpływu oddziaływania danego emitera na wybranym obszarze. W przykładowej analizie rozkładu metali w wierzchniej warstwie gleby (0-20 cm) w rejonie dwóch hut w Chinach, ujawniono, iż wraz ze wzrostem odległości od huty Zhuzhou zaobserwowano obniżenie ilości metali w badanej warstwie gleby w kolejności  $Cd (5,78) > Zn (1,29) > Pb (0,95) > Ni (0,51) > Cr (0,49) > As (0,39) > Cu (0,29) > Hg (0,27)$ , natomiast od drugiej – Huludao –  $Cd (13,08) > Zn (2,05) > Hg (1,69) > Pb (0,83) > Ni (0,39) > Cu (0,34) > As (0,29) > Cr (0,22)$  (w nawiasach podano średnie wartości wskaźnika zanieczyszczenia  $P_i$ ), przy czym istotne różnice w redukcji w zawartości Hg i Pb były prawdopodobnie spowodowane przez migracje i sedymentację lotnych gazów z hut do atmosfery (Yu in., 2021). Długotrwała działalność wydobywcza i hutnicza, która została już zakończona, również może wpływać na zawartość metali ciężkich w glebach znajdujących się w pobliżu nieczynnych zakładów. Pokazano w przypadku terenów rolniczych w południowo-zachodnich Chinach, położonych blisko miejsc, gdzie w ciągu ostatnich kilku stuleci zajmowano się wydobywaniem ołowiu oraz wytapianiem Pb-Zn, że były poważnie zanieczyszczone (Xie i in., 2023). Zanieczyszczenie metalami ciężkimi może również dotyczyć powietrza, gdzie zawarte w nim cząstki stałe (PM), powstałe wskutek intensywnego rozwoju industrializacji oraz miast mogą także zawierać w swoim składzie metale ciężkie, które pojawiają się wskutek czynników naturalnych (burze piaskowe) jak i antropogenicznych np.: działalność przemysłowa, emisje spalin, pyły z budynków i chodników, spalanie paliw kopalnych, śmieci i tytoniu oraz resublimacje atmosferyczne (Solejmani i in., 2018).

## **2.2. Metale ciężkie w glebie.**

Metale ciężkie, dzięki swoim właściwościom mogą przez bardzo długi okres czasu, nawet kilkuset lat, być obecne w środowisku. Dodatkowo, skażenie nimi obejmuje nie tylko konkretny obszar, na którym znajduje się źródło emitujące ten rodzaj

zanieczyszczeń, ale też przyległe gleby, grunty rolne, wody powierzchniowe czy osady (Teršič i in., 2009; Patel i in., 2018; Anaman i in. 2022). Zaobserwowano, że metale wykrywane w gruntach rolnych, mogą pochodzić z więcej niż jednego źródła. Przykłady podali Yu i wsp (2021): w próbkach gleby pobranych z pól uprawnych, umiejscowionych w pobliżu fabryki i huty w rejonie, wykryto znacznie podwyższone stężenia pierwiastków takich, jak: Cd, Hg, Pb, Zn, prawdopodobnie głównie wyemitowanych z działalności huty, a także z działalności rolniczej, ze źródeł naturalnych oraz mieszanych – przemysłowych i związanych z ruchem drogowym.

Ruchliwość i dostępność metali ciężkich w glebie zależy od jej zdolności adsorpcyjnych i desorpcyjnych, a te są powiązane z właściwościami gleby: pH, zawartością materii organicznej oraz minerałów ilastych, pojemnością wymiany kationów, statusem redoks, węglanu wapnia, tlenków żelaza i manganu, stężeniem fosforu, potasu, wapnia oraz żelaza i manganu (Zeng i in., 2011; Deng i in., 2023;). Szereg procesów fizykochemicznych również wpływają na rodzaj i zawartość metali bądź metaloidów w środowisku glebowym. Do nich mogą należeć, np.: reakcje sorpcji/desorpcji, utleniania i redukcji, rozpuszczania i wytrącania oraz kompleksowanie roztworów, w szczególności reakcje sorpcji i desorpcji metali lub metaloidów z kompleksów sorpcyjnych zależą od pH, charakteru składników gleby oraz obecność i stężenie kationów i anionów nieorganicznych (Caporale i Violante 2016). Gleby, które posiadały odczyn zasadowy oraz tereny, gdzie średnie roczne opady były niższe, okazały się bardziej narażone na wyższy poziom zanieczyszczenia metalami (Wen i in., 2022). Zaobserwowano, że obecność rozpuszczonej materii organicznej (w zależności od jej rodzaju oraz pH gleby) może modyfikować adsorpcje i rozpuszczalność jonów metali (Kim i in., 2015). Ocena stopnia akumulacji, wraz ze wzrostem głębokości gleby wykazały, iż poziom wykrytych pierwiastków takie, jak: Hg, Cd, Cu, Pb i Zn był największy w wierzchniej warstwie gleby (0-20 cm) w porównaniu z głębszą warstwą (150-200 cm) – powodem tego mogły być liczne tereny miejskie, z rozwiniętym przemysłem oraz działalnością człowieka (Lv i in., 2015). Czynniki takie, jak: wilgotność i pH gleby, cechy i właściwości skał osadowych miały wpływ na rozkład przestrzenny następujących metali ciężkich w glebie, takich, jak: As, Cd, Hg, Pb, Sb i Zn, wziętej z terenu zakładu wytopu metali nieżelaznych. Dodatkowo uzyskane wyniki pokazały, że innymi czynnikami wpływającymi na rozkład przestrzenny tych metali w kierunku poziomym były odległość od piekarni, placu surowcowego i elektrolizera (Ma i in.,

2023). Geologia (skała macierzysta i okres) oraz rzeźba terenu (wysokość, położenie) zaś okazały się istotne, przy rozmieszczeniu w przestrzeni As i Pb (Shi i in., 2018).

### 2.3 Metale ciężkie w roślinach.

Rośliny są zdolne do akumulacji metali ciężkich w swoich tkankach. Wydajność tego procesu zależy od biodostępności tych pierwiastków w glebie. Ze względu na złożoność tego dynamicznego zjawiska można go podzielić na trzy etapy:

- 1) Dostępność środowiskowa – całkowita ilość metali ciężkich w glebie, które mogą zostać rozpuszczone w wodzie porowej;
- 2) Biodostępność środowiskowa – ilość frakcji rozpuszczonej w wodzie porowej, która może być pobrana przez korzenie roślin;
- 3) Biodostępność toksykologiczna – ilość metali ciężkich, zdolnych do bioakumulacji lub innych procesów w roślinie, w zależności od translokacji, metabolizmu i detoksykacji (Kim i in., 2015).

Zdolność bioakumulacji jest określana również przez stopień przemieszczania się metali z części podziemnych do nadziemnych, który zależy od rodzaju metalu (Pachura i in., 2015). Jest zależna także od gatunku rośliny. W badaniu prowadzonym w celu określenia biodostępności i bioakumulacji metali u roślin borówki czarnej *Vaccinium myrtillus* oraz borówki bruszniczy *Vaccinium vitis-idaea*, pochodzących z trzech zanieczyszczonych terenów bezpośredniego sąsiedztwa huty w Miasteczku Śląskim, huty żelaza w Dąbrowie Górniczej-Łosień oraz elektrowni Jaworzno III w Jaworznie) oraz jednego pseudo-poligonu kontrolnego (rezerwat przyrody Pazurek w Jaroszowcu Olkuskim. Znotowano znacznie wyższe stężenia Cd, Pb, Zn i Fe stwierdzono u *V. myrtillus* i *V. vitis-idaea* uprawianych w najbardziej zanieczyszczonym miejscu (w pobliżu huty w Miasteczku Śląskim) w porównaniu z pozostałymi obszarami oraz zdecydowanie większą bioakumulację tych metali u borówki bruszniczy (Kandziora-Ciupa i in., 2017). W tym miejscu należy także wspomnieć o roślinach, które wyróżniają się umiejętnością gromadzenia bardzo wysokich stężeń metali w częściach nadziemnych bez widocznych oznak uszkodzeń tzw. hyperakumulatorów, które w przeciwieństwie do roślin tolerancyjnych, nie ograniczają wnikania i translokacji tych pierwiastków z korzenia do pędu (Verbruggen i in., 2009). Zjawisko hyperakumulacji jest możliwe, dzięki unikalnym mechanizmom wykształconym u niektórych roślin. Rośliny niebędące hyperakumulatorami, jako sposób detoksykacji, poddają nadmiar metali procesowi sekwestracji w wakuolach korzeniowych, natomiast hyperakumulatory – przeprowadzają

ją w dużych komórkach spichrzowych epidermy, dzięki podwyższonej ekspresji specyficznych białek transportowych – od wychwytu metali w korzeniach do komórek magazynujących w epidermie (Leitenmaier i Küpper, 2013). Oprócz tego zaobserwowano, że skuteczna sekwestracja może odgrywać ważną rolę w ponadprzeciętnym gromadzeniu pierwiastków, w przeciwieństwie do ich szybkiego transportu do komórek parenchymy u hyperakumulatora kadmu – gatunku rozchodnika *Sedum alfredii* (Tian i in., 2017). Konstytutywna nadekspresja transporterów metali czy zdolność do ich szybkiej translokacji z korzenia do pędu, należą do wyjątkowych właściwości akumulacji metali u roślin, które są hyperakumulatorami (Sytar i in., 2021). Zdolność do wysokiej tolerancji na Cd u łobody solniskowej *Atriplex halimus* może być związana z jej zdolnością do unikania dużych ilości Cd w tkankach nadziemnych, a także z podwyższoną aktywnością SOD, CAT i GPx – enzymów antyoksydacyjnych w liściach (Mesnoua i in., 2016). Stres kadmowy może powodować również aktywację układu odpornościowego. Jest on uruchamiany przez różne szlaki sygnałowe np.: szlak kalmoduliny wapnia, nadprodukcji reaktywnych form tlenu czy syntezy fitohormonów, które w odpowiedzi mogą wywołać określone reakcje, jak np.: chelatacja kadmu, łagodzenie skutków uszkodzeń tkanek roślinnych (El Rasafi i in., 2022).

## 2.4 Metale ciężkie u owadów.

Ujawniono różnice w bioakumulacji różnych metali ciężkich u owadów żerujących na pokarmie o podwyższonej ich zawartości. Metale ciężkie mogą przechodzić ze środowiska abiotycznego do organizmów żywych, i w konsekwencji zanieczyszczać łańcuchy pokarmowe (Ali i Khan, 2018). Warto zwrócić uwagę na transfer, bioakumulację oraz biomagnifikację metali w łańcuchu pokarmowym poczynając od roślin do owadów roślinożernych i dalej do drapieżnych. U owadów, żerujących na roślinie koniczynie Aleksandryjskiej *Trifolium alexandrinum* (u której stwierdzono akumulację metali wg ilości  $Zn > Cd > Pb$ ) ujawniono różnice w kumulacji poszczególnych metali. U sinicy nadbrzeżnej *Ailopus thalassinus*, zaobserwowano nagromadzenie większych ilości Pb niż Cd i Zn. U mszycy *Sitobion avenae* – niższe wartości Pb i Zn niż u sinicy nadbrzeżnej, natomiast nie wykazano podwyższonej akumulacji Cd. Ponadto w ciele drapieżnej biedronki *Coccinella septempunctata* poziom wymienionych pierwiastków był znacznie wyższy niż u mszyc, którymi się biedronki żywiły (Butt i in., 2018).

Owady mogą być ważnym wskaźnikiem zanieczyszczenia metalami ciężkimi w środowisku, jako tzw. bioindykatory. U gatunków takich, jak konik polny *Oxya hyla hyla* czy motyl z rusałkowatych, *Danaus chrysippus*; bytujących w różnych odległościach od obszaru przemysłowego w dystrykcie Gujrat w Punjab w Pakistanie – wyższy poziom akumulacji metali (Cd, Cu, Cr, Zn, Ni) zanotowano u osobników zebranych ze stanowisk położonych bliżej zakładów przemysłowych. (Azam i in. 2015). Kumulacja metali w ciele roślinożernych owadów, może być związana z różnicami w ich kumulacji w poszczególnych tkankach czy narządach. Przykładowo, u larw motyla *Lymantria dispar* żerującego na pożywce z dodatkiem kadmu i ołowiu, zawartość tych metali w ciele tłuszczowym, hemolimfie i przewodzie pokarmowym była wyższa niż w głowie oraz powłokach ciała. Stężenia Cd i Pb było dodatnio skorelowane z ich ilością w diecie. Gdy larwy były narażone na nadmiar obu pierwiastków w pokarmie, rejestrowano większą akumulację tego metalu, który był dostępny w wyższym stężeniu (Zhang i in., 2020).

## **2.5 Działanie kadmu i cynku na roślinożerne owady.**

Szkodliwe działanie tego metalu może ujawniać się w różny sposób. Może indukować produkcję reaktywnych form tlenu (ROS) m. in. poprzez zastępowanie Fe w białkach cytoplazmatycznych i błonowych, zwiększanie wewnątrzkomórkowego poziomu wapnia oraz wykazywanie wysokiego powinowactwa do grup -SH w enzymach obrony antyoksydacyjnej takich, jak dysmutaza ponadtlenkowa (SOD), katalaza (CAT), peroksydaza glutationowa (GPx) czy dehydrogenaza glukozy-6-fosforanowa (G6PD) i hamowanie ich aktywności. Większe stężenia ROS i ich reakcje z biomolekułami komórkowymi mogą prowadzić do podwyższenia poziomu peroksydacji lipidów, uszkodzeń białek błonowych, uszkodzeń DNA czy do zmiany ekspresji genów (Amamou i in. 2015; Matović i in. 2015; Sharma i in. 2015). Jego obecność może wywoływać również utratę mitochondriów (Pi i in., 2013).

Kadm obecny w diecie owadów także może mieć wpływ na ich rozwój i fizjologię. Przykładem może być motyl *Helicoverpa armigera* żerujący na pożywce z dodatkiem kadmu. Wraz ze wzrostem jego stężenia w diecie obserwowano obniżenie przeżywalności, niższe masy ciał larw, poczwerek i imago, obniżenie płodności samic, wydłużenie czasu rozwoju larw i poczwerek. Dodatkowo zaobserwowano obniżenie aktywności enzymów detoksykacyjnych, takich jak GST, karboksyloesterazy i monooksygenazy cytochromu P450, i podwyższenie aktywności – acetylocholinoesterazy (Zhan i in. 2017). W celu oceny wpływu długotrwałego stresu (6

miesięcznego) związanego z metalami ciężkimi Cd na szkodniki zbożowe, *Aleuroglyphus ovatus*. Karmiono je sztuczną dietą z dodatkiem różnymi stężeniami Cd (0, 5, 10, 20 mg/kg). Zaobserwowano, iż wraz ze wzrostem stężenia Cd wzrastała śmiertelność we wszystkich stadiach rozwojowych. Zawartość białka w różnych stadiach larwalnych i dorosłych owadów przy stężeniu Cd w pożywce wynoszącym 20 mg/kg była istotnie większa niż w grupie kontrolnej bez dodatku tego metalu. Analiza wykazała także, że aktywność dysmutazy ponadtlenkowej (SOD) w różnych stadiach larwalnych była wyższa niż w grupie kontrolnej, gdy stężenie Cd osiągało 5 mg/kg. Narażenie *A. ovatus* na Cd w diecie zmniejszyło aktywność peroksydazy (POD) i katalazy (CAT) we wszystkich stadiach larwalnych w porównaniu z grupą kontrolną. Aktywność S-transferazy glutationowej (GST) w przypadku stężenia Cd 20 mg/kg była najniższa we wszystkich stadiach larwalnych w porównaniu z innymi stężeniami Cd. Wraz ze wzrostem stężenia Cd następowało obniżanie aktywności GST u owadów dorosłych (Zhang i in., 2022). W innym badaniu, wykryto bioakumulację kadmu (Cd) w bobie *Vicia faba* i żerujących na nim mszycach *Megoura crassicauda* poprzez ciągłe narażenie tej rośliny na różne stężenia kadmu (0, 3,125, 6,25, 12,5, 25, 50 mg/l). Oceniono także zawartość metabolitów energetycznych u osobników z następujących po sobie pięciu pokoleniach owadów. Stwierdzono, że w porównaniu z grupą kontrolną obniżone stężenie glikogenu i podwyższoną trehalozę u mszyc pierwszego pokolenia potraktowanych Cd. Nie zanotowano istotnych zmian w zawartości węglowodanów u czwartego i piątego pokolenia mszyc (Xie i in., 2024). Zmiany obserwowane wśród przedstawicieli owadów mogą zależeć także od ich stadiów rozwojowych. Wraz ze wzrostem kadmu w pożywieniu nimfy pasikonika *Oxya chinensis*, nastąpiło podwyższenie aktywności GST u nimf i następnie jej obniżenie u dorosłych (Zhang i in. 2014). Kadm może wywoływać działanie mutagenne, co opisano na przykładzie larw brudnicy nieparki *Lymantria dispar*, karmionych pokarmem zawierającym 50 i 100 µg Cd/g suchej masy pożywki. U tych pochodzących z terenu zanieczyszczonego kadmem, zanotowano niższy poziom uszkodzeń DNA w hematocytach, niż u larw zebranych z obszaru nieskażonego (Matić i in., 2016). Obecność kadmu w roślinach żywicielskich może wpływać na intensywność żerowania. U larw *Spodoptera littoralis* w III, IV, V i VI stadium, zauważono obniżenie konsumpcji roślin traktowanych 100 mg CdCl<sub>2</sub>/kg, za wyjątkiem trzeciego stadium rozwojowego, ponadto tempo wzrostu uległo obniżeniu w III, IV i V stadium (Abu ELEla i ElSayed 2015).



Cynk jest pierwiastkiem śladowym, niezbędnym do prawidłowego wzrostu i reprodukcji organizmów żywych, stabilizacji DNA oraz ekspresji genów, wchodzi również w skład ponad 300 enzymów, zaangażowanych w większość głównych szlaków metabolicznych (Frassinetti 2006). Oddziałuje z białkami np. poprzez promowanie procesów enzymatycznych, utrzymywanie stabilności struktury czwartorzędowej, czy przez promowanie interakcji z innymi cząsteczkami (np.: białkami, kwasami nukleinowymi) (Terrin i in., 2015). Pełni rolę inhibitora apoptozy komórek, ponieważ jest zaangażowany w działanie kilku enzymów metabolizmu DNA, a także w czynniki transkrypcyjne, mogą być aktywowane w apoptozie (Szuster-Ciesielska i in., 2000). Bierze udział w oddychaniu komórkowym (jest kofaktorem anhidrazy węglanowej), funkcjach immunologicznych, biosyntezie białek i DNA oraz podziale komórek (Bonaventura i in., 2015). Cynk jest również fizjologicznym inhibitorem kanałów protonowych bramkowanych napięciem (HV1), przez co zmienia fizjologię kilku typów komórek np. zmniejszenie impulsu oksydacyjnego w fagocytach, ograniczenie wydzielania histaminy w bazoofilach, zmniejszenie inwazyjności komórek nowotworowych (Chaves i in., 2018). Cynk jest obojętnym jodem redoks, który nie posiada właściwości utleniających ani redukujących, wobec tego sam w sobie nie może być bezpośrednim przeciwutleniaczem (Prasad i Bao, 2019). Pierwiastek ten jest istotny dla wielu enzymów, które uczestniczą w produkcji i neutralizacji wolnych rodników (Kloubert i Rink, 2015). W przypadku nagromadzenia się nadmiernych ilości cynku w komórce, aby nie dopuścić do pojawienia się toksycznych efektów, może być on: wydalany z komórki, przechowywany w różnych pęcherzykach w komórce, albo łączony z niektórymi białkami np. metalotioneinami (Baltaci i in., 2018).

Liczne badania udowodniły wpływ cynku na owady, głównie przedostający się do ich organizmu wraz z pokarmem. Zaobserwowano, iż u mszyc fitofagicznych *Aphis medicaginis*, umieszczonych na siewkach *Vicia faba*, tempo reprodukcji, zdolność rozrodcza, ekspresja genu kodującego witellogeninę uległo zmniejszeniu wraz ze wzrostem stężeń cynku w pokarmie roślinnym, dodatkowo również zanotowano zmniejszone drapieżnictwo *Harmonia axyridis* w stosunku do mszyc narażonych na wysokie zawartości tego metalu (Xie i in., 2014). Liście morwy wzbogacone cynkiem, które stanowiły pokarm dla gąsienic *Bombyx mori*, powodowały zwiększenie płodności i wyższy stosunek kokonu do powłok, a także obniżały stosunek włókien do powłok, zmniejszając syntezę białka włókien, usuwanych jako odpad (Younus Wani i in., 2018). Pierwiastek ten może mieć wpływ na programowaną śmierć komórki oraz aktywność

fagocytarną komórek odpornościowych, które są istotne w rozwoju owadów. Analiza u wywilżni karłowatej *Drosophila melanogaster* wykazała, że cynk zwiększa fagocytozę i PCD hemocytów, a także wywołał wysoką i niską aktywność kaspaz odpowiednio u *D. melanogaster*, dodatkowo zanotowano również zmniejszoną żywotność mitochondriów w hematocytach u *D. melanogaster* (Filipiak i in., 2010). Narażenie na różne stężenia cynku u owadów pochodzących z terenów zanieczyszczonych, jak i nieskażonych może także wpływać na niektóre parametry. Zaobserwowano u *Chorthippus brunneus*, pochodzących zarówno z miejsc zanieczyszczonych, jak i czystych, narażonych w trakcie diapauzy lub po wylęgu na niższe stężenia cynku, znaczne uszkodzenia DNA w neuroblastach, poza tym zanotowano znaczny wzrost zawartości wapnia w mózgu, szczególnie u owadów pochodzących z terenów niezanieczyszczonych (Augustyniak i in., 2006).

### 3. Głód.

Zjawisko krótkotrwałego okresu głodu u owadów jest ważnym czynnikiem środowiskowym, który może przyczynić się do wystąpienia różnych reakcji organizmu owada na ten stresor, zarówno na poziomie behawioralnym, fizjologicznym jak i molekularnym. Dotychczasowe badania ujawniły szereg konsekwencji w związku z narażeniem na ten stresor oraz przedstawiły różne strategie przeciwdziałające jego negatywnym skutkom. Istotną kwestią jest ukazanie różnorodnego oddziaływania głodu u owadów, oraz na osobniki z różnych etapów rozwoju osobniczego.

Głód początkowo powoduje wzrost aktywności owadów w poszukiwaniu pożywienia, ale po pewnym czasie obniżenie tej aktywności, ze względu na obniżenie rezerw energetycznych. Może temu towarzyszyć wzrost agresji, rywalizacji i przypadków kanibalizmu w stosunku do osobników tego samego gatunku (Scharf 2016). Prowadzić może także do wydłużenia rozwoju larw, znacznego zmniejszenia masy poczwerek, jak również do znacznego obniżenia płodności u samic z rodziny Coccinellidae *Propylea dissecta* (Chen i Ruberson 2008; Singh i in., 2021). Innym skutkiem głodu może być także większa podatność na pasożyty i patogeny (Yang i in., 2007). Ciekawym przykładem jest obserwacja wpływu czasu głodzenia (trwającego 24 lub 48 godzin) na aktywność larw inwazyjnego pluskwiaka *Bagrada hilaris*, szkodnika roślin kapustnych. W przypadku poddania dłuższego 48-godzinnego okresu głodu, osobniki głodujące pokonywały większe dystanse niż niegłodujące. Można by przypuszczać, że brak pożywienia przyczyniał się większego rozprzestrzeniania się, czyli

mógł być impulsem do rozpoczęcia poszukiwań przez larwy środowiska bardziej zasobnego w pokarm (Grettenberger i Joseph 2019). Wheeler i współautorzy (2001), z kolei, oceniali nie tylko efekty okresu głodu, ale i narażenia na metanolowe ekstrakty roślinne z gałązek drzewa z rodziny meliowatych *Trichilia americana* na osobniki *Spodoptera litura* (Lepidoptera, Noctuidae), groźnych szkodników bawełny. Ujawnili oni wystąpienie jednego lub dwóch dodatkowych stadiów larwalnych u osobników tego gatunku które poddano działaniu obu stresorów.

Istotne różnice u owadów głodujących obserwowano także w zakresie dostępności substratów energetycznych. W badaniach nad skutkami głodu u biedronki *Harmonia axyridis* (Coleoptera, Coccinellidae) zaobserwowano zmiany w stężeniu substratów energetycznych, takich jak trehaloza i glikogen w ciele imago biedronek. Po pierwszych ośmiu godzinach głodu mierzono u biedronek, niższy poziom trehalozy, podczas gdy glikogen pozostał na tym samym poziomie jak u osobników kontrolnych. Po 24 do 72 godzinach głodowania, biedronki cechowały się niższym poziomem trehalozy. (Shi i in., 2017). Z kolei, znaczne obniżenie zawartości lipidów, obserwowano u głodzonych świerszczy *Acheta domesticus* (24 h czas głodu). Zawartość lipidów po głodzie trwającym 48 godzin była podobna do tej zanotowanej u świerszczy kontrolnych (Inácio i in. 2021). Głód trwający 48 godzin wpływał także na tempo oddychania i metabolizm energetyczny u innego szkodnika upraw, larw słonecznicy orężówki *Helicoverpa armigera*. Badaniom poddano larwy od trzeciego stadium rozwojowego aż do poczwarki. W przypadku niedoboru pożywienia u larw zaobserwowano obniżenie tempa pobieranego O<sub>2</sub> i usuwanego CO<sub>2</sub>, a także niższą wartość współczynnika oddechowego (RQ) wskazujących na znaczne spowolnienie tempa metabolizmu. Zanotowano u nich także wyraźnie niższą zawartość triglicerydów i glikogenu oraz zawartość trehalozy w hemolimfie niż u osobników, które nie doświadczyły niedoboru pożywienia. Ujawniono istotny wzrost aktywności regulacji procesów związanych z ekspresją białek zaangażowanych w szlaki kosztowne energetycznie – metabolizmu glukozy i kwasów tłuszczowych (Jiang i in., 2019).

Głód może stymulować obronę antyoksydacyjną. Farahani i współautorzy (2020) ujawnili, że głód (trwający 24 i 48 godzin), podobnie jak zmiana temperatury lub obecność pasożytów, może wywołać taką reakcję u larw ostatniego stadium u przedstawiciela omacnicowatych *Ectomyelois ceratoniae*. Brak pożywienia to stresor, wpływający na metabolizm komórkowy u owadów, często wywołujący zwiększenie ilości reaktywnych form tlenu. Np., ze wzrostem czasu trwania głodu (okres ten trwał 24

i 48 godzin) w ciele larw omacnicy *Ectomyelois ceratoniae* zmierzono wyraźny wzrost poziom dialdehydu malonowego (produktu peroksydacji lipidów) (Farahani i in., 2020).

#### **4. Systemy obronne wobec wybranych stresorów.**

Uregulowany stan redoks jest niezbędny do utrzymania prawidłowej fizjologii i metabolizmu komórkowego. Tiole są to związki organiczne, zawierające grupę sulfhydrylową. Odgrywają istotną rolę w obronie przed reaktywnymi formami tlenu. Tiole całkowite występują zarówno w postaci wolnej, jak i związanej z białkami. W większości komórek eukariotycznych, tiole cysteinowe są najbardziej wrażliwe na wahania komórkowego stanu redoks. W normalnych warunkach fizjologicznych cytozol ma wysoce redukujące środowisko, które utrzymuje większość tioli białkowych w stanie zredukowanym. Fizjologiczny stres oksydacyjny może prowadzić do powstawania kwasów sulfenowych, które są przekształcane w wyższe stopnie utlenienia, dwusiarczki wewnątrzcząsteczkowe lub dwusiarczki połączone z glutationem. Nadmierny stres oksydacyjny powoduje masowe i nieodwracalne utlenianie tioli białkowych, zubożenie glutationu i śmierć komórki (Prakash i in., 2009; Baba i Bhatnagar 2018). Warto tutaj wspomnieć o konkretnym związku, biorący udział w obronie przed wolnymi rodnikami, jakim jest glutation. Jest wszechobecnym tripeptydem zawierającym tiole, który odgrywa kluczową rolę w biologii komórki. Moduluje odpowiedź komórki na zmiany redoks związane z reaktywnymi formami tlenu. Reguluje ekspresję genów i apoptozę oraz bierze udział w transbłonowym transporcie substancji organicznych. Ochronne działanie glutationu może przejawiać się tym, że reaktywne formy tlenu są zredukowane lub nieaktywne poprzez wytworzenie wiązania dwusiarkowego między dwiema cząsteczkami glutationu, tworząc utleniony glutation (Jefferies i in., 2003). Kolejną grupą związków, pełniącą rolę detoksykacyjną to S-transferazy glutationowe (GST). Składają się z wielofunkcyjnych białek szeroko rozpowszechnionych w przyrodzie, zarówno u eukariontów, jak i prokariontów. U eukariontów GST są podzielone ze względu na ich lokalizację komórkową, na co najmniej trzy główne rodziny białek, a mianowicie cytozolowe GST, mitochondrialne GST i mikrosomalne GST. GST pełnią wiele ról biologicznych, w tym ochronę komórek przed stresem oksydacyjnym, a także biorą udział w syntezie i modyfikacji leukotrienów i prostaglandyn, chronią DNA komórkowe przed uszkodzeniem oksydacyjnym. Katalizują reakcję sprzęgania glutationu z różnymi związkami elektrofilowych. Dezaktywują metabolity wtórne, powstające podczas stresu oksydacyjnego (Bartosz, 2013; Allocati i in., 2018). Jedną z najczęściej stosowanych

strategii do oceny równowagi między wolnymi rodnikami a antyoksydantami w układach biologicznych jest określenie całkowitej pojemności antyoksydacyjnej (TAC). Pozytywną jej cechą to m. in. możliwość oceny znanych i nieznanых przeciwtleniaczy oraz ich addytywnego, synergistycznego i/lub antagonistycznego działania w złożonym systemie chemicznym lub biologicznym (Fraga i in., 2014).

Istotną rolę w obronie przed wolnymi rodnikami, powstałymi w sytuacji narażenia na metale ciężkie w tym kadm, odgrywają katalaza (CAT), dysmutaza ponadtlenkowa (SOD) oraz S-transferaza glutationowa (GST) (Kafel i in., 2014). Enzymy te w wielu badaniach są przedstawiane jako wrażliwe wskaźniki stresu oksydacyjnego na obszarach zanieczyszczonych metalami (Augustyniak i in. 2009; Migula i in. 2004; Augustyniak i Migula 2000). Stres spowodowany przez kadm i cynk może skutkować podwyższeniem ekspresji wybranych genów S-transferaz glutationowych (GST np. z klasy Delta), jak zaobserwowano u larw muszek z rodzaju *Drosophila* karmionych pokarmem, wzbogaconym tymi metalami (Yepiskoposyan i in., 2006). Tolerancja na obecność kadmu w diecie u larw światłówki naziemnicy *Spodoptera exigua* może wzrastać z czasem ekspozycji na metal. U osobników pierwszego pokolenia, narażonych na kadm, notowano wyższą śmiertelność niż wśród tych z kolejnych pokoleń żerujących na pożywce z podwyższonym stężeniem metalu. Wyższemu stężeniu kadmu w hemolimfie u osobników z kolejnych pokoleń z populacji narażonych na ten metal wielopokoleniowo, towarzyszył wzrost poziomu glutationu utlenionego oraz całkowitej pojemności antyoksydacyjnej, związane z prawdopodobnym sprawniejszym ograniczaniem negatywnych skutków działania metalu w porównaniu z tym obserwowanym u osobników z początkowego pokolenia narażonego na działanie metalu (Kafel i in., 2012). Wcześniejsze badania na osobnikach światłówki naziemnicy *Spodoptera exigua* z linii kontrolnej i kadmowej, z osobnikami eksponowanymi na Cd w ciągu wielu pokoleń. Badania te wskazywały, że w szczególności zmiany stężenia węglowodanów wydawały się być czułym biomarkerem stresu związanego z metalami, niezależnie od stadium rozwojowego osobników i okresu głodu. Wzrost całkowitej zdolności przeciwutleniającej i stężenia produktów peroksydacji lipidów w 4. stadium larwalnym pod wpływem kadmu był zależny od pochodzenia z linii (kontrolnej lub kadmowej) (Pompka i in., 2022). Wielopokoleniowe narażenie na kadm i jednocześnie na inny czynnik, np. insektycyd – spinosad powodowało u osobników *S. exigua* zmiany wiązało się z reakcjami (np. znaczącym wzrostem HSP70) umożliwiającymi przetrwanie w obecności dodatkowego stresora. Interakcje tę można określić jako tolerancję krzyżową

(Augustyniak i in., 2017). Nadmiar cynku może także prowadzić do uszkodzeń komórkowych przez wytwarzanie reaktywnych form tlenu. W warunkach narażenia na cynk motyla *Antheraea pernyi*, w jego ciele tłuszczowym zidentyfikowano 2399 genów o różnej ekspresji (DEG), które były związane były z obroną antyoksydacyjną (Liu i in., 2018).

## II. CELE PRACY

Przy zwalczaniu szkodliwych owadów ważna jest kompleksowa ocena oddziaływania czynników środowiskowych. Ważnym aspektem wydaje się być ocena, czy wcześniejsze oddziaływanie kilku czynników: obecności w naturalnej diecie wysokiego stężenia metali: kadmu i cynku, podwyższonej zawartości flawonoidów lub krótkotrwałego braku pożywienia wpłynie na sprawność detoksykacyjną owadów roślinożernych. Głód, metale oraz substancje roślinne mogą oddziaływać na określone parametry rozwojowe owadów, takie jak czas trwania i ilość stadiów rozwojowych, zmiany przyrostu masy ciała w konkretnych stadiach, przeżywalność, procesy metaboliczne zachodzące w organizmie. Wymienione czynniki w warunkach naturalnych mogą działać razem, jednak nie znane są działania bliżej takie łączne działania. Jest to o tyle ważne, że może mieć znaczenie przy zasiedlaniu różnych roślin i wywoływaniu szkód, czy przy zwalczaniu szkodników roślin uprawnych. Przetrwanie w takich warunkach będzie m.in. zależało od sprawności systemów detoksykacyjnych i dostępności substratów energetycznych.

Stwierdziłam występowanie biedronek biedronek owelnicy lucernianki, *Subcoccinella vigintiquatuorpunctata* L. na terenie zdegradowanym w wyniku wcześniejszej działalności, nieczynnej aktualnie huty metali nieżelaznych „Szopienice”, ale porośniętym między innymi już trawami i lepnicą. Na tym terenie znaleziono szereg osobników tego gatunku biedronki żerujących na liściach lepnicy rozdętej *Silene vulgaris*. Podobnie biedronki tego gatunku znaleziono na liściach lepnicy porastających tereny w pobliżu nieczynnej Huty Metali Nieżelaznych „Szopienice”. Analizy zawartości metali ujawniły znaczące istotnie różnice w zawartości średniej metali kadmu (od 4,1 do 38,5 mg/kg suchej masy w maju oraz 6,32 do 40,23 mg/kg suchej masy w lipcu) i cynku (od 1549,3 do 3800,1 mg/kg suchej masy w maju oraz 2590 do 4183 mg/kg suchej masy w lipcu) z pędów naziemnych roślin, między roślinami zebranymi z różnych odległości od dawnej huty (Nadgórska-Socha i in., 2009). Wydaje się, że tak zróżnicowana ekspozycja na ilości metali w diecie skutkować będzie innymi kosztami obrony antyoksydacyjnej i jeśli uwzględnić także możliwość przejściowego niedoboru pokarmu – może to skutkować na dalszym zasiedlaniu roślin uprawnych takich jak lucerna. Co więcej może także mieć związek z odmienną wrażliwością na naturalne insektycydy. Działanie nadmiaru obu pierwiastków zwykle prowadzi do znaczącego wzrostu stresu oksydacyjnego w organizmach i wydatkami energii na obronę antyoksydacyjną (Kafel i

in., 2021). Chcąc planować obronę przeciw szkodliwym roślinożercom, warto uwzględnić ich wcześniejsze doświadczenia w oddziaływaniu różnych stresów jak nadmiar metali, krótkotrwały okres głodu.

Głównym celem badań w tym projekcie jest ocena sprawności detoksykacyjnej biedronek owelnicy lucernianki, *Subcoccinella vigintiquatuorpunctata* L., żerujących na roślinach żywicielskich o zróżnicowanej zawartości kadmu i cynku oraz flawonoidów. Na tej podstawie sformułowano następujące problemy badawcze:

1. Kumulacja metali ciężkich w roślinach i u biedronek na nich żerujących w zależności od odległości od emitera.
2. Porównanie reakcji obronnych i poziomu substratów energetycznych u biedronek żerujących na pędach lepnicy rozdętej różniących się zawartością metali i flawonoidów.
3. Porównanie obrony detoksykacyjnej u osobników poddanych krótkotrwałemu okresowi głodu z roślin lepnicy różniących się zawartością metali.
4. Porównanie reakcji obronnych u osobników żerujących na lucernie a pochodzących z trzech różnych stanowisk.



### III. MATERIAŁ I METODY

#### 1. Charakterystyka badanego gatunku.

Oweńnica lucernianka *Subcoccinella vigintiquatuorpunctata* (Coleoptera: Coccinellidae) powszechnie występuje w Europie, Azji Północnej i Ameryce. Zasiedla kilkadziesiąt gatunków roślin żywicielskich, najczęściej żeruje na roślinach motylkowych i goździkowych. Głównie preferuje stepowe rejony Europy południowej (Wheeler i Thomas 1981; Romankow 1963). Samice składają jaja zarówno na górnej jak i dolnej części liści roślin, głównie w maju-czerwcu w naszym kraju. Larwy żerują na blaszce liściowej, odżywiając się epidermą i parenchymą liści, w wyniku czego tworzą charakterystyczne ażurowe uszkodzenia. Występuje jedno pokolenie w roku, dorosłe osobniki zimują w ściółce (Bariś 2021). Aby je zwalczyć, stosuje się insektycydy, gdy zbiera się nasiona lucerny opryskując rośliny przed kwitnieniem, ale na plantacjach lucerny przeznaczonej na paszę nie wolno stosować zabiegów chemicznych, więc niezbędne są inne metody, wydaje się, że wykorzystanie substancji naturalnych do odstraszenia lub zwalczania owadów może mieć znaczenie dla ochrony roślin przeznaczonych na paszę. Przykładowo, wskazano skuteczność olejku mięty bogatego w fenole w ograniczaniu żerowania dorosłych osobników oweńnicy lucernianki (Yildirim i in., 2019). Chrząszcze letniego pokolenia żerują na plantacjach lucerny od lipca, na zimowanie schodzą na przełomie sierpnia i września. Trzeba zaznaczyć, że jeszcze niedawno biedronka ta uchodziła za mało względnie mało szkodliwy gatunek w Polsce, ale w związku z ociepleniem klimatu występuje coraz częściej co może wiązać się ze wzrostem szkód w uprawach w Polsce (Horoszkiewicz i in., 2012; Golenia i Romankow 1974). Warto zwrócić uwagę, że osobniki tego gatunku łatwo zasiedlają miejsca zanieczyszczone, wzdłuż dróg, torów kolejowych, wokół wysypisk śmieci (Wheeler i Thomas 1981).

#### 2. Zbiór oraz hodowla materiału badawczego.

Larwy oweńnicy lucernianki zbierano w miesiącu czerwcu, a ich dorosłe osobniki – w lipcu z terenu nieczynnej Huty Metali Nieżelaznych „Szopienice” z trzech stanowisk badawczych, oddalonych odpowiednio I – 450 m, II – 250 m, III – 50 m od nieczynnego emitera. Na tym obszarze wcześniejsze badania pokazały znaczne różnice w stężeniach metali ciężkich w pędach naziemnych roślin lepnicy rozdętej (Nadgórska-Socha i in., 2011). Larwy biedronek zbierano w miesiącu czerwcu, a dorosłe osobniki – w lipcu, w

momencie ich liczego występowania w tym rejonie. Jednocześnie z tych samych stanowisk w miesiącu lipcu, zostały zebrane nadziemne pędy lepnicy rozdętej *Silene vulgaris* (Tab. 2.1).

| Larwy i osobniki dorosłe oraz rośliny |                                  |
|---------------------------------------|----------------------------------|
| Nr stanowiska                         | Odległość od nieczynnego emitera |
| I                                     | 450 m                            |
| II                                    | 250 m                            |
| III                                   | 50 m                             |

**Tabela 2.1** Odległości poszczególnych powierzchni, z których zostały zebrane owady i rośliny.

Larwy, z poszczególnych stanowisk umieszczono w eppendorfach (po dwa osobniki w każdym eppendorfie) i przechowywano w zamrażarce w  $-80^{\circ}\text{C}$  do dalszych oznaczeń. Zebrane osobniki dorosłe hodowano w warunkach laboratoryjnych na pędach lepnicy rozdętej pochodzące z tych samych stanowisk co biedronki na nich hodowane. W tym celu biedronki, odpowiednio z każdego stanowiska, wkładano do osobnego terrarium. Następnie świeżo zebrane pędy lepnicy rozdętej *S. vulgaris*, których końce owijano watą nasączoną wodą oraz folią aluminiową i wkładano codziennie jako pokarm do każdego z terrarium, odpowiednio z każdego stanowiska, z jakiej pochodziły zebrane osobniki. Osobniki te hodowano przez 5 dni, codziennie wymieniając rośliny na nowe, w temperaturze  $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$ , zachowując fotoperiod 16:8 L:D, w laboratorium Instytutu Biologii, Biotechnologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach. Następnie część osobników wkładano do eppendorfów, po jednym osobniku w każdym, i przechowywano w zamrażarce w  $-80^{\circ}\text{C}$ , przed oznaczeniami stężenia metali, poziomu substratów energetycznych, glutationu zredukowanego (GSH), aktywności enzymów: S-transferazy glutationowej (GST) i  $\gamma$ -glutamylotraspeptydazy (GGT), poziomu dialdehydu malonowego (MDA), całkowitej pojemności antyoksydacyjnej (TAC), poziomu tioli zredukowanych/utlenionych.

Część osobników z hodowli poddawano krótkim okresom bez dostępu pokarmu, przenoszono je do szalek Petriego i odpowiednio trzymano w przedziałach 24-godzinnych jedną grupę owadów przez 1 dzień (1D), a drugą przez kolejne dwa dni bez pokarmu (2D). W szalkach owijano nawilżony wodą destylowaną kawałek ligniny w kawałek folii aluminiowej, tak by mógł parować i umieszczano w szalkach. W efekcie hodowano biedronki w kolejnych grupach doświadczalnych, przedstawionych w tabeli poniżej ze wskazaniem liczby osobników użytych do doświadczenia. Osobniki z grupy,

pochodzącej z trzeciego stanowiska, gdy poddano tylko 1-dniowemu okresowi głodzenia cechowała duża śmiertelność, wynosząca 90% wszystkich osobników z tej grupy, stąd nie prowadzono w ich przypadku dłuższego okresu głodzenia. Po skończonym okresie głodzenia również wkładano do eppendorfów, po jednym osobniku w każdym, i przechowywano w zamrażarce w -80°C przed wykonaniem oznaczeń.

Pozostałe dorosłe osobniki owelnicy owelnianki, hodowano na sadzonkach lucerny w temperaturze  $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$ , przy fotoperiodzie 16:8 L:D w laboratorium Instytutu Biologii, Biotechnologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach. Wcześniej hodowano je przez 5 dni na pędach lepnicy rozdętej *S. vulgaris*, (tak jak wcześniej opisano pędy nadziemne roślin codziennie wymieniano), w terrariach utrzymywano a potem przenoszono je na sadzonki lucerny siewnej *Medicago sativa* odmiana „La Bella Campagnola”. By uzyskać sadzonki lucerny, nasiona wysiewano na krążkach torfowych do kiełkowania/ukorzenia o ustalonym pH 6, umieszczonych na tacy do wysiewu, a następnie przykrywano plastikowym kloszem. Po dwóch tygodniach, sadzonki lucerny o wysokości około 10 cm były gotowe do włożenia do terrariów z biedronkami. Po tym okresie część biedronek poddawano odpowiednio 1- i 2-dniowemu okresowi głodzenia (oprócz osobników pochodzących z trzeciej powierzchni). Na końcu owady umieszczano w eppendorfach i przechowywano w zamrażarce w -80°C przed wykonaniem dalszych oznaczeń.

### **3. Oznaczenia wykonane w pędach nadziemnych roślin: lepnicy rozdętej *S. vulgaris* i lucerny siewnej *M. sativa* oraz w ciele larw i osobników dorosłych owelnicy lucernianki *S. vigintiquatuorpunctata*.**

Przeprowadzono następujące pomiary:

- Oznaczanie stężenia metali Cd i Zn w pędach nadziemnych lepnicy rozdętej *S. vulgaris* oraz w ciele owelnicy lucernianki *S. vigintiquatuorpunctata*, pochodzących z hodowli na pędach nadziemnych lepnicy rozdętej *S. vulgaris* z wykorzystaniem absorpcyjnej spektrometrii atomowej AAS.
- Pomiar stężenia flawonoidów całkowitych w pędach nadziemnych lepnicy rozdętej *S. vulgaris* i lucerny siewnej *M. sativa* metodą spektrofotometryczną.
- W ciele larw owelnicy lucernianki *S. vigintiquatuorpunctata* zmierzono przy użyciu spektrofлуorymetru Hitachi F-7000: stężenie glutationu zredukowanego, a przy użyciu spektrofotometru Tecan Infinite M200 Pro: stężenie białka

całkowitego metodą Bradforda, aktywność S-transferazy glutationowej (GST) za pomocą CDNB, poziom całkowitej pojemności antyoksydacyjnej (TAC) z użyciem rodnika ABTS<sup>+</sup>, stężenie dialdehydu malonowego (MDA), wyznaczono proporcję tioli zredukowanych do utlenionych (RSH/RSSR) oraz aktywność  $\gamma$ -glutamylotraspeptydazy (GGT), zmierzono hamowanie GST w warunkach in vitro.

- W ciele osobników dorosłych owężnicy lucernianki *S. vigintiquatuorpunctata* pochodzących z hodowli na pędach nadziemnych lepnicy rozdętej *S. vulgaris* (I i II stanowisko, niepoddane i poddane 1-dniowemu okresowi głodu) zmierzono stężenia substratów energetycznych (węglowodanów, białka, lipidów, glikogenu).
- W ciele osobników dorosłych owężnicy lucernianki *S. vigintiquatuorpunctata* pochodzących z hodowli na pędach nadziemnych lepnicy rozdętej *S. vulgaris* i przeniesionych na lucernę siewną *M. sativa* zmierzono: stężenie glutationu zredukowanego, stężenie białka całkowitego, aktywność S-transferazy glutationowej (GST) badanie in vitro GST w obecności wybranych inhibitorów, poziom całkowitej pojemności antyoksydacyjnej (TAC), stężenie dialdehydu malonowego (MDA), proporcja tioli zredukowanych do utlenionych (RSH/RSSR) oraz aktywność  $\gamma$ -glutamylotraspeptydazy (GGT), z użyciem odpowiednio spektrofлуorymetru i spektrofotometru, zgodnie z opisem w poprzednim akapicie.

#### **4. Opis użytych metod/technik badawczych.**

##### **4.1 Stężenie Cd i Zn w pędach roślin i ciele owężnicy lucernianki *S. vigintiquatuorpunctata*.**

Pomiar stężenia metali kadmu i cynku w pędach nadziemnych lepnicy rozdętej *S. vulgaris* oraz w ciele osobników dorosłych owężnicy lucernianki *S. vigintiquatuorpunctata* przeprowadzono za pomocą technik płomieniowej i elektrotermicznej absorpcyjnej spektrometrii atomowej AAS. Na każdą próbę przypadało po 1 osobniku na próbę, natomiast w przypadku roślin – 0,5 g suchej masy lepnicy rozdętej *S. vulgaris*.

Osobniki dorosłe owężnicy lucernianki *S. vigintiquatuorpunctata* oraz lepicę rozdętą *S. vulgaris*, najpierw suszono w temperaturze 50°C przez tydzień, ważono i przenoszono do szklanych próbek. Próby zalewano ultra czystym 65% kwasem

azotowym (V) (Suprapur, Merck KGaA Darmstadt, Niemcy) i po wstępnej mineralizacji przez dobę w temperaturze pokojowej próbówki przenoszono do studzienek w bloku grzejnym (Stuart Scientific Block Heater) i poddawano mineralizacji w kolejnych etapach w różnych temperaturach: 2 godziny w temperaturze 60°C a potem w temperaturze 120°C przez 3 dni zwierzęta lub przez 14 dni rośliny. Uzyskany klarowny, przezroczysty roztwór bez osadu każdej próby dopełniano wodą redestylowaną do odpowiedniej objętości końcowej (dla zwierząt – 4ml, roślin – 15 ml).

W celu określenia stężenia metali w ciecie osobników dorosłych owężnicy lucernianki *S. viginquatuorpuntata* zmierzono stężenie Zn metodą płomieniową (FAAS) a Cd metodą elektrotermiczną (GFAAS) w piecu z głowicą GFS 35Z Zeeman Furnance Head przy użyciu spektrometru absorpcyjnego iCE™ 3500 at. (AAS, Thermo Fisher Scientific). Poziomy metali obliczono, podobnie jak w pędach nadziemnych lepnicy rozdętej *S. vulgaris*, z krzywych odniesienia przygotowanych dla każdego pierwiastka przy użyciu wzorców Merck. Zawartość kadmu i cynku wyrażono w mg/kg suchej masy.

#### **4.2 Stężenie flawonoidów całkowitych w pędach nadziemnych lepnicy rozdętej *S. vulgaris* i lucerny siewnej *M. sativa*.**

Przed pomiarem suszono pędy nadziemne lepnicy rozdętej *S. vulgaris* i lucerny siewnej *M. sativa* w temperaturze 50°C a następnie ich naważki 0,5 g rozcierano w moździerz, a potem ekstrahowano w 10 ml 80% etanolu. Uzyskane ekstrakty roślinne, filtrowano za pomocą bibuły filtracyjnej i umieszczono w szklanych, szczelnie zamkniętych naczyniach.

W celu oznaczenia stężenia flawonoidów całkowitych w pędach nadziemnych lepnicy rozdętej *S. vulgaris* i lucerny siewnej *M. sativa*, w dołku, polistyrenowej 96-dołkowej płytki mieszano kolejno 25 µl ekstraktu roślinnego, 75 µl 95% etanolu, 5 µl 10% chlorku glinu, 5 µl 1M octanu magnezu oraz 140 µl wody destylowanej i inkubowano w temperaturze pokojowej przez 30 minut w ciemności. Następnie wykonywano pomiar absorbancji przy długości fali  $\lambda=415$  nm przy użyciu czytnika płytek Tecan Infinite M200 Pro. Stężenia flawonoidów wyliczono z krzywej wzorcowej, przygotowanej z wyjściowego roztworu kwercetyny o stężeniu 400 µg/ml (Zou i in. 2004).

#### **4.3 Pomiary parametrów stresu oksydacyjnego w ciele larw i osobników dorosłych owelnicy lucernianki *S. viginquatuorpunctata*.**

Przed przystąpieniem do pomiarów każdą próbkę zawierającą po dwie larwy homogenizowano w 400  $\mu$ l buforu PBS (pH 7,4), natomiast osobniki dorosłe – pojedynczo w 250  $\mu$ l tego buforu, następnie wirowano przy 16000 g w temperaturze 4°C przez 5 minut. Powstały supernatant wykorzystywano do przeprowadzania oznaczeń.

##### **4.3.1 Stężenie glutationu zredukowanego (GSH).**

Do pomiaru stężenia glutationu zredukowanego (GSH), wykorzystano mieszaninę reakcyjną zawierającą: (OPA) w metanolu rozcieńczany w 0,05 M buforze fosforanowym (pH 8,0) z 1 mM EDTA. W pierwszej kolejności odbiańczano próby mieszając 50  $\mu$ l próby 50  $\mu$ l 10% roztworu wodnego kwasu trichlorooctowego. Tak przygotowane próby wirowano przy 9000 g w temperaturze 4°C przez 10 minut. 20  $\mu$ l supernatantu, zmieszano z 980  $\mu$ l 0,05 M buforu fosforanowego (pH 8,0), do którego dodano 1 mM EDTA by uzyskać pH buforu bliskie 7,0. W celu oznaczenia stężenia glutationu zredukowanego (GSH) do każdego z dołków, polistyrenowej 96-dołkowej płytki w kolorze czarnym mieszano kolejno 10  $\mu$ l zneutralizowanego supernatantu, 10  $\mu$ l 0,1% roztwór induktora orto ftalaldehydu oraz 180  $\mu$ l buforu fosforanowego (wcześniej wymienionego) i inkubowano w ciemności w temperaturze pokojowej przez 10 minut. Następnie dokonywano pomiaru fluorescencji przy  $\lambda_{ex}$ : 355 nm i  $\lambda_{em}$ : 420 nm przy pomocy spektrofluorymetru Hitachi F-7000. Wyniki odczytywano z krzywej kalibracyjnej wykorzystując szereg roztworów GSH w buforze fosforanowym w o zakresie stężeń 0-1000  $\mu$ M GSH. Uzyskane wyniki w  $\mu$ mol, przeliczono uwzględniając stężenie białka w próbach i wyrażono w jednostkach  $\mu$ mol/mg białka (Roušar i in., 2012).

##### **4.3.2 Pomiar całkowitej pojemności antyoksydacyjnej (TAC).**

Do pomiaru całkowitej pojemności antyoksydacyjnej (ang. *total antioxidant capacity* TAC) do którego wykorzystuje się reakcję redukcji kationowych rodników ABTS<sup>+</sup>, pochodzących z ABTS (2,2-azytnobis(3etylobenzotiazolini-6-sulfonian)) według opisu Re i in. (1999). Kationowy rodnik ABTS<sup>+</sup> przygotowuje się rozpuszczając 19,5 mg ABTS oraz 3,3 mg nadsiarczany potasu (K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>) w 7 ml 0,1 M buforu PBS o pH 7,4; następnie roztwór pozostawia się w ciemności w temperaturze pokojowej przez 16 h. Po tym czasie rozcieńcza się go czterokrotnie i przechowuje w temperaturze -20°C

przed pomiarem. Po odtajaniu, roztwór ten rozcieńcza się w celu wyrównania absorbancji do  $0,7 \pm 0,02$  przy 414 nm. Pomiar TAC przeprowadzono z użyciem 96-dółkowej polistyrenowej płytki. Do każdego dołka dodawano 10  $\mu\text{l}$  próby oraz 90  $\mu\text{l}$  roztworu rodnika ABTS<sup>+</sup> i inkubowano w ciemności w temperaturze pokojowej przez 5 minut. Następnie przy użyciu czytnika płytek Tecan Infinite M200 Pro, mierzono absorbancję przy długości fali  $\lambda=734$ . Do przygotowania krzywej wykorzystywano roztwór Troloxu, analogu witaminy E. W tym celu rozpuszczono 2,5 mg Troloxu w 10 ml alkoholu etylowego 100%, a następnie rozcieńczono otrzymany roztwór w wodzie w stosunku 1:3. Zakres stężeń Troloxu wynosił 0-20  $\mu\text{M}$ . Wyniki wyliczano z krzywej i wyrażano w postaci ekwiwalentu pojemności antyoksydacyjnej Troloxu i wyrażono w  $\mu\text{M}$  Troloxu/mg białka (Re i in. 1999).

#### **4.3.3 Aktywność S-transferazy glutationowej (GST).**

Aktywność S-transferazy glutationowej (GST), zmierzono zgodnie z metodą Yu (1982) przy użyciu 1-chloro-2,4-dinitrbenzenu (CDNB). Mierzono stężenie powstałego konjugatu CDNB z glutationem przy długości fali  $\lambda=340$  nm. Sporządzano mieszaninę zawierającą 200  $\mu\text{l}$  1 mM roztworu GSH w 0,05 M buforze PBS o pH 7,4 oraz 18  $\mu\text{l}$  próby. Następnie dodawano 2  $\mu\text{l}$  15 mM roztworu etanolowego CDNB. Zmiany absorbancji rejestrowano w liniowym zakresie szybkości reakcji w ciągu pierwszych 3 minut, przy  $\lambda=340$ , za pomocą spektrofotometru Tecan Infinite M200 Pro. Różnice absorbancji próby ślepej odejmowano od różnicy absorbancji dla danej próby. Aktywność enzymu wyrażono w  $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$  białka, wykorzystując do obliczeń współczynnik ekstynkcji równy  $9,6 \text{ mM}^{-1} \text{ l}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (Yu 1982).

#### **4.3.4 Badanie in vitro GST w obecności wybranych inhibitorów.**

W celu zbadania hamowania GST w warunkach in vitro w obecności wybranych inhibitorów użyto zmodyfikowanej metody Tang i współp. (2014). W tym celu, 10  $\mu\text{l}$  supernatantu mieszano z 10  $\mu\text{l}$  roztworu inhibitora (4g/L kwercetyny lub 4g/L  $\text{CdNO}_3$  lub 4g/L  $\text{ZnNO}_3$ ) i inkubowano w temperaturze pokojowej przez 10 minut. Aktywność resztkowa (GST), zmierzono zgodnie z wcześniej opisaną metodą (Yu 1982) przy użyciu CDNB. Różnice dotyczyły proporcji użytych składników mieszaniny reakcyjnej. 75  $\mu\text{l}$  2 mM roztworu GSH w 0,05 M buforze PBS o pH 7,4 mieszano z 20  $\mu\text{l}$  próby z inhibitorem lub PBS. Następnie dodawano 5  $\mu\text{l}$  15 mM roztworu etanolowego CDNB. Zmiany

absorbancji rejestrowano w liniowym zakresie szybkości reakcji w ciągu pierwszych 3 minut, przy  $\lambda=340$ , za pomocą spektrofotometru Tecan Infinite M200 Pro. Po skorygowaniu w zmianie absorbancji dla próby zmianami absorbancji na próby ślepej wyliczano aktywność resztkową mikromolach konjugatów CDNB/min. A następnie określano % hamowania w stosunku do aktywności GST mierzonej bez inhibitora (Yu 1982; Tang i in., 2014).

#### **4.3.5 Stężenie dialdehydu malonowego (MDA) – produktu peroksydacji lipidów.**

W celu oznaczenia stężenia MDA mieszano 60  $\mu$ l próby z 60  $\mu$ l 10% kwasu tróchlorooctowego (TCA). Następnie mieszaninę wirowano przy 12000 g w temperaturze 4°C przez 10 minut 100  $\mu$ l zebranego supernatantu po wirowaniu mieszano z 70  $\mu$ l 1% kwasu 2-tiobarbiturowego (TBA). Następnie próby podgrzewano w temperaturze 100°C przez 60 minut. Po tym czasie próby chłodzono na lodzie, ponownie mieszano i mierzono absorbancję przy długości fali  $\lambda=535$  nm przy użyciu spektrofotometru Tecan Infinite M200 Pro. w próbie ślepej zamiast próby używano wody, Wyniki wyrażano w  $\mu$ M MDA/mg białka przy współczynniku ekstynkcji wynoszącym  $1,56 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (Bar-Or i in., 2001).

#### **4.3.6 Proporcja tioli zredukowanych do utlenionych (RSH/RSSR).**

Pomiar stosunku tioli zredukowanych do utlenionych wykonywano wg metody Khramtsov i in. (1997). Bazuje ona na utlenieniu zredukowanych tioli (RSH) przez kwas 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzoesowy) (DTNB). Reakcja utleniania była mierzona przy długości fali  $\lambda=412$  nm przy użyciu spektrofotometru Tecan Infinite M200 Pro. Na początku, w celu dokonania pomiaru utlenionych tioli, najpierw przeprowadzono analizę tioli całkowitych (RSH + RSSR) mianowicie, do 25  $\mu$ l homogenatu dodawano 50  $\mu$ l 2 M kwasu solnego i inkubowano w temperaturze pokojowej przez 20 minut. Następnie 50  $\mu$ l tej mieszaniny oraz 50  $\mu$ l 2 M kwasu solnego po 20 minutach mieszano ze 100  $\mu$ l 1 M NaOH ( $\text{pH} \geq 7,0$ ). Potem dodawano również 500  $\mu$ l 0,1% DTNB i inkubowano w temperaturze 37°C przez 10 minut. Po tym czasie tiole całkowite mierzono pobierając 25  $\mu$ l tak przygotowanej mieszaniny i dodając do niej 100  $\mu$ l buforu PBS i inkubowano w temperaturze pokojowej przez 20 minut. Jako standard zastosowano cysteinę. Absorbancja zarówno RSH, jak i RSH + RSSR, została zmierzona przy długości fali



$\lambda=412$  nm. Zawartość RSH obliczono jako różnicę pomiędzy zredukowanymi tiolami po redukcji powstałej po dodaniu kwasu solnego (RSSR) a początkową zawartością RSH w próbie. Końcowy wynik przedstawiono w postaci proporcji RSSR do RSH (Khramtsov i in. 1997).

#### 4.3.7 Aktywność enzymu $\gamma$ -glutamylotraspeptydazy (GGT).

Oznaczanie aktywności enzymu  $\gamma$ -glutamylotraspeptydazy (GGT) wykonywano metodą wg Szasz (1974). W tym celu sporządzano mieszaninę reakcyjną, składającą się z 200  $\mu$ l buforu Tris-HCl z 10 mM  $MgCl_2$  i 4,4 mM  $\gamma$ -glutamilo p-nitroanilidu oraz 85 mM glicyloglicyny. Następnie do mieszaniny dodawano 10  $\mu$ l próby i dokonywano pomiaru zmiany absorbancji przy długości fali  $\lambda=405$  nm w 25°C w kolejnych 5 minutach przy użyciu spektrofotometru Tecan Infinite M200 Pro. Aktywność tego enzymu wyliczano z wykorzystaniem współczynnika ekstynkcji wynoszącym 9,9 mM $\times$ cm<sup>-1</sup>. Wyniki wyrażono 9,9 mM $\times$ cm<sup>-1</sup>. Wyniki wyrażono w mM $\cdot$ mg białka<sup>-1</sup> $\cdot$ min<sup>-1</sup> (Szasz 1974).

#### 4.3.8 Stężenie białka całkowitego.

Stężenie białka oznaczano spektrofotometrycznie przy użyciu metody Bradford (1976), wykorzystującej tworzenie barwnego kompleksu białka z barwnikiem *Coomassie Brilliant Blue* G-250, w wyniku czego następuje zmiana zabarwienia roztworu z brązowego na niebieski. Sporządzony wcześniej odczynnik Bradforda zawierający w swoim składzie *Coomassie Brilliant Blue* G-250 o stężeniu 0,01% rozpuszczony w etanolu oraz kwasie ortofosforowym i rozcieńczony wodą destylowaną. Pomiar przeprowadzano z wykorzystaniem płytki polistyrenowej 96-dołkowej. Do każdego dołka wprowadzono 5  $\mu$ l próby 250  $\mu$ l rozcieńczonego odczynnika Bradforda po 10minutowej inkubacji w ciemności mierzono absorbancję przy długości fali  $\lambda=595$  nm przy użyciu spektrofotometru Tecan Infinite M200 Pro. Stężenie białka obliczano w oparciu o krzywą wzorcową, przygotowaną z wyjściowego roztworu albuminy bydlęcej (BSA), wykorzystując zakres stężeń krzywej wynosił 20-200  $\mu$ g białka/100  $\mu$ l. Uzyskane wyniki, które wyrażono w mg/ml i wykorzystano do obliczeń aktywności badanych enzymów, GSH oraz TAC.

#### 4.4 Stężenie substratów energetycznych.

W celu określenia stężenia węglowodanów, lipidów, białka i glikogenu wykorzystano zmodyfikowaną metodę opracowaną przez Foray i in. (2012). Na początku biedronkę homogenizowano w 60  $\mu$ l wcześniej przygotowanego wodnego buforu do lizy, składającego się z 100 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1 mM ditiotretolu (DTT) i 1 mM EDTA. Próbę wirowano przy 180 g w 4°C przez 5 minut. Stężenie białka mierzono z wykorzystaniem metody Bradford (1976). W dalszej kolejności przygotowywano próby do oznaczeń: węglowodanów, lipidów i glikogenu. Do próby dodawano 6,7  $\mu$ l 20%  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  oraz 500  $\mu$ l mieszaniny chloroform : metanol w stosunku objętościowym 1:2, a następnie energicznie wytrząsano i wirowano przy 180 g w 4°C przez 15 minut. Powstały osad został później używany do oznaczenia stężenia glikogenu, natomiast supernatant – do oznaczenia stężenia węglowodanów i lipidów.

Stężenie węglowodanów badano w następujący sposób: 150  $\mu$ l supernatantu odparowywano w temperaturze pokojowej do objętości około 30  $\mu$ l, a następnie dodawano 240  $\mu$ l odczynnika antronowego o stężeniu 1,42 g L<sup>-1</sup>. Następnie po inkubacji prób w temperaturze 90°C przez 15 minut, pobierano 200  $\mu$ l próby na 96-dołkową płytkę polistyrenową, i mierzono absorbancję przy długości fali  $\lambda=625$  nm przy użyciu spektrofotometru Tecan Infinite M200 Pro. Jako próbę ślepą przygotowano mieszaninę chloroform : metanol (1:2). Zakres stężeń glukozy wykorzystanych do wyznaczenia krzywej wzorcowej wynosił 0-1 mg/ml.

Stężenie lipidów oznaczano z użyciem odczynnika wanilinowego. Po całkowitym odparowaniu 100  $\mu$ l supernatantu, do próbki wprowadzano 10  $\mu$ l 95%  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , a następnie inkubowano w temperaturze 90°C przez 2 minuty. Po schłodzeniu prób na lodzie i dodaniu do nich 190  $\mu$ l odczynnika wanilinowego (stężenie końcowe waniliny w roztworze 68% kwasu ortofosforanowego wynosiło 1,2 g L<sup>-1</sup>), próby mieszano i inkubowano w temperaturze pokojowej przez 15 minut. Po tym czasie, pobierano 190  $\mu$ l próby na 96-dołkową płytkę polistyrenową. Mierzono absorbancję przy długości fali  $\lambda=525$  nm przy użyciu spektrofotometru Tecan Infinite M200 Pro. Jako próbę ślepą również przygotowano mieszaninę chloroform : metanol (1:2). Zakres stężeń trioleiny wykorzystanej do wyliczenia krzywej wzorcowej wynosił 0-0,885 mg/ml.

Aby określić stężenie glikogenu, najpierw osad przepłukiwano 400  $\mu$ l 80% metanolu, a następnie odwirowano przy 16000 g, w temperaturze 4°C przez 5 minut. Ten etap powtarzano dwukrotnie. Następnie po zlanie metanolu, dodawano 1 ml odczynnika antronowego i inkubowano osad w temperaturze 90°C przez 15 minut. Po schłodzeniu

próbek na lodzie, 200  $\mu$ l próby przenoszono na 96-dołkową płytkę polistyrenową i mierzono absorbancję przy długości fali  $\lambda=625$  nm przy użyciu spektrofotometru Tecan Infinite M200 Pro. Przygotowano także próbę ślepa – mieszaninę chloroform : metanol (1:2). Zastosowano tę sama krzywą wzorcową, jak w przypadku wyznaczania stężenia węglowodanów.

Stężenia wszystkich substratów energetycznych wyrażano w  $\mu$ g/mg tkanki (Foray i in., 2012).

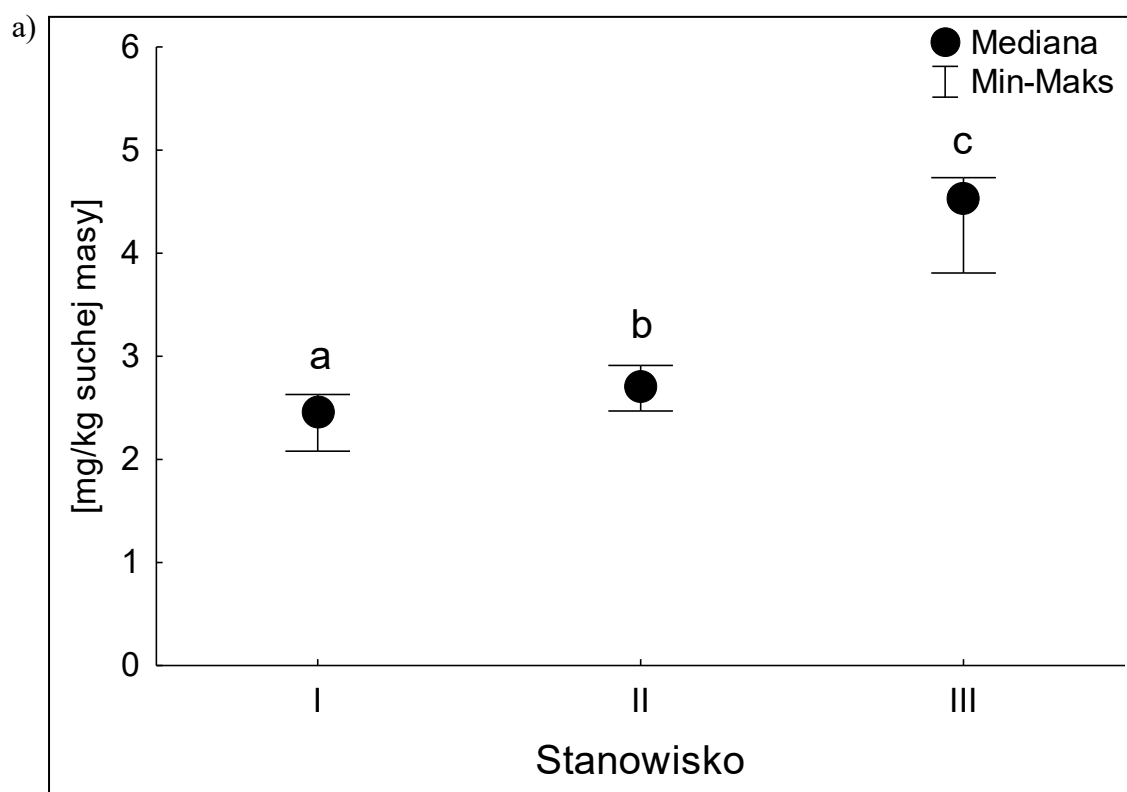
## **5. Metody statystyczne.**

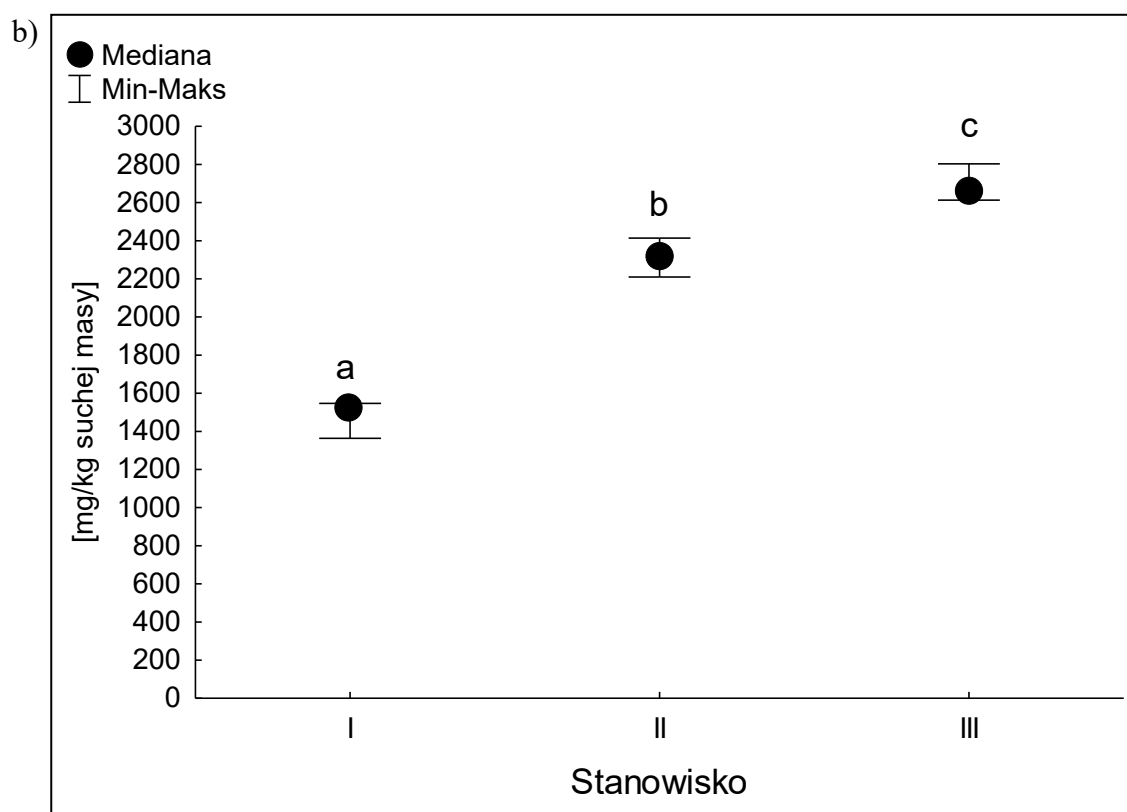
Analizy statystyczne przeprowadzono przy użyciu programu STATISTICA 13.3. Ilość powtórzeń w każdej z grup doświadczalnych wynosiła  $n=7$ . Wobec tego do ustalenia istotnych różnic pomiędzy tymi grupami, użyto testu nieparametrycznego,  $p<0,05$ . W przypadku badania *in vitro* GST w obecności wybranych inhibitorów, przedstawiono zestawienie uzyskanych rezultatów.

#### IV. WYNIKI

##### 1. Zawartość metali w pędach nadziemnych lepnicy rozdętej *S. vulgaris*.

Różnice w stężeniu metali: kadmu i cynku w pędach nadziemnych lepnicy rozdętej *S. vulgaris* były istotne statystycznie, gdy porównać rośliny pochodzące z trzech stanowisk wokół nieczynnego emitera (tj. 450 m, 250 m, 50 m). Stężenie metali (kadmu i cynku) w roślinach ze stanowiska położonego najbliżej nieczynnego emitera była najwyższe, a najniższe w roślinach ze stanowiska najbardziej odległego (Ryc. 1.1 a i b).





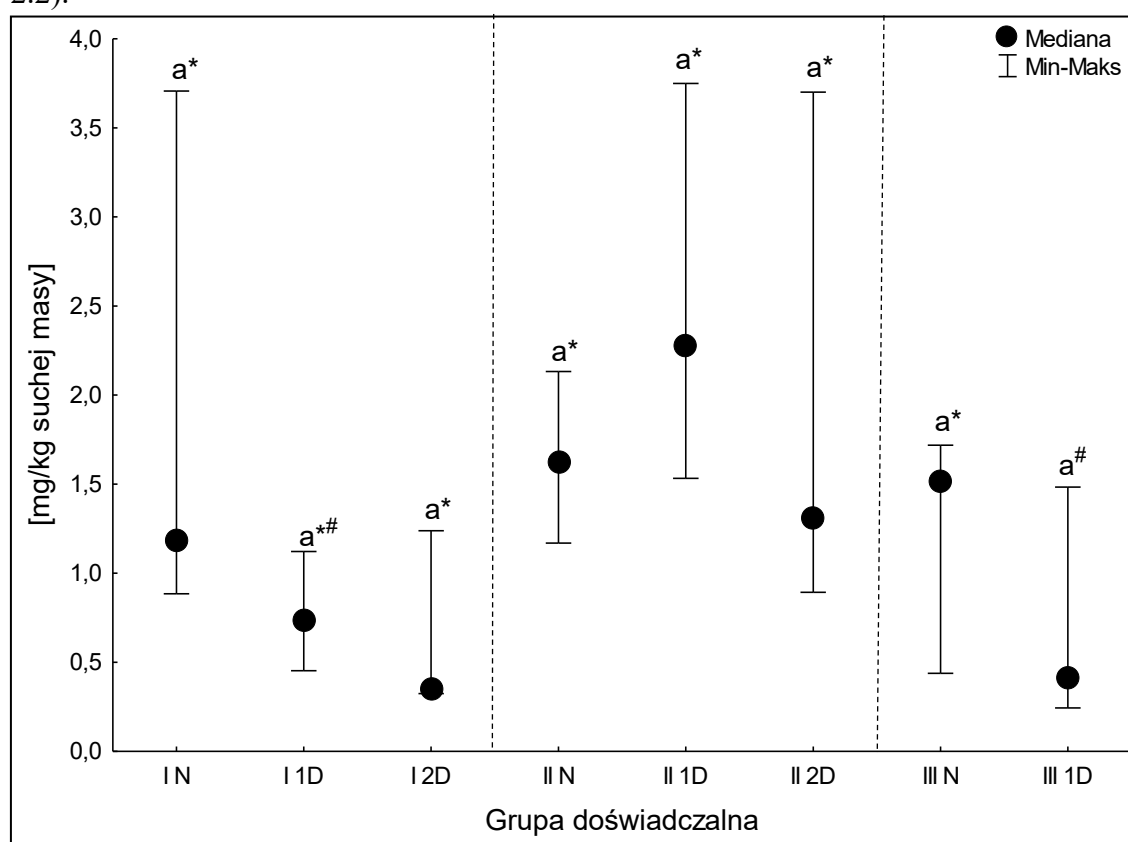
**Ryc. 1.1** Stężenie kadmu (a) i cynku (b) [mg/kg suchej masy] w pędach nadziemnych lepnicy rozdętej *S. vulgaris*, zebranych z trzech stanowisk, znajdujących się w różnych odległościach od nieczynnego emitera.

a, b, c – różnice pomiędzy różnymi stanowiskami

Analiza statystyczna: test nieparametryczny Kruskala-Wallisa,  $p < 0,05$ .

## 2. Zawartość metali w ciele osobników dorosłych owelnicy lucernianki *S. vigintiquatuorpunctata*.

Stężenie kadmu w ciele dorosłych biedronek owelnicy lucernianki *S. vigintiquatuorpunctata* pochodzących z trzech różnych stanowisk, hodowanych na pędach nadziemnych lepnicy rozdętej *S. vulgaris* z odpowiednich stanowisk, było podobne. Jedyną różnicę wyznaczono dla biedronek poddanych 1-dniowemu okresowi głodu, zaobserwowano istotnie wyższy poziom kadmu u osobników pochodzących z drugiego stanowiska w porównaniu tymi ze stanowiska trzeciego (Ryc. 2.1). Natomiast w przypadku zawartości cynku w ciele biedronek, nie odnotowano istotnych różnic (Ryc. 2.2).



**Ryc. 2.1** Stężenie kadmu (Cd) [mg/kg suchej masy] w ciele osobników dorosłych owelnicy lucernianki *S. vigintiquatuorpunctata* hodowanych na pędach nadziemnych lepnicy rozdętej *S. vulgaris*, pochodzących z trzech stanowisk, znajdujących się w różnych odległościach od nieczynnego emitera i poddanych krótkotrwałym okresom głodzenia.

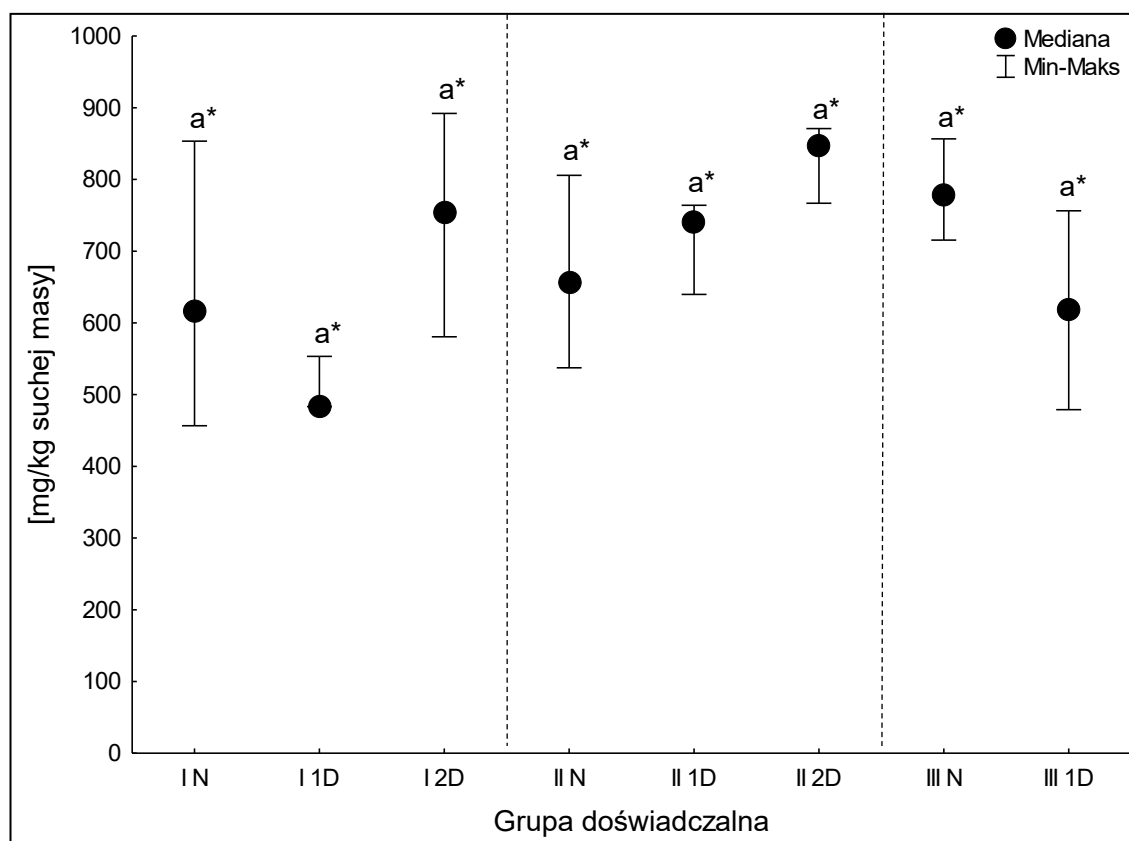
I, II, III – numer stanowiska

N – niegłodzone, 1D – 1-dniowy okres głodu, 2D – 2-dniowy okres głodu

a, b – różnice pomiędzy owadami w obrębie danego stanowiska

\*, # - różnice pomiędzy okresami głodzenia z różnych stanowisk

Analiza statystyczna: test nieparametryczny Kruskala-Wallisa,  $p < 0,05$ .



**Ryc. 2.2** Stężenie cynku (Zn) [mg/kg suchej masy] w ciele osobników dorosłych owężnicy lucernianki *S. vigintiquatuorpunctata* hodowanych na pędach nadziemnych lepnicy rozdętej *S. vulgaris*, pochodzących z trzech stanowisk, znajdujących się w różnych odległościach od nieczynnego emitera i poddanych krótkotrwałym okresom głodzenia

I, II, III – numer stanowiska

N – niegłodzone, 1D – 1-dniowy okres głodu, 2D – 2-dniowy okres głodu

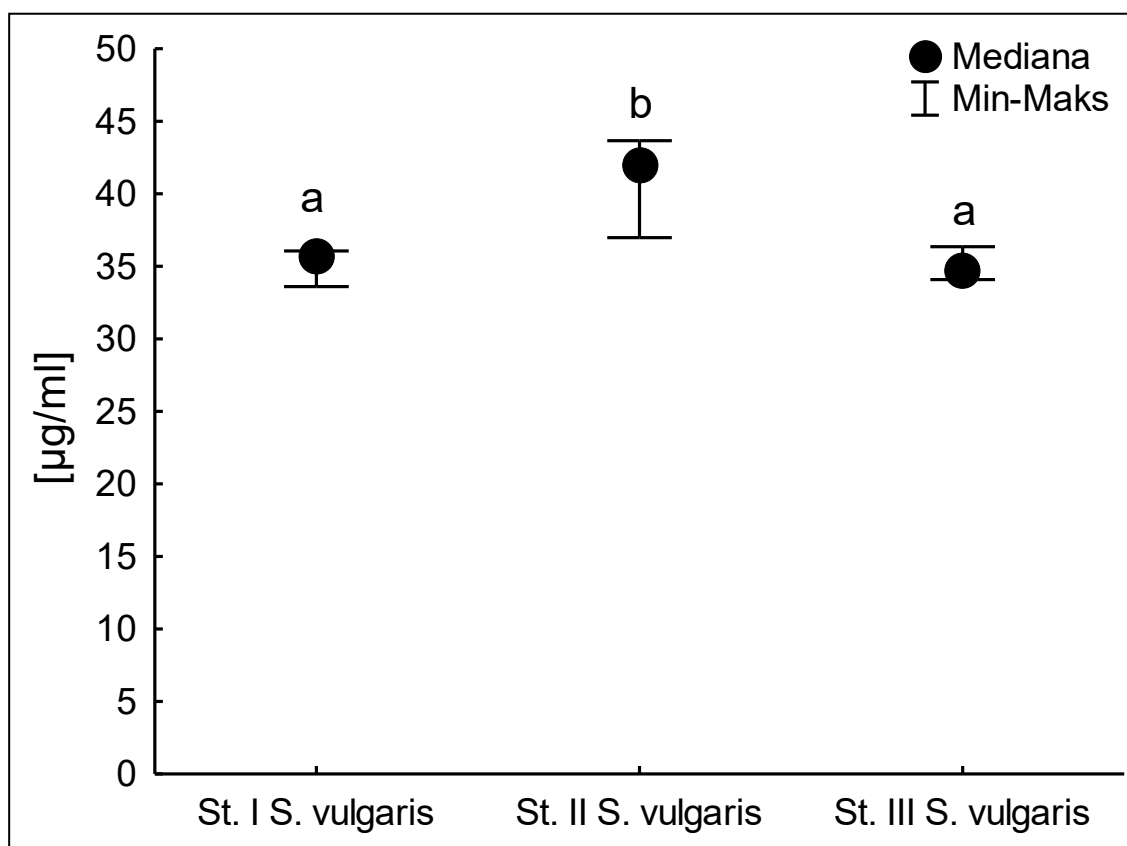
a, b – różnice pomiędzy owadami w obrębie danego stanowiska

\*, # - różnice pomiędzy okresami głodzenia z różnych stanowisk

Analiza statystyczna: test nieparametryczny Kruskala-Wallisa,  $p < 0,05$ .

**3. Stężenie flawonoidów całkowitych w pędach nadziemnych roślin: lucerny siewnej *M. sativa* oraz lepnicy rozdętej *S. vulgaris* zebranej z trzech różnych odległościach, oddalonych od nieczynnego emitera.**

W pędach nadziemnych lepnicy rozdętej *S. vulgaris* pochodzącej z drugiego stanowiska, odnotowano istotną statystycznie większą zawartość flawonoidów w porównaniu do tych roślin zebranych z pozostałych stanowisk. Natomiast u lucerny siewnej *M. sativa* hodowanej w laboratorium, zanotowano podobną zawartość flawonoidów, jak w przypadku lepnicy rozdętej *S. vulgaris* pochodzącej z pierwszego stanowiska (Ryc. 3.1).



**Ryc. 3.1** Stężenie flawonoidów całkowitych [µg/ml] w pędach nadziemnych lepnicy rozdętej *S. vulgaris* zebranej z trzech różnych odległościach, oddalonych od nieczynnego emitera.

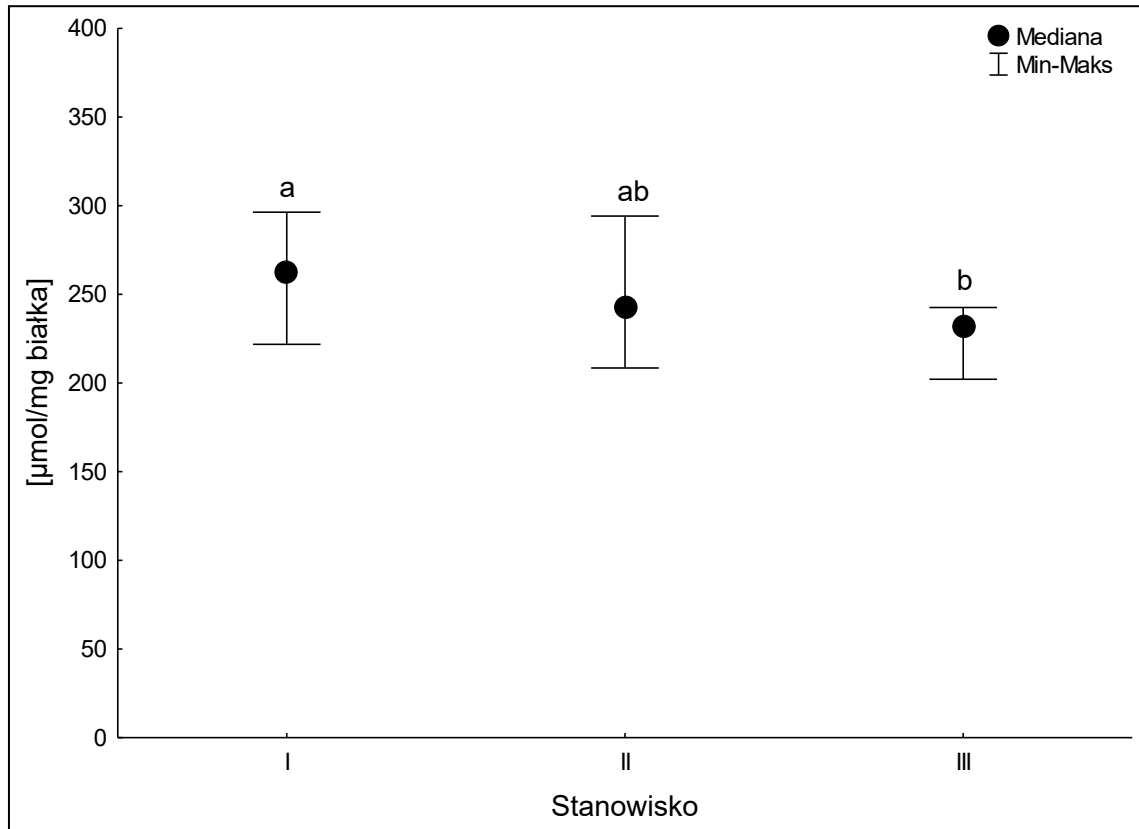
a, b – różnice pomiędzy różnymi roślinami

Analiza statystyczna: test nieparametryczny Kruskala-Wallisa,  $p < 0,05$ .



#### 4. Stężenie glutationu zredukowanego (GSH).

Stężenie glutationu zredukowanego (GSH) w ciele larw owężnicy lucernianki *S. vigintiquatuorpunctata* zebranych z pierwszego stanowiska, było istotnie wyższe niż w ciele larw pochodzących z trzeciego stanowiska (Ryc. 4.1).

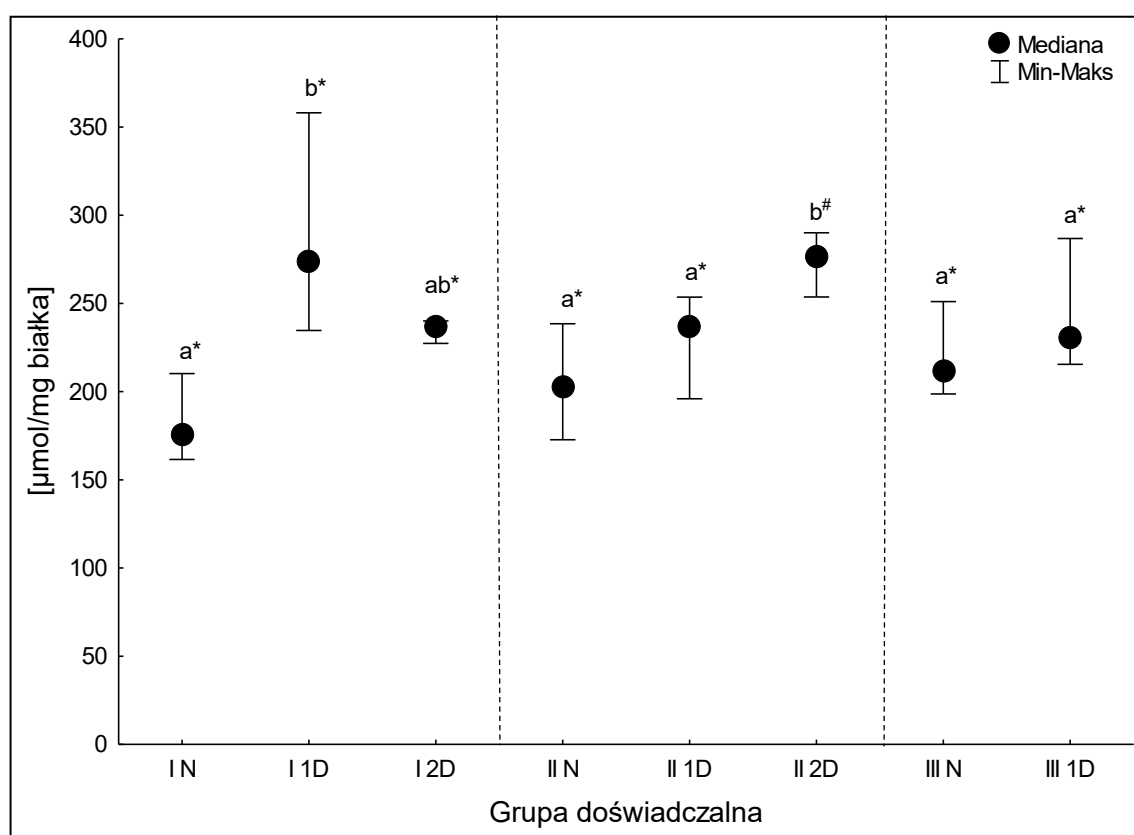


**Ryc. 4.1** Stężenie glutationu zredukowanego (GSH) [ $\mu\text{mol/mg}$  białka] w ciele larw owężnicy lucernianki *S. vigintiquatuorpunctata* z pochodzących z trzech stanowisk, znajdujących się w różnych odległościach od nieczynnego emitera i poddanych krótkotrwałym okresom głodzenia.

a, b – różnice pomiędzy larwami zebranymi z trzech stanowisk

Analiza statystyczna: test nieparametryczny Kruskala-Wallisa,  $p < 0,05$ .

Stężenie glutationu zredukowanego (GSH) w ciele osobników dorosłych owelnicy lucernianki *S. vigintiquatuorpunctata* hodowanych na pędach nadziemnych lepnicy rozdętej *S. vulgaris*, pochodzących ze stanowiska pierwszego, było istotnie wyższe w ciele biedronek głodzonych 1 dzień w porównaniu do tych niepoddanych okresowi głodu. Stężenie glutationu zredukowanego (GSH) w ciele osobników ze stanowiska drugiego było istotnie wyższe niż w ciele biedronek głodzonych przez dwa dni w porównaniu do niegłodzonych lub poddanych 1-dniowemu okresowi głodu. Natomiast stężenie GSH w ciele osobników głodzonych przez okres 2 dni z pierwszego stanowiska było istotnie niższe niż u osobników z drugiego stanowiska (Ryc. 4.2).



**Ryc. 4.2** Stężenie glutationu zredukowanego (GSH) [μmol/mg białka] w ciele osobników dorosłych owelnicy lucernianki *S. vigintiquatuorpunctata* hodowanych na pędach nadziemnych lepnicy rozdętej *S. vulgaris*, pochodzących z trzech stanowisk, znajdujących się w różnych odległościach od nieczynnego emitery i poddanych krótkotrwałym okresom głodzenia.

I, II, III – numer stanowiska

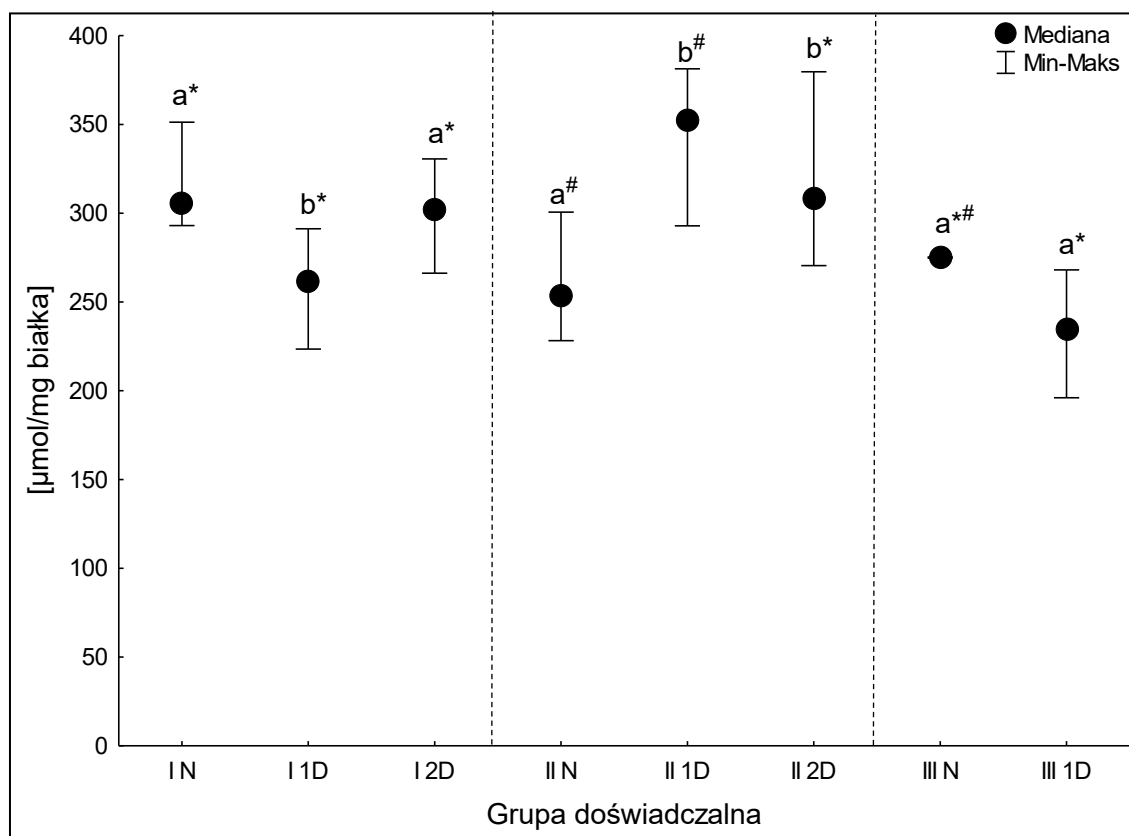
N – niegłodzone, 1D – 1-dniowy okres głodu, 2D – 2-dniowy okres głodu

a, b – różnice pomiędzy owadami w obrębie danego stanowiska

\*, # - różnice pomiędzy okresami głodzenia z różnych stanowisk

Analiza statystyczna: test nieparametryczny Kruskala-Wallisa,  $p < 0,05$ .

Stężenie glutationu zredukowanego (GSH) w ciele osobników dorosłych owężnicy lucernianki *S. vigintiquatuorpuntata* hodowanych na pędach nadziemnych lucerny siewnej *M. sativa*, pochodzących z pierwszego stanowiska, było istotnie wyższe w ciele osobników niegłodzonych lub poddanych 2-dniowemu okresowi głodzenia w porównaniu do tych poddanych 1-dniowemu okresowi głodzenia. Natomiast stężenie GSH w ciele wszystkich osobników głodzonych z drugiego stanowiska, było istotnie wyższe od niepoddanych głodzeniu. Stężenie GSH w ciele osobników niegłodzonych z pierwszego stanowiska, było istotnie wyższe w porównaniu do osobników z drugiego stanowiska. Poza tym stężenie GSH w ciele osobników pochodzących z drugiego stanowiska, poddanych 1-dniowemu okresowi głodzenia, było istotnie wyższe niż w ciele osobników pochodzących z pierwszego i trzeciego stanowiska po takim samym okresie głodzenia (Ryc. 4.3).



**Ryc. 4.3** Stężenie glutationu zredukowanego (GSH) [ $\mu\text{mol/mg}$  białka] w ciele osobników dorosłych owelnicy lucernianki *S. vigintiquatuorpunctata* hodowanych na pędach nadziemnych lucernie siewnej *M. sativa*, pochodzących z trzech stanowisk, znajdujących się w różnych odległościach od nieczynnego emitera i poddanych krótkotrwałym okresom głodzenia.

I, II, III – numer powierzchni

N – niegłodzone, 1D – 1-dniowy okres głodu, 2D – 2-dniowy okres głodu

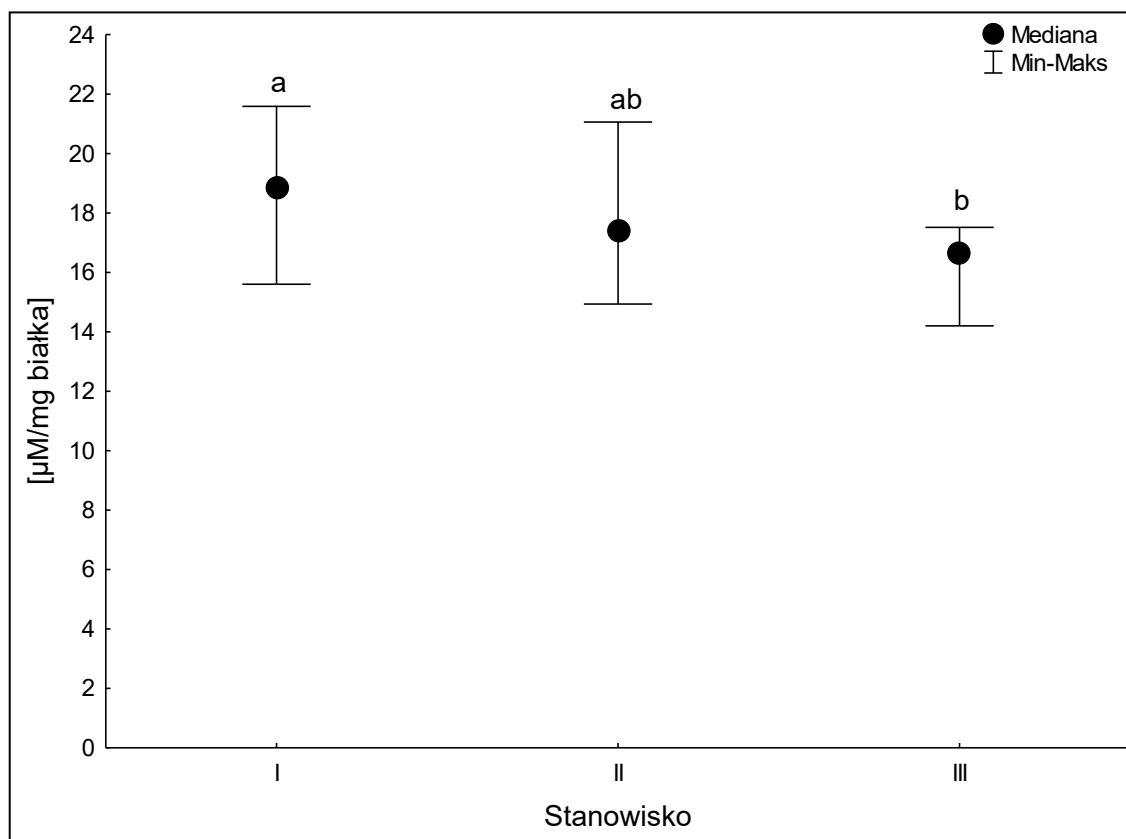
a, b – różnice pomiędzy owadami w obrębie danego stanowiska

\*, # - różnice pomiędzy okresami głodzenia z różnych stanowisk

Analiza statystyczna: test nieparametryczny Kruskala-Wallisa,  $p < 0,05$ .

## 5. Poziom całkowitej pojemności antyoksydacyjnej (TAC).

Poziom całkowitej pojemności antyoksydacyjnej (TAC) w ciele larw owelnicy lucernianki *S. vigintiquatuorpunctata* pochodzących z pierwszego stanowiska był istotnie wyższy w porównaniu z osobnikami pochodzącymi z trzeciego stanowiska (Ryc. 5.1).

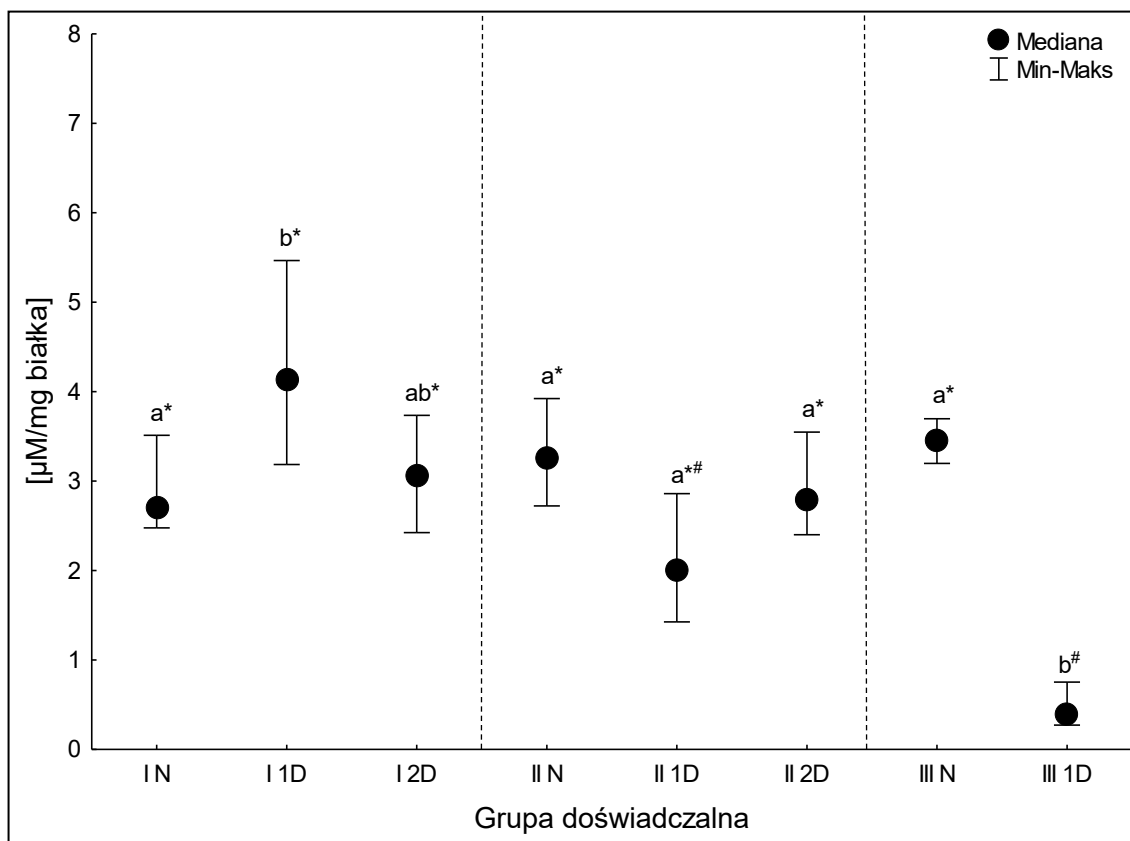


**Ryc. 5.1** Poziom całkowitej pojemności antyoksydacyjnej (TAC) [μM/mg białka] w ciele larw owelnicy lucernianki *S. vigintiquatuorpunctata* pochodzących z trzech stanowisk, znajdujących się w różnych odległościach od nieczynnego emitera.

a, b – różnice pomiędzy larwami zebranymi z trzech stanowisk

Analiza statystyczna: test nieparametryczny Kruskala-Wallisa,  $p < 0,05$ .

Poziom całkowitej pojemności antyoksydacyjnej (TAC) w ciele osobników dorosłych owężnicy lucernianki *S. vigintiquatuorpunctata* hodowanych na pędach nadziemnych lepnicy rozdętej *S. vulgaris*, pochodzących z pierwszego stanowiska, był istotnie wyższy po 1-dniowym okresie głodu w porównaniu mierzonym u osobników niegłodzonych. Natomiast poziom całkowitej pojemności antyoksydacyjnej (TAC) w ciele osobników pochodzących z trzeciego stanowiska był istotnie większy u niepoddanych głodzeniu w porównaniu z poddanymi 1-dniowemu okresowi głodu. Zaobserwowano również, że poziom TAC w ciele osobników po 1-dniowym okresie głodu był istotnie większy od mierzonego u tych pochodzących z pierwszego stanowiska w porównaniu z osobnikami z trzeciego stanowiska (Ryc. 5.2).



**Ryc. 5.2** Poziom całkowitej pojemności antyoksydacyjnej (TAC) [ $\mu\text{M}/\text{mg}$  białka] w ciele osobników dorosłych owelnicy lucernianki *S. viginquatuorpunctata* hodowanych na pędach nadziemnych lepnicy rozdętej *S. vulgaris*, pochodzących z trzech stanowisk, znajdujących się w różnych odległościach od nieczynnego emitera i poddanych krótkotrwałym okresom głodzenia.

I, II, III – numer stanowiska

N – niegłodzone, 1D – 1-dniowy okres głodu, 2D – 2-dniowy okres głodu

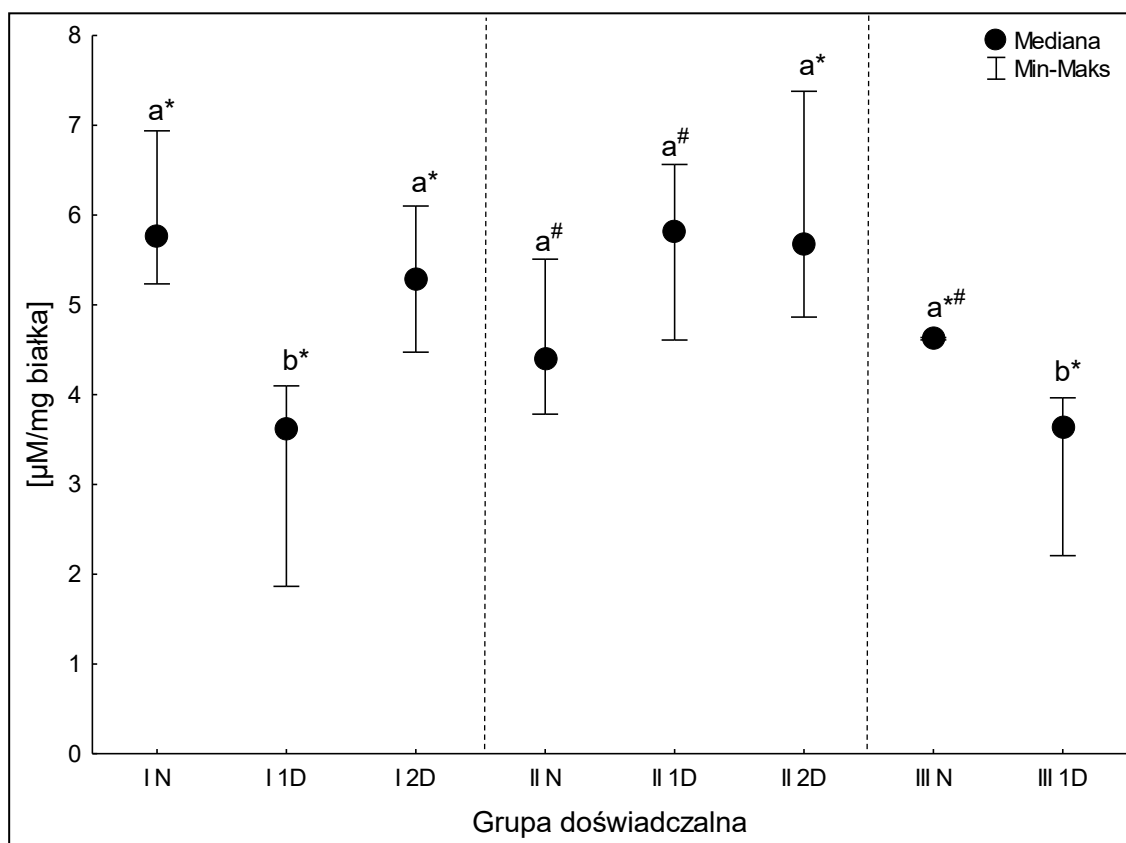
a, b – różnice pomiędzy owadami z danego stanowiska

\*, # - różnice pomiędzy okresami głodzenia z różnych stanowisk

Analiza statystyczna: test nieparametryczny Kruskala-Wallisa,  $p < 0,05$ .

Poziom całkowitej pojemności antyoksydacyjnej (TAC) w ciele osobników dorosłych owężnicy lucernianki *S. vigintiquatuorpunctata* hodowanych na pędach nadziemnych lucerny siewnej *M. sativa*, pochodzących z pierwszego stanowiska był istotnie niższy u głodzonych 1 dzień w porównaniu z niegłodzonymi lub poddanymi 2-dniowemu okresowi głodu. Oprócz tego poziom TAC w ciele osobników niegłodzonych, pochodzących z trzeciego stanowiska był wyższy w porównaniu z osobnikami poddanymi 1-dniowemu okresowi głodu. Poza tym poziom TAC w ciele osobników niegłodzonych z pierwszego stanowiska był istotnie wyższy od mierzonego u tych pochodzących z drugiego stanowiska. Oprócz tego poziom TAC w ciele osobników głodzonych przez 1 dzień, pochodzących z drugiego stanowiska, był istotnie wyższy od ustalonego dla osobników pochodzących z pierwszego i trzeciego stanowiska (Ryc. 5.3).





**Ryc. 5.3** Poziom całkowitej pojemności antyoksydacyjnej (TAC) [ $\mu\text{M}/\text{mg}$  białka] w ciele osobników dorosłych owelnicy lucernianki *S. viginquatuorpunctata* hodowanych na pędach nadziemnych lucerny siewnej *M. sativa*, pochodzących z trzech stanowisk, znajdujących się w różnych odległościach od nieczynnego emitera i poddanych krótkotrwałym okresom głodzenia.

I, II, III – numer stanowiska

N – niegłodzone, 1D – 1-dniowy okres głodu, 2D – 2-dniowy okres głodu

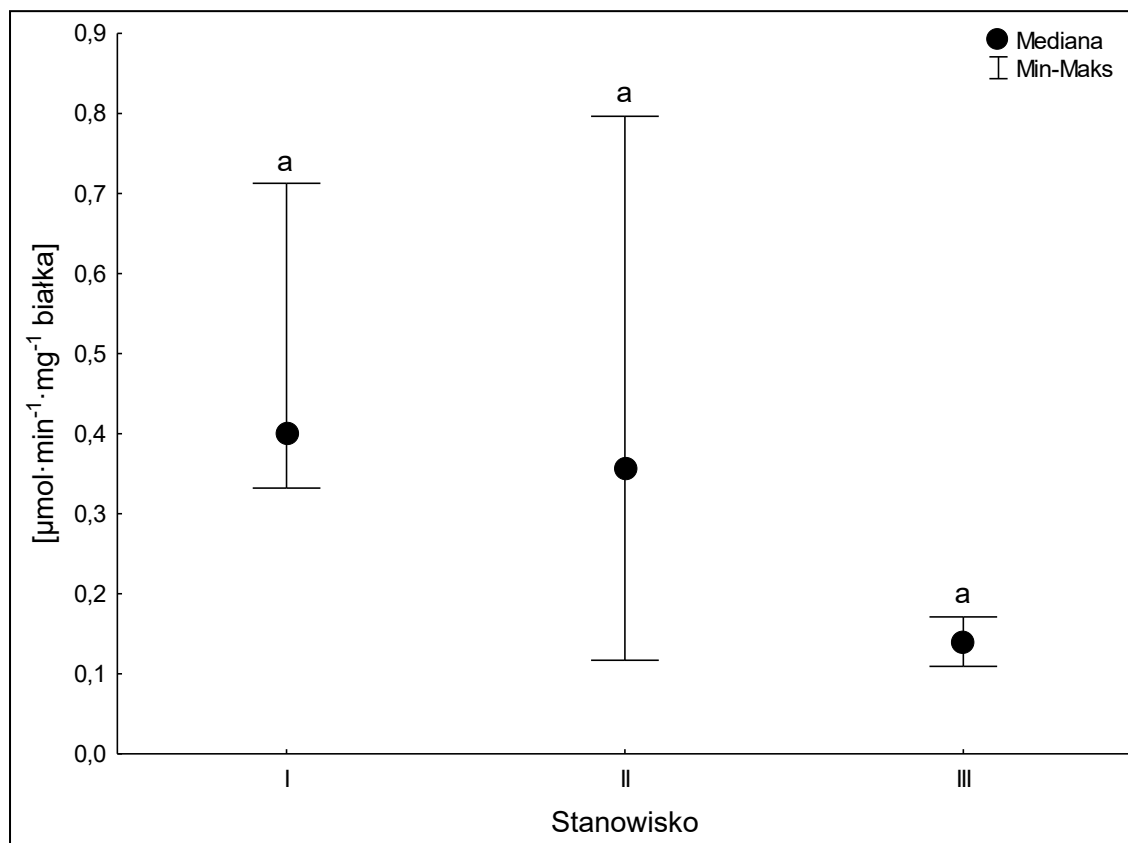
a, b – różnice pomiędzy owadami z danego stanowiska

\*, # - różnice pomiędzy okresami głodzenia z różnych stanowisk

Analiza statystyczna: test nieparametryczny Kruskala-Wallisa,  $p < 0,05$ .

## 6. Aktywność S-transferazy glutationowej (GST).

Larwy owężnicy lucernianki *S. vigintiquatuorpunctata*, pochodzące z trzech różnych stanowisk, cechowała podobna aktywność S-transferazy glutationowej (GST) (Ryc. 6.1).

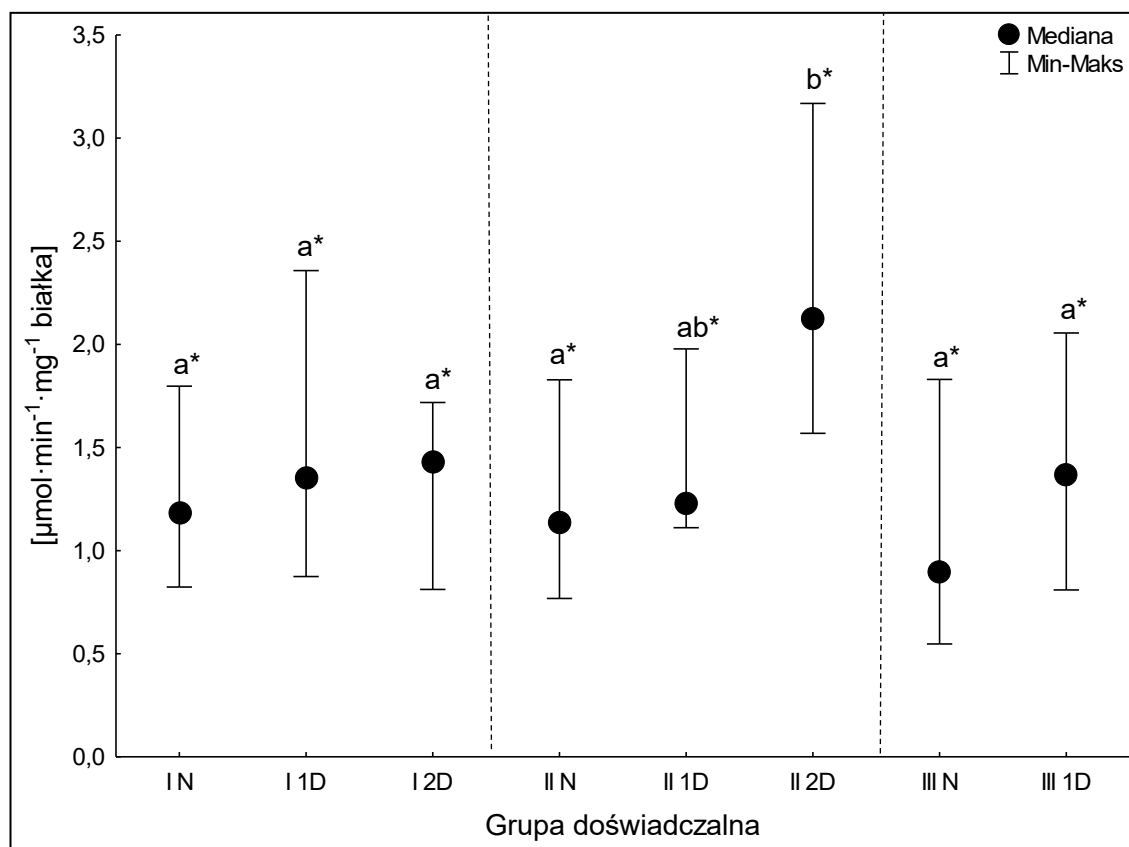


**Ryc. 6.1** Aktywność S-transferazy glutationowej (GST) [ $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$  białka] w ciele larw owężnicy lucernianki *S. vigintiquatuorpunctata* pochodzących z trzech stanowisk, znajdujących się w różnych odległościach od nieczynnego emitera.

a, b – różnice pomiędzy larwami zebranymi z trzech stanowisk

Analiza statystyczna: test nieparametryczny Kruskala-Wallisa,  $p < 0,05$ .

Aktywność S-transferazy glutationowej (GST) zmierzona w ciele osobników dorosłych owelnicy lucernianki *S. vigintiquatuorpunctata* hodowanych na pędach nadziemnych lepnicy rozdętej *S. vulgaris*, pochodzących ze stanowiska drugiego poddanych 2-dniowemu okresowi głodu, była istotnie wyższa w porównaniu do ustaloną dla osobników niegłodzonych (Ryc. 6.2.).



**Ryc. 6.2** Aktywność S-transferazy glutationowej (GST) [ $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$  białka] w ciele osobników dorosłych owelnicy lucernianki *S. vigintiquatuorpunctata* hodowanych na pędach nadziemnych lepnicy rozdętej *S. vulgaris*, pochodzących z trzech stanowisk, znajdujących się w różnych odległościach od nieczynnego emitera i poddanych krótkotrwałym okresom głodzenia I, II, III – numer stanowiska

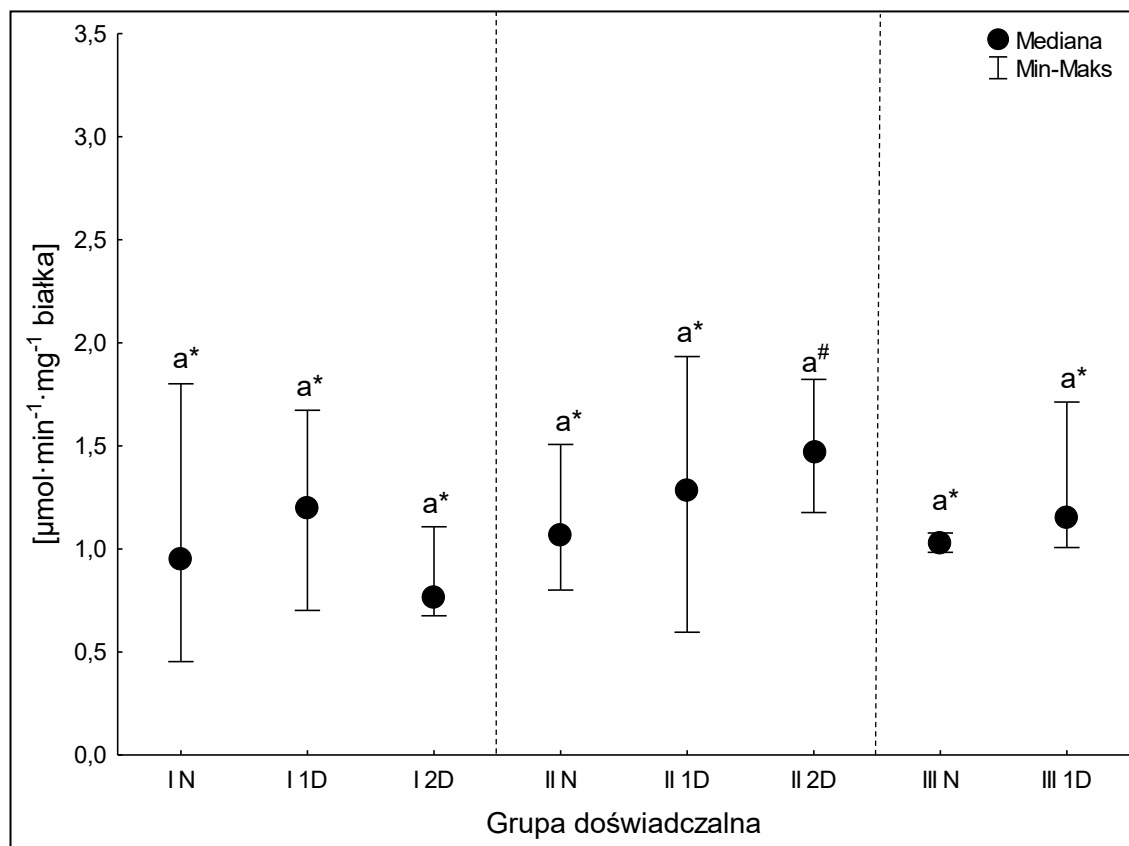
N – niegłodzone, 1D – 1-dniowy okres głodu, 2D – 2-dniowy okres głodu

a, b – różnice pomiędzy owadami z danego stanowiska

\*, # – różnice pomiędzy okresami głodzenia z różnych stanowisk

Analiza statystyczna: test nieparametryczny Kruskala-Wallisa,  $p < 0,05$ .

Aktywność S-transferazy glutationowej (GST) w ciele osobników dorosłych owelnicy lucernianki *S. vigintiquatuorpunctata* hodowanych na pędach nadziemnych lucerny siewnej *M. sativa*, poddanych 2-dniowemu okresowi głodu, była istotnie wyższa dla osobników pochodzących z drugiego stanowiska w porównaniu tymi z pierwszego stanowiska (Ryc. 6.3).



**Ryc. 6.3** Aktywność S-transferazy glutationowej (GST) [ $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$  białka] w ciele osobników dorosłych owelnicy lucernianki *S. vigintiquatuorpunctata* hodowanych na pędach nadziemnych lucerny siewnej *M. sativa*, pochodzących z trzech stanowisk, znajdujących się w różnych odległościach od nieczynnego emitera i poddanych krótkotrwałym okresom głodzenia.

I, II, III – numer stanowiska

N – niegłodzone, 1D – 1-dniowy okres głodu, 2D – 2-dniowy okres głodu

a, b – różnice pomiędzy owadami z danego stanowiska

\*, # - różnice pomiędzy okresami głodzenia z różnych stanowisk

Analiza statystyczna: test nieparametryczny Kruskala-Wallisa,  $p < 0,05$ .

## 7. Badanie in vitro GST w obecności wybranych inhibitorów.

W przypadku niegłodzonych jak i głodzonych jeden dzień biedronek wyznaczona inhibicja GST z udziałem kwercetyny, oraz azotanów kadmu i cynku była wyższa dla osobników ze stanowiska pierwszego niż dla osobników ze stanowiska drugiego (Tab 7.1 i 7.2).

|                                   | Grupa doświadczalna                       |             |                                           |             |
|-----------------------------------|-------------------------------------------|-------------|-------------------------------------------|-------------|
|                                   | I N                                       |             | I 1D                                      |             |
|                                   | średnia±SD<br>[μM konjugatów<br>CDNB/min] | % inhibicji | średnia±SD<br>[μM konjugatów<br>CDNB/min] | % inhibicji |
| Bez dodatku                       | 80±9                                      | –           | 117±17                                    | –           |
| Dodatek 4g/L<br>kwercetyny        | 27±16                                     | 33          | 34±9                                      | 30          |
| Dodatek 4g/L<br>CdNO <sub>3</sub> | 44±16                                     | 55          | 59±12                                     | 50          |
| Dodatek 4g/L<br>ZnNO <sub>3</sub> | 63±2                                      | 79          | 72±17                                     | 62          |

**Tabela 7.1** Aktywność resztkowa GST związków kwercetyny, cynku i kadmu, wyznaczona w stosunku do pomiaru bez dodatku w ciele osobników dorosłych owelnicy lucernianki *S. viginquatuorpunctata* hodowanych na pędach nadziemnych lucerny siewnej *M. sativa*, pochodzących z pierwszego stanowiska i poddanych krótkotrwałemu okresowi głodzenia.

% inhibicji – (aktywność resztkowa /aktywność bez inhibitora) x 100

I, II – numer stanowiska

N – niegłodzone, 1D – 1-dniowy okres głodu

|                                   | Grupa doświadczalna                       |             |                                           |             |
|-----------------------------------|-------------------------------------------|-------------|-------------------------------------------|-------------|
|                                   | II N                                      |             | II 1D                                     |             |
|                                   | średnia±SD<br>[μM konjugatów<br>CDNB/min] | % inhibicji | średnia±SD<br>[μM konjugatów<br>CDNB/min] | % inhibicji |
| Bez dodatku                       | 53±6                                      | –           | 87±4                                      | –           |
| Dodatek 4g/L<br>kwercetyny        | 24±9                                      | 45          | 32±10                                     | 37          |
| Dodatek 4g/L<br>CdNO <sub>3</sub> | 42±14                                     | 79          | 46±14                                     | 53          |
| Dodatek 4g/L<br>ZnNO <sub>3</sub> | 51±13                                     | 96          | 61±14                                     | 70          |

**Tabela 7.2** Aktywność resztkowa GST związków kwercetyny, cynku i kadmu, wyznaczona w stosunku do pomiaru bez dodatku w ciele osobników dorosłych owelnicy lucernianki *S. viginquatuorpunctata* hodowanych na pędach nadziemnych lucerny siewnej *M. sativa*, pochodzących z drugiego stanowiska i poddanych krótkotrwałemu okresowi głodzenia.

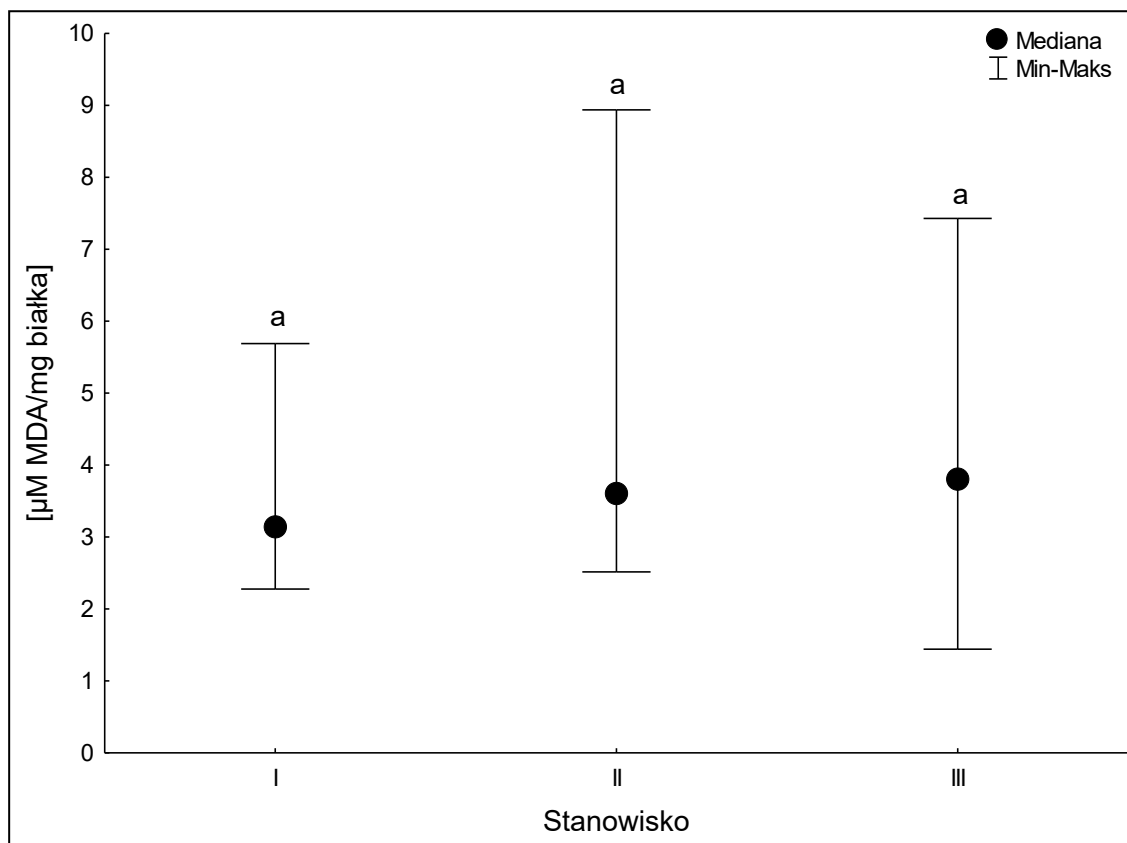
% inhibicji – (aktywność resztkowa /aktywność bez inhibitora) x 100

I, II – numer stanowiska

N – niegłodzone, 1D – 1-dniowy okres głodu

## 8. Stężenie dialdehydu malonowego (MDA) – produktu peroksydacji lipidów.

W przypadku larw owężnicy lucernianki *S. vigintiquatuorpunctata* pochodzących z trzech różnych stanowisk, nie zaobserwowano różnic istotnych statystycznie w stężeniu dialdehydu malonowego (MDA) – produktu peroksydacji lipidów (Ryc. 8.1).

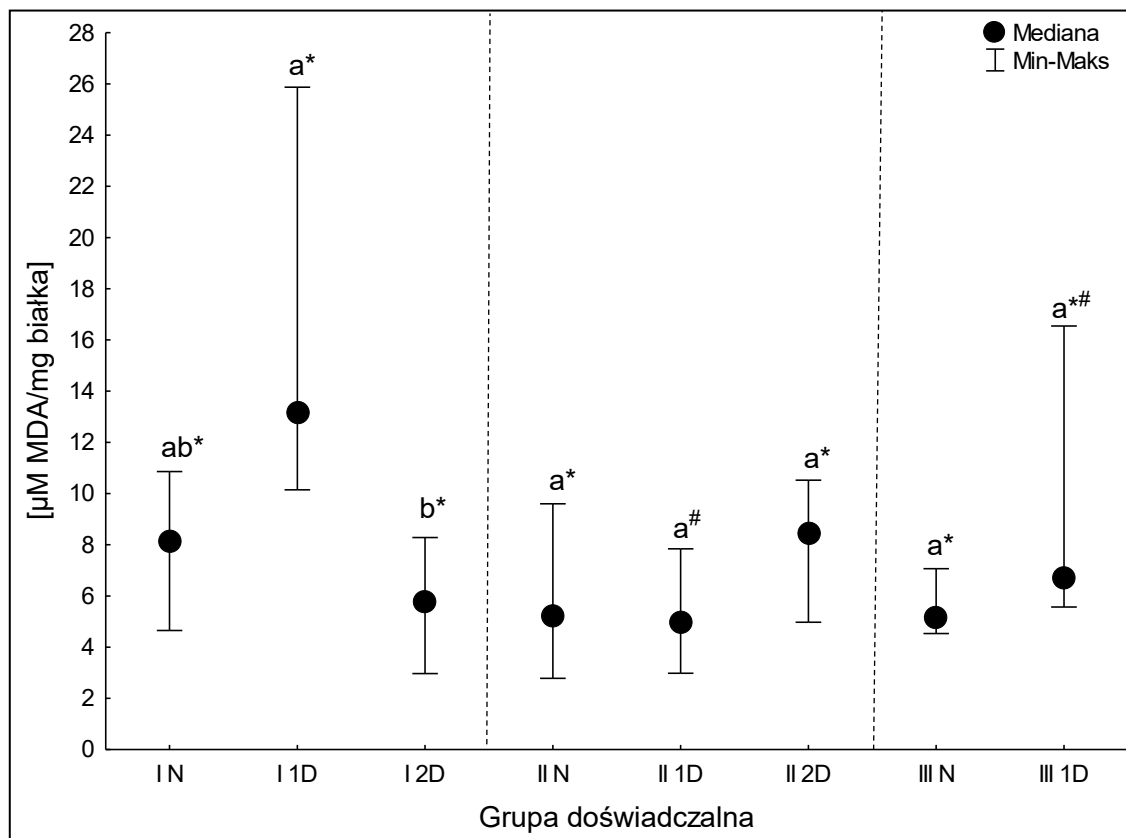


**Ryc. 8.1** Stężenie dialdehydu malonowego (MDA) – produktu peroksydacji lipidów [ $\mu\text{M}$  MDA/mg białka] w ciele larw owężnicy lucernianki *S. vigintiquatuorpunctata* pochodzących z trzech stanowisk, znajdujących się w różnych odległościach od nieczynnego emitera.

a, b – różnice pomiędzy larwami zebranymi z trzech stanowisk

Analiza statystyczna: test nieparametryczny Kruskala-Wallisa,  $p < 0,05$ .

Stężenie dialdehydu malonowego (MDA) w ciele osobników dorosłych owężnicy lucernianki *S. vigintiquatuorpunctata* hodowanych na pędach nadziemnych lepnicy rozdętej *S. vulgaris*, pochodzących z pierwszego stanowiska, było istotnie wyższe w przypadku osobników poddanych 1-dniowemu okresowi głodu niż tych po 2-dniowym okresie głodu. Zaobserwowano również w przypadku osobników po 1-dniowym okresie głodu, istotnie wyższe stężenie MDA w przypadku osobników pochodzących z pierwszego stanowiska w porównaniu z drugim (Ryc. 8.2).



**Ryc. 8.2** Stężenie dialdehydu malonowego (MDA) – produktu peroksydacji lipidów [ $\mu\text{M}$  MDA/mg białka] w ciele osobników dorosłych owężnicy lucernianki *S. vigintiquatuorpunctata* hodowanych na pędach nadziemnych lepnicy rozdętej *S. vulgaris*, pochodzących z trzech stanowisk, znajdujących się w różnych odległościach od nieczynnego emitera i poddanych krótkotrwałym okresom głodzenia.

I, II, III – numer stanowiska

N – niegłodzone, 1D – 1-dniowy okres głodu, 2D – 2-dniowy okres głodu

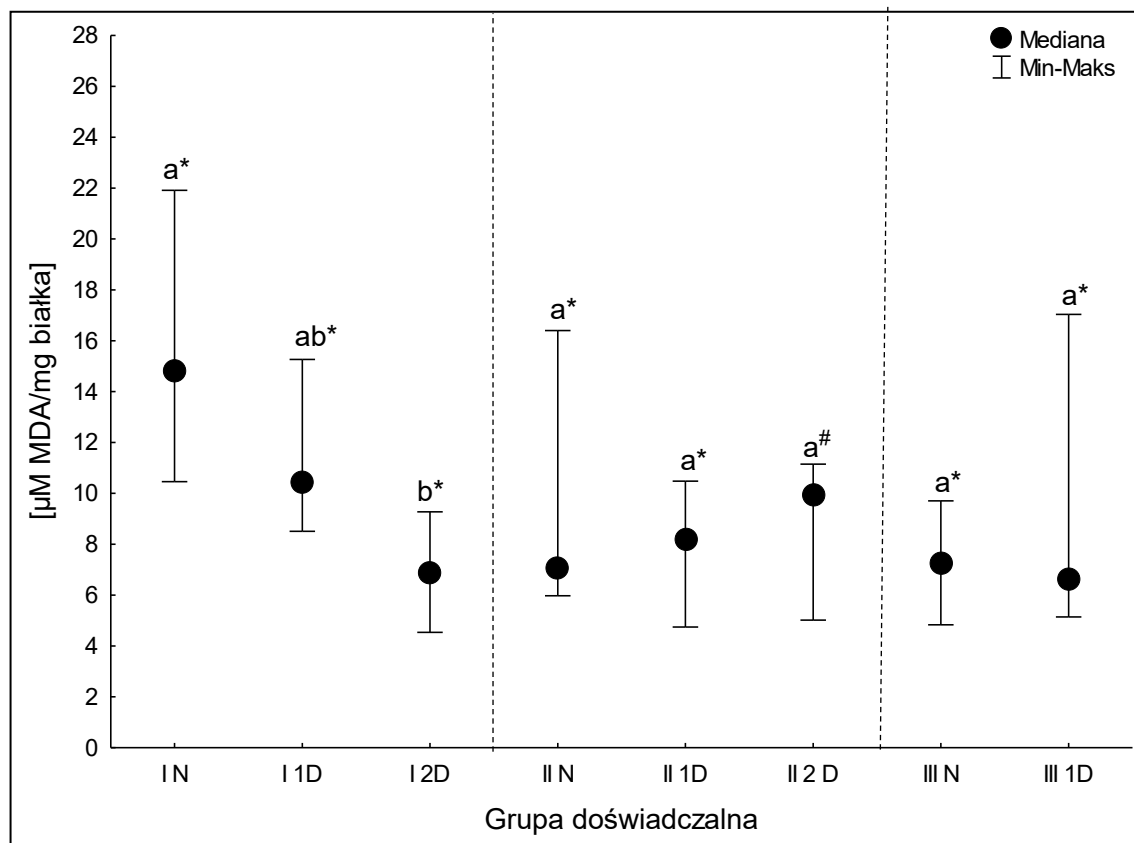
a, b – różnice pomiędzy owadami z danego stanowiska

\*, # - różnice pomiędzy okresami głodzenia z różnych stanowisk

Analiza statystyczna: test nieparametryczny Kruskala-Wallisa,  $p < 0,05$ .



Stężenie MDA mierzone w ciele osobników dorosłych owężnicy lucernianki *S. vigintiquatuorpunctata* hodowanych na pędach nadziemnych lucerny siewnej *M. sativa*, pochodzących z pierwszego stanowiska, było istotnie wyższe u niegłodzonych osobników w porównaniu z osobnikami poddanymi 2-dniowemu okresowi głodu. Oprócz tego w ciele osobników po 2-dniowym okresie głodu z pierwszego stanowiska, zmierzono istotnie niższe stężenie MDA niż u pochodzących ze stanowiska drugiego (Ryc. 8.3).



**Ryc. 8.3** Stężenie dialdehydu malonowego (MDA) – produktu peroksydacji lipidów [µM MDA/mg białka] w ciele osobników dorosłych owężnicy lucernianki *S. vigintiquatuorpunctata* hodowanych na pędach nadziemnych lucerny siewnej *M. sativa*, pochodzących z trzech stanowisk, znajdujących się w różnych odległościach od nieczynnego emitery i poddanych krótkotrwałym okresom głodzenia.

I, II, III – numer stanowiska

N – niegłodzone, 1D – 1-dniowy okres głodu, 2D – 2-dniowy okres głodu

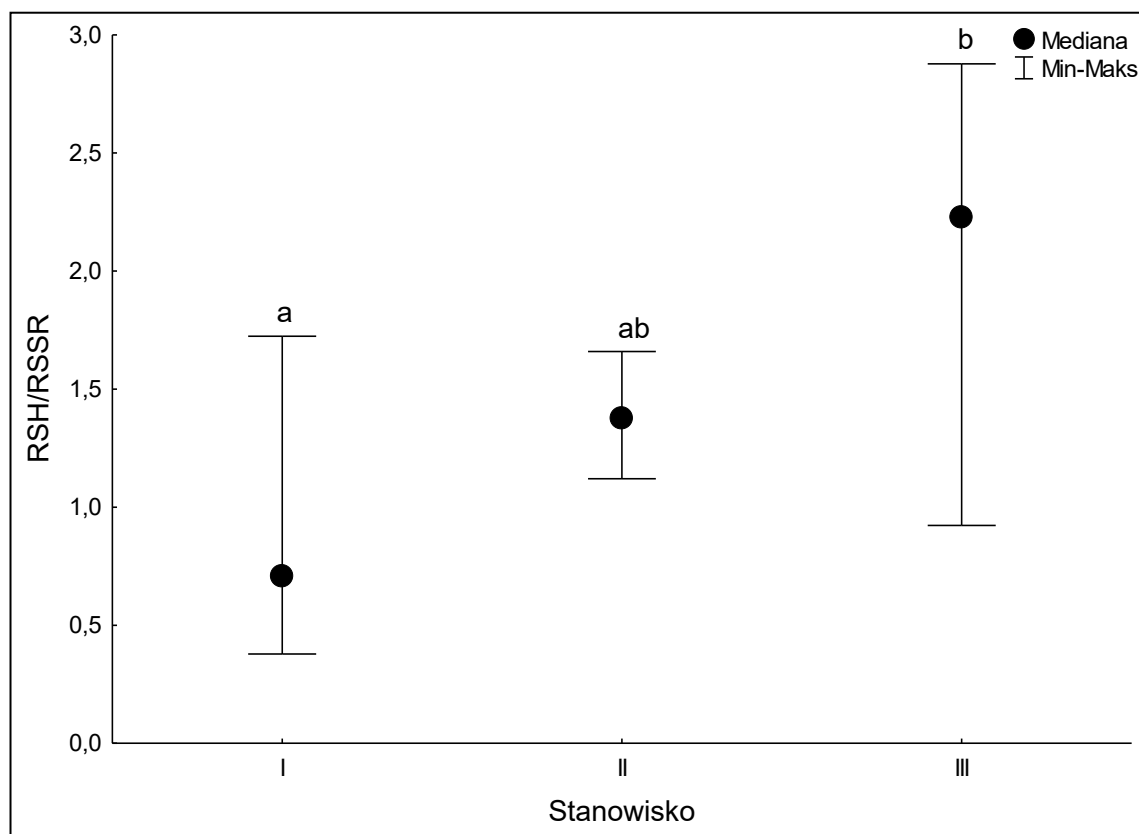
a, b – różnice pomiędzy owadami z danego stanowiska

\*,<sup>#</sup> - różnice pomiędzy okresami głodzenia z różnych stanowisk

Analiza statystyczna: test nieparametryczny Kruskala-Wallisa,  $p < 0,05$ .

### 9. Proporcja tioli zredukowanych do utlenionych (RSH/RSSR).

Proporcja RSH do RSSR wyznaczona dla larw owelnicy lucernianki *S. vigintiquatuorpunctata* pochodzących z trzeciego stanowiska, była istotnie wyższa niż dla larw ze stanowiska pierwszego (Ryc 9.1).

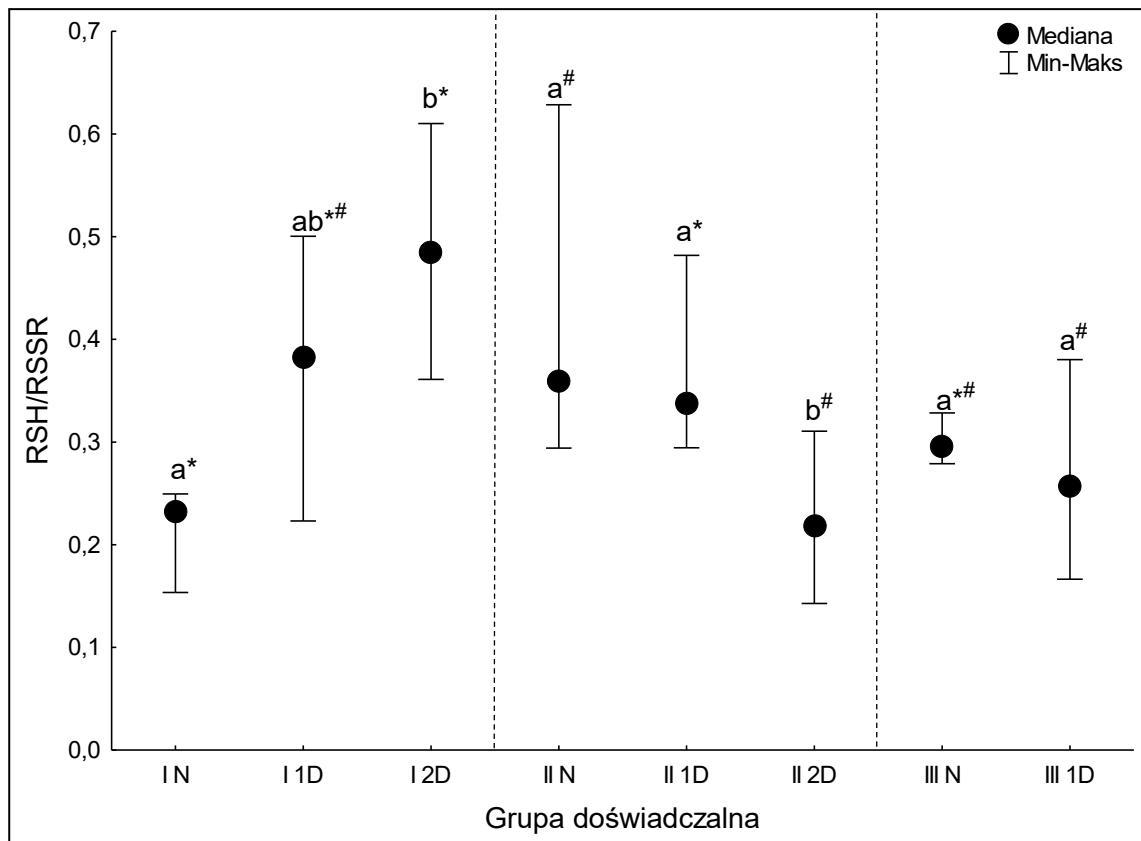


**Ryc. 9.1** Proporcja tioli zredukowanych do utlenionych (RSH/RSSR) w ciele larw owelnicy lucernianki *S. vigintiquatuorpunctata* pochodzących z trzech stanowisk, znajdujących się w różnych odległościach od nieczynnego emitera.

a, b – różnice pomiędzy larwami zebranymi z trzech stanowisk

Analiza statystyczna: test nieparametryczny Kruskala-Wallisa,  $p < 0,05$ .

Proporcja RSH do RSSR wyznaczona dla osobników dorosłych owężnicy lucernianki *S. vigintiquatuorpunctata* hodowanych na pędach nadziemnych lepnicy rozdętej *S. vulgaris*, pochodzących z pierwszego stanowiska, była istotnie niższa dla osobników niegłodzonych w porównaniu z osobnikami głodzonymi przez 2 dni. Stosunek tioli zredukowanych do utlenionych w ciele osobników ze stanowiska drugiego zarówno niegłodzonych jak i poddanych 1-dniowemu okresu głodu, był istotnie większy w porównaniu do osobników głodzonych przez 2 dni. Z kolei biorąc po uwagę okres głodzenia, to w ciele osobników niegłodzonych, istotnie wyższą proporcję RSH do RSSR odnotowano w ciele osobników pochodzących ze stanowiska drugiego, niż u tych ze stanowiskiem pierwszym. Podobna zależność była wyznaczona dla osobników głodzonych przez 1 dzień ze stanowiska drugiego w porównaniu z tymi z trzeciego stanowiska, oraz dla osobników głodzonych przez 2 dni – ze stanowiska pierwszego w porównaniu z tymi ze stanowiskiem drugim (Ryc. 9.2).



**Ryc. 9.2** Proporcja tioli zredukowanych do utlenionych (RSH/RSSR) w ciele osobników dorosłych owelnicy lucernianki *S. vigintiquatuorpunctata* hodowanych na pędach nadziemnych lepnicy rozdętej *S. vulgaris*, pochodzących z trzech stanowisk, znajdujących się w różnych odległościach od nieczynnego emitera i poddanych krótkotrwałym okresom głodzenia.

I, II, III – numer stanowiska

N – niegłodzone, 1D – 1-dniowy okres głodu, 2D – 2-dniowy okres głodu

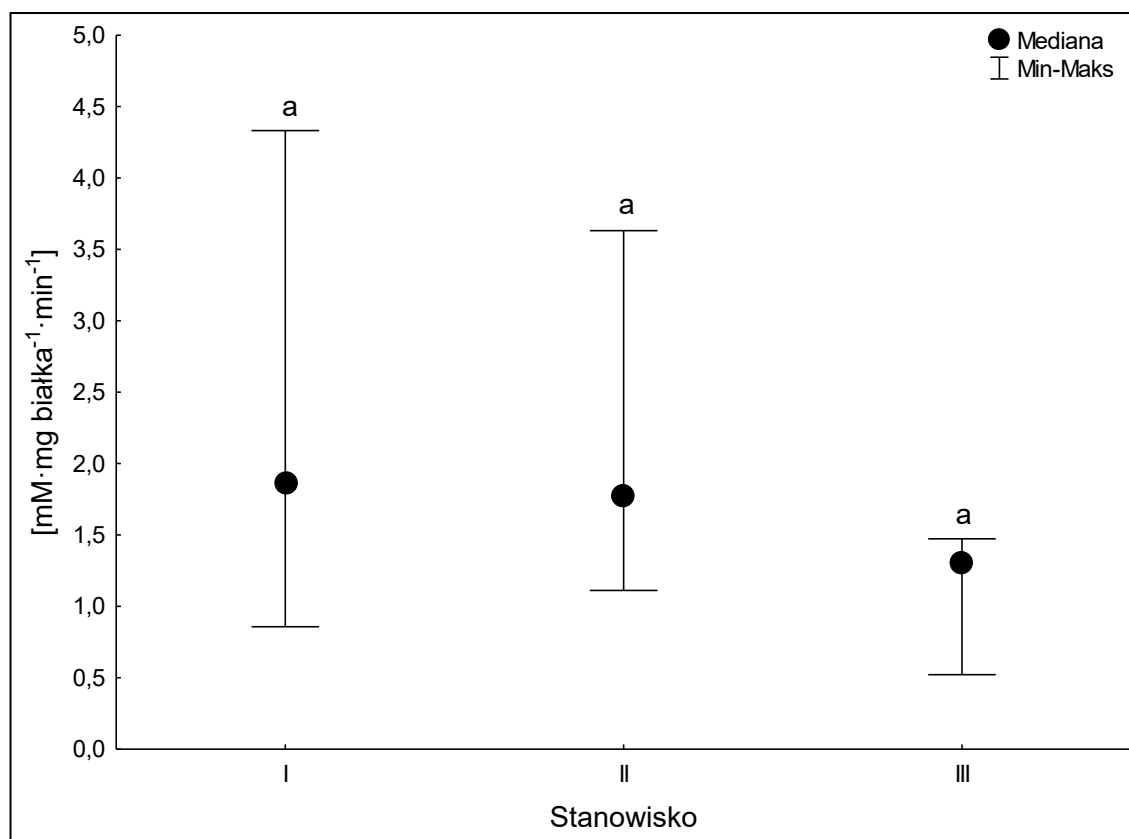
a, b – różnice pomiędzy owadami z danego stanowiska

\*, # - różnice pomiędzy okresami głodzenia z różnych stanowisk

Analiza statystyczna: test nieparametryczny Kruskala-Wallisa,  $p < 0,05$ .

## 10. Aktywność $\gamma$ -glutamylotraspeptydazy (GGT).

W ciele larw owelnicy lucernianki *S. vigintiquatuorpunctata* pochodzących z trzech różnych stanowisk, nie zaobserwowano różnic istotnych statystycznie w aktywności  $\gamma$ -glutamylotraspeptydazy (GGT) (Ryc. 10.1).



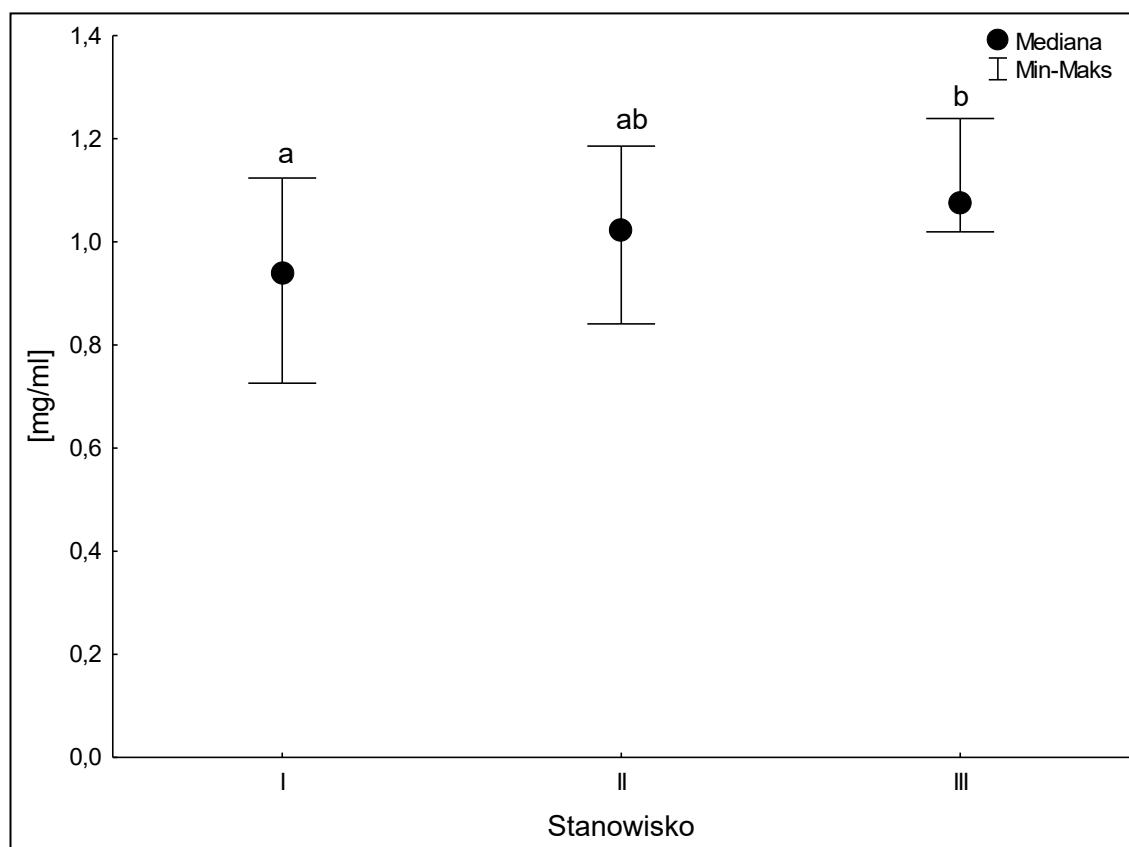
**Ryc. 10.1** Aktywność enzymu  $\gamma$ -glutamylotraspeptydazy (GGT) [mM·mg białka<sup>-1</sup>·min<sup>-1</sup>] w ciele larw owelnicy lucernianki *S. vigintiquatuorpunctata* pochodzących z trzech stanowisk, znajdujących się w różnych odległościach od nieczynnego emitera.

a, b – różnice pomiędzy larwami zebranymi z trzech stanowisk

Analiza statystyczna: test nieparametryczny Kruskala-Wallisa,  $p < 0,05$ .

## 11. Stężenie białka całkowitego.

Stężenie białka całkowitego w ciele larw owężnicy lucernianki *S. vigintiquatuorpunctata* pochodzących z trzeciego stanowiska, było istotnie wyższe w porównaniu w ciele larw zebranych ze stanowiska pierwszego (Ryc. 11.1).

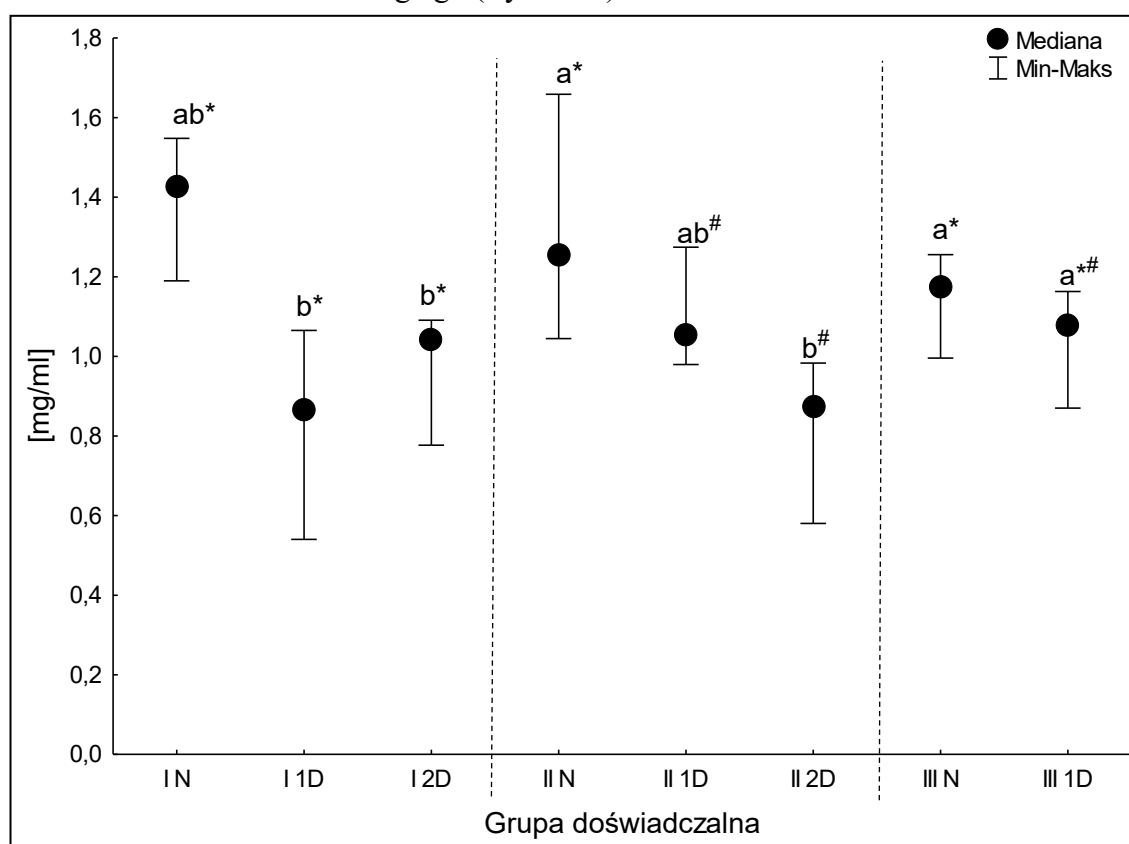


**Ryc. 11.1** Stężenie białka całkowitego [mg/ml] w ciele larw owężnicy lucernianki *S. vigintiquatuorpunctata* pochodzących z trzech stanowisk, znajdujących się w różnych odległościach od nieczynnego emitera.

a, b – różnice pomiędzy larwami zebranymi z trzech stanowisk

Analiza statystyczna: test nieparametryczny Kruskala-Wallisa,  $p < 0,05$ .

Stężenie białka całkowitego w ciele osobników dorosłych owelnicy lucernianki *S. vigintiquatuorpunktata* hodowanych na pędach nadziemnych lepnicy rozdętej *S. vulgaris* pochodzących z pierwszego stanowiska i głodzonych 1 i 2 dni było istotnie niższe w porównaniu z niegłodzonymi osobnikami. Zaś w przypadku biedronek z drugiego stanowiska, stężenie białka dla osobników niegłodzonych było istotnie wyższe niż dla osobników głodzonych przez 2 dni. Osobniki poddane 1-dniowemu okresowi głodu z pierwszego stanowiska miały istotnie niższe stężenie białka niż podobnie traktowane osobniki z drugiego stanowiska. Natomiast w ciele osobników głodzonych przez 2 dni z pierwszego stanowiska zanotowano istotnie wyższe stężenie białka w porównaniu z osobnikami ze stanowiska drugiego (Ryc. 11.2).



**Ryc. 11.2** Stężenie białka całkowitego [mg/ml] w ciele osobników dorosłych owelnicy lucernianki *S. vigintiquatuorpunktata* hodowanych na pędach nadziemnych lepnicy rozdętej *S. vulgaris*, pochodzących z trzech stanowisk, znajdujących się w różnych odległościach od nieczynnego emitera i poddanych krótkotrwałym okresom głodzenia.

I, II, III – numer stanowiska

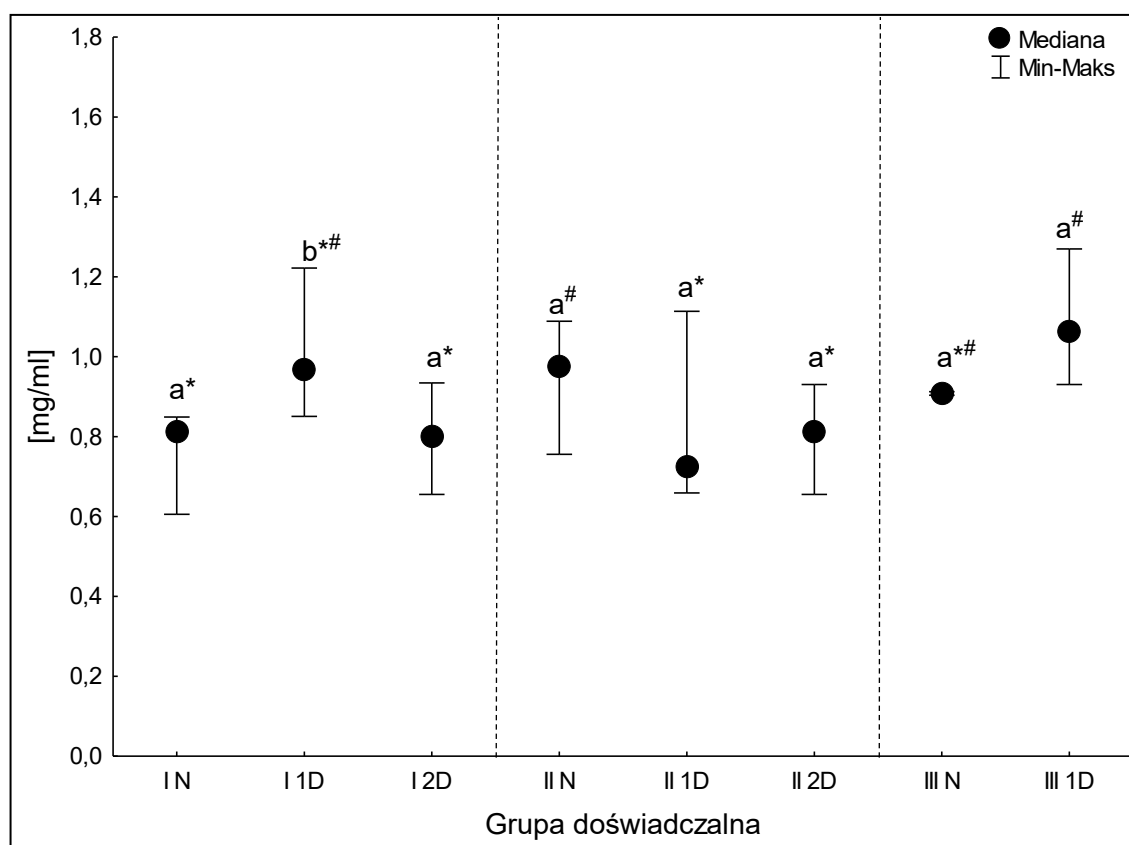
N – niegłodzone, 1D – 1-dniowy okres głodu, 2D – 2-dniowy okres głodu

a, b – różnice pomiędzy owadami z danego stanowiska

\*,<sup>#</sup> - różnice pomiędzy okresami głodzenia z różnych stanowisk

Analiza statystyczna: test nieparametryczny Kruskala-Wallisa,  $p < 0,05$ .

Stężenie białka całkowitego w ciele osobników dorosłych owelnicy lucernianki *S. vigintiquatuorpunktata* hodowanych na pędach nadziemnych lucerny siewnej *M. sativa*, pochodzących z pierwszego stanowiska i głodzonych przez 1 dzień, było istotnie wyższe w porównaniu z niegłodzonymi i poddanymi 2-dniowemu okresowi głodzenia z tego stanowiska. Zaobserwowano także istotnie niższe stężenie białka w ciele osobników niegłodzonych z pierwszego stanowiska niż z drugiego. Oprócz tego w ciele osobników głodzonych przez 1 dzień, istotnie wyższe stężenie białka posiadały osobniki z trzeciego stanowiska w porównaniu z tymi z drugiego stanowiska (Ryc. 11.3).



**Ryc. 11.3** Stężenie białka całkowitego [mg/ml] w ciele osobników dorosłych owelnicy lucernianki *S. vigintiquatuorpunktata* hodowanych na pędach nadziemnych lucerny siewnej *M. sativa*, pochodzących z trzech stanowisk, znajdujących się w różnych odległościach od nieczynnego emitery i poddanych krótkotrwałym okresom głodzenia.

I, II, III – numer stanowiska

N – niegłodzone, 1D – 1-dniowy okres głodu, 2D – 2-dniowy okres głodu

a, b – różnice pomiędzy owadami z danego stanowiska

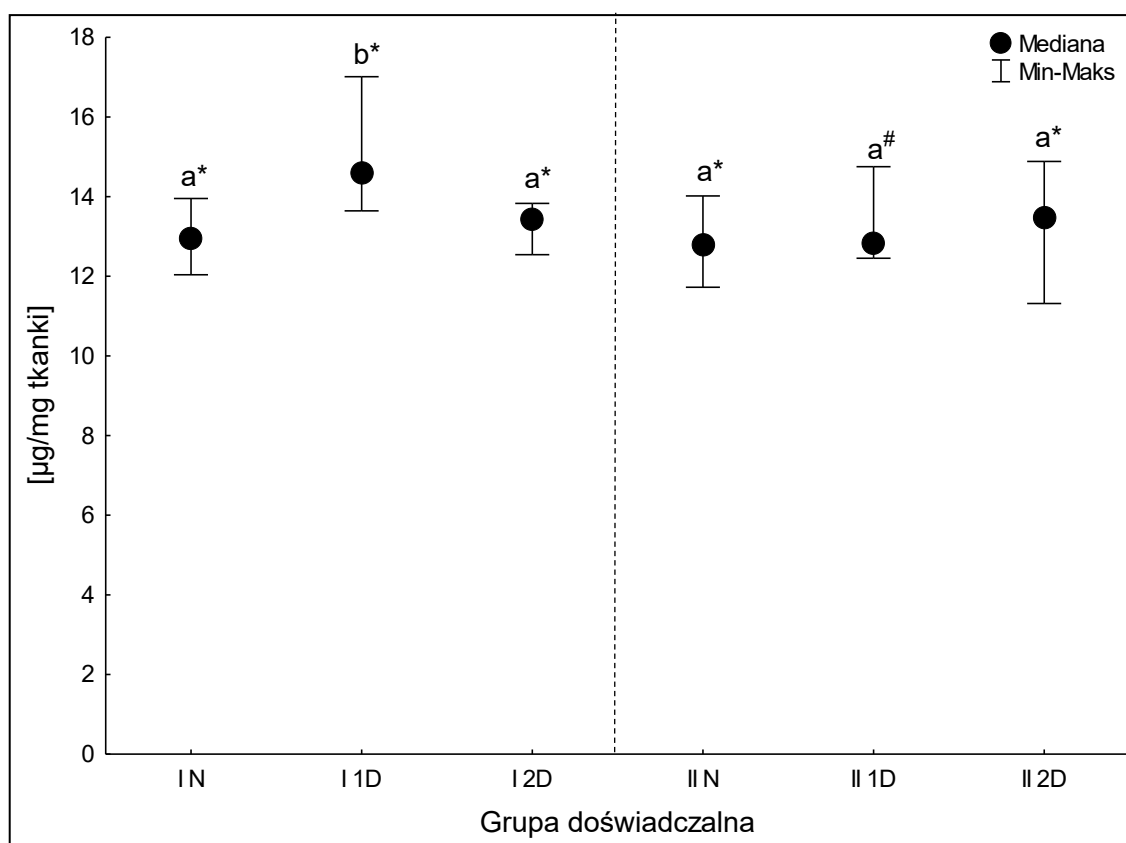
\*, # - różnice pomiędzy okresami głodzenia z różnych stanowisk

Analiza statystyczna: test nieparametryczny Kruskala-Wallisa,  $p < 0,05$ .



## 12. Stężenie substratów energetycznych.

Stężenie białka w ciele osobników dorosłych owelnicy lucernianki *S. vigintiquatuorpunktata* hodowanych na pędach nadziemnych lepnicy rozdętej *S. vulgaris*, pochodzących z pierwszego stanowiska było istotnie wyższe w ciele osobników poddanych 1-dniowemu okresowi głodu w porównaniu do niegłodzonych oraz po 2-dniowym okresie głodu. Oprócz tego istotnie wyższe stężenie białka zaobserwowano w ciele osobników z pierwszego stanowiska niż z drugiego, ale tylko w przypadku osobników poddanych 1-dniowemu okresowi głodu (Ryc. 12.1).



**Ryc. 12.1** Stężenie białka [µg/mg tkanki] w ciele osobników dorosłych owelnicy lucernianki *S. vigintiquatuorpunktata* hodowanych na pędach nadziemnych lepnicy rozdętej *S. vulgaris*, pochodzących z trzech stanowisk, znajdujących się w różnych odległościach od nieczynnego emitery i poddanych krótkotrwałym okresom głodzenia.

I, II – numer stanowiska

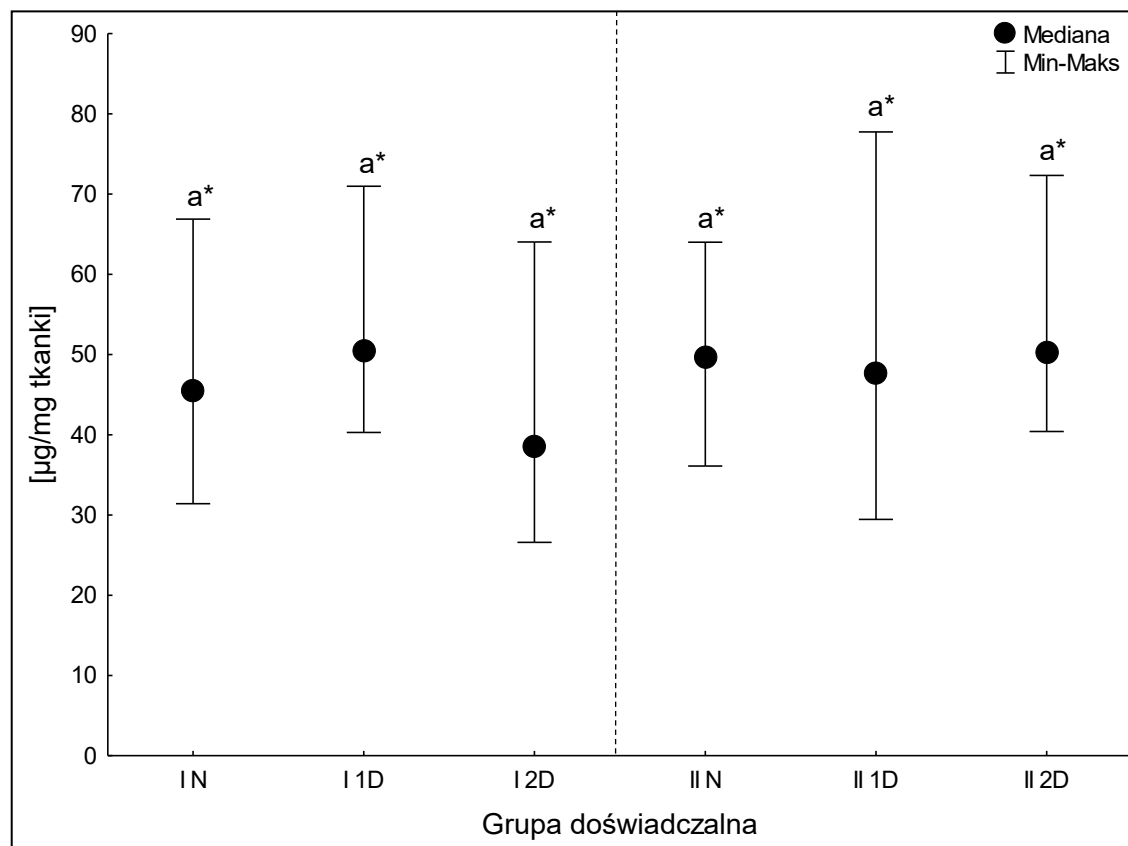
N – niegłodzone, 1D – 1-dniowy okres głodu, 2D – 2-dniowy okres głodu

a, b – różnice pomiędzy owadami z danego stanowiska

\*, # - różnice pomiędzy okresami głodzenia z różnych stanowisk

Analiza statystyczna: test nieparametryczny Kruskala-Wallisa,  $p < 0,05$ .

W przypadku mierzonego w ciele biedronek stężenia węglowodanów, nie zaobserwowano różnic istotnych między osobnikami z poszczególnych grup (Ryc. 12.2).



**Ryc. 12.2** Stężenie węglowodanów [µg/mg tkanki] w ciele osobników dorosłych owężnicy lucernianki *S. vigintiquatuorpunktata* hodowanych na pędach nadziemnych lepnicy rozdętej *S. vulgaris*, pochodzących z trzech stanowisk, znajdujących się w różnych odległościach od nieczynnego emitera i poddanych krótkotrwałym okresom głodzenia.

I, II – numer stanowiska

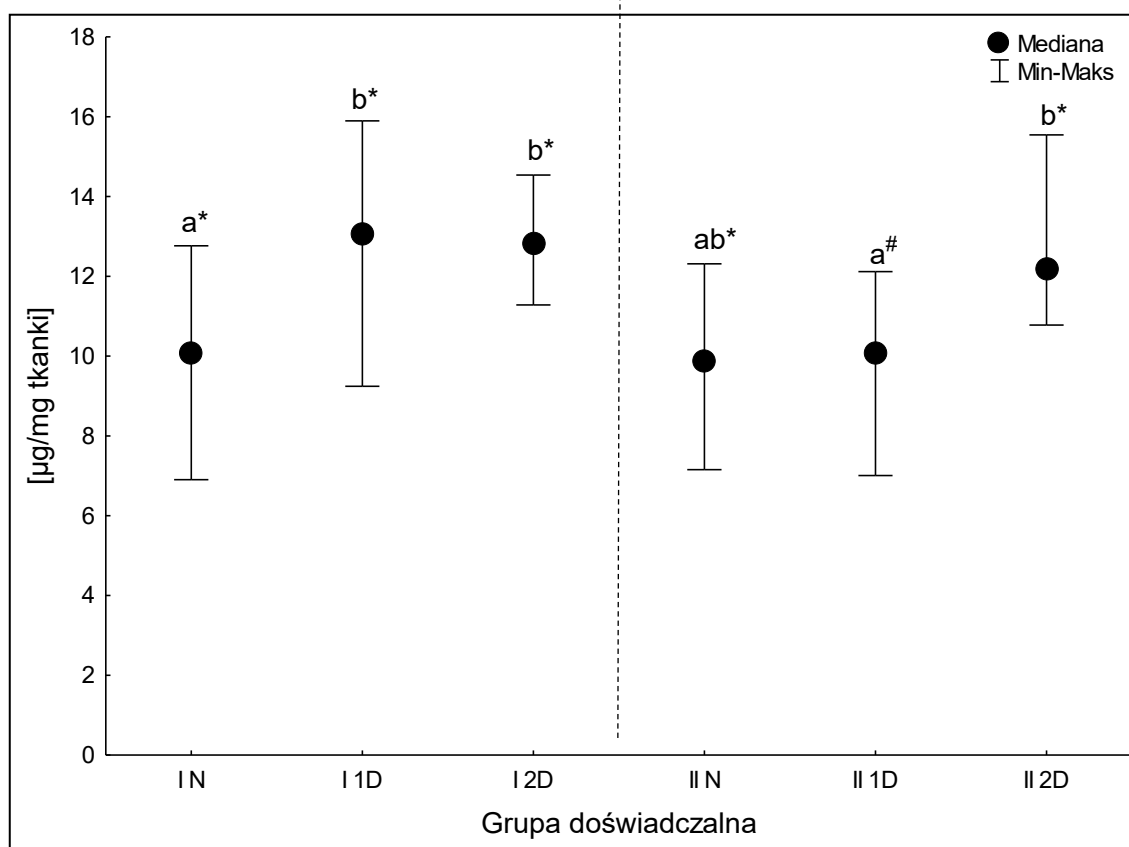
N – niegłodzone, 1D – 1-dniowy okres głodu, 2D – 2-dniowy okres głodu

a, b – różnice pomiędzy owadami z danego stanowiska

\*, # - różnice pomiędzy okresami głodzenia z różnych stanowisk

Analiza statystyczna: test nieparametryczny Kruskala-Wallisa,  $p < 0,05$ .

Stężenie lipidów w ciele osobników dorosłych owelnicy lucernianki *S. viginquatuorpunctata* hodowanych na pędach nadziemnych lepnicy rozdętej *S. vulgaris*, pochodzących z pierwszego stanowiska było istotnie niższe w ciele osobników niegłodzonych niż w ciele poddanych 1- i 2-dniowemu okresowi głodu. Natomiast w przypadku osobników pochodzących z drugiego stanowiska, stężenie to było istotnie wyższe u biedronek po 2-dniowym okresie głodu niż u głodzonych przez 1 dzień. Z kolei w ciele osobników poddanych 1-dniowemu okresowi głodu z pierwszego stanowiska, zaobserwowano istotnie wyższe stężenie lipidów w porównaniu z podobnie traktowanymi osobnikami ze stanowiska drugiego (Ryc. 12.3).



**Ryc. 12.3** Stężenie lipidów [µg/mg tkanki] w ciele osobników dorosłych owelnicy lucernianki *S. viginquatuorpunctata* hodowanych na pędach nadziemnych lepnicy rozdętej *S. vulgaris*, pochodzących z trzech stanowisk, znajdujących się w różnych odległościach od nieczynnego emitera i poddanych krótkotrwałym okresom głodzenia.

I, II – numer stanowiska

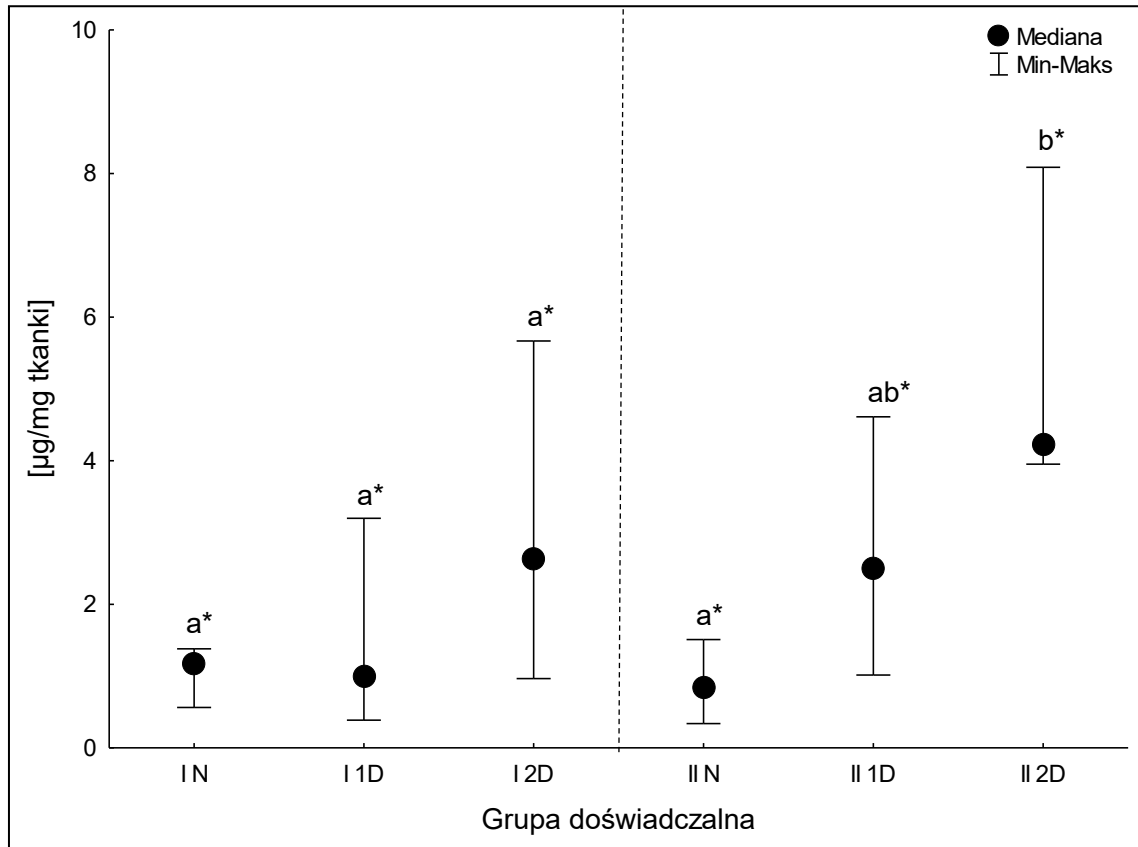
N – niegłodzone, 1D – 1-dniowy okres głodu, 2D – 2-dniowy okres głodu

a, b – różnice pomiędzy owadami z danego stanowiska

\*, # - różnice pomiędzy okresami głodzenia z różnych stanowisk

Analiza statystyczna: test nieparametryczny Kruskala-Wallisa,  $p < 0,05$ .

Stężenie glikogenu w ciele osobników dorosłych owelnicy lucernianki *S. vigintiquatuorpunctata* hodowanych na pędach nadziemnych lepnicy rozdętej *S. vulgaris*, pochodzących z drugiego stanowiska, było istotnie wyższe w przypadku osobników poddanych 2-dniowemu okresowi głodu w porównaniu z niegłodzonymi (Ryc. 12.4).



**Ryc. 12.4** Stężenie glikogenu [µg/mg tkanki] w ciele osobników dorosłych owelnicy lucernianki *S. vigintiquatuorpunctata* hodowanych na pędach nadziemnych lepnicy rozdętej *S. vulgaris*, pochodzących z trzech stanowisk, znajdujących się w różnych odległościach od nieczynnego emitera i poddanych krótkotrwałym okresom głodzenia.

I, II – numer stanowiska

N – niegłodzone, 1D – 1-dniowy okres głodu, 2D – 2-dniowy okres głodu

a, b – różnice pomiędzy owadami z danego stanowiska

\*,# - różnice pomiędzy okresami głodzenia z różnych stanowisk

Analiza statystyczna: test nieparametryczny Kruskala-Wallisa,  $p < 0,05$ .

## V. DYSKUSJA

### 1. Stężenie metali w lepnicy rozdętej i w ciałach owelnicy lucernianki *S. vigintiquatuor punctata* z trzech stanowisk.

Wcześniejsze badanie, analizujące stężenie metali kadmu i cynku w próbkach gleby, pobranej z odległości 250 m od emitera – Huty Metali Nieżelaznych Szopienice w Katowicach, ukazało następujące stężenia Cd 111,11 mg kg<sup>-1</sup> i Zn 10147,6 mg kg<sup>-1</sup> (Pacwa-Płociniczak i in., 2018). Wcześniejsze prace pokazały również zróżnicowanie w zawartości metali ciężkich w roślinach lepnicy rozdętej *S. vulgaris* w zależności od położenia od emitera. Przykładowo, średnie stężenie kadmu i cynku w pędach nadziemnych lepnicy rozdętej zbieranych w maju i w czerwcu w latach 2003-2005 były następujące: 31,51 i 26,42 Cd mg/kg suchej masy i Zn 3627,2 i 3959,1 mg/kg suchej masy, w odległości 250 m od nieczynnego emitera (Nadgórska-Socha i in., 2009). Obecna analiza stężeń tych dwóch pierwiastków roślin zbieranych w miesiącu lipcu wyniosła 2,4 Cd mg/kg suchej masy i 1493,3 Zn mg/kg suchej masy (Ryc. 1.1). Huta nie pracuje od 1976, a na hałdowisku ciągle rejestrowane były wysokie poziomy metali w pędach rosnącym na niej lepnicy (Nadgórska-Socha i Ciepał 2009; Wilczok 2012). Poziom metali w tkankach lepnicy rozdętej i jej powszechne występowanie na tym terenie może sugerować, że zasiedlana jest prawdopodobnie przez oporny ekotyp na takie stresowe warunki (Koźmińska i in, 2019). Choć porównanie różnych populacji *S. vulgaris* w pracy (Nadgórska-Socha i in, 2011), nie potwierdziło pewnych cech cechujących odporne ekotypy, ważne jest także że wśród populacji *S. vulgaris* hodowanych na glebie z dodatkiem Cd, czy Pb najniższą kumulację zmierzono w sadzonkach z Szopienic niż w sadzonkach roślin pochodzących z hałdy cynku czy z okolic Dąbrowy Górniczej gdzie w XIX wieku wydobywano rudy cynku i ołowiu (Nadgórska-Socha i in., 2011).

Skutki działalności hutniczej, związane ze znacznym skażeniem metalami ciężkimi w środowisku i akumulacją metali w roślinach badano i w innych obszarach dawnej aktywności hutniczej. Akumulację wybranych metali analizowano w glebie i w 43 dziko rosnących gatunkach roślin w pobliżu obszaru skażonego wytopem ołowiu w Chinach. W glebie na badanym obszarze stwierdzono podwyższone stężenia metali takich, jak Cd, Cu, Pb i Zn, które według wskaźników zanieczyszczeń zostały sklasyfikowane w następujący sposób: Cd > Pb > Cu > Zn. Zaś stężenia metali ciężkich w roślinach klasyfikowały się w kolejności Pb > Zn > Cd > Cu (Xing i in. 2020). Poziom metali w roślinach różnił się w zależności od stanowiska w mieście (obszar o dużym

natężeniu ruchu, przemysłowy i mieszkalny), z którego została zebrana roślina. Generalnie poziom metali był większy w glebie niż w roślinach w niej rosnących. Akumulacja zaś różniła się w zależności od gatunku rośliny użytej w badaniu (Barthwal i in., 2008).

Poziom metali takich, jak Cd, Pb i Zn analizowano także w glebie, znajdującej się na obszarze nieczynnej od 1990 roku huty w miejscowości Žerjav na Słowenii, i z miejsc położonych w pobliżu, przekraczały one maksymalne dopuszczalne normy. Ich zawartość była skorelowana z poziomem tych metali w czterech roślinach leczniczych, zebranych z tych obszarów, ale zależnie od gatunku rośliny (Kočevar Glavač i in., 2017). W kolejnym doświadczeniu, które polegało na hodowaniu roślin (rzodkiewki, szpinaku i koniczyny) w glebie pochodzącej z terenu dawnej huty cynku w Spelter w Stanach Zjednoczonych, zanotowano średnie stężenia metali zaobserwowane u tych roślin: Zn: 135-1400 mg/kg i Cd 1-28 mg/kg tkanki roślinnej. W tymże badaniu także stwierdzono zależność akumulacji metali od gatunku rośliny (Mishra i in., 2020).

Podobną sytuację ujawniono w Jaworznie. Zbadano próbki gleb pobranych z obszaru historycznego hutnictwa cynku, odbywającego się od XIX wieku aż do lat 70-tych XX wieku w Jaworznie i wykryto w nich zawartości metali ciężkich takich, jak: Cr, Cu, Ni i Mn, świadczące o silnym zanieczyszczeniu tychże gleb (Sutkowska i in. 2013). Badania przeprowadzone na zindustrializowanym obszarze w Mortagne du Nord we Francji, gdzie w latach 1901-1963 znajdowała się huta cynku i ołowiu. W prawie wszystkich pobranych próbkach gleby zanotowano przekroczone regionalne rolnicze wartości referencyjne dla Cd i Pb. Podobnie podwyższone stężenia tych metali w stosunku do obowiązujących norm zaobserwowano w warzywach (marchew, fasola szparagowa, por, sałata, ziemniak, rzodkiewka, pomidor) pochodzących z tychże terenów (Douay i in., 2007). Wyniki tych doświadczeń sugerują, że pomimo zakończenia działalności hutniczej, mogą na tym terenie w glebie, znajdować się metale ciężkie, które potencjalnie mają możliwość przedostania się do występujących na niej roślin.

Ważnym czynnikiem, dzięki któremu metale mogą przedostać się do organizmu owadów to zdolność roślin do translokacji tychże pierwiastków z zanieczyszczonej gleby do części roślin zjadanych przez owady (Wang i in., 2019). Poziom metali ciężkich w glebie oraz w roślinach może być różna w zależności od odległości od emitera. Zanotowano bowiem, że w glebie i w ziarnach pszenicy pochodzących z obszaru huty Pb w Chinach, stężenia Cd, Cu, Pb i Zn zwiększały się wraz ze zmniejszaniem się odległości od huty (Li i in., 2020). Podobnie, zawartość metali ciężkich takich, jak Cd, Cu, Ni, Pb i

Zn, wykrytych w próbkach gleby z obszaru położonego bliżej dawnej huty cynku w Chinach, była wyższa niż w próbkach pobranych z większej odległości (Gao i in., 2022).

W przypadku biedronek, zbieranych w lokalizacjach wcześniej wymienionych i hodowanych kolejne 5 dni na pędach lepnicy z odpowiednich lokalizacji stwierdzono brak zróżnicowania w zawartości metali (Ryc. 2.1 i 2.2). Analiza stężenia metali u larw *Agrotis ipsilon* ujawniła znaczny wzrost ich zawartości u osobników karmionych pokarmem, pochodzącym z terenów przemysłowych w porównaniu z kontrolą (Rasmy i in. 2024).

Stężenie metali w przeliczeniu mg/kg suchej masy w pędach materiału biologicznego ujawniło ponad 2 razy niższe stężenie w ciele biedronek w przypadku kadmu i cynku (Ryc. 1.1 oraz 2.1 i 2.2). To może sugerować na funkcjonowanie skutecznych mechanizmów broniące przed akumulacją metali występujących w wysokich stężeniach w roślinach żywicielskich. Owady mogą wykrywać i unikać metali w środowisku. Mogą również detoksykować metale, sekwestrując je w białkach wymiatających metale (np. metalotioneinach), a następnie wydalając. Owady w odpowiedzi na zaistniały stres oksydacyjny, mogą reagować poprzez regulację w górę cząsteczek przeciwutleniaczy i mechanizmów naprawy DNA (Gekière 2025).

To ważne, bo niektóre rośliny mogą gromadzić metale chronić się przed ich zjadaczami. Praca Kazemi-Dinan i współp. (2013) wskazała, że taka forma obrony może być dotyczyć głównie polifagów, którzy mogą żerować na szerokim spektrum roślin żywicielskich, w odróżnieniu do bardziej wyspecjalizowanych i żerujących na niewielu gatunkach roślin oligofagów czy monofagów. W pracy Miguli i współp. (2004) oceniano poziom akumulacji metali u chrząszczy drapieżnych szyszonka *Pterostichus oblongopunctatus* i kusaka cezarka *Staphylinus caesareus* oraz żywiącego się odchodami owadów roślinożernych i butwiejącymi liśćmi żuka gnojara *Geotrupes stercosus*, czy roślinożercy naliściaka kędziarzewego *Phyllobius betullae* z rejonu charakteryzującego się gradientem zanieczyszczeń wokół okolic Olkusa. Zasugerowano w oparciu o te wyniki pewną zdolność regulacji poziomu metali ciężkich w ciele chrząszczy, ponieważ mimo znaczącego gradientu w zanieczyszczeniu gleb z poszczególnych stanowisk, w zakresie zróżnicowanie w stężeniu metali między osobnikami z poszczególnych lokalizacji obserwowano nieliczne przykłady takich różnic. Autorzy, także wskazali, że na poziom metali może mieć wpływ płeć, wiek czy dokładna historia ekspozycji na metale, której również tej pracy nie możemy odtworzyć. Tyle że biedronki przed analizą metali, 5 dni hodowano na roślinach z odpowiednich lokalizacji. Analizowano zawartości

metali ciężkich w trzech różnych odległościach od działającej w latach 1911-1999 huty Cu/Pb na pustyni Chihuahuan w pobliżu El Paso w Stanach Zjednoczonych. Z tych terenów zebrano próbki gleby, mrówki *Pogonomyrmex rugosus* oraz nasiona traw *Dasyochola pulchella* i *Bouteloua curtipendula*, na których zaobserwowano aktywne żerowanie tych owadów. W tych badaniach ujawniono z kolei, niższe stężenia metali ciężkich w ciele mrówek i nasionach traw takich, jak Cd, Cu i Pb jeśli były zbierane w większych odległościach od nieczynnej huty (Del Toro i in., 2010).

## **2. Zawartość flawonoidów w pędach nadziemnych lepnicy rozdętej *S. vulgaris* z trzech analizowanych stanowisk.**

W roślinach oznaczano również zawartość flawonoidów. wyznaczono zróżnicowanie w zawartości flawonoidów, przy czym najwyższe stężenie zmierzono w roślinach ze stanowiska drugiego znajdującego się pomiędzy skrajnymi stanowiskami (Rys. 3.1). Przeprowadzone badania nad zależnością pomiędzy występowaniem metali w glebie, a zawartością flawonoidów w roślinach wykazały w pędach kapusty sitowatej *Brassica juncea* znaczny spadek zawartości flawonoidów traktowanych 0,6 mM Cd w porównaniu z kontrolą (Kapoor i in., 2014). W innym badaniu analizowano narażenie pomidora *Lycopersicon esculentum* na stres wywołany metalami Cu i Zn. Roślina ta była narażona na różne stężenia tych metali (0, 200, 300, 400, 500 ppm). Zanotowano, że w liściach i korzeniach tych roślin, poddanych działaniu Cu i Zn, akumulacja flawonoidów była większa w porównaniu do roślin kontrolnych (Badiaa i in., 2020). W pędach nadziemnych *S. vulgaris* Flawonoidy mogą także przyczyniać się do wystąpienia stresu oksydacyjnego u owadów, cechujący się zmianą aktywności enzymów detoksykacyjnych. Przykładem są larwy motyli *Earias vittella*, w ciele których zanotowano obniżenie aktywności S-transferazy glutationowej (GST), żerujących na diecie z dodatkiem flawonoidu w porównaniu do larw karmionych pożywką bez flawonoidu (Baskar i in., 2014). Jednakże wyniki innego badania wykazały, że w ciele wywilżni karłowatej *Drosophila melanogaster* traktowanych jednocześnie kwercetyną i H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> występował niższy stres oksydacyjny w porównaniu z kontrolą (Subramanian i in., 2017).



### **3. Obrona detoksykacyjna owelnicy lucernianki *S. vigintiquatuorpunctata* żerujących na pędach nadziemnych lepnicy rozdętej *S. vulgaris*, cechujących się zróżnicowaniem zawartości metali i flawonoidów.**

Porównano reakcje detoksykacyjne larw i osobników dorosłych zbieranych z różnych lokalizacji wokół emitera i żerujących na roślinach cechujących się zróżnicowaniem w stężeniu kadmu i cynku i flawonoidów, także zbieranych z odpowiednich lokalizacji (Tab.1.1). Larwy, żerujące na roślinach z najbliższej położonego względem emitera stanowiska, cechował obniżony poziom glutationu zredukowanego i całkowitej pojemności antyoksydacyjnej oraz podwyższony stosunek tioli zredukowanych do utlenionych i stężenia białka całkowitego jeśli porównać je z larwami żerującymi na roślinach położonych najdalej od emitera (Ryc.4.1; 5.1; 9.1; 11.1). To sugerowałoby, większy udział niskocząsteczkowych antyoksydantów w detoksykacji u osobników żerujących na roślinach o niższym stężeniu metali. Z kolei larwy z powierzchni bliżej nieczynnego emitera, prawdopodobnie cechują większe wydatki energetyczne na produkcję białek i ich udział w procesach antyoksydacyjnych (Ryc. 11.1). W przypadku osobników dorosłych różnice ujawniono jedynie w przypadku stosunku tioli zredukowanych do utlenionych. Te żerujące na roślinach ze stanowiska drugiego cechowała wyższa wartość tego parametru niż te z żerujące na roślinach ze stanowiska położonego dalej od nieczynnego emitera (Ryc. 9.2). Między osobnikami dorosłymi żerującymi na roślinach pochodzących z różnych stanowisk, nie wykazano także różnic w zawartości substratów energetycznych (Ryc. 12.1-12.4).

### **4. Krótkotrwale okresy głodu u osobników dorosłych owelnicy lucernianki *S. vigintiquatuorpunctata* po okresie żerowania na lepnicy rozdętej *S. vulgaris*.**

Pomimo ujawnienia niewielkich różnic między parametrami obrony chemicznej między osobnikami dorosłymi żerującymi na pędach lepnicy z różnych stanowisk, poddanie ich krótkim okresom głodu, czyli dodatkowy stresor ujawniło więcej różnic między osobnikami hodowanymi na lepnicy pochodzącej z różnych stanowisk. Szereg różnic ujawniono po 1 dniu głodówki. Osobniki żerujące na roślinach zbieranych z najbardziej odległego stanowiska wyróżniał podwyższony poziom TAC w stosunku do osobników żerujących na roślinach ze stanowiska położonego najbliższego nieczynnego emitera (Ryc. 5.2). Oprócz tego osobniki ze stanowiska pierwszego cechował wyższy poziom produktów peroksydacji i obniżony poziom białka całkowitego niż u osobników z żerujących na roślinach z drugiego stanowiska (Ryc. 8,2; 11.2). Z kolei

osobniki pochodzące z drugiego stanowiska różniły się od tych z roślin najbardziej skażonych metalami wyższym stosunkiem tioli zredukowanych do niezredukowanych (Ryc. 9.2). Z kolei dłuższa, bo 2-dniowa głodówka, różnicowała osobniki z pierwszego i drugiego stanowiska w stosunku tioli (Ryc. 9.2). Te wyniki częściowo potwierdzają mniejszy udział obrony drobnocząsteczkowych antyoksydantów u osobników z bliżej położonych stanowisk względem nieczynnego źródła zanieczyszczeń. A zróżnicowanie między reakcjami osobników z bliżej położonych stanowisk sugerować mogą ważną rolę substancji produkowanych przez rośliny, które mogą działać na stres oksydacyjny takich jak flawonoidy i wykorzystaniem GSH w procesach enzymatycznych np. z udziałem GST. Flawonoidy, w tym najpowszechniej występująca w roślinach – kwercetyna, mogą wpływać na aktywność enzymów detoksykujących. Dobrze to ukazano w badaniach nad oznaczaniem aktywności GST. W jednym z nich larwy *Hyphantria cunea* (Lepidoptera), karmiono sztuczną pożywką z dodatkiem następujących stężeń kwercetyny (0; 0,25; 0,50; 1,00; 2,00; 4,00%). Wyniki ujawniły, że aktywność GST w jelitach larw znacznie wzrosła wraz ze wzrostem stężenia kwercetyny powyżej 1,00% (Gao i in., 2022). W innym doświadczeniu wykorzystano do badań larwy *Lymantria dispar* (Lepidoptera), które karmiono sztucznymi dietami z dodatkiem flawonoidów: kwercetyny, flawonu lub rutyny dodanych oddzielnie do pożywek. Aktywność GST mierzono w ciele larw po 12, 24, 48 i 72 godzinach. Zaobserwowano wówczas istotne zwiększenie aktywności GST po spożyciu przez larwy pożywek, zawierających powyżej wymienione flawonoidy w porównaniu do kontroli (Wang i in., 2019). Natomiast w ciele larw owelnicy lucernianki *S. vigintiquatuorpunctata*, pochodzących z trzech różnych stanowisk, nie zanotowano istotnych różnic w aktywności GST (Ryc. 6.1). I chociaż nie zanotowano różnic w aktywności GST, ale trzeba pamiętać że GST są zbiorem wielu izoenzymów o różnym powinowactwie do różnych ksenobiotyków (Koirala B K i in., 2022). Ujawnione zróżnicowanie w hamowaniu GST w homogenatach biedronek analizowana in vitro, sugeruje że mogą różnić się składem izoenzymów, niezależnie od ujawnionej podobnej aktywności w poszczególnych osobnikach, to zróżnicowanie w aktywności ujawniono wyższą inhibicję w ciele osobników ze stanowiska pierwszego niż z drugiego, niezależnie od wcześniejszego głodu (Tab. 7.1; 7.2).

Warto też zwrócić uwagę, że porównując osobniki po 1 dniu głodu z I i II stanowiska, te bliżej położone nieczynnego emitera cechowały niższe poziomy białek i lipidów, wskazując prawdopodobnie na zużycie tych substratów energetycznych w obliczu stresora, jakim był głód (Ryc. 12.1; 12.3). Inaczej było w badaniu na larwach

motyli *Spodoptera exigua* stwierdzono, że osobniki z linii kadmowej, poddane 1-dniowemu okresowi głodu, wykazywały niższe stężenie węglowodanów w porównaniu do osobników niepoddanych głodzeniu, choć należy pamiętać że pokarmem larw była sztuczna dobrze zbilansowana pożywka różniąca się jedynie zawartością kadmu (Pompka i in., 2022).

#### **5. Reakcja obronna u osobników owelnicy lucernianki *S. vigintiquatuorpunctata* hodowanych na lucernie siewnej *M. sativa*, wcześniej hodowanych na roślinach lepnicy rozdętej *S. vulgaris* o różnej zawartości metali i flawonoidów.**

Żerowanie biedronek na lucernie może wywoływać znaczące szkody. Chrząszcze letniego pokolenia żerują przenosząc się na plantacje lucerny od lipca, na zimowanie schodzą na przełomie sierpnia i września (Horoszkiewicz i in., 2012; Golenia i Romankow 1974). Wcześniejsze „doświadczenia” żerowania na roślinach o różnej zawartości metali lub allelozwiązków takich jak flawonoidy może mieć znaczenie dla sprawności ich systemów obronnych, gdy będą zasiedlać pola lucerny. Szczególnie że wykazano że olejek mięty bogaty w fenole, może odgrywać istotną rolę w ograniczaniu żerowania dorosłych osobników owelnicy lucernianki (Yildirim i in., 2019). Niezależnie przeniesienie na nowe rośliny żywicielskie może stanowić nowe wyzwanie, łatwiej rozprzestrzeniać się na rośliny o podobnym składzie, jeśli chodzi o allelozwiązki (Erbilgin i in., 2014). Zarówno metale, takie jak kadm czy cynk, jak i flawonoidy, mogą modyfikować obronę antyoksydacyjną owadów (Kafel i in. 2014). Warto zwrócić uwagę że przeniesienie na nową roślinę żywicielską ujawniło zróżnicowanie między osobnikami z poszczególnych stanowisk, względem wykorzystania drobnocząsteczkowych antyoksydantów. Wydaje się, że jest ono wyraźnie jest mniej efektywne w przypadku osobników zwłaszcza ze stanowiska drugiego w porównaniu z pierwszym, w przypadku niegłodzonych w ciele osobników (Ryc. 5.3). Osobniki z drugiego stanowiska wyróżniało także podwyższenie stężenia GSH oraz TAC w ciele osobników ze stanowiska drugiego w porównaniu z pozostałymi stanowiskami, po 1-dniowej głodówce (Ryc. 4.3; 5.3).

Te różnice sugerują, że mogło to mieć znaczenie dla sprawności systemów detoksykacyjnych ze względu na historię żerowania. Zrozumienie nowych interakcji między rośliną żywicielską a roślinożercą jest jednym z najtrudniejszych zagadnień w biologii inwazji, ponieważ wtórne związki rośliny żywicielskiej, mogą mieć kaskadowy

wpływ na rozprzestrzenianie się żywiciela i zasięgów populacji owadów roślinożernych (Erbilgin i in. 2014).

## VI. WNIOSKI

1. Ujawniono gradient kadmu i cynku w zakresie zmian ich stężenia w pędach nadziemnych lepnicy rozdętej w zależności od odległości od nieczynnej huty – wyższe stężenia rejestrowano w pędach roślin położonych bliżej nieczynnego emitera. Osobniki owelnicy lucernianki *S. vigintiquatuorpunctata* z różnych stanowisk nie różniły się stężeniem metali w ich ciele.
2. Rozkład stężenia flawonoidów całkowitych zmierzony w pędach lepnicy rozdętej *S. vulgaris* nie wykazywał zróżnicowania podobnego do rozkładu stężenia metali, jedynie rośliny pochodzące z lokalizacji położonej między skrajnymi stanowiskami względem nieczynnego emitera cechowało najwyższe stężenie tych substancji.
3. Osobniki owelnicy lucernianki *S. vigintiquatuorpunctata* zależnie od tego, czy żerowały na roślinach ze stanowisk położonych bliżej lub dalej nieczynnego emitera, cechowały odmienne mechanizmy obrony antyoksydacyjnej. Te z lokalizacji bliżej położonych, wyróżniała obrona z udziałem tioli białkowych a z te z najdalszej położonej lokalizacji, obrona z udziałem niskocząsteczkowych antyoksydantów. Niezależnie nie stwierdzono różnic w poziomach substratów energetycznych analizowane u dorosłych biedronek z różnych stanowisk.
4. Zastosowanie dodatkowego stresora, głodu, ujawniło różnice w poziomie substratów energetycznych w ciele osobników owelnicy lucernianki *S. vigintiquatuorpunctata*, co mogło być związane z większymi wydatkami na obronę detoksykacyjną, z istotną rolą glutationu zredukowanego u tych żerujących na roślinach bliżej położonych nieczynnego emitera, a w przypadku tych żerujących na roślinach z pozostałych stanowisk, generalnie tioli białkowych. Różnice w obronie antyoksydacyjnej między osobnikami z dwóch najodleglejszych stanowisk, może być związane z zawartością flawonoidów w pędach lepnicy zebranych z tych lokalizacji.
5. Przeniesienie owadów na nową roślinę żywicielską sugeruje ważną rolę w udziale drobnocząsteczkowych antyoksydantów w procesach obronnych, gdy owady wcześniej żerowały na roślinach lepnicy rozdętej pochodzących ze stanowiska położonego najdalej od emitera.
6. Różnice w obronie antyoksydacyjnej z udziałem glutationu zredukowanego i poziomie uszkodzeń oksydacyjnych między osobnikami żerującymi na lucernie

siewnej *M. sativa*, a wcześniej żerującymi na lepnicy rozdętej *S. vulgaris*, zlokalizowanej w różnej odległości od emitera i skutki głodzenia, ujawniające podobne tendencje jeśli chodzi o różnice w procesach obronnych, sugerują, że historia ekspozycji na zanieczyszczenia może mieć znaczenie dla sprawności obrony detoksykacyjnej.

7. Głodzenie osobników owężnicy lucernianki *S. vigintiquatuorpunctata* wcześniej żerujących na lucernie siewnej *M. sativa*, pochodzących ze stanowiska drugiego ujawniło wzrost obrony antyoksydacyjnej z udziałem glutationu zredukowanego.

## VII. BIBLIOGRAFIA

1. Abu ElEla S. A., ElSayed W. M. 2015. The influence of cadmium on the food consumption and utilization of the cotton leaf worm *Spodoptera littoralis* (Boisd.) (Lepidoptera: Noctuidae). *Ecol. Balk.* 7(1): 81-85
2. Adamo P., Dudka S., Wilson M. J., McHardy W. J. 2002. Distribution of trace elements in soils from the Sudbury smelting area (Ontario, Canada). *Water Air Soil Pollut.* 137: 95–116
3. Agati G., Brunetti C., Fini A., Gori A., Guidi L., Landi M., Sebastiani F., Tattini M. 2020. Are flavonoids effective antioxidants in plants? Twenty years of our investigation. *Antioxidants.* 9(11): 1098
4. Agrell J., Oleszek W., Stochmal A., Olsen M., Anderson P. 2003. Herbivore-Induced Responses in Alfalfa (*Medicago sativa*). *J. Chem. Ecol.* 29: 303–320
5. Ali H., Khan E. 2018. Trophic transfer, bioaccumulation, and biomagnification of non-essential hazardous heavy metals and metalloids in food chains/webs—Concepts and implications for wildlife and human health. *Hum. Ecol. Risk Assess.* 25(6): 1353–1376
6. Allocati N., Masulli M., Di Ilio C., Federici L. 2018. Glutathione transferases: substrates, inhibitors and pro-drugs in cancer and neurodegenerative diseases. *Oncogenesis.* 7: 8
7. Almeida R. P. P., Nunneya L. 2015. How Do Plant Diseases Caused by *Xylella fastidiosa* Emerge? *Plant Dis.* 99(11): 1457-1658
8. Amamou F., Nemmiche S., Meziane R. K., Didi A., Yazit S. M., Chabane-Sari D. 2015. Protective effect of olive oil and colocynth oil against cadmium-induced oxidative stress in the liver of Wistar rats. *Food Chem. Toxicol.* 78: 177-184
9. Amegan K. E., Fourati Y., Del-valle S., Salgon S., Ferrante P., Robin C., Lavoit A-V., Caromel B., Larbat R., Kergunteuil A. 2024. Joint effects of inter-specific and intra-specific diversity of tomato volatile profiles on antixenosis against *Tuta absoluta*. *Entomol. Gen.* 44(2): 325-337
10. Anaman R., Peng C., Jiang Z., Liu X., Zhou Z., Guo Z., Xiao X. 2022. Identifying sources and transport routes of heavy metals in soil with different land uses around a smelting site by GIS based PCA and PMF. *Sci. Total Environ.* 823: 153759
11. Ankush, Prakash R., Singh V., Diwedi A., Popat R. C., Kumari S., Kumar N., Dhillon A., Gourav. 2021. Sewage sludge impacts on yields, nutrients and heavy

- metals contents in pearl millet–wheat system grown under saline environment. *Int. J. Plant Prod.* 15: 93–105
12. Augustyniak M., Babczyńska A., Augustyniak M. 2009. Does the grasshopper *Chorthippus brunneus* adapt to metal polluted habitats? A study of glutathione-dependent enzymes in grasshopper nymphs. *Insect Sci.* 16: 33–42
  13. Augustyniak M., Juchimiuk J., Przybyłowicz W. J., Mesjasz-Przybyłowicz J., Babczyńska A., Migula P. 2006. Zinc-induced DNA damage and the distribution of metals in the brain of grasshoppers by the comet assay and micro-PIXE. *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.* 144(3): 242–251
  14. Augustyniak M., Migula P. Body burden with metals and detoxifying abilities of the grasshopper—*Chorthippus brunneus* (Thunberg) from industrially polluted areas. In: Markert B, Friese K, editors. *Trace elements—their distribution and effects in the environment*. Amsterdam: Elsevier; 2000. pp. 423–454
  15. Augustyniak M., Tarnawska M., Babczyńska A., Kafel A., Zawisza-Raszka A., Adamek B., Płachetka-Bożek A. 2017. Cross tolerance in beet armyworm: long-term selection by cadmium broadens tolerance to other stressors. *Ecotoxicology* 26: 1408–1418
  16. Azam I., Afsheen S., Zia A., Javed M., Saeed R., Sarwar M. K., Munir B. 2015. Evaluating insects as bioindicators of heavy metal contamination and accumulation near industrial area of Gujrat, Pakistan. *Biomed Res. Int.* 2015: 942751
  17. Baba S. P., Bhatnagar, A. 2018. Role of thiols in oxidative stress. *Curr. Opin. Toxicol.* 7: 133–139
  18. Badiia O., Yssaad H. A. R., Topcuoglu B. 2020. Effect of heavy metals (copper and zinc) on proline, polyphenols and flavonoids content of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *Plant Arch.* 20(2): 2125–37
  19. Baltaci A.K., Yuce K. Mogulkoc, R. 2018. Zinc metabolism and metallothioneins. *Biol. Trace. Elem. Res.* 183: 22–31
  20. Bariş, A. 2021. General information about *Subcoccinella vigintiquatuorpunctata* Linnaeus, 1758 (Coleoptera: Coccinellidae). *Recent Biological Studies: Chapter 7*: 143–159
  21. Bar-Or D., Rael L. T., Lau E. P., Rao N. K., Thomas G. W., Winkler J. V., Yukl R. L., Kingston R. G., Curtis C. G. 2001. An analog of the human albumin N-



- terminus (Asp-Ala-His-Lys) prevents formation of copper-induced reactive oxygen species. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 284(3): 856–862
22. Barthwal J., Nair S., Kakkar P. 2008. Heavy metal accumulation in medicinal plants collected from environmentally different sites. *Biomed. Environ. Sci.* 21(4): 319-324
  23. Bartosz G. *Druga twarz tlenu: wolne rodniki w przyrodzie*. Wydawnictwo Naukowe PWN. 2013
  24. Baskar K., Muthu C. Ignacimuthu S. 2014. Effect of pectolinarigenin, a flavonoid from *Clerodendrum phlomidis*, on total protein, glutathione S-transferase and esterase activities of *Earias vittella* and *Helicoverpa armigera*. *Phytoparasitica*. 42, 323–331
  25. Biancarosa I., Liland N. S., Biemans D., Araujo P., Bruckner C. G., Waagbø R., Torstensen B. E., Lock E. J., Amlund H. 2018. Uptake of heavy metals and arsenic in black soldier fly (*Hermetia illucens*) larvae grown on seaweed-enriched media. *J. Sci. Food Agric.* 98(6): 2176–2183
  26. Biswas G.C. 2013. Insect pests of soybean (*Glycine max* L.), their nature of damage and succession with the crop stages. *J. Asiat. Soc. Bangladesh, Sci.* 39(1): 1-8
  27. Bonaventura P., Benedetti G., Albarède F., Pierre Miossec P. 2015. Zinc and its role in immunity and inflammation. *Autoimmun. Rev.* 14(4): 277–285
  28. Boué S. M., Raina A. K. 2003. Effects of plant flavonoids on fecundity, survival, and feeding of the formosan subterranean termite. *J. Chem. Ecol.* 29: 2575-2584
  29. Bradford M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72(1-2): 248-254
  30. Briffa J., Sinagra E., Blundell R. 2020. Heavy metal pollution in the environment and their toxicological effects on humans. *Heliyon*. 6(9): e04691
  31. Butt A., Qurat-ul-Ain, Rehman K., Khan M. X., 2018. Hesselberg T. Bioaccumulation of cadmium, lead, and zinc in agriculture-based insect food chains. *Environ. Monit. Assess.* 190: 698
  32. Caporale A. G., Violante A. 2016. Chemical processes affecting the mobility of heavy metals and metalloids in soil environments. *Curr. Pollution Rep.* 2: 15–27
  33. Chaves G., Bungert-Plümke S., Franzen A., Musset B. 2018. Zinc inhibition of an insect voltage-gated proton channel. *Biophys. J.* 14(3): 492a

34. Chen Y., Ruberson J. R., 2008. Starvation effects on larval development of beet armyworm (Lepidoptera: Noctuidae). J Entomol. Sci. 43: 247-253
35. Ciss M., N Parisey N., Dedryver C-A., Pierre J-S. 2013. Understanding flying insect dispersion: Multiscale analyses of fragmented landscapes. Ecol. Inform. 14: 59-63
36. Del Toro I., Floyd K., Gardea-Torresdey J., Borrok D. 2010. Heavy metal distribution and bioaccumulation in Chihuahuan Desert Rough Harvester ant (*Pogonomyrmex rugosus*) populations. Environ. Pollut. 158(5): 1281–1287
37. Deng W., Wang F., Liu W. 2023. Identification of factors controlling heavy metals/metalloid distribution in agricultural soils using multi-source data. Ecotoxicol. Environ. Saf. 253(15): 114689
38. Douay F., Roussel H., Fourrier H., Heyman C., Chateau G. 2007. Investigation of Heavy Metal Concentrations on Urban Soils, Dust and Vegetables Nearby a Former Smelter Site in Mortagne du Nord, Northern France. J. Soils Sediments. 7(3): 143–146
39. El Rasafi T. E., Oukarroum A., Haddioui A., Song H., Kwon E. E., Bolan N., Tack F. M. G., Sebastian A., Prasad M. N. V., Rinklebe J. 2022. Cadmium stress in plants: A critical review of the effects, mechanisms, and tolerance strategies. Crit. Rev. Environ. Sci. Technol. 52(5): 675–726
40. Erbilgin N., Ma C., Whitehouse C., Sha, B., Najjar A., Evenden M. 2014. Chemical similarity between historical and novel host plants promotes range and host expansion of the mountain pine beetle in a naïve host ecosystem. New Phytol. 201(3): 940-950
41. Farahani S., Bandani A. R., Alizadeh H., Goldansaz S. H., Whyard S., 2020. Differential expression of heat shock proteins and antioxidant enzymes in response to temperature, starvation, and parasitism in the Carob moth larvae, *Ectomyelois ceratoniae* (Lepidoptera: Pyralidae). PLoS One. 15(1): 1-18
42. Filipiak M., Bilska E., Tylko G., Pyza E. 2010. Effects of zinc on programmed cell death of *Musca domestica* and *Drosophila melanogaster* blood cells. J. Insect Physiol. 56(4): 383-390
43. Fraga C. G., Oteiza P. I., Galleano M. 2014. In vitro measurements and interpretation of total antioxidant capacity. Biochim. Biophys. Acta (BBA) Gen. Subj. 1840(2): 931-934

44. Frassinetti S., Bronzetti G., Caltavuturo L., Cini M., Croce C. D. 2006. The role of zinc in life: a review. *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.* 25(3): 597-610
45. Fu J., Zhang A., Wang T., Qu G., Shao J., Yuan B., Wang Y., Jiang G. 2013. Influence of e-waste dismantling and its regulations: temporal trend, spatial distribution of heavy metals in rice grains, and its potential health risk. *Environ. Sci. Technol.* 47 (13): 7437–7445
46. Gao H., Koopmans G. F., Song J., Groenenberg, J. E., Liu X., Comans R. N. J., Weng L. 2022. Evaluation of heavy metal availability in soils near former zinc smelters by chemical extractions and geochemical modelling. *Geoderma.* 423: 115970
47. Gao Y.-L., Pan Z.-Y., Meng X., Yuan Y.-F., Li H.-Y., Chen M. 2022. The effect of quercetin on the growth, development, nutrition utilization, and detoxification enzymes in *Hyphantria cunea* Drury (Lepidoptera: Arctiidae). *Forests.* 13(11): 1945
48. García-Carmona M., Romero-Freire A., Sierra Aragon M., Martínez Garzón F. J., Martín Peinado F. J. 2017. Evaluation of remediation techniques in soils affected by residual contamination with heavy metals and arsenic. *J. Environ. Manag.* 191: 228-236
49. Garrett R. 2000. Natural Sources of Metals to the Environment. *Hum. Ecol. Risk Assess.* 6(6): 945-963
50. Gautam H., Sharma A., Trivedi P. K. 2023. The role of flavonols in insect resistance and stress response. *Curr. Opin. Plant Biol.* 73: 102353
51. Gekière A. 2025. Terrestrial insect defences in the face of metal toxicity. *Chemosphere.* 372: 144091
52. Glavač N. K., Djogo S., Ražić S., Kreft S., Veber M. 2017. Accumulation of heavy metals from soil in medicinal plants. *Arh Hig Rada Toksikol.* 68(3): 236–244
53. Golenia A., Romankow W. 1974. Choroby i szkodniki roślin motylkowych drobnonasiennych. PWRL. Warszawa
54. Grace M. A., Achick T. E., Bonghan B. E., Bih M. E., Ngo N. V., Ajeck M. J., Prudence G. T. B, Ntungwen, F. C. 2019. An overview of the impact of climate change on pathogens, pest of crops on sustainable food biosecurity. *Int. J. Ecotoxicol. Ecobiol.* 4(4): 114-124
55. Grettenberger I. M., Joseph S. V., 2019. Influence of starvation on walking behavior of *Bagrada hilaris* (Hemiptera: Pentatomidae). *PLoS One.* 14(4): 1-16

56. Gu M. L., Yang J., Tian X., Fang W. M., Xu J. P., Yin Y. Q. 2022. Enhanced total flavonoid accumulation and alleviated growth inhibition of germinating soybeans by GABA under UV-B stress. *RSC Adv.* 12(11): 6619–6630
57. Harborne J. B., Williams C. A. 2000. Advances in flavonoid research since. *Phytochemistry.* 55: 481-504
58. Hołtra, A., Zamorska-Wojdyła, D. 2020. The pollution indices of trace elements in soils and plants close to the copper and zinc smelting works in Poland's Lower Silesia. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 27: 16086–16099
59. Horoszkiewicz-Janki J., Mrówczyński M. 2012. *Metodyka zintegrowana.* IOR PIB Poznań. 47
60. Ibrahim M.H., Chee Kong Y., Mohd Zain N. A. 2017. Effect of cadmium and copper exposure on growth, secondary metabolites and antioxidant activity in the medicinal plant Sambung Nyawa (*Gynura procumbens* (Lour.) Merr). *Molecules.* 22(10): 1623
61. Inácio A.C., Vågsholm I., Jansson A., Vaga M., Boqvist S., Fraqueza M. J. 2021. Impact of starvation on fat content and microbial load in edible crickets (*Acheta domesticus*). *J. Insects Food Feed.* 7(7): 1143-1148
62. Jefferies H., Coster J., Khalil A., Bot J., McCauley R. D., Hall J. C. 2003. Glutathione. *ANZ J. Surg.* 73(7): 517-522
63. Jiang T., Ma L., Liu X.-Y., Xiao H.-J., Zhang W.-N., 2019. Effects of starvation on respiratory metabolism and energy metabolism in the cotton bollworm *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae). *J. Insect Physiol.* 119: 103951
64. Jiao W., Song B., Pan H., Liu X. 2024. Influences of Salt Stress on Cotton Metabolism and Its Consequential Effects on the Development and Fecundity of *Aphis gossypii* Glover. *Insects.* 15: 713
65. Kafel A., Babczyńska A., Zawisza-Raszka A., Tarnawska M., Płachetka-Bożek A., Augustyniak M. 2021. Energy reserves, oxidative stress and development traits of *Spodoptera exigua* Hübner individuals from cadmium strain. *Environ. Pollut.* 268: 115366
66. Kafel A., Rozpędek K., Szulińska E., Zawisza-Raszka A., Migula, P. 2014. The effects of cadmium or zinc multigenerational exposure on metal tolerance of *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae). *Environ. Sci. Pollut. Res.* 21(6): 4705–4715

67. Kafel A., Zawisza-Raszka A., Szulińska E. 2012. Effects of multigenerational cadmium exposure of insects (*Spodoptera exigua* larvae) on anti-oxidant response in haemolymph and developmental parameters. *Environ Pollut.* 162: 8-14
68. Kandziora-Ciupa M., Nadgórska-Socha A., Barczyk G., Ciepał R. 2017. Bioaccumulation of heavy metals and ecophysiological responses to heavy metal stress in selected populations of *Vaccinium myrtillus* L. and *Vaccinium vitis-idaea* L. *Ecotoxicology* 26: 966–980
69. Kapoor D., Kaur S., Bhardwaj R. 2014. Physiological and biochemical changes in *Brassica juncea* plants under Cd-induced stress. *Biomed Res. Int* 2014(1): 726070
70. Kazemi-Dinan A., Thomaschky S., Stein R. J., Krämer U., Müller C. 2014. Zinc and cadmium hyperaccumulation act as deterrents towards specialist herbivores and impede the performance of a generalist herbivore. *New Phytol.* 202(2): 628-639
71. Kim R-Y., Yoon J-K., Kim T-S., Yang J. E., Owens G., Kim K-R. 2015. Bioavailability of heavy metals in soils: definitions and practical implementation—a critical review. *Environ. Geochem. Health.* 37: 1041–1061
72. Kloubert V., Rink L. 2015. Zinc as a micronutrient and its preventive role of oxidative damage in cells. *Food Funct.* 6: 3195–3204
73. Koirala B K S., Moural T. Zhu F. 2022. Functional and structural diversity of insect glutathione s-transferases in xenobiotic adaptation. *Int. J. Biol. Sci.* 18(15): 5713–5723
74. Koźmińska A., Wiszniewska A., Hanus-Fajerska E., Boscaiu M., Al Hassan M., Halecki W., Vicente O. 2019. Identification of salt and drought biochemical stress markers in several *Silene vulgaris* populations. *Sustainability.* 11(3): 800
75. Kumar R., Rathor V S. 2020. Nature and types of damage by insect pests. *J. Ent. Res.* 44(4): 639-646
76. Laity J. H., Lee B. M., Wright P. E. 2001. Zinc finger proteins: new insights into structural and functional diversity. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 11(1): 39–46
77. Laštůvka Z. 2009. Climate Change and Its Possible Influence on the Occurrence and Importance of Insect Pests. *Plant Protect. Sci.* 45: Special Issue: S53–S62
78. Leitenmaier B., Küpper H. 2013. Compartmentation and complexation of metals in hyperaccumulator plants. *Front. Plant Sci.* 4: 374

79. Li L., Zhang Y., Ippolito J. A., Xing W., Qiu K., Yang H. 2020. Lead smelting effects heavy metal concentrations in soils, wheat, and potentially humans. *Environ Pollut.* 257: 113641
80. Liao L. H., Wu W. Y., Berenbaum M. R. 2017. Behavioral responses of honey bees (*Apis mellifera*) to natural and synthetic xenobiotics in food. *Sci. Rep.* 7: 15924
81. Liu Y., Xin Z. Z., Song J., Zhu X. Y., Liu Q. N., Zhang D. Z., Tang B. P., Zhou C. L., Dai L. S. 2018. Transcriptome analysis reveals potential antioxidant defense mechanisms in *Antheraea pernyi* in response to zinc stress. *J. Agric. Food Chem.* 66(30): 8132–8141
82. Lv J., Liu Y., Zhang Z., Dai J., Dai B., Zhu Y. 2015. Identifying the origins and spatial distributions of heavy metals in soils of Ju country (Eastern China) using multivariate and geostatistical approach. *J. Soils Sediments.* 15: 163–178
83. Ma Y., Li Y., Fang T., He Y., Wang J., Liu X., Wang Z., Guo G. 2023. Analysis of driving factors of spatial distribution of heavy metals in soil of non-ferrous metal smelting sites: Screening the geodetector calculation results combined with correlation analysis. *J. Hazard. Mater.* 445(5): 130614
84. Manan F.A., Mamat D.D., Samad A.A., Ong Y.S., Ooh K.F., Chai T.T. 2015. Heavy metal accumulation and antioxidant properties of *Nephrolepis biserrata* growing in heavy metal-contaminated soil, *Glob. Nest J.* 17(3): 544-554
85. Manikandan P., Rengalakshmi R. 2024. Influence of weather factors on population dynamics of major insect pests in Moringa (*Moringa oleifera* Lam.) in south Tamil Nadu. *J. Agrometeorol.* 26(2): 238–242
86. Marais J. P., Deavours B., Dixon R. A., Ferreira D., 2006. The stereochemistry of flavonoids. Springer Science. New York. 1-46
87. Martley E., Gulson B. L., Pfeifer H. R. 2004. Metal concentrations in soils around the copper smelter and surrounding industrial complex of Port Kembla, NSW, Australia. *Sci. Total Environ.* 325(1-3): 113-127
88. Masindi V., Muedi K. L. 2018. Environmental contamination by heavy metals. Heavy metals. *InTech.* 115-133
89. Matic D., Vlahović M., Kolarević S., Perić Mataruga V., Ilijin L., Mrdaković M., Vuković Gačić B. 2016. Genotoxic effects of cadmium and influence on fitness components of *Lymantria dispar* caterpillars. *Environ Pollut.* 218: 1270-1277

90. Matović V., Buha A., Đukić-Ćosić D., Bulat Z. 2015. Insight into the oxidative stress induced by lead and/or cadmium in blood, liver and kidneys. *Food Chem. Toxicol.* 78: 130-140
91. Mesnoua M., Mateos-Naranjo E., Barcia-Piedras J. M., Jesús Alberto Perez-Romero J. A., Lotmani B., Redondo-Gomez S. 2016. Physiological and biochemical mechanisms preventing Cd-toxicity in the hyperaccumulator *Atriplex halimus* L. *Plant Physiol. Biochem.* 106: 30-38
92. Mierziak J., Kostyn K., Kulma A. 2014. Flavonoids as important molecules of plant interactions with the environment. *Molecules.* 9(10): 16240-16265
93. Migula P., Łaszczyca P., Augustyniak M., Wilczek G., Rozpędek K., Kafel A., Wołoszyn M. 2004. Antioxidative defence enzymes in beetles from metal pollution gradient. *Biologia Bratislava.* 59(5): 645–654
94. Mishra B., McDonald L. M., Roy M., Lanzirotti A., Myneni S. C. B. 2020. Uptake and speciation of zinc in edible plants grown in smelter contaminated soils. *PLoS One.* 15(4): e0226180
95. Mol J., Grotewold E., Koes R. 1998. How genes paint flowers and seeds. *Trends Plant Sci.* 3: 212–217
96. Musilova J., Julius Arvay J., Vollmannova A., Toth T., Tomas J. 2016. Environmental contamination by heavy metals in region with previous mining activity. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 97: 569–575
97. Nadgórska-Socha A., Ciepał R. 2009. Phytoextraction of zinc, lead and cadmium with *Silene vulgaris* Moench (Garcke) in the Postindustrial Area. *Ecol. Chem. Eng. A.* 16(7): 831-837
98. Nadgórska-Socha A., Ciepał R., Kandziora M., Kafel A. 2009. Heavy metals bioaccumulation and physiological responses to heavy metal stress in populations of *Silene vulgaris* Moench (Garcke) from heavy metal contaminated sites. *Ecol. Chem. Eng. A.* 16: 389-397
99. Nadgórska-Socha A., Kandziora-Ciupa M., Ciepał R., Walasek K. 2011. Effects of Zn, Cd, Pb on physiological response of *Silene vulgaris* plants from selected populations. *Polish J. Environ. Stud.* 20(3): 599-604
100. Oliveira M. C., Morales-Silva T., Pereira P., Pec M., Souza L. A., Peñaflor M. F. G. V. 2024. Plant-mediated facilitation to conspecifics and heterospecifics by two phloem-feeding maize pests: The influence of insect identity and order of arrival. *Ecol. Entomol.* 49: 662–672

- 101.Osibanjo O., Nnorom I.C. 2007. The challenge of electronic waste (e-waste) management in developing countries. *Waste Manag. Res.* 25(6): 489-501
- 102.Pachura P., Ociepa-Kubicka A., Skowron-Grabowska B. 2016. Assessment of the availability of heavy metals to plants based on the translocation index and the bioaccumulation factor. *Desalin. Water Treat.* 57(3): 1469–1477
- 103.Pacwa-Płociniczak M., Płociniczak T., Yu D., Kurola J. M., Sinkkonen A., Piotrowska-Seget Z., Romantschuk M. 2018. Effect of *Silene vulgaris* and heavy metal pollution on soil microbial diversity in long-term contaminated soil. *Water Air Soil. Pollut.* 229: 13
- 104.Park J. H., Lamb D., Paneerselvam P., Choppala G., Bolan N., Chung J-W. 2011. Role of organic amendments on enhanced bioremediation of heavy metal(loid) contaminated soils. *J. Hazard. Mater.* 185(2-3): 549-574
- 105.Patel P., Raju N. J., Reddy B. C. S. R., Suresh U., Sankar D. B., Reddy T. V. K. 2018. Heavy metal contamination in river water and sediments of the Swarnamukhi River Basin, India: risk assessment and environmental implications. *Environ. Geochem. Health.* 40: 609–623
- 106.Peer W.A., Murphy A. S. 2007. Flavonoids and auxin transport: modulators or regulators? *Trends Plant Sci.* 12: 556–563
- 107.Peralta-Videa J. R., Lopez M. L., Narayan M., Saupe G., Gardea-Torresdey, J. 2009. The biochemistry of environmental heavy metal uptake by plants: implications for the food chain. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 41(8-9); 1665–1677
- 108.Peterson P., Fowler S. V., Barrett D. P. 2024. Low host-plant nitrogen contributes to poor performance of heather beetle, an introduced weed biocontrol agent in New Zealand. *Biol. Control* 197: 105589
- 109.Pi H., Xu S., Zhang L., Guo P., Li Y., Xie J., Tian L., He M., Lu Y., Li M., Zhang Y., Zhong M., Xiang Y., Deng L., Yu Z. 2013. Dynamin 1-like-dependent mitochondrial fission initiates overactive mitophagy in the hepatotoxicity of cadmium. *Autophagy.* 9(11): 1780–1800
- 110.Politycka B. 2007. *Fizjologia roślin.* red. Kozłowska M. 251-286. PWRiL. Poznań
- 111.Pompka, A., Szulińska, E., Kafel, A. 2022. Starvation and cadmium affect energy reserves and oxidative stress in individuals of *Spodoptera exigua*. *Ecotoxicology* 31: 1346–1355



112. Prakash M., Shetty M. S., Tilak P., Anwar N. 2009. Total thiols: biomedical importance and their alteration in various disorders. *Online J. Health Allied. Scs.* 8(2): 2
113. Prasad A. S., Bao B. 2019. Molecular mechanisms of zinc as a pro-antioxidant mediator: clinical therapeutic implications. *Antioxidants.* 8(6): 164
114. Rahman Z., Ved Pal Singh V. P. 2019. The relative impact of toxic heavy metals (THMs) (arsenic(As), cadmium (Cd), chromium (Cr)(VI), mercury (Hg), and lead (Pb)) on the total environment: an overview. *Environ. Monit. Assess.* 191: 419
115. Rasm, S., Mohamed A., Yousef, H.A. 2024. Impact of Exposure to Leaves From Metal-Polluted Sites on the Developmental Parameters of Larvae of the Dark Sword-Grass, *Agrotis ipsilon* (Lepidoptera: Noctuidae). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 87: 144–158
116. Re R., Pellegrini N., Proteggente A., Pannala A., Yang M., Rice-Evans C. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic. Biol. Med.* 26(9-10): 1231-1237
117. Riddick E.W., Wu Z., Eller F. J., Berhow M. A. 2018. Utilization of quercetin as an oviposition stimulant by lab-cultured *Coleomegilla maculata* in the presence of conspecifics and a tissue substrate. *Insects.* 9(3): 77
118. Romankow W. 1963. Szkodliwa entomofauna lucerny. *Prace Naukowe Instytutu Ochrony Roślin.* 5: 90-206
119. Roušar T., Kučera O., Lotková H., Cervinková Z. 2012. Assessment of reduced glutathione: comparison of an optimized fluorometric assay with enzymatic recycling method. *Anal. Biochem.* 423(2): 236–240
120. Ruan J., Xu Z. 2016. Constructing environment-friendly return road of metals from e-waste: Combination of physical separation technologies. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 54: 745–760
121. Saini R., Kumar D., Chauhan J., Jasrotia P. 2024. Panicle compactness along with abiotic factors influence the abundance of earhead feeding insect pests of sorghum [*Sorghum bicolor* (L.) Moench]. *Int. J. Trop. Insect Sci.* 44: 1785–1795
122. Sankhla M. S., Kumar R. 2019. Contaminant of heavy metals in groundwater & its toxic effects on human health & environment. *Int. J. Environ. Sci. Nat. Res.* 18(5): 1-5
123. Sarpong L., Boadi N. O., Nimako C., Bortey-Sam N., Akoto O. 2025. Contamination, health risk assessment, and spatial distribution of heavy metals in

- soils from gold mining district, Ghana. *Int. J. Environ. Sci. Technol.* 22, 10195–10218
124. Scharf I. 2016. Review: The multifaceted effects of starvation on arthropod behavior. *Anim. Behav.* 119: 37-48
  125. Seraj F., Rahman T. 2018. Heavy metals, metalloids, their toxic effect and living systems. *Am. J. Plant Sci.* 9: 2626-2643
  126. Sharma H., Rawal N., Mathew B. B. 2015. The characteristics, toxicity and effects of cadmium. *Int. J. Nanosci. Nanotechnol.* 3: 1-9
  127. Shi T., Hu Z., Shi Z., Guo L., Chen Y., Li Q., Wu G. 2018. Geo-detection of factors controlling spatial patterns of heavy metals in urban topsoil using multi-source data. *Sci. Total Environ.* 643(1): 451-459
  128. Shi Z. K., Wang S., Wang S. G., Zhang L., Xu Y.-X., Guo X.-J., Zhang F., Tang B., 2017. Effects of starvation on the carbohydrate metabolism in *Harmonia axyridis* (Pallas). *Biol. Open.* 6: 1096-1103
  129. Singh P., Mishra G., Omkar, 2021. Are the effects of hunger stage-specific? A case study in an aphidophagous ladybird beetle. *Bull. Entomol. Res.* 111(1): 66-72
  130. Sivakoff F. S., Rosenheim J. A., Dutilleul P., Carriere Y. 2013. Influence of the surrounding landscape on crop colonization by a polyphagous insect pest. *Entomol. Exp. Appl.* 149: 11–21
  131. Soleimani M., Amini N., Sadeghian B., Wang D., Fang L. 2018. Heavy metals and their source identification in particulate matter (PM<sub>2.5</sub>) in Isfahan City, Iran. *J. Environ. Sci.* 72: 166-175
  132. Stankovic S., Stankovic, A. R. 2013. Bioindicators of Toxic Metals. In: Lichtfouse, E., Schwarzbauer, J., Robert, D. (eds) *Green Materials for Energy, Products and Depollution. Environmental Chemistry for a Sustainable World.* vol 3. Springer. Dordrecht. pp. 151–228
  133. Stork N. E. 2018. How many species of insects and other terrestrial arthropods are there on earth? *Annu. Rev. Entomol.* 63: 31–45
  134. Su Q., Zhou Z., Zhang J., Shi C., Zhang G., Jin Z., Wang W., Li C. 2018. Effect of plant secondary metabolites on common cutworm, *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae). *Entomol. Res.* 48(1): 18–26
  135. Subramanian P., Kaliyamoorthy K., Jayapalan J. J., Abdul-Rahman P. S., Haji Hashim O. 2017. Influence of Quercetin in the Temporal Regulation of Redox Homeostasis in *Drosophila melanogaster*. *J. Insect Sci.* 17(2): 1-11

136. Sutkowska K., Czech T., Teper L., Krzykowski T. 2013. Heavy metals soil contamination induced by historical zinc smelting in Jaworzno Ecol. Chem. Eng. A. 20(12): 1441-1450
137. Sytar O., Ghosh S., Malinska H., Zivcak M., Brestic M. 2021. Physiological and molecular mechanisms of metal accumulation in hyperaccumulator plants. *Physiol. Plant.* 173(1): 148–166
138. Szasz G. G-glutamyltranspeptidase. 1974. Bergmeyer H. U., Gawehn K. Methods of enzymatic analysis. Verlag Chemie Weinheim. 715-719
139. Szuster-Ciesielska A., Stachura A., Słotwińska M., Kamińska T., Sniezko R., Paduch R., Abramczyk D., Filar J., Kandefer-Szerszeń M. 2000. The inhibitory effect of zinc on cadmium-induced cell apoptosis and reactive oxygen species (ROS) production in cell cultures. *Toxicology.* 145(2-3): 159–171
140. Tanaka Y., Sasaki N., Ohmiya A. 2008. Biosynthesis of plant pigments: anthocyanins, betalains and carotenoids. *Plant J.* 54(4): 733-749
141. Tang F., Zhang X., Liu Y., Gao X., Liu N. 2014. *In vitro* inhibition of glutathione S-transferases by several insecticides and allelochemicals in two moth species. *Int. J. Pest Manag.* 60(1): 33–38
142. Tchounwou P. B., Yedjou C. G., Patlolla A. K., Sutton D. J. 2012. Heavy Metal Toxicity and the Environment. In: Luch, A. (eds) *Molecular, Clinical and Environmental Toxicology. Experientia Supplementum.* vol 101. Springer. Basel. pp. 133-164
143. Terrin G., Berni Canani R., Di Chiara M., Pietravalle A., Aleandri V., Conte F., De Curtis M. 2015. Zinc in early life: a key element in the fetus and preterm neonate. *Nutrients.* 7(12): 10427-10446
144. Teršič T., Gosar M., Šajn R. 2009. Impact of mining activities on soils and sediments at the historical mining area in Podljubelj, NW Slovenia. *J. Geochem. Explor.* 100(1): 1–10
145. Thakur M., Shashi Rawat S. 2014. Effect of abiotic factors on population dynamics of insect pests and natural enemies in potato crop. *J. Agrometeorol.* 16(2): 187-191
146. Tian S., Xie R., Wang H., Hu Y., Hou D., Liao X., Brown P. H., Yang H., Lin X., Labavitch J. M., Lu L. 2017. Uptake, sequestration and tolerance of cadmium at cellular levels in the hyperaccumulator plant species *Sedum alfredii*. *J. Exp. Bot.* 68(9) 2387–2398

147. Tibebu B. 2018. Defense mechanisms of plants to insect pests: From morphological to biochemical approach. Trends Tech Sci Res. 2(2): 555584
148. Van Loon J. J. A., Wang C. Z., Nielsen J. K., Gols R., Qiu Y. T. 2002. Flavonoids from cabbage are feeding stimulants for diamondback moth larvae additional to glucosinolates: Chemoreception and behavior. Entomol. Exp. Appl. 104(1): 27-34
149. Verbruggen N., Hermans C., Schat H. 2009. Molecular mechanisms of metal hyperaccumulation in plants. New Phytol. 181: 759–776
150. Wang Z., Liu X., Qin H. 2019. Bioconcentration and translocation of heavy metals in the soil-plants system in Machangqing copper mine, Yunnan Province, China. J. Geochem. Explor. 200: 159-166
151. Wang Z., Nur F. A., Ma J., Wang J., Cao C. 2019. Effects of poplar secondary metabolites on performance and detoxification enzyme activity of *Lymantria dispar*. Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol. 225: 108587
152. Wani M. Y., Rather R. A., Bashir M., Shafi S., Rani S. 2018. Effect of zinc on the larval growth and quality cocoon parameters of silkworm (*Bombyx mori* L.): a review. Int. J. Fauna and Biol. Stud. 5(4): 31-36
153. War A. R., Paulraj M. G., Ahmad T., Buhroo A. A., Hussain B., Ignacimuthu S., Sharma H. C. 2012. Mechanisms of plant defense against insect herbivores. Plant Signal. Behav. 7(10): 1306-1320
154. War A.R., Taggar G.K., Hussain B., Taggar M.S., Nair R.M., Sharma H.C. 2018. Plant defence against herbivory and insect adaptations. AoB PLANTS. 10(4): ply037
155. Wen M., Ma Z., Gingerich D. B., Zhao X., Zhao D. 2022. Heavy metals in agricultural soil in China: A systematic review and meta-analysis. Eco-Environ. Health. 1(4): 219-228
156. Wheeler A. G., Thomas J. Henry. 1981. Seasonal history and habits of the european alfalfa beetle, *Subcoccinella vigintiquatuorpunctata* (L.) (Coleoptera: Coccinellidae). Coleopt. Bull. JSTOR. 35: 197–203
157. Wheeler D. A., Isman M. B., Sanchez-Vindas P. E., Arnason J. T., 2001. Screening of Costa Rican *Trichilia* species for biological activity against the larvae of *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae). Biochem. Syst. Ecol. 29: 347-358
158. Whitfield A. E., Falk B.W., Rotenberg D. 2015. Insect vector-mediated transmission of plant viruses. Virology. 479-480: 278–289

159. Wilczok E. 2012. Huta cynku Uthemann. Szopienice.PL.  
<https://szopienice.pl/2012/12/25/huta-uthemann/> [dostęp: 25.08.2025]
160. Winkel B. S. J. 2006. The science of flavonoids. Ed. Grotewold E. Springer. New York. 71-97
161. Winkel-Shirley B. 2001. Flavonoid biosynthesis. A colorful model for genetics, biochemistry, cell biology, and biotechnology. *Plant Physiol.* 126(2): 485-493
162. Wu J., Lv S., Zhao L., Gao T., Yu C., Hu J., Ma F. 2023. Advances in the study of the function and mechanism of the action of flavonoids in plants under environmental stresses. *Planta.* 257: 108
163. Wu X., Cobbina S. J., Mao G., Xu H., Zhang Z., Yang L. 2016. A review of toxicity and mechanisms of individual and mixtures of heavy metals in the environment. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 23(9): 8244–8259
164. Xie X., Liu Y., Qiu H., Yang X. 2023. Quantifying ecological and human health risks of heavy metals from different sources in farmland soils within a typical mining and smelting industrial area. *Environ. Geochem. Health.* 45: 5669–5683
165. Xie Y., Wang S., Wan S., Chen L., Shen Q., Zhao K., Tao S., Zhou W., Zhang X., Tan X., Xie B., Tang B. 2024. The stress response of aphids to the accumulation of heavy metals along *Vicia faba* L. under cadmium treatment. *Insects.* 15(12): 999
166. Xing W., Liu H., Banet T., Wang H., Ippolito J. A., Li, L. 2020. Cadmium, copper, lead and zinc accumulation in wild plant species near a lead smelter. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 198: 110683
167. Xu D.-M., Fu R.-B., Liu H.-Q., Guo X.-P. 2021. Current knowledge from heavy metal pollution in Chinese smelter contaminated soils, health risk implications and associated remediation progress in recent decades: A critical review. *J. Clean. Prod.* 286: 124989
168. Yactayo-Chang J. P., Mendoza J., Willms S. D., Rering C. C., Beck J. J., Block A. K. 2021. *Zea mays* Volatiles that Influence Oviposition and Feeding Behaviors of *Spodoptera frugiperda*. *J. Chem. Ecol.* 47: 799–809
169. Yang S., Ruuhola T., Rantala M. J., 2007. Impact of starvation on immune defense and other life-history traits of an outbreaking geometrid, *Epirrita autumnata*: a possible casual trigger for the crash phase of population cycle. *Ann. Zool. Fennici.* 44: 89-96

170. Yepiskoposyan H., Egli D., Fergestad T., Selvaraj A., Treiber C., Multhaup G., Georgiev O., Schaffner W. 2006. Transcriptome response to heavy metal stress in *Drosophila* reveals a new zinc transporter that confers resistance to zinc. *Nucleic Acids Res.* 34(17): 4866–4877
171. Yildirim H., Bekircan Ç., Bektaş E. 2019. Antifeedant effects of essential oil of *Mentha longifolia* subsp. *longifolia* L. HUDSON (Lamiaceae) on *Subcoccinella vigintiquatuorpunctata* L. (Coleoptera: Coccinellidae). *Biol. Diversity Conservation* 12(2): 103-108
172. Yu D., Wang J., Wang Y., Du X., Li G., Li B. 2021. Identifying the source of heavy metal pollution and apportionment in agricultural soils impacted by different smelters in China by the positive matrix factorization model and the Pb isotope ratio method. *Sustainability.* 13(12): 6526
173. Yu S.J., 1982. Host plant induction of glutathione S-transferase in the fall army worm. *Pestic. Biochem. Physiol.* 18: 101-106
174. Zeng F., Ali S., Zhang H., Ouyang Y., Qiu B., Wu F., Zhang G. 2011. The influence of pH and organic matter content in paddy soil on heavy metal availability and their uptake by rice plants. *Environ. Pollut.* 159(1): 84-91
175. Zhan H., Zhang J., Chen Z., Huang Y., Ruuhola T., Yang S. 2017. Effects of Cd<sup>2+</sup> exposure on key life history traits and activities of four metabolic enzymes in *Helicoverpa armigera* (Lepidopteran: Noctuidae). *Chem. Ecol.* 33(4): 325–338
176. Zhang H. Y., Qi S. S., Dai Z. C., Zhang M., Sun J. F., Du D. L. 2017. Allelopathic potential of flavonoids identified from invasive plant *Conyza canadensis* on *Agrostis stolonifera* and *Lactuca sativa*. *Allelopathy J.* 41(2): 223-238
177. Zhang J., Jiang D., Dong X., Meng Z., Yan S. 2020. Accumulation of Cd and Pb in various body parts, organs and tissues of *Lymantria dispar asiatica* (Lepidoptera: Erebidae). *J. Asia-Pac. Entomol.* 23(4): 963-969
178. Zhang Y. P., Song D. N., Wu H. H., Yang H. M., Zhang J. Z., Li L. J., Ma E. B., Guo Y. P. 2014. Effect of dietary cadmium on the activity of glutathione s-transferase and carboxylesterase in different developmental stages of the *Oxya chinensis* (Orthoptera: Acridoidea). *Environ. Entomol.* 43(1): 171–177
179. Zhang Y., Xiong W., Yang S., Ai H., Zou Z., Xia B. 2022. Effects of long-term exposure to cadmium on development, reproduction and antioxidant enzymes of *Aleuroglyphus ovatus* (Acari: Acaridae). *Insects.* 13(10): 895

180. Zhang Y., Zhang S., Xu L. 2023. The pivotal roles of gut microbiota in insect plant interactions for sustainable pest management. *npj Biofilms Microbiomes*. 9:66
181. Zhao S., Shi X., Li C., Zhang H., Wu Y. 2014. Seasonal variation of heavy metals in sediment of Lake Ulansuhai, China. *Chem. Ecol.* 30(1): 1–14
182. Zou Y., Lu Y., Wei D. 2004. Antioxidant activity of flavonoid-rich extracts of *Hypericum perforatum* L. in vitro. *J. Agric. Food Chem* 52: 5032-5039
183. Zwolak A., Sarzyński, M., Szpyrka E., Stawarczyk K. 2019. Sources of Soil Pollution by Heavy Metals and Their Accumulation in Vegetables: a Review. *Water Air Soil Pollut.* 230: 164