

MARIA GWIAZDA, EDMUND BAKUNIAK
Instytut Przemysłu Organicznego w Warszawie

GENETYCZNE ASPEKTY OPORNOŚCI STAWONOGÓW NA PESTYCYDY

Intensywne stosowanie chemicznego zwalczania szkodników doprowadziło w krótkim czasie do powstawania populacji opornych [7, 11]. Oporność na pestycydy pojawiła się także w Polsce i to zarówno w sektorze sanitarnym [18], jak i wśród szkodników roślin rolniczych uprawianych w polu oraz w szklarniach [9, 10]. Liczne badania wykazały, iż zjawisko to, mające charakter predaptacyjny, powstaje wskutek selekcji pestycydem populacji heterogennych pod względem cechy oporności [1].

Na rozwój oporności na insektycydy w jakiejś populacji wpływają 3 rodzaje czynników: genetyczne, aplikacyjne i biologiczno-ekologiczne [15]. Spośród czynników genetycznych należy wymienić tzw. potencjał genetyczny (obecność genów oporności i genów pomocniczych), frekwencję genów oporności, liczbę i kombinacje genów oporności, stopień oporności uzyskany przez jeden gen lub kombinację genów, dominację lub recesywność genów oporności i przystosowalności opornych genotypów.

Czynniki związane z aplikacją, to przede wszystkim nacisk selekcyjny, którego intensywność określa, liczebność populacji (poddanej selekcji, liczba selekcionowanych pokoleń i poziom uzyskanej śmiertelności i bezpłodności. Wpływ ma również stadium rozwojowe owada, rodzaj użytego związku chemicznego, droga aplikacji, a także rodzaj stosowanych uprzednio insektycydów.

Do biologiczno-ekologicznego zespołu czynników wpływających na rozwój opornych populacji należą: liczba pokoleń w roku, względna izolacja populacji, jej zagęszczenia, szybkość wzrostu i struktury płodności, zmienność warunków ekologicznych w czasie i przestrzeni oraz selekcja naturalna włącznie z koadaptacją.

Badania prowadzone szerokim frontem na wszystkich kontynentach wykazały, iż liczba opornych gatunków szkodników stale wzrasta (tab. 1) stwarzając poważny problem w ochronie żywności.

Badania nad dziedziczeniem charakteru oporności wykazały, iż prawie we wszystkich przypadkach chodzi o allelizm jednego głównego genu [2]. Pojedyncze geny były odpowiedzialne za oporność na DDT u 11 gatunków, na dieldrynę u 18 gatunków, na związki fosforo-organiczne u 6 gatunków, na karbaminiany u 2 gatunków (tab. 2). Natomiast oporność

Tabela 1

Liczba opornych gatunków szkodników [9]

Szkodniki	1963 r.	1975 r.
Sanitarne	79	108
Rolnicze	78	142
	157	250

Tabela 2

Monofaktorialna dziedziczność oporności na insektycydy [2]

DDT	Dieldryna	Związki fosforo-organiczne	Karbaminiany
D <i>Musca</i> <i>Culex fatigans</i> <i>Drosophila</i>	P <i>Musca</i> <i>Anopheles</i> 6 podg. <i>C. fatigans</i> <i>A. aegypti</i>	D <i>Musca</i> <i>Chrysomyia</i> <i>C. tarsalis</i> <i>Tetranychus</i> 2 gat.	D <i>Musca</i> <i>Drosophila</i>
P <i>Aedes aegypti</i> <i>Euxesta</i>	<i>Phaenicia</i> <i>Chrysomyia</i> <i>Hylemyia</i> 2 gat. <i>Euxesta</i> <i>Blatella</i> <i>Cimex</i> <i>Pediculus</i>	<i>Boophilus</i>	
R <i>Anopheles</i> , 4 podg. <i>Blatella</i> <i>Boophilus</i>			

D = dominująca

P = pośrednia

R = recesywna

na DDT u 2 gatunków karaczanów i *Drosophila* była uwarunkowana wieloma genami. Podobnie wieloczynnikową okazała się oporność na malation u *Aedes aegypti*, na propoksur u *Culex fatigans* i na arseniany u *Carpocapsa pomonella* [3].

Cecha oporności na insektycydy fosforoorganiczne i karbaminiany była zwykle dominująca. Oporność na związki cyklodienowe miała prawie zawsze charakter pośredni. Oporność na DDT zwykle była recesywna, u *A. aegypti* i *Euxesta notata* była pośrednia, a u *Musca domestica* i *Culex fatigans* — dominująca.

Badania genetyczne odegrały dużą rolę w zrozumieniu mechanizmów oporności, występujących u szczepów niektórych gatunków. Dzięki nim można:

- a) oznaczyć liczbę czynników i ich lokalizację na chromosomach,
- b) izolować poszczególne czynniki i identyfikować mechanizmy oporności,
- c) oznaczyć łączny efekt 2 lub więcej mechanizmów detoksykujących.

Metody oznaczania sprzężenia czynników oporności

Analizę genetyczną prowadzi się drogą powtarzanych krzyżówek wstecznych między szczepem wrażliwym a opornym, oceniając efekt działania insektycydu na podstawie zależności między dawką a śmiertelnością. Dokładniejszą analizę umożliwia użycie w tych badaniach mutantów wizualnych sprzężonych z genami oporności, których występowanie stwierdzono u różnych gatunków szkodników o znaczeniu sanitarnym i rolniczym [12]. Najwięcej prac wykonano z gatunkami *Drosophila melanogaster* Meig. i *Musca domestica* L. ze względu na to, iż genetyka tych gatunków jest poznana najlepiej [20]. Szczególnie dużo mutantów

Tabela 3

Lokalizacja niektórych markerów na autosomach muchy domowej [22]

Chromosom	Marker *
I	ac, acv, ab
II	ar, car, cm
III	bwb, dv, bw, w, ro
IV	ct, rb, ext
V	ocra, Lp, Iv

* — skróty oznaczeń angielskich

wizualnych o cechach zwanych markerami (znacznikami) wykryto u muchy domowej. W tabeli 3 przedstawiono lokalizację niektórych markerów na autosomach muchy domowej. Nie stwierdzono ani markerów ani sprzężonych genów oporności na chromosomie VI, determinancie płci [22].

Efektywność działania insektycydu w pokoleniu F₁ pozwala na ocenę z grubsza genetycznego charakteru oporności, np. czy jest ona heterogenna czy homogenna, cytoplazmatyczna czy chromosomalna, dominu-

jąca czy recesywna. Na tym etapie badań użycie markerów nie jest konieczne, a dalsza hodowla lub krzyżówki wsteczne ze szczepem rodzicielskim mogą być pomocne dla określenia sposobu dziedziczenia oporności.

Jednakże wyciąganie wniosków na podstawie interpretacji linii zależności między dawką a śmiertelnością jest często utrudnione i mylące, zwłaszcza gdy oporność jest kontrolowana przez wiele genów. Dla ustalenia, na którym chromosomie jest zlokalizowany gen oporności, należy wykonać krzyżówkę wsteczną F_1 — samce. Tutaj konieczne jest użycie szczepu znaczonego, szczególnie na wielu chromosomach. Badacze japońscy [22] stosują szczep: bwb (III), ocra (V), ar (II), ac (I) oraz: ro (III), ext (IV), cm (II), acv (I).

Trzecim stopniem genetycznej analizy oporności jest oznaczenie loci genu na znanej mapie chromosomu. Osobniki żeńskie pokolenia (F_1) ze skrzyżowania szczepu opornego z markerem krzyżuje się z osobnikami męskimi mutanta markera. Zwykle do tego celu trzeba użyć co najmniej 2 markerów. Następnie zaś oblicza się wartość rekombinacji [21] między genami.

Genetyka oporności u muchy domowej

Mucha domowa jest obiektem powszechnie używanym w badaniach genetyki oporności, tak ze względu na znajomość genetyki formalnej tego gatunku, jak i na łatwość hodowli i powstawania oporności na wiele związków chemicznych. Dlatego też analiza genetyczna oporności u muchy domowej jest najlepiej opracowana (tab. 4).

O p o r n o ś ć n a D D T. Oporność na DDT jest kontrolowana przez co najmniej 3 czynniki, a wg Oppenoortha [13] przez 4. Najważniejszy z nich, Deh, warunkujący aktywność detoksykującego enzymu DDT — dehydrochlorinazy, znajduje się na chromosomie II w pobliżu markera car [5,16,17,19,22]. Jest on niecałkowicie dominujący i jest odpowiedzialny za oporność na DDT i jego łatwo dehydrochlorowane analogi jak np. TDE, natomiast nie odszczepia chlorowodoru z cząsteczki metoksychloru i Dilanu. Występuje w różnych formach allelicznych [17], które powodują zróżnicowanie poziomu oporności. DDTazę inhibują FDMC (1,1-bis-4-chlorofenylo (-2,2,2-trójfluoroetanol) i WARF-antiresistant (N,N-dibutylo-p-chlorobenzenosulfonamid).

Dalszymi genami przyczyniającymi się do oporności na DDT są recesywne geny kdr i kdr-O, znajdujące się na chromosomie III. Geny te, [2] są odpowiedzialne za oporność na porażenie systemu nerwowego nie tylko przez DDT, ale także przez chlorowane węglowodory, które nie mogą być dehydrochlorowane oraz pyretroidy. Mechanizmy te nie są

Tabela 4

Lokalizacja genetycznych czynników oporności u muchy domowej [9]

Chromosom	Określenie czynnika oporności	Mechanizm biochemiczny	Zakres oporności
II	Deh a	DDT-dehydrochlorinaza fosfataza	DDT, TDE wiele związków fosforoorganicznych
	NIC	oksydazy o funkcjach mieszanych	diazinon, diazoxon dithion, paration
	R Baygon	oksydazy o funkcjach mieszanych	kumafos-oxon-karbaminiany
	Ox	epoksydaza aldryny	zwiększona aktywność oksydaz mikrosomalnych — wpływ na oporność nieznany
	DMS	oksydacje nie inhibowane przez Sezamex	dimetoat, dimetoxon, wiele związków fosforoorganicznych, sezamex
	gst	aktywność transferazy-S- -glutationu	diazinon diazoxon paration, azinfosmetyl synergizowane
	py-ex		pyretryny naturalne i pyretroidy syntetyczne
III	kdr	„knock-down”	DDT, metoksychlor, pyretroidy (16, 17)
	kdr — O kdr NPR	„knock-down” opóźnienie „knock-down” blokowane przez sezamex	(szczep Orlando) pyretryny, DDT
	pen	zwolnione przenikanie	DDT, dieldryna, diazoinon, pyretryny
IV	pen (tin) dld ₁	zwolnione przenikanie	związki cynoorganiczne dieldryna i inne cyklodienowe, HCH
	V	ses DDT-md	detoksykacja mikrosomalna
		py-ses	mechanizm blokowany przez sezamex

blokowanie przez synergetyki z grupy związków metylenodwuoksyfenyloowych. Wreszcie, na V chromosomie znajduje się gen nazywany ses lub DDT-md [17], o pośredniej dominacji, który kontroluje oksydazy o funkcjach mieszanych, degradujące DDT u szczepów selekcjonowanych związkami fosforoorganicznymi, a być może także pyretrynami.

Oporność na HCH i dieldrynę. Zarówno biochemiczne jak i genetyczne przyczyny oporności na HCH mimo wielu badań, nie są w pełni wyjaśnione i przypuszcza się, że jest ona wynikiem udziału wielu

genów zlokalizowanych u niektórych szczepów na chromosomach: I, II, III i V u innych zaś na II, III i V [22]. Oppenoorth i Nasrat [14] stwierdzili natomiast, iż główny gen oporności na HCH jest zlokalizowany na chromosomie IV. Również na IV chromosomie znajduje się gen oporności na dieldrynę, która jest monofaktorialna. Oprócz tego na II chromosomie znajduje się czynnik Ox, odpowiedzialny za zwiększoną aktywność oksydaz mikrosomalnych, związanych prawdopodobnie z opornością na aldrynę.

Oporność na insektycydy fosforoorganiczne. Za oporność na insektycydy fosforoorganiczne odpowiedzialnych jest wiele mechanizmów i rządzących nimi genów, z których jeszcze nie wszystkie zostały poznane. Najlepiej znaną przyczyną oporności opracowaną przez badaczy holenderskich [13] jest karboksyesteraza zmodyfikowana w kierunku aktywności fosfatazowej, określana jako czynnik a, zlokalizowany na II chromosomie. Występuje on w postaci licznych alleli, różniących się specyficznością.

U wielu szczepów much opornych na związki fosforoorganiczne gen *gst* (transferaza — S-glutationu) znajduje się na II chromosomie blisko genu *a* Gen DDT-md lub *ses* na V chromosomie jest odpowiedzialny za oporność na te insektycydy fosforoorganiczne, które nie są rozkładane przez mechanizm związany z genem *a*. U szczepu NIC stwierdzono występowanie oksydaz kontrolowanych przez gen na chromosomie II.

Silną oporność na dimetoxon i umiarkowaną na dimetoat stwierdzono u szczepu 49r₂b, selekcjonowanego dimetoatem. Czynnik warunkujący tę oporność nazwano DMS i zlokalizowano na chromosomie II, blisko markera *ar*. Znajdujący się na chromosomie III gen *pen* jest odpowiedzialny za zwolnione przenikanie różnych związków jak DDT, dieldryny, diazinonu, niektórych związków cynoorganicznych.

Oporność na karbaminiany, takie jak karbaryl, Isolan, wydaje się być kontrolowana głównie przez gen na chromosomie V lub przez 2 czynniki, na chromosomie II i V [22].

Oporność na Baygon i Matacil u szczepu opornego na Baygon i diazinon, była uwarunkowana genami na V, III i II chromosomie.

Oporność na pyretryny. Za oporność na związki pyretrynowe odpowiedzialne są 4 czynniki [4]. Są to: *py-ses* na V chromosomie, którego mechanizm oporności na naturalne pyretryny może być zablokowany sezameksem i *py-ex*, zlokalizowany na II chromosomie i wywołujący wysoką oporność na synergizowane pyretryny naturalne i na pyretroidy syntetyczne, lecz nie na same naturalne pyretryny. Następnym czynnikiem ograniczającym toksyczność związków pyretrynowych jest *pen*, zmniejszający szybkość przenikania insektycydów przez kutikulę oraz *kdr-NPR*, ogólny mechanizm oporności na pyretryny. Te ostatnie geny znajdują się na chromosomie III.

• *Potrzeby badawcze*

Dla poznania mechanizmów oporności potrzebne są dalsze badania idące zasadniczo w 2 kierunkach, a mianowicie:

- a) oddzielenie i lokalizacja pojedynczych czynników oporności zwłaszcza u wielu gatunków szkodników rolniczych,
- b) studia nad mechanizmami biochemicznymi związanymi z poszczególnymi genami oporności.

Na dalszym planie powinny być także badania nad interakcjami między mechanizmami oporności na ten sam insektycyd, w przypadku gdy za daną oporność odpowiedzialnych jest kilka czynników.

Należy podkreślić znaczenie tego rodzaju badań dla praktyki, gdyż dopiero znajomość biochemicznej genetyki oporności pozwala na prawidłowe stosowanie związków użytych do zwalczania szkodników. Chodzi tu szczególnie o właściwą sekwencję środków po sobie, selekcja bowiem jakimś insektycydem jednego lub więcej genów prowadzi zwykle do tzw. oporności krzyżowej. W Polsce wykonano dotąd nieliczne prace nad genetyką [19] i mechanizmami oporności [6,8], chociaż względy ekonomiczne oraz ochrony środowiska wymagają pilnego ich rozszerzenia. Szczególnie troskliwego opracowania potrzebują nowe środki, zanim zostaną wprowadzone do praktyki rolniczej.

Z niniejszego przeglądu wynika, iż dopiero badania genetyczne mogą dać pewność co do biochemicznych przyczyn oporności. Badania takie mogą być prowadzone jedynie w wyspecjalizowanych laboratoriach z udziałem dobrych genetyków i biochemików.

Najpilniejszą potrzebę dla szerokiej praktyki rolniczej stanowi jednak wczesne wykrywanie oporności szkodników w polu. O metodach pomiaru poziomu oporności jak i sposobach zapobiegania i zwalczania populacji opornych pisze obszernie Gwiazda w odrębnym artykule [9].

LITERATURA

1. Bakuniak E., Gwiazda M.: Zesz. Probl. Post. Nauk Rol. Z. 60, 251—264, 1966.
2. Brown A.W.A.: World Review of Pest. Control, Vol. 6, Nr 4, 104—114, 1967.
3. Brown A.W.A.: Pal R.: Insecticide resistance in Arthropods, WHO Geneva 1971.
4. Farnham A.W.: Pestic. Sci., 4, 513—520, 1973.
5. Goszczyńska K., Styczyńska B.: Roczn. PZH, 23, Nr 3, 301—309, 1972.
6. Gwiazda M., Lord K.A.: Ann. appl. Biol. 59, 221—232, 1967.
7. Gwiazda M.: Pestycydy, nr 4, 1—16, 1971.
8. Gwiazda M.: P. Pismo Entom. 42/2, 461—482, 1972.
9. Gwiazda M.: „Entomologia a intensyfikacja rolnictwa” PWN s. 201—217. 1979.
10. Łakocy A.: Biul. IOR 47, 89—103, 1970.
11. Łakocy A.: Prace Nauk. IOR, 14, 15—83, 1973.
12. Milani R.: Misc. Publ. Entom. Soc. America, 75—83, 1973.
13. Oppenoorth F.J.: Ann. Rev. Entomol. 10, 185—206, 1965.
14. Oppenoorth R.J.: Nasrat G.E.: Ent. exp. appl., 9, 223—231, 1966.
15. Resistance of vectors and reservoirs of disease to pesticides Twenty-second Report of the WHO Expert Committee on Insecticides, Technical Report Series 585, WHO, Geneva 1976.
16. Rupeš V., Pinterova J.: Acta entomol. bohemoslovaca, 73, No 5 293—301, 1976.
17. Sawicki R.M.: Pestic. Sci. 4, 501—512, 1973.
18. Styczyńska B.: Ocena ustoiczivosti k insektidam wrednych s sanitarnoj toczki zrenija nasekomych na territorii Polszy, Mat. Symp. RWPG w temacie „Mechanizmy dzialania insektycydow” Sopot, 1974.
19. Styczyńska B., Krzemińska A.: Roczn. PZH. Nr 4, 465—472, 1974.
20. Tsukamoto M.: Methods for the linkage group determination of insecticide resistance factors in the housefly, Botyu Kagaku, 29, III, 50—60, 1964.
21. Tsukamoto M.: Japan. J. Genetics, Vol. 40, No 3, 159—171, 1965.
22. Tsukamoto M.: Res. Rev. 25, 289—314, 1969.