

BOGUMIŁA STYCZYNSKA ALICJA KRZEMINSKA

GENETYCZNE ASPEKTY OPORNOŚCI NA INSEKTYCYDY U *MUSCA DOMESTICA* L.

CZĘŚĆ I. CHARAKTER OPORNOŚCI NA DDT U DZIKIEGO SZCZEPU
MUCHY DOMOWEJ (*M. DOMESTICA* L.) ODŁOWIONEGO Z OKOLIC
WARSZAWY

Z Zakładu Toksykologii Sanitarnej Państwowego Zakładu Higieny w Warszawie
Kierownik: doc. dr hab. T. Syrowatka

*Wykazano, że oporność na DDT u dzikiego szczepu much (*M. domestica* L.) odłowionych z okolic Warszawy jest uwarunkowana dwoma czynnikami genetycznymi, związanymi z chromosomem II i III.*

Pojawienie się coraz liczniejszych populacji owadów opornych na stosowane insektycydy, spowodowało wzrost zainteresowania genetyką oporności. W roku 1951 *Harrison* [1] po raz pierwszy odkrył dziedziczenie czynnika oporności na porażenie „knock down” pod wpływem DDT u włoskiego szczepu muchy domowej *M. domestica* L. Od tego czasu datuje się gwałtowny wzrost prac nad dziedziczeniem oporności. Zebrano znaczny zasób wiadomości z genetyki formalnej owadów, szczególnie zaś muchy domowej [2, 3, 4], u której zanotowano ponad 100 mutacji lub aberacji. U połowy tych mutantów oznaczano już sprzężenie tych mutacji z chromosomem (linkage group), a dla jednej trzeciej miejsce genu na chromosomie. Otrzymanie różnych szczepów znaczonej muchy domowej (markerów), spowodowało dalszy rozwój badań nad genetyką oporności.

Prace oparte na markerach branych do krzyżówek z badanym szczepem opornym wyjaśniają problem liczby czynników decydujących o dziedziczeniu oporności na niektóre insektycydy.

Geny oporności na różne insektycydy rozmieszczone są na różnych somatycznych chromosomach.

U muchy domowej posiadającej 6 par chromosomów wykryto jak podaje *Brown* [5] trzy czynniki kierujące opornością na DDT.

Najważniejszy gen oporności na DDT i gen specyficzny odpowiedzialny za śmiertelność znajduje się na chromosomie II-gim w pobliżu markera *car* (czerwone oczy). Jest to gen, który warunkuje wytworzenie detoksykacyjnego enzymu DDT — dehydrochlorynazy.

Drugi gen oporności decydujący o wrażliwości nerwowej pod wpływem DDT, umieszczony jest na chromosomie III-cim. Na tym samym chromosomie położony jest gen brązowej barwy ciała. Trzeci gen opornościowy na DDT wykryto u duńskiego szczepu much na chromosomie V-tym, i uznano za kierujący pewnym typem detoksykacji.

Celem pracy było wykazanie jakie czynniki genetyczne warunkują oporność na DDT u dzikiego szczepu much odłowionych z okolic Warszawy.

MATERIAŁY

Owady testowe

1. Szczep oporny na DDT, oznaczony symbolem RW. Przywieziony z terenu do laboratorium wykazał 12-krotną oporność na DDT w porównaniu do wrażliwego szczepu hodowlanego. Szczep ten poddany został dalszej selekcji (przez 24 pokolenia) na DDT w celu zwiększenia oporności.

W chwili brania do doświadczeń LD_{50} wynosiło 220 $\mu\text{g}/\text{owada}$.

2. Szczep wrażliwy znaczony trzema wizualnie różnymi cechami: acv — brak żyłki anterior na skrzydle markera — chromosom I; car — czerwone oczy — chromosom II; bwb — brązowe ciało — chromosom III. (Według starej nomenklatury bwb II; car V; acv VI). Szczep otrzymany z Holandii (Laboratory for Research on Insecticides).

Insektycydy

DDT — przekrystalizowany z produktu technicznego izomer p,p' — DDT o temp. topnienia 109 — 111°C.

METODYKA

1. Selekcja szczepu dzikiego RW

Selekcję much prowadzono metodą *Sawickiego i Farnhama* [6]. W kolejnych pokoleniach podwyższając dawkę insektycydu tak, aby po selekcji śmiertelność much wynosiła powyżej 60%. Dwudzieste czwarte pokolenie selekcjonowano 1% roztworem acetonowo-wodnym (7:3) DDT.

2. Oznaczanie wrażliwości much na DDT

Oznaczanie wrażliwości much na DDT wykonano metodą mikrodawkowania kontaktowego nanosząc p,p' DDT rozpuszczone w 1 μl acetonu na grzbietową stronę tułowia 1—2 dniowych much. Stosowano dawki w zakresie od 0,15 do 320 $\mu\text{g}/\text{muchę}$. Śmiertelność much sprawdzano po 24 godzinach. Owady silnie porażone liczone jako martwe.

Badania wrażliwości i oporności szczepów much potomstwa w celu otrzymania linii regresji dawka — śmiertelność prowadzono zwykle na 60 samicach i samcach dla każdej dawki. Stosowano dawki: dla szczepu wrażliwego acv; car; bwb w zakresie od 0,009 do 0,15 $\mu\text{g}/\text{muchę}$, a dla szczepu opornego na DDT (RW) od 20 do 320 $\mu\text{g}/\text{muchę}$.

3. Krzyżowanie szczepów

W celu uzyskania odpowiedzi, czy czynnik genetyczny jest dominujący czy recesywny, badano na oporność na DDT mieszańce F_1 . Do krzyżowania masowego brano zwykle po 100 dziewiczych samic i samców zebranych w ciągu 10 godzin po wylocie.

Do dalszych badań brano otrzymane w wyniku krzyżowania potomstwo F_1 łącznie z krzyżówek a + b, potomstwo z krzyżówki wstecznej (BC) oraz pokolenie drugie (F_2) z tzw. krzyżówki wsobnej tab. I.

Tabela I
Krzyżowanie owadów według schematu

Krzyżówka	Liczba łącznych owadów
I	a) ♀ 25 acv, car, bwb × 25 ♂ RW → F ₁ b) ♂ 25 acv, car, bwb × 25 ♀ RW
II	25 ♀ acv, car, bwb × 25 F ₁ ♂ (RW ♀ × acv, car, bwb ♂) krzyżówka wsteczna BC
III	25 ♀ F ₁ × 25 ♂ F ₁ → F ₂ krzyżówka wsobna

Użycie do krzyżówki wstecznej samców F₁ powodowane było tym, że u samców muchy domowej nie występuje zjawisko tzw. „crossing-over” [7]. W takim systemie krzyżowania każdy chromosom zachowuje się jako pojedynczy czynnik.

Prowadzono krzyżówkę wsteczną z markerami wrażliwymi, zakładając, że jeden z czynników oporności ma charakter dominujący.

W badaniach wrażliwości na DDT pokolenie F₁, F₂ i BC traktowano dawkami w zakresie od 0,15 do 160 µg/muchę.

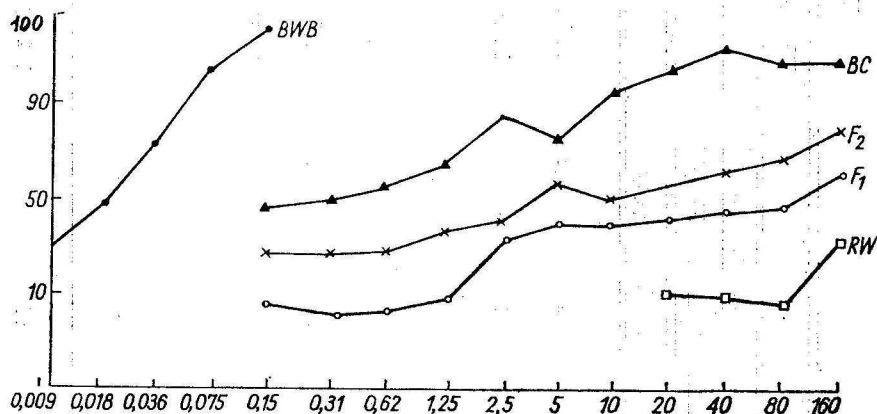
Śmiertelność much kontrolowano po 24 godzinach, po czym otrzymane procenty śmiertelności nanoszono na papier logarytmiczno-probity, wykreślając linie regresji dawka — śmiertelność.

Dawki korygowano w stosunku do ciężaru ciała much według wzoru:

$$\frac{\text{ciężar teoretyczny ciała owada}^*)}{\text{ciężar teoretyczny ciała owada}^o)} = \text{wskaźnik}$$

Wskaźnik stanowi mnożnik dla stosowanych dawek.

Otrzymane wyniki przedstawiono graficznie (ryc. 1).



Ryc. 1. Poziom oporności na DDT u dzikiego szczepu odlowionego z okolic Warszawy RW, szczepu wrażliwego markera i ich potomstwa.

Genetyczną analizę oporności prowadzono na jednodniowych muchach obu płci. Traktowano jedną dawką całe potomstwo otrzymane z krzyżówki wstecznej (BC) — 10 µg DDT/muchę, natomiast pochodzące z krzyżowania hybryd F₁, pokolenie F₂ — dawką 20 µg DDT/muchę. Doświadczenie powtarzano dwukrotnie. Każdorazowo na pokoleniach much otrzymanych z 2—3 kładek jaj.

*) — samica 20 mg, samiec 15 mg.

T a b e l a II

Genetyczna analiza dominującego czynnika opornościowego na DDT w krzyżówce wstecznej BC♀ bwł, car, acv → ♂F₁
(RP ♀ × bwł, car, acv ♂)

Fenotypy 3 × 2 : 1 bw b ear acv	Doświadczenie I				Doświadczenie II				Suma		Średnie
	liczba much		procent przeżywa- jących	arc-sin	liczba much		procent przeżywa- jących	arc-sin	arc-sin		
	bada- nych	przeżywa- jących			bada- nych	przeżywa- jących					
+++	95	24	25,3	30,20	306	79	25,8	30,53	60,73	30,36	
bw b + +	95	6	6,3	14,54	270	33	11,9	20,18	34,72	17,36	
+ ear +	68	0	0	0	264	0	0	0	0	0	
bw b ear +	56	0	0	0	296	0	0	0	0	0	
+ + acv	63	22	33,3	35,24	200	61	30,5	33,52	68,76	34,38	
bw b + acv	73	11	15,1	12,87	199	26	13,1	21,22	44,09	22,04	
+ ear acv	66	0	0	0	222	2	0,9	5,44	5,44	2,72	
bw b ear acv	78	0	0	0	237	0	0	0	0	0	
Suma	594	63		102,85	1994	201		110,89	213,74	106,86	

W 24 godziny po traktowaniu DDT potomstwa z krzyżówki wstecznej oraz pokolenia F_2 obliczano owady martwe oraz przeżywające i osobno segregowano wg odpowiednich fenotypów. Procenty przeżywających much każdego fenotypu przekształcano w jednostki arc-sin według metody statystycznej analizy wyników *Tsukamoto* [8]. Jednostki te odczytano z tablic *Elland* [9]. Na podstawie uzyskanych danych wykonano kalkulację chromosomalnego efektu oporności oraz przeprowadzono analizę wariancyjną efektów otrzymanych dla poszczególnych chromosomów [10].

OMÓWIENIE WYNIKÓW

A. Selekcja szczepu RW

Prowadzona selekcja dzikiego szczepu opornego na DDT powodowała dalszy stopniowy wzrost oporności. I tak w pokoleniu F_1 otrzymano oporność 12-krotną, w F_{12} już 200, a w F_{24} 1300 krotnie wyższą niż szczepu hodowanego wrażliwego na ten insektycyd.

B. Badania wrażliwości na DDT

Na ryc. 1 przedstawiono graficznie otrzymane wyniki badania wrażliwości na DDT szczepów macierzystych opornego RW i wrażliwego markera acv (I), car (II), bwb (III) oraz potomstwa F_1 , F_2 i z krzyżówki wstecznej BC.

Jak widać, pokolenie hybryd F_1 wykazało znaczną oporność na DDT, gdyż 70% osobników przeżyło dawki w granicach od 0,15 do 160 $\mu\text{g}/\text{muchę}$. Można z tych danych wnioskować, że oporność na DDT u szczepu RW ma charakter dominujący nad wrażliwością.

Przebieg linii regresji dla pokolenia F^2 oraz BC potwierdzają to założenie gdyż są one prawie równoległe do osi odciętych. W pokoleniu F^2

Tabela III

Analiza wariancyjna chromosomalnych efektów oporności na DDT w krzyżówce wstecznej BC ♀ bwb, car, acv x ♂ F_1 (♂ RW x ♀ bwb, car, acv)

Rodzaj wariancji 3 : 2 : 1 bwb car acv	Efekt oporności	Suma kwadratów	Stopień swobody	Wariancja S^2	Kryterium zgodności T
Ogólna ssT		2975,83	15	—	—
wg fenotypów SSp		2943,24	7	420,32	99,60 $\%$
3	28,06	196,84	1	196,84	46,64 $\%$
2	101,42	2571,51	1	2571,51	609,36 $\%$
3+2	22,62	127,92	1	127,92	30,31 $\%$
1	11,42	32,61	1	32,61	7,73
3+1	2,06	1,06	1	1,06	0,25
2+1	5,98	8,94	1	8,94	2,12
3+2+1	3,38	2,86	1	2,86	0,68
wg powtórzeń SSD		4,04	1	4,04	0,96
Resztowa (błąd) ssE		29,55	7	4,22	

$\%$ znakienne przy poziomie prawdopodobieństwa 0,01

Tabela IV

Genetyczna analiza czynnika opornościowego na DDT w krzyżówce wsobnej $F_3 \text{ RP} \times \text{♂ bwb, car, acv} \rightarrow F_1 \rightarrow F_2$

Fenotypy 3 : 2 : 1 bwb car acv	Doświadczenie I				Doświadczenie II				Suma		Średnia
	liczba much bada- nych	przeżywa- jących	procent przeżywa- jących	arc-sin	liczba much bada- nych	przeżywa- jących	procent przeżywa- jących	arc-sin	arc-sin	arc-sin	
+++	1245	278	22,3	28,18	1118	662	59,2	50,30	78,48	39,24	
bwb++	409	36	8,8	17,26	321	30	9,3	17,76	35,02	17,51	
+car+	296	28	9,4	17,85	430	36	8,3	16,74	34,59	17,29	
bwb: car+	74	0	0	0	143	0	0	0	0	0	
++acv	367	73	19,6	26,28	313	123	39,3	38,82	65,10	32,55	
bwb+acv	138	7	5,1	13,05	104	19	18,3	25,33	28,38	19,19	
+car acv	76	7	9,2	17,66	92	6	6,4	14,65	32,31	16,15	
bwb car acv	22	0	0	0	36	0	0	0	0	0	
Suma	2627	429		120,28	2557	876		163,60	283,88	141,9	

wystąpiło około 50%, a w pokoleniu BC około 20% osobników opornych, biorąc pod uwagę, że oporny szczep dziki RW zawierał tylko około 85% osobników opornych.

W tabeli II podano genetyczną analizę dominującego czynnika opornościowego na DDT dla potomstwa z krzyżówki wstecznej BC poddanego działaniu pojedynczej dawki 10 μg /muchę.

Przedstawiono tutaj liczby przeżywających much dla każdego fenotypu oraz procenty przekształcone w jednostki arc-sin. Jak widać, zaledwie pojedyncze osobniki fenotypu z czerwonymi oczami przeżywają stosowaną dawkę, co sugeruje istnienie co najmniej jednego czynnika dominującego i zgadza się z wynikami otrzymanymi na podstawie linii regresji.

Wyniki analizy wariancyjnej wpływu poszczególnych chromosomów na oporność na DDT u szczepu dzikiego RW przedstawiono w tabeli III. Jak wynika z obliczeń kryterium zgodności T, dwa czynniki są przy poziomie prawdopodobieństwa 0,01 statystycznie wysoce znamienne — czynnik na chromosomie II, jak i czynnik na chromosomie III.

Przeprowadzona na podstawie wyników genetycznych analiza statystyczna pokolenia much F_2 traktowanych dawką 20 μg /muchę (Tab. IV) potwierdziła również, że oporność na DDT u szczepu much dzikich RW wywołana jest dwoma czynnikami, z których jeden główny czynnik dominujący znajdujący się na chromosomie II w pobliżu markera car wywołuje wytwarzanie dehydrochlorynazy. Drugi czynnik umiejscowiony na chromosomie III (marker bw^b) warunkujący porażenie „knock down” związany jest z niską wrażliwością nerwową na DDT [5].

WNIOSEK

Przeprowadzona na podstawie wyników genetycznych analiza statystyczna pokolenia z krzyżówki wstecznej potomstwa (F_1) z formą rodzicielską (BC) oraz F_2 much dzikich opornych na DDT (odłowionych z okolic Warszawy), wykazała, że opornością tą kierują dwa czynniki — główny związany z chromosomem II i drugi czynnik związany z chromosomem III.

В. Стычиньска, А. Кжеминьска

ГЕНЕТИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ОПОРНОСТИ НА ИНСЕКТИЦИДЫ

Часть I. Характер опорности на ДДТ у дикого штамма комнатной мухи (*M. domestica* L.) отловленного в окрестностях Варшавы

Резюме

Велись исследования по методу скрещивания дикого штамма опорного на ДДТ с чувствительным маркером целью предъявления характера и количества факторов опорности на этот инсектицид у отловленного штамма. Дикий штамм подвергли в лаборатории дальнейшей селекции на ДДТ. Обозначение чувствительности мух (*M. domestica* L.) на ДДТ исполнено по методу контактового микродозирования (topical application) применяя дозы: для штамма чувствительного маркера в пределах от 0,009 до 0,15; для опорного от 20 до 320 и для поколения F_1 (гибриды), F_2 а также потомства из скрещивания регрессии (back cross) от 0,15 до 160 $\mu\text{г}$ ДДТ/насекомое.

До генетического анализа опорности потомства из скрещивания регрессии (BC) подавали одну дозу 10 $\mu\text{г}$ а поколению F_2 20 $\mu\text{г}$ /муха. Целью определения

переживающих фенотипов необходимым к исполнению генетичного статистического анализа.

Удостоверено, что опорность на ДДТ у штамма диких мух отловленных в окрестностях Варшавы, вызвана была двумя факторами: доминированным условным геном обуславливающим производивших детоксикационного энзима ДДТ дегидрохлориназ, помещенном на хромосоме II, а также геном влияющим на уменьшение нервной чувствительности помещенном на хромосоме III.

B. Styczyńska, A. Krzemińska

GENETIC ASPECTS OF RESISTANCE TO INSECTICIDES OF *MUSCA DOMESTICA* L.

Part I. The character of resistance to DDT of a wild strain of house fly (*M. domestica* L.) from the environs of Warsaw

Summary

The investigations were conducted by the method of crossing a wild strain resistant to DDT with a sensitive marker to determine the character and number of factors of resistance to this insecticide in the wild strain. This strain was subjected to a further selection in the laboratory for DDT resistance.

Determinations of the sensitivity to DDT in the flies (*M. domestica* L.) were carried out by the method of topical application and the doses used were from 0.009 to 0.15 for the sensitive marker strain, from 20 to 320 for the resistant strain, and the dose for the generation F_1 (mixed strain), F_2 and the offsprings from a back cross — from 0.15 to 160 $\mu\text{g}/\text{insect}$.

For genetic analysis of resistance of the back cross generation (BC) the insects received one dose of 10 μg and the F_2 generation was given a dose of 20 $\mu\text{g}/\text{insect}$ for determination of surviving phenotypes necessary for genetic statistical analysis.

It was found that DDT resistance in the wild strain caught in the environs of Warsaw was caused by two factors: a dominant gene determining present on chromosome II, and a gene determining a decrease in the nervous system sensitivity present on chromosome III.

PIŚMIENNICTWO

1. Harrison C. M.: Inheritance of resistance to DDT in the Housefly *M. domestica* L., Nature 1951, 167, 855. — 2. Hiroyoski T.: Some new Mutants and linkage — groups of the House — fly, J. of Econ. Entomol., 1960, 53, 98. — 3. Hoyer R. F.: Some new mutants of the house fly *M. domestica* L., J. of Econ. Entomol., 1966, 59, 133. — 4. Borbesgaard P., Keiding J.: Crossing Experiments with Insecticide resistant House flies *M. domestica* L., Vidtnsk Medd. Dansk naturch. Foren., 1953, 117, 83. — 5. Brown A. W. A.: Insecticide resistance — genetic implications and applications. World Rev. Pest Control, 1967, 6, 104. — 6. Sawicki R. M., Farnham A. W.: Adipping technique for selecting House flies *M. domestica* L. for resistance to insecticides. Bull. Entomol. Res., 1964, 55, 541. — 7. Hiroyoski T.: The linkage map of the house fly, *M. domestica* L., Genetics, 1961, 46, 1973. — 8. Tsukamoto M.: Methods for the linkage group determination of insecticide — resistance factors in the House fly: Botyu-kagaku 1964, 29, 51. — 9. Eland R.: Statystyka matematyczna w zastosowaniu do doświadczalnictwa rolniczego PWN — Warszawa, 1964. — 10. Goszczyńska K., Styczyńska B.: Genetyczna analiza oporności na DDT muchy *M. domestica* L., Roczniki PZH, 1972, 23, 301.

Dn. 10.I.1974 r.

00-791 Warszawa, ul. Chocimska 24.