

PAWEŁ GARBALIŃSKI

**Udział oksydaz o funkcjach mieszanych
w odporności szeliniaka sosnowca
(*Hylobius abietis* L.)
na insektycydy z grupy pyretroidów**

The Share of Oxidases with Mixed Functions in the Resistance
of Pine Weevil (*Hylobius abietis* L.) against Insecticides
from the Pyrethroid Group

Wstęp

Najczęstszą formą ochrony lasu przed szkodliwymi owadami są zabiegi chemiczne z użyciem insektycydów kontaktowo-żołądkowych (9). Ponad 35% z nich stanowią insektycydy z grupy pyretroidów stosowane w lotniczych zabiegach zwalczania foliofagów, w ochronie upraw przed ryjkowcami oraz do zabezpieczania surowca drzewnego przed szkodnikami technicznymi (7).

Wieloletnie stosowanie środków owadobójczych może prowadzić do obniżania wrażliwości entomofauny na insektycydy oraz powstawania ras owadów odpornych na preparaty chemiczne (18). Każdego roku stwierdza się rasy odporne u nowych gatunków owadów, pajęczaków, roztoczy (5).

Insektycydy przedostające się do organizmów owadów są transportowane przy udziale hemolimfy do tkanki docelowej, którą w przypadku większości preparatów, w tym także pyretroidów jest układ nerwowy (12). Pyretroidy działając na układ nerwowy owadów powodują, że kanały sodowe w membranie nerwu pozostają w pozycji otwartej, przepuszczalnej dla jonów Na^+ , co powoduje zakłócenia w przewodzeniu impulsów nerwowych i w końcowym efekcie prowadzi do śmierci owada (13). Podczas tego transportu w tkankach owadów zachodzi szereg przemian metabolicznych, będących w głównej mierze procesami enzymatycznymi mającymi na celu rozkład insektycydu na substancje bardziej polarne i wydalanie ich z organizmów owadów.

Przemiany metaboliczne insektycydu odbywają się dwuetapowo (6). Etap pierwszy, zwany metabolizmem pierwotnym polega na utlenianiu, redukcji lub hydrolizie insektycydu. Produkty tego etapu mogą być wydalone z organizmu owada lub podlegać dalszym przemianom w fazie drugiej, zwanej metabolizmem wtórnym. W tej fazie odbywa się połączenie produktów metabolizmu pierwotnego z cukrami, aminokwasami, kwasem glukuronowym, siarczanami lub fosforanami w celu utworzenia rozpuszczalnych, łatwo wydalanych z organizmu związków.

W przypadku pyretroidów tworzenie reaktywnych substratów (metabolizm pierwotny) może odbywać się na drodze utlenienia lub hydrolizy wiązania estrowego w cząsteczce pyretroidu (15). Reakcje utleniania są procesami enzymatycznymi, w których udział biorą oksydazy wraz z układem cytochromu P-450.

Udział mechanizmów oksydacyjnych w odporności owadów można badać przy użyciu odpowiednich synergetyków, związków blokujących ten rodzaj metabolizmu. Należy do nich butoksylan piperonylu, niespecyficzny inhibitor oksydaz związanych z cytochromem P-450.

Owady wykształciły wiele mechanizmów obronnych pozwalających im skutecznie przeciwstawiać się stosowanym obecnie insektycydom. Obecnie poznanych jest kilka mechanizmów odporności na pyretroidy (3). Mechanizmy metaboliczne związane są z procesami enzymatycznymi zachodzącymi w organizmach owadów. Zalicza się do nich metabolizm:

- "pen" (zwolnione przenikanie insektycydów przez kutikulę owadów),
- oksydacyjny z udziałem oksydaz o funkcjach mieszanych,
- hydrolityczny z udziałem hydrolaz.

Do mechanizmów niemetalabolicznych zalicza się mechanizm "kdr", opóźniający występowanie u owadów objawów porażenia (reakcja knock-down).

Zjawisko powstawania odporności było głównie badane na przykładzie szkodników upraw rolniczych oraz szkodników sanitarnych (8), natomiast badania dotyczące owadów leśnych nie były dotychczas prowadzone. Dlatego też w Zakładzie Ochrony Lasu IBL podjęto badania nad odpornością szeliniaka sosnowca (*Hylobius abietis* L.), groźnego szkodnika upraw drzew iglastych (17) na stosowane w praktyce ochrony lasu insektycydy z grupy pyretroidów.

Celem badań było określenie poziomu odporności chrząszczy szeliniaka sosnowca na pyretroidy oraz stwierdzenie czy i w jakim stopniu metabolizm oksydacyjny jest odpowiedzialny za odporność tego szkodnika na badane insektycydy. Wyniki badań mogą przyczynić się do lepszego poznania mechanizmów odpowiedzialnych za odporność szeliniaka sosnowca na pyretroidy oraz wytypowania najskuteczniejszych preparatów chemicznych w ochronie lasu przed tym szkodnikiem.

Materiały i metodyka badań

Materiał biologiczny stanowiły chrząszcze szeliniaka sosnowca zbierane z dołków chwytanych i pułapek rurowych w latach 1994–1995 na terenie Nadleśnictwa Sokołów Podlaski (RDLP Warszawa). Do badań użyto następujących preparatów z grupy pyretroidów:

- Alfazot 05 EC zawierający 5% alfametryny w 1l preparatu,
- Decis 2,5 EC zawierający 25g deltametryny w 1l preparatu,
- Fury 100 EC zawierający 100g zetacypermetryny w 1l preparatu.

W doświadczeniach prowadzonych w 1994 roku wykorzystano wszystkie ww. preparaty, natomiast w roku 1995 użyto tylko insektycydów Alfazot 05 EC i Fury 100 EC. W celu określenia udziału metabolizmu oksydacyjnego w odporności chrząszczy na badane insektycydy, w badaniach wykorzystano synergetyk: butoksylan piperonylu.

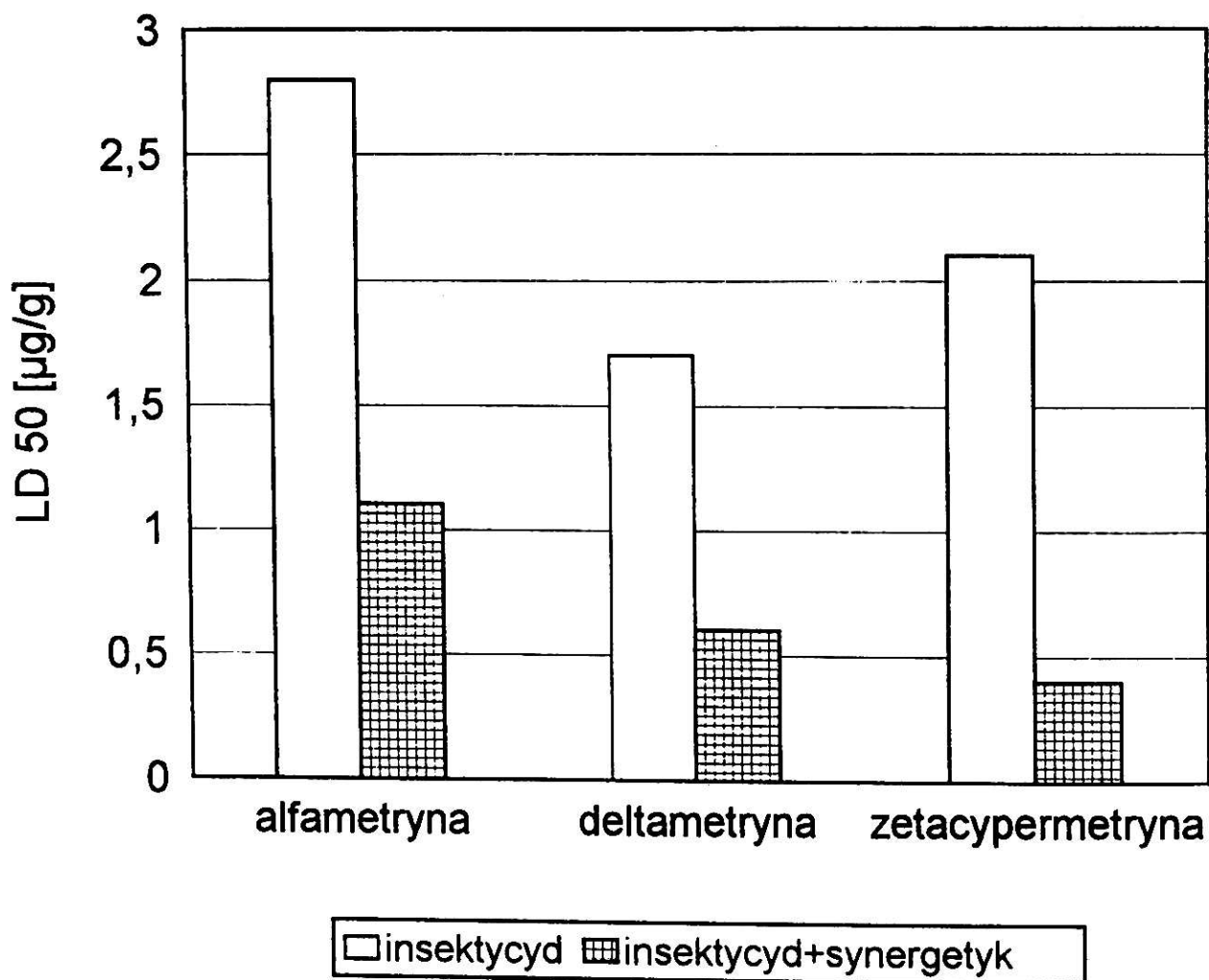
Aby ocenić odporność szeliniaka sosnowca na użyte w badaniach insektycydy, dla każdego z preparatów określono dawkę powodującą śmiertelność 50% badanej grupy owadów (LD₅₀). Insektycydy rozcieńczano acetonem tworząc dla każdego 6–10 stężeń (dawek) obniżających się w postępie geometrycznym. Przygotowane roztwory insektycydów nanoszono w dawce 1 mikrolitra na brzuszną stronę odwłoka chrząszcza stosując aparat do kropelkowania. Każdym stężeniem insektycydu traktowano 30 owadów w dwóch powtórzeniach po 15 sztuk. W doświadczeniu wykonano następujące warianty:

- 30 owadów (2 × 15 osobników) traktowanych insektycydem,
- 30 owadów (2 × 15 osobników) traktowanych synergetykiem. Owady traktowano 2% roztworem butoksylanu piperonylu, w ilości 1 mikrolitra na owada i po godzinie nanoszono na nie odpowiednie roztwory acetonowe poszczególnych insektycydów.
- 30 owadów (2 × 15 osobników) traktowanych czystym acetonem (kontrola acetonowa),
- 30 owadów (2 × 15 osobników) traktowanych butoksylanem piperonylu (kontrola butoksylanowa).
- 30 owadów (2 × 15 osobników) nietraktowanych (kontrola zwykła),

Badane chrząszcze wraz z 5–6 cm gałązkami sosnowymi stanowiącymi pokarm dla owadów, umieszczano w płytkach Petri'ego i trzymano w temperaturze 20–23°C. Śmiertelność chrząszczy wyrażoną w procentach obliczano po 7 dniach od aplikacji insektycydów. Wartości LD₅₀ w mikrogramach substancji aktywnej na 1 g masy ciała owada, dla samego insektycydu oraz insektycydu z synergetykiem obliczono metodą logarytmiczno-probitową (4), stosując program komputerowy opracowany w Instytucie Przemysłu Organicznego. Do obliczeń brano 4–6 kolejnych stężeń (dawek) insektycydu dających śmiertelność chrząszczy w granicach 10–90%. W przypadku wysokiej śmiertelności (ponad 10%) w kontroli zwykłej, wyniki korygowano wzorem Abbotta (1). W celu określenia stopnia udziału oksydaz o funkcjach mieszanych w odporności chrząszczy szeliniaka sosnowca na badane pyretroidy, obliczono także współczynniki synergizmu — S (LD₅₀ samego insektycydu / LD₅₀ insektycydu + synergetyk).

Wyniki i dyskusja

Insektycydy z grupy pyretroidów należą do trucizn działających kontaktowo-żołądkowo. Zastosowana w badaniach metoda indywidualnego dawkowania insektycydów na powierzchnię ciała owadów, pozwoliła dokładnie określić aktywność kontaktową badanych substancji, czyli porównać odporność szeliniaka sosnowca na kontaktowe działanie inse-



RYC. 1. Odporność chrząszczy szeliniaka sosnowca na pyretroidy w 1994 roku

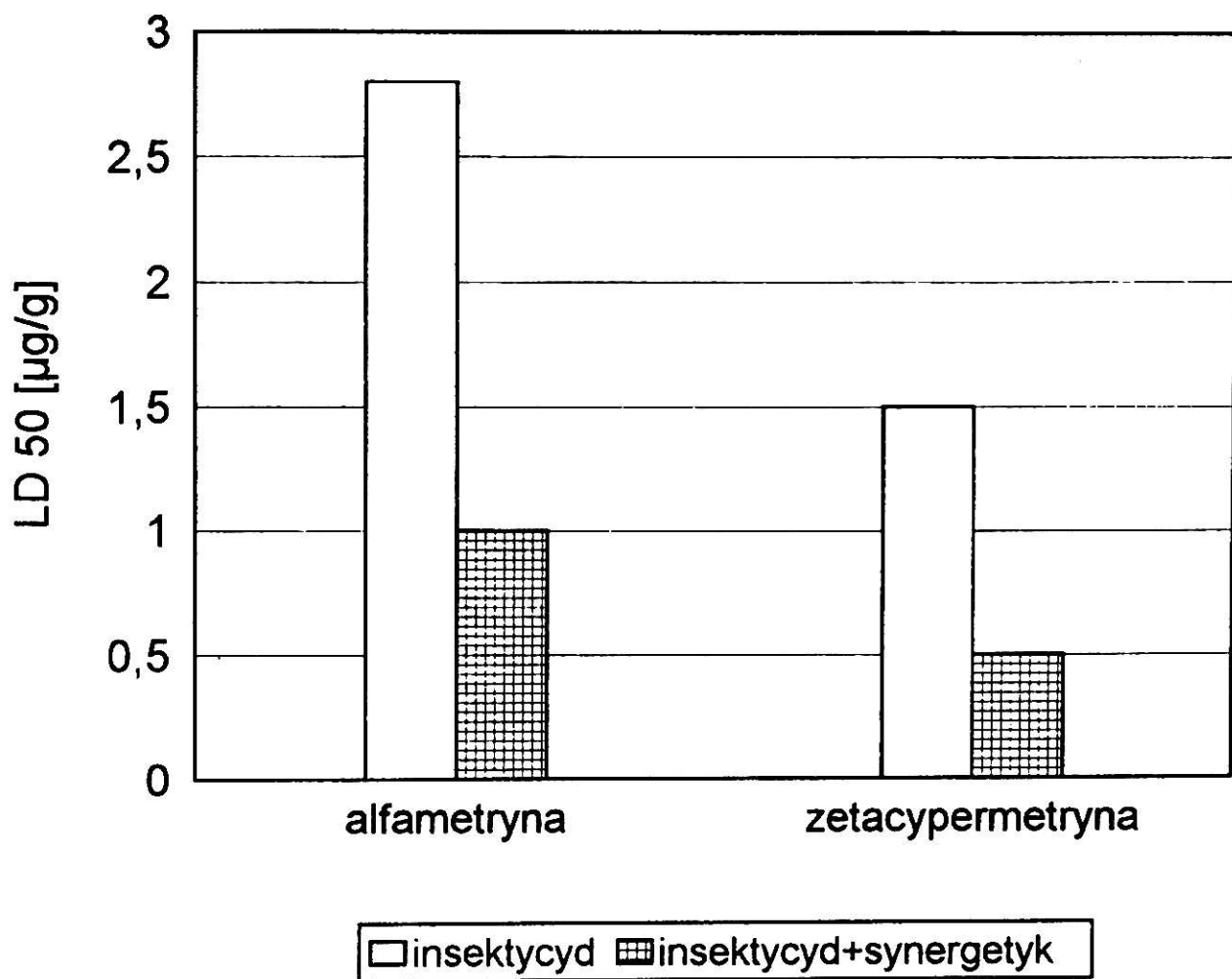
ktycydów. Porównanie to oparto na wartościach LD₅₀, wskaźnika najlepiej charakteryzującego działanie preparatów owadobójczych. Wartości LD₅₀ przeliczono na 1g masy ciała chrząszcza, co pozwoliło na wnioskowanie, że im większa wartość wskaźnika LD₅₀ tym większa odporność owada na dany insektycyd.

Odporność chrząszczy szeliniaka sosnowca w 1994 roku na badane insektycydy z grupy pyretroidów ilustruje rycina 1. Porównując otrzymane wyniki można stwierdzić, że największą (2,78 µg/g) wartość LD₅₀ uzyskano dla alfametryny, nieco mniejszą (2,10 µg/g) dla zetacypermetryny, natomiast zdecydowanie najmniejszą (1,70 µg/g) dla deltametryny. Uszeregowanie według zmniejszającej się wartości LD₅₀ wskazuje na najwyższą odporność szeliniaka sosnowca na alfametrynę zastosowaną w postaci preparatu Alfazot 05 EC, a najmniejszą na deltametrynę będącą substancją aktywną insektycydu Decis 2,5 EC.

Zastosowanie butoksylanu piperonylu spowodowało wzmożenie działania użytych w doświadczeniu pyretroidów (tabela). Największe synergistyczne działanie (najwyższy współczynnik synergizmu) stwierdzono w przypadku zetacypermetryny, której aktywność owadobójcza wzrosła ponad pięciokrotnie. Wzmożenie działania alfametryny i deltametryny było podobne; odpowiednio 2,5 i 2,9 razy.

TABELA
Wartości współczynników synergizmu (S)

| Preparat chemiczny | Substancja aktywna | Współczynnik synergizmu S | |
|--------------------|--------------------|---------------------------|---------|
| | | 1994 r. | 1995 r. |
| Alfazot 05 EC | alfametryna | 2,53 | 2,77 |
| Decis 2,5 EC | deltametryna | 2,93 | – |
| Fury 100 EC | zetacypermetryna | 5,38 | 3,00 |



RYC. 2. Odporność chrząszczy szeliniaka sosnowca na pyretroidy w 1995 roku

Ponad dwukrotny wzrost działania insektycydów po zastosowaniu butoksylanu piperonylu, związku blokującego metabolizm oksydacyjny, wskazuje na udział tego metabolizmu w odporności chrząszczy szeliniaka sosnowca na preparaty z grupy pyretroidów.

Wyniki doświadczeń z 1995 roku, w których do badań użyto alfametryny i zetacypermetryny (ryc. 2) potwierdziły rezultaty badań z roku poprzedniego. Również i w tych

doświadczeniach odporność chrząszczy szeliniaka sosnowca na zetacypermetrynę była prawie dwukrotnie niższa ($LD_{50} = 1,50 \mu\text{g/g}$) niż na alfametrynę ($LD_{50} = 2,77 \mu\text{g/g}$). Po zastosowaniu butoksyłanu piperonylu zaobserwowano wzmożenie działania obu użytych w doświadczeniu pyretroidów. Aktywność owadobójcza alfametryny wzrosła ok. 2,8 razy natomiast zetacypermetryny 3 razy (tabela). Wysokie wartości współczynników synergizmu potwierdziły udział metabolizmu oksydacyjnego w odporności chrząszczy szeliniaka sosnowca na pyretroidy.

Nieco inne wyniki uzyskano w badaniach prowadzonych w Zakładzie Ochrony Lasu IBL w latach 1990–1992 nad odpornością chrząszczy szeliniaka sosnowca pochodzących z Nadleśnictwa Wyszaków (RDLP Warszawa) (10). Odporność owadów na alfametrynę, zetacypermetrynę oraz deltametrynę była zbliżona, a wartości LD_{50} wahały się od 4,10 $\mu\text{g/g}$ do 5,48 i były znacznie większe od wartości LD_{50} uzyskanych w badaniach chrząszczy z Nadleśnictwa Sokołów Podlaski. Przyczyną różnego poziomu odporności populacji szeliniaka sosnowca pochodzących z poszczególnych nadleśnictw może być rodzaj oraz intensywność stosowania preparatów chemicznych w latach poprzednich w ochronie upraw drzew iglastych.

Podsumowanie

W pracy przedstawiono wyniki badań przeprowadzonych w latach 1994–1995 nad odpornością chrząszczy szeliniaka sosnowca na insektycydy z grupy pyretroidów. Spośród badanych substancji najslabszym działaniem owadobójczym charakteryzowała się alfametryna (największe wartości LD_{50}), natomiast deltametryna oraz zetacypermetryna działały znacznie lepiej. Zastosowanie synergetyka — butoksyłanu piperonylu spowodowało wzmożenie działania wszystkich badanych pyretroidów, co wskazuje na znaczny udział metabolizmu oksydacyjnego w odporności chrząszczy szeliniaka sosnowca na insektycydy z grupy pyretroidów.

Z Zakładu Ochrony Lasu
Instytutu Badawczego Leśnictwa

Literatura

1. **Abbot W., S.:** A method of computing the effectiveness of an insecticide. *J. Econ. Entomol.* 1925. 18: 265–267.
2. **Brindley W. A., Selim A., A.:** Synergism and antagonism in the analysis of insecticide resistance. *Environ. Entom.* 1984. 13: 348–353.
3. **Farnham A., W.:** Genetics of resistance of pyrethroid — selected houseflies, *Musca domestica* L. *Pestic. Sci.* 1973. 4: 513–520.
4. **Finney D., J.:** Probit analysis. Cambridge Univ. Press. 1952.
5. **Georghiou G., P., Mellon R., B.:** Pest resistance in time and space. W: Pest resistance to pesticide. (G., P. Georghiou, T. Sato eds). 1983. Plenum press. New York: 1–46.

6. **Gliniewicz A.:** Biologiczne uwarunkowania oporności prusaków *Blattella germanica* L. na permetrynę. Rozprawa doktorska, PZH. 1991.
7. **Głowacka B.:** Insektycydy zalecane w ochronie lasu w 1995 r. Instytut Badawczy Leśnictwa, Zakład Ochrony Lasu. 1995.
8. **Keiding J.:** Development of resistance to pyrethroids in field populations of Danish houseflies. *Pestic. Sci.* 1976. 7: 283 - 291.
9. **Malinowski H.:** Badania nad odpornością owadów na insektycydy stosowane w ochronie lasu. *Sylwan.* 1993. 3: 45–54.
10. **Malinowski H., Garbaliński P., Chmielińska M.:** Porównanie wrażliwości szeliniaka sosnowca (*Hylobius abietis* L.) i innych szkodliwych owadów na insektycydy z grupy pyretroidów. *Sylwan.* 1994. 6: 53–60.
11. **Medhat R. i in.:** Development of resistance and cross-resistance in fenvalerate and deltamethrin selected strains of *Spodoptera littoralis* (Boisd.). *Pestic. Sci.* 1983. 14: 508–512.
12. **Narahashi T.:** Nerve membrane as a target of pyrethroids. *Pestic. Sci.* 1976. 7: 267–272.
13. **Narahashi T.:** Neurophysiological study of pyrethroids: molecular and membrane mechanism of action, IUPAC Symp. 1983.: 179–186.
14. Ocena występowania i prognoza pojawu ważniejszych szkodników leśnych. 1975–1994.
15. **Różański L.:** Metabolizm, degradacja i toksyczność pestycydów. III Syntetyczne insektycydy pyretroidowe. *Wiad. Chem.* 1985. 39: 427–449.
16. **Sawicki R. M., Denholm I.:** Adaptation of insects to insecticides. w: *Origins and development of adaptation*, ed. Pitman Books. London. 1984.: 152–166.
17. **Skrzecz I.:** Ochrona upraw drzew iglastych przed szeliniakiem sosnowcem. *Sylwan.* 1993. 2:43–48.

Summary

The share of oxidases with mixed functions in the resistance of pine weevil (*Hylobius abietis* L.) against insecticides from the pyrethroid group

Insecticides from the pyrethroid group constitute more than 35% of preparations used currently in the forest protection practice. Multi-year applications of insecticide preparations lead to a decrease of entomofauna's sensitivity to insecticides and to arising of insect varieties resistant against chemical preparations. Insects have many protection mechanisms efficiently allowing to counteract insecticides from the pyrethroid group used at present. The oxidation mechanism with participation of oxidases with mixed functions is one of resistance mechanisms.

This report presents the results of investigations carried out in the years 1994–1995 upon the resistance of pine weevil (*Hylobius abietis* L.) the dreadful pest of coniferous cultures,

against pyrethroids used at forest protection. The insecticides Alfazot 05 EC (alphamethrine as an active substance), Decis 2.5 EC (based on deltamethrine), and Fury 100EC (based on zeta-cypermethrin) were used in experiments. Piperonyl butoxide — a synergist, restraining this type of metabolism, was used for assessing the share of oxidizing metabolism in the resistance of pine weevil beetles from the area of the Sokołów Podlaski forest district.

It was found that pine weevil beetles were most resistant against alphamethrine (the highest LD₅₀ value), a bit less resistant against zeta-cypermethrin, and least resistant against deltamethrine (the least value of LD₅₀). The use of synergist compound — piperonyl butoxide caused more than a doubled action of pyrethroids used in the experiment. This evidences a considerable share of oxidizing metabolism with participation of oxidases with mixed functions in the resistance of pine weevil beetles against insecticides from the pyrethroid group.