

OPORNOŚĆ STAWONOGÓW HEMATOFAGICZNYCH – NARASTAJĄCY PROBLEM. I. MECHANIZMY OPORNOŚCI NA INSEKTYCYDY

ELŻBIETA KĘDRA

Instytut Parazytologii im. W. Stefańskiego PAN, ul. Twarda 51/55, 00-818 Warszawa;
E-mail: elba@twarda.pan.pl

ABSTRACT. Resistance in the hematophagous arthropods – problem on the rise. I. Resistance mechanisms to insecticides. Hematophagous arthropods are pesky but can also be very dangerous to human health due to their ability to act as vectors to many viral, bacterial or parasite-related diseases. The common application of chemicals to control pests led to the increasing resistance to pesticides among both insects and ticks. The causes underlying the appearance of the resistance and the mechanisms involved are presented in this article. The description of mechanisms is presented starting from decreased penetration of the pesticide, to an increase in metabolism of pesticide, to the reduced sensitivity of the pesticide's target.

Key words: insecticide resistance, pest control, resistance mechanisms.

W ostatnich latach pojawia się coraz większa liczba doniesień dotyczących nowych stwierdzeń oporności wśród owadów i roztoczy na środki służące do ich zwalczania. Jest to problem bardzo poważny wobec powszechności stosowania pestycydów w walce ze stawonogami szkodliwymi z punktu widzenia gospodarczych i zdrowotnych interesów człowieka. Działalność pewnych gatunków owadów czy pajęczaków jest nie tylko uciążliwa, ale ze względu na możliwość przenoszenia przez nie chorób wirusowych, bakteryjnych czy pasożytniczych może też być niebezpieczna. W celu zmniejszenia szkód wyrządzanych przez owady, od wielu dziesiątków lat podejmowane są próby ograniczania ich liczebności. Rozwój przemysłu chemicznego dawał nadzieję na szybkie, skuteczne i ostateczne rozwiązanie problemu. Stosowane na szeroką skalę środki chemiczne przynosiły pożądany efekt, lecz niestety okazał się on krótkotrwały. Gradacje szkodników nasilały się, m.in. z powodu szkodliwego wpływu insektycydów także na ich naturalnych wrogów (Boczek 1992). Powszechne stosowanie środków chemicznych nie pozostało też bez ujemnego wpływu na środowisko naturalne. Rosnąca świadomość zagrożeń wynikających z nadmiernego stosowania środków chemicznych w połączeniu z obserwacjami uodparniania się owadów szkodliwych na pestycydy przyczyniła się do zwiększenia uwagi na dobór i właściwe użycie niezbędnych środków. Już prawie dziesięć lat temu zidentyfikowano ponad 500 gatunków owadów odpornych na syn-

tetyczne insektycydy (Georghiou 1994) i liczba ta stale rośnie. Zmniejszenie wrażliwości na insektycydy (i analogicznie akarycydy) stwierdzono u szeregu gatunków komarów (Grant i Matsumura 1988, Raymond i Marquine 1994, Hemingway i wsp. 2000), meszek (Montagna i wsp. 2003), wszy (Mumcuoglu i wsp. 1995, Rupes i wsp. 1995, Bartels i wsp. 2001), pcheł (Bossard i wsp. 1998) i kleszczy (Crampton i wsp. 1999).

Owady w toku ewolucji wykształciły szereg przystosowań chroniących je przed różnymi patogenami jak i czynnikami abiotycznymi środowiska. Rozwijanie odporności na czynniki biotyczne i abiotyczne jest naturalną adaptacją grupy organizmów do warunków życia. Insektycydy jako toksyny są elementem środowiska wywierającym silną presję selekcyjną. Przystosowanie się do ich obecności, wytworzenie oporności na ich działanie pozwala na przeżycie i zachowanie gatunku. Oporność, to korzystna dla danego organizmu zdolność do tolerowania dawek toksycznych, które mogą okazać się śmiertelne dla osobników normalnych (wrażliwych) tego samego gatunku. Powszechna oporność na insektycydy wśród owadów nie jest wynikiem powstawania nowych genów, ale jedynie modyfikacji już istniejących (Scott 1995). Oporność wśród populacji owadów nie pojawia się pod wpływem działania pestycydu, ale w wyniku jego presji zwiększa się udział osobników niewrażliwych w populacji. Przyczyny powstawania oporności oraz mechanizmy ich działania są już częściowo poznane, ale w dalszym ciągu trwają intensywne badania nad tymi zagadnieniami.

Substancje toksyczne mogą wnikać do ciała owada różnymi drogami: poprzez powłoki ciała, układ pokarmowy czy system tchawek. Specyficzne mechanizmy ograniczające ich szkodliwość mogą wykształcić się na kilku poziomach: ograniczenia penetracji pestycydu, zmniejszenia wrażliwości miejsc na które działa czy przyspieszenia ich metabolizowania. Najprostszym sposobem ograniczenia wnikania środka toksycznego jest unikanie kontaktu z nim w wyniku zmian w zachowaniu (behavioral change). Zmniejszenie wnikania toksyn może odbywać się również przez spadek penetracji do wnętrza ciała np. przez modyfikację budowy i/lub właściwości pokrywy ciała czy też przewodu pokarmowego. Liczne larwicydy stosowane do biologicznego zwalczania komarów zawierają jako substancję czynną toksynę *Bacillus thuringiensis var. israelensis* lub *Bacillus sphaericus* (Chen 1994, Bhattacharya 1998). Doświadczenia genetyczne sugerują, że mechanizm oporności na endotoksynę produkowaną przez bakterie wiąże się z redukcją przyłączania jej w jelicie środkowym owada (Tabashnik i wsp. 1996, Nielsen-Leroux i wsp. 1997) lub wzrostowi jej trawienia przez proteazy jelitowe (Keller i wsp. 1996).

Dwa inne mechanizmy powodujące wysoki stopień niewrażliwości to oporność metaboliczna związana z aktywnością pewnych grup enzymów oraz niewrażliwość miejsca do którego łączy się toksyna w normalnych warunkach (target site insensitivity). Na każdy z tych mechanizmów składa się kilka procesów biologicznej detoksykacji (Scott 1995).

W odporności metabolicznej biorą udział trzy zasadnicze kompleksy enzymów:

(1) monooksygenazy związane z cytochromem P450

(2) niespecyficzne esterazy

(3) s-transferazy glutationu.

Enzymy związane z cytochromem P450 katalizują różne reakcje detoksyfikacji u owadów, obejmujące m.in. hydroksylacje DDT, epoksydacje cyklodienów i oksydacje estrów (Feyereisen 1999). Prawdopodobnie u poszczególnych osobników istnieje kilka różnych rodzajów enzymów P450 i po kilka rodzajów alleli ich genów (z rodziny CYP) podobnie jak u komara *Anopheles albimanus* (Scott i wsp. 1994). Nadekspresja genów CYP przyczynia się do powstawania oporności w stosunku do DDT, organofosforanów, pyretroidów oraz karbaminianów (Chandre i wsp. 1998, Kasai i Scott 2000). Inna grupa enzymów – esterazy – zdolna jest do hydrolizowania wiązań estrowych obecnych w licznych insektycydach, szczególnie w związkach fosforoorganicznych i karbaminianach. Podniesienie poziomu esteraz przyczyniające się do szybszego rozkładu toksyn może nastąpić w wyniku amplifikacji kodującego je genu lub zmiany jego ekspresji (Scott 1995, Hemingway i wsp. 2000). U wielu owadów oporność na insektycydy związana jest ze wzrostem poziomu aktywności s-transferaz glutationu (GST). Enzymy te odpowiedzialne są za detoksyfikację wielu ksenobiotyków poprzez łączenie ich z glutationem. Przykładem oporności związanej z GST jest zmniejszenie wrażliwości na DDT i pyretroidy wśród komarów należących do *Anopheles* (Ranson i wsp. 1997, Prapanthadara i wsp. 1998) i *Aedes* (Grant i Matsumura 1988).

Z odpornością bazującą na niewrażliwości miejsc docelowych wiążą się zmiany w takich strukturach jak:

(1) kanały sodowe

(2) GABA receptor

(3) receptor dla JH (hormonu juwenilnego)

(4) acetylocholinoesterazy.

Zniesienie wrażliwości w przypadku insektycydów działających na kanały sodowe odbywa się najczęściej przez punktowe mutacje tzw. „knock down resistance” (kdr) związane z genami kanału sodowego. Mutacje kdr i super-kdr czynią owady niewrażliwymi głównie na pyretroidy (Williamson i wsp. 1996, Jamroz i wsp. 1998). Oporność na permetrynę i DDT wśród wielu gatunków może wiązać się z inną mutacją punktową, w genie kanałów sodowych błony komórkowej neuronów stawonogów (Ranson i wsp. 2000). Wynikająca z niej substytucja jednego aminokwasu innym (np. leucyny fenyloalaniną lub seryną) w miejscu odpowiedzialnym za wiązanie pestycydu przyczynia się do zmniejszenia lub zupełnego zniesienia jego toksycznego działania. Analogicznie pojedyncza zmiana nukleotydu w genie dla receptora kwasu γ -aminomasłowego (GABA) i związane z tym wbudowanie innego aminokwasu w strukturę receptora decyduje o powstaniu oporności na cyklodieny (Ffrench-Constant i wsp. 1993). Akarycydy i insektycydy fosforoorganiczne oraz

karbaminiany są inhibitorami enzymów z grupy cholinoesteraz. Hamując aktywność acetylocholinoesterazy, przyczyniają się do nagromadzenia neurotransmitera – acetylocholiny i wynikającej stąd blokady przekazywania kolejnych impulsów nerwowych. Mechanizm oporności na te związki wiąże się z występowaniem niewrażliwej na nie acetylocholinoesterazy (np. populacje *Anopheles gambiae* na Wybrzeżu Kości Słoniowej; N'Guessan i wsp. 2003). Zidentyfikowano już przynajmniej pięć punktowych mutacji w miejscu wiązania insektycydu przez acetylocholinę, przyczyniających się do zredukowania wrażliwości na związki fosforoorganiczne i karbaminiany (Mutero i wsp. 1994).

Dużym problemem jest występowanie tzw. oporności krzyżowej oraz oporności na wiele insektycydów jednocześnie. Szeroko rozpowszechniona oporność krzyżowa na dwie lub więcej klas insektycydów wynika z podobnego sposobu działania i/lub mechanizmu ich detoksykacji, np. związki fosforoorganiczne i karbaminiany. Akumulacja różnych typów oporności prowadzi do niewrażliwości niepożądanych owadów na wiele różnych rodzajów pestycydów (Small i wsp. 1998, Picollo i wsp. 2000). Zwalczanie niepożądanych stawonogów bez wcześniejszego określenia ich wrażliwości na stosowane substancje może być nie tylko mało skuteczne, ale przyczynia się do rozprzestrzeniania oporności. Wiedza o szkodliwym wpływie insektycydów na środowisko naturalne oraz zdrowie człowieka skłaniają do opracowywania optymalnych metod ich stosowania w zwalczaniu uciążliwych owadów czy kleszczy. Przy podejmowaniu kroków mających na celu planowe i kompleksowe ich zwalczanie, istotne jest położenie nacisku na właściwy wybór pestycydu. Niezbędna jest wcześniejsza identyfikacja mogącej potencjalnie występować oporności oraz stałe monitorowanie efektów przeprowadzonych działań. Szybka akumulacja wiedzy dotyczącej biochemicznych i molekularnych mechanizmów działania insektycydów oraz opracowywane metody identyfikacji oporności pozwolą na skuteczne i bezpieczniejsze zwalczanie niepożądanych gatunków.

LITERATURA

- Bartels C.L., Peterson K.E., Taylor K.L. 2001. Head lice resistance: itching that just won't stop. *The Annals of Pharmacotherapy* 35: 109-12.
- Bhattacharya P.R. 1998. Microbial control of mosquitoes with special emphasis on bacterial control. *Indian Journal of Malariology* 35: 206-24.
- Boczek J. 1992. Niechemiczne metody zwalczania szkodników roślin. SGGW, Warszawa.
- Bossard R.L., Hinkle N.C., Rust M.K. 1998. Review of insecticide resistance in cat fleas (Siphonaptera: Pulicidae). *Journal of Medical Entomology* 35: 415-22.
- Chandre F., Darriet F., Darder M., Cuany A., Doannio J.M.C., Pasteur N., Guillet P. 1998. Pyrethroid resistance in *Culex quinquefasciatus* from West Africa. *Medical and Veterinary Entomology* 12: 359-366.
- Chen L. 1994. Production, formulation and storage of BT. VIth International Colloquium on Invertebrate Pathology and Microbial Control, Montpellier, 1: 74.
- Crampton A.L., Baxter G.D., Barker S.C. 1999. A new family of cytochrome P450 genes (CYP41)

- from the cattle tick, *Boophilus microplus*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 29: 829-34.
- Feyereisen R. 1999. Insect P450 enzymes. *Annual Review of Entomology* 44: 507-533.
- Ffrench-Constant R.H., Steichen J., Rocheleau T.A., Aronstein K., Roush R.T. 1993. A single amino acid substitution in a β -aminobutyric acid subtype A receptor locus associated with cyclodiene insecticide resistance in *Drosophila* populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90: 1957-1961.
- Georghiou G.P. 1994. Mechanisms and microbial characteristics of invertebrate resistance to bacterial toxins. VIth International Colloquium on Invertebrate Pathology and Microbial Control, Montpellier, 1: 48-50.
- Grant D.F., Matsumura F. 1988. Glutathione S-transferase in *Aedes aegypti* larvae. Purification and properties. *Insect Biochemistry* 18: 615-622.
- Hemingway J., Coleman M., Paton M., McCarroll L., Vaughan A., DeSilva D. 2000. Aldehyde oxidase is coamplified with the World's most common *Culex* mosquito insecticide resistance-associated esterases. *Insect Molecular Biology* 9: 93-99.
- Jamroz R.C., Guerrero F.D., Kammlah D.M., Kunz S.E. 1998. Role of the kdr and super-kdr sodium channel mutations in pyrethroid resistance: correlation of allelic frequency to resistance level in wild and laboratory populations of horn flies (*Haematobia irritans*). *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 28: 1031-1037.
- Kasai S., Scott J.G. 2000. Overexpression of cytochrome P450 CYP6D1 is associated with monooxygenase-mediated pyrethroid resistance in house flies from Georgia. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 68: 34-41.
- Keller M., Sneh B., Strizhov N., Prudovsky E., Regev A., Koncz C. 1996. Digestion of delta-endotoxin by gut proteases may explain reduced sensitivity of advanced instar larvae of *Spodoptera littoralis* to CryIC. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 26: 365-373.
- Montagna C.M., Anguiano O.L., Gauna L.E., Pechen de d-Angelo A.M. 2003. Mechanisms of resistance to DDT and pyrethroids in Patagonian populations of *Simulium* blackflies. *Medical and Veterinary Entomology* 17: 95-101.
- Mumcuoglu K.Y., Hemingway J., Miller H., Ioffe-Uspensky I., Klaus S., Ben-Ishai F., Galun R. 1995. Permethrin resistance in the head louse *Pediculus capitis* from Israel. *Medical and Veterinary Entomology* 9: 427-432.
- Mutero A., Pralavorio M., Bride J.M., Fournier D. 1994. Resistance-associated point mutations in insecticide-insensitive acetylcholinesterase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91: 5922-5926.
- N'Guessan R., Darriet F., Guillet P., Carnevale P., Traore-Lamizana M., Corbel V., Koffi A.A., Chandre F. 2003. Resistance to carbosulfan in *Anopheles gambiae* from Ivory Coast, based on reduced sensitivity of acetylcholinesterase. *Medical and Veterinary Entomology* 17:19-25.
- Nielsen-Leroux C., Pasquier F., Charles J.F., Sinigre G., Gaven B., Pasteur N. 1997 Resistance to *Bacillus sphaericus* involves different mechanisms in *Culex pipiens* (Diptera:Culicidae) larvae. *Journal of Medical Entomology* 34: 321-327.
- Picollo M.I., Vassena C.V., Mougabure Cueto G.A., Verneti M., Zerba E.N. 2000. Resistance to insecticides and effect of synergists on permethrin toxicity in *Pediculus capitis* (Anoplura: Pediculidae) from Buenos Aires. *Journal of Medical Entomology* 37: 721-725.
- Prapanthadara L., H. Ranson H., Somboon P., Hemingway J. 1998. Cloning, expression and characterization of an insect class I glutathione S-transferase from *Anopheles dirus* species B. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 28: 321-329.
- Ranson H., Cornel A.J., Fournier D., Vaughan A., Collins F.H., Hemingway J. 1997. Cloning and localization of a glutathione S-transferase class I gene from *Anopheles gambiae*. *The Journal of Biological Chemistry* 272: 5464-5468.

- Ranson H., Jensen B., Vulule J.M., Wang X., Hemingway J., Collins F.H. 2000. Identification of a point mutation in the voltage-gated sodium channel gene of Kenyan *Anopheles gambiae* associated with resistance to DDT and pyrethroids. *Insect Molecular Biology* 9: 491-497.
- Raymond M., Marquine M. 1994. Evolution of insecticide resistance in *Culex pipiens* populations: the Corsican paradox. *Journal of Evolutionary Biology* 7: 315-337.
- Rupes V.J., Moravec J., Chmela J., Ledvinka J., Zelenkova J. 1995. A resistance of head lice (*Pediculus capitis*) to permethrin in the Czech Republic. *Journal of Public Health Medicine* 3: 30-32.
- Scott J.A. 1995. The molecular genetics of resistance: resistance as a response to stress. *Florida Entomologist* 78: 399-414.
- Scott J.A., Collins F.H., Feyereisen R. 1994. Diversity of cytochrome P450 genes in the mosquito, *Anopheles albimanus*. *Biochemical and biophysical research communications* 205: 1452-1459.
- Small G.J., Karunaratne S.H., Hemingway J. 1998. Characterization of amplified esterase Estbeta1(2) associated with organophosphate resistance in a multi-resistant population of the mosquito *Culex quinquefasciatus* from Cuba. *Medical and Veterinary Entomology* 12: 187-91.
- Tabashnik B.E., Malvar T., Liu Y.B., Finson N., Borthakur D., Shin B.S., Park S.H., Masson L., de Maagd R.A., Bosch D. 1996. Cross-resistance of the diamondback moth indicates altered interactions with domain II of *Bacillus thuringiensis* toxins. *Applied and Environmental Microbiology* 62: 2839-2844.
- Williamson M.S., Martinez-Torrez D., Hick C.A., Devonshire A.L. 1996. Identification of mutations in the housefly *para*-type sodium channel gene associated with knockdown resistance (*kdr*) to pyrethroid insecticides. *Molecular & General Genetics MGG* 252: 51-60.

Zaakceptowano do druku 28 października 2003