

85. Riccardo MILANI. — Comportamento mendeliano della resistenza alla azione abbattente del DDT e correlazione tra abbattimento e mortalità in *Musca domestica* L.

Riassunto. — I caratteri *knock-down resistance* (*kdr*) e *plexus* (*plx*) sono comuni in una popolazione naturale di mosche, vivente in una regione (Latina) periodicamente sottoposta a trattamenti estensivi con DDT e altri insetticidi di contatto. La ereditarietà di questi caratteri è stata analizzata incrociando un ceppo *kdr plx* con due ceppi normali (+ *Tripoli* e + *arancio*). Il carattere *kdr* si eredita come monofattoriale, recessivo autosomico, in accordo con le osservazioni degli autori precedenti. I segreganti *kdr* sono anche resistenti all'azione mortale del DDT, mentre non tutti gli individui che vengono abbattuti muoiono. Questo mostra che l'omozigosi per *kdr* non è necessaria ma è sufficiente per la sopravvivenza al contatto con DDT.

Il carattere *plx* non segrega secondo i modelli mendeliani tipici. Gli incroci fatti con il ceppo + *Tripoli* hanno dato segreganti *plx* + e *plx* tra i quali la mortalità in seguito ai trattamenti con DDT non fu distribuita a caso, essendo significativamente più elevata tra gli individui *plx* +.

I reperti dei vari autori sono ricordati e discussi.

Résumé. — Les caractères *knock-down resistance* (*kdr*) et *plexus* (*plx*) sont communs dans une population naturelle de mouches, vivant en une région (Latina) périodiquement soumise à des traitements extensifs de DDT et autres insecticides de contact. La transmissibilité de ces caractères a été analysée en croisant une souche *kdr plx* avec deux souches normales (+ *Tripoli* et + *orange*). Le caractère *kdr* est hérité comme monofactoriel, récessif autosomique, en accord avec les observations des auteurs précédents. Les produits de ségrégation *kdr* sont aussi résistants à l'action mortelle du DDT, alors que pas tous les individus abattus ne meurent. Ceci démontre que l'homozygose pour *kdr* n'est pas nécessaire, mais suffit à la survie au contact avec le DDT.

La ségrégation du caractère *plx* ne se fait pas selon les modèles Mendéliens typiques. Les croisements effectués avec la souche + *Tripoli* ont donné des produits de ségrégation *plx* + et *plx* parmi lesquels la mortalité à la suite de traitements au DDT ne se répartissait pas au hasard vu qu'elle fut significativement plus élevée chez les individus *plx* +.

Les expériences des différents auteurs sont rappelées et leurs conclusions discutées.

Summary. — The characters *knock-down resistance* (*kdr*) and *plexus* (*plx*) occur commonly in a natural population of *Musca domestica* in a district (Latina) which has been extensively treated from time to time with DDT and other contact insecticides. A *kdr plx* strain has been crossed with two normal strains (+ *Tripoli* and + *orange*) and the heredity of these characters has been analysed.

kdr inherits monofactorially as an autosomic recessive character, agreeing with the observations of previous authors. *kdr* segregants are also kill-resistant to DDT, but many knock-down susceptible flies are also kill-resistant: thus *kdr* homozygosis is a sufficient but not a necessary condition for survival after contact with DDT.

The character *plx* does not display typical Mendelian segregation. The *plx*+ and *plx* segregants recovered after out-crossing with strain + *Tripoli* showed a statistically significant difference in mortality; the *plx*+ (normal) individuals were more susceptible.

Various findings of previous authors are reviewed and discussed.

Zusammenfassung. — Bei Fliegenstämmen, die frei in einer Gegend (Latina) leben, die in regelmässigen Zeitabständen extensiv mit DDT und anderen Kontaktinsektiziden behandelt wird, sind *knockdown resistance* (*kdr*) und *plexus* (*plx*) allgemein vorhandene Eigenschaften. Die Erbllichkeit dieser Eigenschaften wurde analysiert, indem ein Stamm mit den Eigenschaften *kdr* und *plx* mit zwei Normalstämmen (+ *Tripoli* und + *orange*) gekreuzt wurde. Gemäss den Beobachtungen früherer Forscher ist *kdr* als alleiniger Faktor als autosomatisches Rezessiv erblich. *kdr*-Fliegen sind auch widerstandsfähig gegen die tödliche Wirkung des DDT, während nicht alle Fliegen, die zu Boden fallen, auch sterben. Hieraus folgt, dass die Homozygose infolge *kdr* nicht notwendig ist, aber ausreicht für ein Überleben nach dem Kontakt mit DDT.

Die *plx*-Eigenschaften tritt nach den typischen Mendelschen Modellen nicht allein auf. Die Kreuzung mit dem + *Tripoli*-Stamm ergab Exemplare mit *plx* + und *plx*, bei denen die Sterblichkeit infolge DDT-Behandlung nicht zufällig war, sondern bezeichnenderweise bei den Exemplaren mit *plx* + grösser war.

Die Berichte der verschiedenen Forscher werden erwähnt und diskutiert.

PREMESSA

La comparsa in seno ad una specie di popolazioni caratterizzate da una tolleranza eccezionalmente elevata verso uno o più sostanze tossiche è un caso iniziale di differenziazione intraspecifica; come tale comporta l'instaurarsi in popolazioni limitate di frequenze geniche nuove per la specie; tali frequenze tendono a nuovi equilibri che possono perdurare soltanto se corrispondono alle esigenze biologiche della popolazione e se esiste almeno un fattore di isolamento. La formazione di tali popolazioni può avvenire o per processi spontanei oppure come conseguenza di processi selettivi determinati dall'uso di insetticidi. Il secondo caso è di gran lunga il più probabile; tuttavia il primo reperto di resistenza al DDT in *Musca domestica* [WIESMANN R. ⁽¹⁾] presumibilmente è da attribuirsi ad un processo spontaneo. Ambedue i processi di differenziazione sono possibili soltanto se preesiste eterogeneità genetica per i fattori in giuoco.

La comparsa di popolazioni di mosca domestica resistenti al DDT colse quasi di sorpresa nell'ultimo dopoguerra gli entomologi sanitari pur essendo una possibilità ben nota agli entomologi agrari. Questo fu naturale conseguenza della diversità nei rapporti tra ospite e parassita nei campi biologici oggetto di competenza specifica.

Nella tecnica agricola infatti a condizioni ottimali per l'ospite, generalmente corrispondono condizioni ottimali o favorevoli anche per il parassita; inoltre la lotta mira sempre a difendere e a colpire popolazioni grandi. Invece nelle presenti condizioni di vita delle popolazioni umane interessate alla lotta contro i propri parassiti, la vita dell'ospite si svolge in nicchie ecologiche generalmente impenetrabili — o difficilmente penetrabili — dagli insetti parassiti. Il parassitismo in tali condizioni rimane endemico; la lotta si svolge sul piano individuale e mira alla distruzione di popolazioni piccole della specie parassita in una porzione assai limitata del suo habitat: tali condizioni non sono favorevoli a processi di differenziazione intraspecifica per selezione. Soltanto contro talune specie vettrici di agenti patogeni la lotta ha mirato alla eradicazione da regioni ampie creando con l'uso di insetticidi ad azione residua, isole impenetrabili al grosso della specie per immigrazione ed aperte a una colonizzazione senza competizione da parte di individui eccezionalmente dotati di particolari mezzi di difesa. Questi tentativi di eradicazione hanno generalmente coinciso — o per lo meno hanno avuto inizio — con eventi che, contrariamente alla difesa dei prodotti della terra, non rientrano nelle quotidiane attività dell'uomo. Fu proprio in

occasione di questi eccezionali tentativi di eradicazione che l'entomologo medico ebbe non solo programmi simili ma anche esperienze eguali a quelle dello entomologo agrario. La più clamorosa — ma non inattesa — fu la comparsa di popolazioni di mosca domestica (*Musca domestica* L.) resistenti al DDT. La prima constatazione di cui si abbia notizie ufficiali risale al 1946 ed è dovuta al Dr. SPEICH, che ad Arnaes (1000 km. a nord di Stoccolma) riscontrò la inefficacia di un prodotto commerciale a base di DDT. Questa osservazione non fu pubblicata dall'autore ma è citata nella estesa indagine sperimentale sulla DDT resistenza condotta — su un ceppo derivato dalla popolazione di Arnaes — da R. WIESMANN e pubblicata nel 1947 ⁽¹⁾. In questo stesso anno fu accertata da G. SACCÀ l'esistenza di mosche DDT resistenti anche nella zona del Delta Tiberino ⁽²⁾. Questi furono i primi reperti in natura ma in laboratorio il problema era già stato affrontato ed erano stati raccolti dati positivi sulla possibilità di selezionare ceppi resistenti come soltanto nel 1948 A. W. LINDQUIST e H. G. WILSON renderanno noto ⁽³⁾.

Ai primi reperti in natura corrispondono tentativi di attribuzione di uno stato tassonomico: razza secondo WIESMANN ⁽¹⁾ e LA FACE ⁽⁴⁾, varietà secondo MISSIROLI ⁽⁵⁾ e SACCÀ ⁽²⁾. I tentativi di attribuzione di uno stato tassonomico presuppongono il riconoscimento (o la presunzione) della stabilità del carattere differenziale attraverso le generazioni, cioè della sua trasmissibilità ereditaria. Un passo del lavoro già citato di WIESMANN ⁽¹⁾ indica che l'importanza dell'ereditarietà era ben chiara a questo autore: « Meiner Ansicht nach besteht die Gefahr, dass in Arnaes durch die DDT Behandlung der Staelle nach einer kuerzeren oder längeren Zeit eine Selektion im Sinne der absoluten Widerstandsfähigkeit der Fliegen erfolgt,... ».

La resistenza — cioè la capacità di tollerare un tossico in dosi insolitamente elevate — non è conseguenza di una generica maggiore vigoria ma corrisponde ad innalzamenti di soglie specifiche di vulnerabilità. Questo comporta specificità non soltanto verso la specie chimica del tossico ma anche specificità del momento in cui l'organismo interpone una barriera al decorso normale della intossicazione. Questo momento e la natura della barriera sono teoricamente individuabili e riconoscibili; tuttavia non è ancora stato delucidato attraverso quali meccanismi la mosca possa neutralizzare la tossicità degli insetticidi clorurati cui appartiene il DDT di cui ci occupiamo. Questo è evidentemente un grave ostacolo ma non un impedimento per ricerche di natura genetica, per ricerche cioè basate sullo studio di caratteri ben definiti siano essi alternativi o quantitativi. Mentre ogni processo fisiologico o struttura anato-

mica riconosciuti perchè contrastano con processi o strutture normali sono definibili in modo univoco, la tolleranza di dosi elevate di una sostanza tossica è conseguenza di caratteristiche che la sopravvivenza cui portano non definisce. Tuttavia i rapporti di causa ed effetto che intercorrono fra meccanismi di difesa (ignoti) e tolleranza (accertabile sperimentalmente) consentono uno studio indiretto dei primi attraverso la seconda.

L'intossicazione può determinare una sintomatologia che inizia e si svolge in modo graduale e ordinato ed avere esito letale o no. E' ovvio che sintomatologia e esito possono non essere correlati e che differenze di risposta alla intossicazione (e quindi di tolleranza) possono manifestarsi a questi due livelli.

In mosche sensibili il DDT determina gravi turbe nervose (eccitamento, incapacità di movimenti coordinati, paralisi) cui succede la morte. Le mosche resistenti possono essere classificate in due gruppi: *a)* con sintomatologia precoce e passeggera, *b)* con sintomatologia molto ritardata o nulla.

Nelle mosche di tipo *a)* l'intossicazione inizialmente decorre come nelle mosche sensibili, ma entro poche ore, se cessa il contatto con l'insetticida, viene superata; la sintomatologia di conseguenza si attenua sino a scomparire. Siccome lo stadio più caratteristico e chiaramente individuabile della intossicazione è l'incapacità di sorreggersi, possiamo dire che questo insetticida ha sulle mosche sensibili due azioni: *abbattente* e *letale*; sulle mosche resistenti del gruppo *a)* ha solo azione abbattente; sulle mosche del gruppo *b)* non ha alcuna azione oppure soltanto azione abbattente molto ritardata; a questo gruppo appartengono i ceppi altamente resistenti [BRUCE W. N. e DECKER G. C. (6)].

La possibilità di riconoscere l'appartenenza di un campione di mosche ad una di queste tre categorie è condizionata dalla tecnica sperimentale seguita.

L'esistenza di queste tre categorie di mosche era già stata riconosciuta e resa nota da BRUCE e DECKER (6). BUSVINE (7) accertò che un ceppo di tipo *a)* ed uno di tipo *b)* differivano per proprietà fisiologiche. Il primo è in grado di dechloridratare il DDT trasformandolo in DDE [MARCH R. B. e METCALF (8); STERNBURG J. e KEARNS C. W. (9); STERNBURG J.; KEARNS C. W. e BRUCE W. N. (10)], il secondo no. BRUCE e DECKER in punti diversi nel loro lavoro (6) scrivono che tutti i ceppi altamente resistenti sono anche resistenti all'abbattimento e considerano la dechloridratazione un importante meccanismo di difesa. Se ne può dedurre che sia stata studiata su ceppi resistenti all'abbattimento. Se così fosse vi sarebbe contrasto tra le osservazioni di BRUCE e DECKER (6) e quella di BUSVINE (7).

La capacità di decloridratazione non sarebbe quindi una proprietà peculiare dei ceppi di uno dei due tipi *a*) o *b*).

Le ricerche genetiche hanno concordemente dimostrato che la resistenza all'abbattimento si eredita come carattere monofattoriale: appare perciò probabile che dipenda da una proprietà biochimica specifica.

Le ricerche genetiche sulla resistenza non sono molte, e furono rivolte a tre aspetti del problema: ereditarietà, selezione, rapporti tra resistenze ad insetticidi diversi. Ci occuperemo qui soltanto delle ricerche in cui fu analizzata l'ereditarietà. Gli autori che se ne occuparono non scelsero tutti lo stesso criterio per discriminare tra mosche sensibili e resistenti. Alcuni scelsero l'abbattimento, altri la mortalità. Il primo viene studiato saggiando i campioni con una dose fissa; lo sperimentatore stabilisce, dopo opportuna scelta, un vaglio che concede due possibilità alternative per ogni singolo individuo del campione: può o non può superare la prova: se non la supera, è necessario un tempo X perchè ciò avvenga. La seconda invece viene studiata determinando, con sottocampioni presunti rappresentativi ed esposti all'azione di dosi scalari, la frequenza nel campione di individui aventi determinate soglie di tolleranza. I reperti sono generalmente comunicati facendo riferimento alla dose che determina risposta positiva nel 50% dei casi (LD₅₀ e dizioni similari). Tempo di contatto e intervallo fra trattamento ed accertamento dell'esito sono prestabiliti e costanti (una e 24 ore rispettivamente). A queste si debbono aggiungere ricerche nelle quali i campioni sono stati sottoposti a prolungato contatto (24 ore) con l'insetticida e furono esaminati per l'esito al termine dell'esperimento [LA FACE L. ⁽¹¹⁾; MÄLTZER D. A. e KIRK R. L. ⁽¹⁴⁾].

Le ricerche del primo tipo hanno dato risultati che si accordano con l'ipotesi (od almeno la suggeriscono) che il carattere considerato (definito genericamente resistenza) sia geneticamente monofattoriale incompletamente recessivo [HARRISON C. M. ⁽¹²⁾; KEIDING J. ⁽¹³⁾] o dominante [MÄLTZER D. A. e KIRK R. L. ⁽¹⁴⁾].

Le ricerche del secondo tipo invece hanno portato all'ipotesi che la resistenza sia un carattere geneticamente complesso e influenzabile da fattori estrinseci [BRUCE W. N. e DECKER G. C. ⁽⁶⁾; HARRISON C. M. ⁽¹⁸⁾; LA FACE LIDIA ⁽⁴⁾]. Da quanto abbiamo visto sopra risulta evidente che nei due casi il termine « resistenza » indica fatti e proprietà tra loro diversi. L'attenzione su questo punto fu chiaramente richiamata da BUSVINE ⁽¹⁵⁻¹⁶⁾ e da HARRISON C. M. ⁽¹⁷⁻¹⁸⁾ cui spetta pure il merito d'avere pubblicato i primi dati numerici sulla ereditarietà della resistenza all'abbattimento e di avere riconosciuto la monofattorialità del carattere preso in esame fornendo una chiara ostensione dei dati sperimentali ⁽¹²⁾.

L'accordo fra i risultati delle ricerche sull'abbattimento appare tanto più significativo quando si ricordi che gli esperimenti vennero compiuti su ceppi e con metodi diversi. MÄLTZER e KIRK praticarono l'applicazione topica di insetticida in dosi note mentre gli altri autori usarono la tecnica del contatto tarsale. Una sola discrepanza tra i risultati merita rilievo: HARRISON e KEIDING osservarono recessività incompleta mentre MÄLTZER e KIRK osservarono dominanza del carattere « resistenza ».

L'uso di ceppi geneticamente eterogenei e il considerare abbattimento e morte come due manifestazioni di una stessa proprietà osservata in momenti diversi determinano incertezze interpretative e giustificano la cautela con cui gli autori esprimono le conclusioni cui i dati sperimentali portano.

La sopravvivenza a dosi scalari in popolazioni discendenti da incroci tra ceppi sensibili e ceppi resistenti fu esaminata da BRUCE e DECKER ⁽⁶⁾ e da NORTON R. J. ⁽¹⁹⁾. In ambedue i casi la prima generazione è descritta come avente tolleranza intermedia a quella dei ceppi parentali; tale livello di tolleranza fu mantenuto nelle generazioni successive controllate fino alla decima da NORTON e fino alla quattordicesima da BRUCE e DECKER. Questi ultimi autori fecero incroci di massa e interpretarono i loro dati come prove di multifattorialità. Non ho potuto avere visione del lavoro di NORTON: dalla rassegna da me consultata ⁽²⁰⁾ non risulta che l'autore si sia impegnato con interpretazioni del meccanismo genetico dei fatti da lui osservati. Tra questi, nel complesso corrispondenti a quelli descritti da BRUCE e DECKER ⁽⁶⁾, meritano rilievo il controllo della corrispondenza genetica tra ceppi resistenti di diversa origine e l'avere osservato persistente differenza nel grado di tolleranza in incroci reciproci.

Anche le ricerche della Prof.ssa L. LA FACE ⁽¹¹⁾ e di D'ALESSANDRO e MARIANI ⁽²¹⁻²²⁾ inducono gli autori a considerare il carattere « resistenza » (intesa come capacità di sopravvivenza al contatto tarsale con dosi elevate di DDT) carattere polifattoriale influenzabile da fattori ambientali. La Prof.ssa L. LA FACE saggia i campioni in esame con 24 ore di contatto con superfici trattate, mentre D'ALESSANDRO e coll. controllano il tempo necessario per la caduta in supinazione senza ripresa del volo; considerano tale condizione prova certa di futura morte; pubblicano percentuali riferite alla caduta a tempi determinati e concludono che « ... appare evidente dai nostri esperimenti che gli alleli « resistenza e sensibilità » non si comportano quali unità come è nella tipica eredità mendeliana; ci troviamo bensì di fronte ad una polimeria di caratteri » ⁽²²⁾. Le ricerche citate rappresentano lo sviluppo della prima constatazione della eredi-

tarietà della DDT resistenza comparsa nella letteratura [LA FACE L. (11); D'ALESSANDRO G. e MARIANI M. (23)].

I risultati delle ricerche citate concordano dunque in un solo punto: gli autori che hanno scelto l'abbattimento come elemento discriminante del grado di intossicazione hanno ottenuto, indipendentemente dalla tecnica di trattamento e dai ceppi usati, risultati che provano o suggeriscono l'esistenza di un gene incompletamente recessivo [HARRISON C. M. (12); KEIDING J. (13)] o dominante [MÄLTZER D. A. e KIRK R. L. (14)] capace di conferire un elevato grado di resistenza ai suoi portatori. I rapporti genetici esistenti fra le due manifestazioni di suscettibilità (o resistenza) non risultano tuttora analizzati benchè già nel 1950 fosse stato segnalato da BRUCE e DECKER che è necessario distinguere tra paralisi e morte e che un elevato grado di tolleranza è sempre accompagnato da resistenza all'abbattimento. Le due manifestazioni di resistenza sono risultate geneticamente distinguibili [HARRISON C. M. (17-18)]; differenze fisiologiche nel metabolismo del DDT sono state accertate tra ceppi di tipo a) e b) [BUSVINE J. R. (?)].

Il disaccordo tra gli autori che hanno condotto ricerche genetiche sulla DDT resistenza deriva dunque in parte dall'aver considerato aspetti diversi, in parte dall'aver trascurato le acquisizioni raggiunte dai ricercatori precedenti e anche dalla metodologia seguita.

Ritengo perciò che un ulteriore contributo sperimentale alle conoscenze in questo campo non sia superfluo.

PROGRAMMA, MATERIALE E METODI

PROGRAMMA.

Il piano di lavoro fu studiato per analizzare i seguenti punti:

1) comportamento ereditario della resistenza all'abbattimento riscontrata in un ceppo selezionato per un carattere morfologico (anormalità di tipo *plexus* alle venature alari);

2) rapporti esistenti tra resistenza all'abbattimento e capacità di sopravvivenza;

3) ereditarietà del carattere *plexus*;

4) rapporti genetici tra i caratteri *resistenza all'abbattimento* e *plexus* comuni in popolazioni naturali di regioni abbondantemente trattate con il DDT.

Il punto 3) sarà soltanto sommariamente considerato nel presente lavoro essendo estraneo al problema di cui ci occupiamo.

MATERIALE.

Ceppi. - Furono usati tre ceppi, di cui uno resistente all'abbattimento ed alla azione mortale del DDT (*kdr; plx*) e due sensibili (+ *Tripoli*, + *arancio*). Il ceppo *kdr; plx* deriva da una singola femmina fecondata raccolta a Latina e fu sottoposto, nelle prime generazioni, a forte pressione selettiva allo scopo di aumentare la penetranza e la espressività di un carattere mutante delle vene alari (venuzze soprannumerarie talora a reticolo, ispessimenti e irregolarità varie sulla vena trasversa posteriore). Per tre volte nella storia del ceppo i riproduttori furono limitati ad una sola femmina fecondata (parentale) o ad una sola coppia (F_7 , F_8). Il grado di inincrocio è quindi molto elevato. In laboratorio questo ceppo non ebbe mai contatto con il DDT; ciò nonostante risultò omogeneo e altamente resistente sia all'azione abbattente, sia all'azione letale di questo insetticida. Fu controllato in 5 occasioni diverse prima degli esperimenti qui descritti esponendo campioni al contatto con depositi di 1 gr/m² su superficie di vetro. I primi sintomi d'intossicazione comparvero sempre dopo almeno 6 ore di contatto. In occasione di un trattamento con soluzione oleosa su carta (vedi oltre) i primi sintomi comparvero dopo 14 ore. In tutti i casi dopo 24 ore alcuni individui non manifestarono ancora sintomi.

Il ceppo + *Tripoli* deriva da alcuni individui raccolti in natura presso Tripoli e fu sempre mantenuto in coltura di massa. All'inizio degli esperimenti era alla 14^a generazione. I controlli effettuati (depositi su vetro 1 gr/m²) prima degli esperimenti provarono che dopo 15' di contatto la caduta è già in atto e dopo 30' (in un solo caso 60') ha coinvolto tutti gli individui esposti. Fu scelto come ceppo normale sia perchè in esso non furono mai osservati i caratteri presenti nel ceppo *kdr; plx* sia perchè proviene da una popolazione naturale separata da quella originaria del ceppo *kdr; plx*. Questo rende improbabile che processi selettivi o di deriva genetica abbiano determinato situazioni genotipiche tali da rendere speciosi i reperti sperimentali.

Il ceppo + *arancio* (addome chiaro, aranciato) fu scelto per la ragione opposta; deriva da una femmina fecondata proveniente dalla stessa popolazione del ceppo *kdr; plx* ed ha quindi probabilità di appartenere alla stessa comunità genica. Subì inizialmente selezione per il colore del corpo, ed ai controlli risultò sensibile alle azioni del DDT e omogeneo. La caduta è in pieno sviluppo dopo 15-20' di contatto e termina entro 35-55' (5 controlli con film su vetro, 1 gr/m²); quattro trattamenti con soluzione oleosa su carta diedero in tre casi inizio e termine di caduta entro 15' e 35' rispettivamente e in due entro 30' e 75'.

TECNICA DI ALLEVAMENTO E DI INCROCIO.

Le tecniche di allevamento e le modalità di incrocio saranno considerate in modo particolareggiato in un'altra nota. Mi limito qui a precisare che le ovodeposizioni furono raccolte su cotone bagnato di latte; lo sviluppo larvale si svolse in terreno colturale formato di crusca, latte in polvere e acqua (2000:120:1000); l'impupamento avvenne in sabbia. Gli individui destinati agli incroci furono prelevati entro la prima ora dallo sfarfallamento onde evitare che accoppiamenti incontrollati interferissero con il piano degli esperimenti.

TRATTAMENTO CON IL DDT.

Scelsi come metodo di trattamento il contatto tarsale con superfici trattate poichè la quantità di sostanza attiva che agisce su ogni individuo viene introdotta nell'organismo attraverso le vie (e, approssimativamente, nelle dosi) che in condizioni non sperimentali hanno rivelato l'esistenza di soglie di tolleranza diversa all'interno di popolazioni naturali e ne hanno cambiato per selezione la frequenza; inoltre il numero dei campioni e degli individui che possono essere trattati ad ogni prova è praticamente illimitato e quindi il piano di ricerca non è soggetto a limitazioni di natura puramente tecnica.

Per rispondere ai quesiti proposti (pag. 8) bisogna accertare sia il tempo necessario perchè si verifichi l'abbattimento, sia la correlazione fra tempo di caduta e mortalità.

I saggi furono eseguiti usando due attrezzature e due tecniche di efficacia provatamente molto vicina (vedi le notazioni sulla resistenza dei ceppi a pag. 1115). I ceppi parentali, le F_1 e le F_2 allevate in massa subirono i trattamenti entro gabbie cubiche (cm. 38 di lato) con 5 pareti di vetro ed il fondo a tramoggia già in uso in questo laboratorio; le F_2 ottenute da coppie singole furono trattate entro coni di carta da filtro impregnati con soluzione oleosa di DDT (vedi fig. e didascalia) sorretti da imbuti di rame. Le gabbie e gli imbuti sono dotati di una valvola girevole — suggerita dal Dott. E. MOSNA — che consente di prelevare gli individui abbattuti senza disturbare il decorso del trattamento. Questo accorgimento consente di suddividere ogni lotto in frazioni delle quali è noto l'ambito di tempo in cui l'abbattimento è avvenuto. Al termine del trattamento gli individui attivi possono essere prelevati anestetizzandoli con CO_2 .

Per accertare la incidenza della mortalità nelle varie frazioni delle popolazioni gli individui abbattuti raccolti ai tempi stabiliti rimangono



Imbuto a valvola per ricerche sull'abbattimento. — L'imbuto, di lamiera di rame, è largo superiormente cm 20,5; ha un'apertura inferiore di cm 4, chiusa da un disco girevole che da un lato appoggia su un nottolino d'arresto. Alla superficie interna aderisce un cono di carta da filtro uguale a quello visibile nella fotografia. I due coni delimitano la camera di contatto, e sono ottenuti da dischi di carta da filtro (diametro cm 24) dopo l'impregnazione col DDT. Un'apertura al vertice, ottenuta asportando un dischetto centrale di cm 4,5 prima della confezione, corrisponde nel cono inferiore (interno) alla valvola girevole e permette nel cono superiore l'introduzione dei campioni; una capsula di vetro di larghezza opportuna chiude l'apertura superiore e permette di osservare l'interno.

forniti di acqua e zucchero in zolle in recipienti di vetro in attesa dell'esito della intossicazione (*).

Il conteggio dei morti e dei sopravvissuti ed il riconoscimento del sesso furono effettuati 48 ore dopo il trattamento, eterizzando i sopravvissuti. Tale intervallo, superiore a quello di uso generale (24h.), è necessario e sufficiente perchè tutti gli individui capaci di tollerare la dose ricevuta si ristabiliscano perfettamente ed i morti secchino facilitando notevolmente la cernita.

Il prelevamento degli individui paralizzati fu fatto, nei trattamenti in gabbia, ad intervalli brevi per delineare il procedere dell'abbattimento nei ceppi d'origine nelle F_1 e nelle F_2 ed avere così la possibilità di stabilire il criterio di discriminazione tra individui sensibili e resistenti nelle popolazioni miste (F_2).

Le F_2 ottenute da coppie singole furono lasciate a contatto con le superfici trattate per 1h e 45' (vedi oltre); dopo questo intervallo furono prelevati gli individui abbattuti. Il prelevamento degli individui resistenti con anestesia da CO_2 seguì dopo altri 15': questa pausa fu interposta per accertare l'inizio del periodo di stasi nella caduta.

Il DDT usato fu DDT tecnico (pp' > 80%) e le dosi furono mgr. 0.1/cm² sulle superfici di vetro e mgr. 0.45/cm² nella carta da filtro.

I solventi scelti furono benzolo per i depositi su vetro e miscela di olio Shell Risella 117 e etere etilico (1:2) per l'impregnazione della carta da filtro (Carta Wathman n. 2, in dischi di cm. 24 di diametro).

L'impregnazione della carta fu fatta seguendo la tecnica consigliata da BUSVINE e NASH (²⁴) adattata come segue:

1) la carta fu n. 2 anzichè n. 1 per motivi di disponibilità al momento degli esperimenti;

2) la soluzione di DDT fu fatta direttamente nella miscela di olio ed etere per superare il limite di solubilità del DDT nell'olio minerale;

3) il residuo oleoso per unità di superficie è stato aumentato per la diversa porosità della carta (mm³ 4,42/cm²).

La dose fu scelta dopo aver sperimentalmente accertato che fosse di efficacia uguale o molto vicina a quella del residuo cristallizzato sulle pareti di vetro delle gabbie.

I trattamenti furono fatti con mosche di 5 giorni di età.

(*) E' opportuno che i recipienti di raccolta, oltre ad essere forniti di acqua e zucchero, abbiano il fondo ricoperto di carta bibula che assorba le deiezioni ed il rigurgito emessi durante le contrazioni; l'affollamento non deve essere tale da causare stretto contatto o sovrapposizione di individui.

Gli esperimenti furono eseguiti in un locale non termoregolato, mantenuto a 25° C. e si svolsero nel periodo 4 dic. 1953 - 24 febr. 1954.

NOMENCLATURA.

La espressione « resistenza all'abbattimento » traduce la locuzione « knock-down resistance » ed è usata con le stesse accezioni, cioè nel significato letterale e per indicare un ben definito carattere fisiologico, geneticamente monofattoriale. Questo carattere, nella prima descrizione (¹²), fu denominato *knock-down resistance* perciò conservo tale nome al locus ad esso corrispondente; indico i due alleli noti *kdr+* (allele normale, incompletamente dominante: determina caduta precoce al contatto con DDT) e *kdr* (incompletamente recessivo, allo stato omozigote determina notevole ritardo nella caduta per intossicazione da DDT).

Le espressioni « capacità di sopravvivenza » e « resistenza alla azione mortale » sono sinonimi e traducono « kill-resistance ».

Nelle descrizioni degli incroci (tabelle) i segni di ♀ e ♂ talora sono ripetuti: indicano allora colture di massa; negli altri casi indicano coppie singole. Gli incroci sono descritti precisando il sesso e il ceppo di appartenenza (oppure l'incrocio d'origine) degli individui usati.

FERTILITA' E RAPPORTO SESSI

Le osservazioni qui riportate si limitano alla fertilità intesa come numero di individui adulti ottenuti da una singola ovodeposizione ed al rapporto tra i sessi; pur non essendo strettamente pertinenti ai problemi in esame, danno un quadro generale del materiale su cui la sperimentazione è stata condotta. I dati sono presentati nelle tabelle 1 e 2. Nella Tabella 1 le colture sono raggruppate in serie, che differiscono fra di loro per il tipo di incrocio e per le modalità di allevamento (coppie isolate o massa): per ogni serie è indicato il numero di coppie feconde, di ovodeposizioni fertili e di individui esaminati suddivisi per sessi. A questi dati seguono le statistiche sulla fertilità (media delle ovodeposizioni $\pm$ errore standard) e sulla normalità del rapporto tra i sessi; questa è misurata dal χ^2 per i valori cumulati di ogni serie e da χ^2_{int} per l'omogeneità tra i dati parziali (colture); nel secondo caso sono indicati anche i gradi di libertà e la probabilità che campionamenti casuali diano differenze maggiori. Infine è indicato il numero di colture di ogni serie in cui fu riscontrato un rapporto sessi significativamente diverso da uno. La ferti-

TABELLA 4. — Fertilità e rapporto sessi.

Serie sperimentale	Descrizione degli incroci	Dati sperimentali				Fertilità $\bar{n} \pm s_x$	Normalità del rapporto sessi (ipotesi n. maschi : n. femmine = 1 : 1)				
		N. coppie	N. culture	Ma- schi	Fem- mine	Tot.	chi ² _g	chi ² _{int}	g. l.	P	N. coltura anormale
1	♀ + Tripoli × ♂ kdr plx	5	5	110	102	212	0.30	9.26	4	0.05	1
2	♀ kdr plx × ♂ + Tripoli	2	2	49	51	100	0.04	0.04	1	0.85	0
3	♀ + arancio × ♂ kdr plx	1	2	76	68	144	0.44	0.8	1	0.60	0
4	♀ kdr plx × ♂ + arancio	2	2	12	13	25	0.04	0.31	1	0.61	0
5	♀ ♀ × ♂ ♂ F ₁ (♀ + Tripoli × ♂ kdr plx)	massa	(2)	183	182	365	—	0.003	1	0.99	—
6	♀ × ♂ F ₁ (♀ + Tripoli × ♂ kdr plx)	4	7	135	130	265	0.94	9.46	6	0.14	0
7	♀ × ♂ F ₁ (♀ kdr plx × ♂ + Tripoli)	5	7	101	68	169	6.44	4.54	6	0.60	1
8	♀ F ₁ (♀ + Tripoli × ♂ kdr plx) × ♂ kdr plx	2	2	32	38	70	0.51	3.22	1	0.80	0
9	♀ ♀ F ₁ (♀ kdr plx × ♂ + Tripoli) × ♂ ♂ kdr plx	massa	(1)	129	103	232	—	—	—	—	—
10	♀ F ₁ (♀ kdr plx × ♂ + Tripoli) × ♂ kdr plx	2	3	54	50	104	1.53	0.23	2	0.90	0
11	♀ kdr plx × ♂ F ₁ (♀ kdr plx × ♂ + Tripoli)	3	4	41	54	95	0.51	1.14	3	0.75	0
12	♀ ♀ × ♂ ♂ F ₁ (♀ kdr plx × ♂ + arancio)	massa	(1)	17	19	36	—	—	—	—	—
13	♀ × ♂ F ₁ (♀ + arancio × ♂ kdr plx)	9	14	351	436	787	9.18	17.46	13	0.15	3
14	♀ F ₁ (♀ + arancio × ♂ kdr plx) × ♂ kdr plx	4	6	160	166	326	0.11	7.02	5	0.20	1
Totali		39	54 + (4)	1450	1480	2930					

lità media nel complesso non è molto elevata; ha i valori maggiori nelle colture ottenute da ♀♀ + *arancio* e dalle loro figlie (serie 3; 13; 14); i valori minori corrispondono a colture ottenute da ♀♀ *kdr*; *plx* (serie 4; 11).

Il rapporto tra i sessi è significativamente diverso da uno solo in due serie (7 e 13; $\chi^2 > 3,84$); anche in questi due casi i valori parziali (colture) risultano tra loro omogenei, e denotano sistematicità nell'errore (eccesso di maschi nella serie 7, deficienza nella serie 13); tuttavia le due serie includono colture nelle quali le differenze numeriche tra i sessi sono significative.

Il saggio del χ^2 ammette una possibilità massima di errore del 5%; quindi su 54 campioni soltanto 2 o 3 dovrebbero per puro caso superare il valore limite. Su un totale di 54 colture ottenute da coppie singole, 6 hanno presentato un rapporto tra i sessi significativamente diverso dal normale. Questo numero è quindi maggiore della tolleranza ammessa dal saggio applicato. I sei casi anormali sono presentati nella Tabella 2, nella

TABELLA 2. — Colture con rapporto sessi anormale.

Coppia P	N. maschi	N. femmine	N. maschi N. femmine	χ^2	Causa presunta
6	43	23	1.87	6.06	Letale nel cromosoma X, in porzione omologa con cr. Y, o caso.
16,38	27	12	2.25	5.76	id. id.
13,58	2	15	0.52	8.90	Letale nel cr. X in porzione non omologa con il cr. Y
13,58	28	43			
13,53	14	27	0.52	4.12	Caso.
(13,53)	(29)	(34)	(0.85)	(0.40)	
13,70	31	49	0.63	4.05	Caso.
(13,70)	(33)	(21)	(1.57)	(2.66)	

quale compaiono tra parentesi dati di altre colture ottenute dalle stesse coppie parentali. In due casi (13,53 e 13,70) nella seconda coltura il rapporto tra i sessi è normale, perciò le differenze numeriche osservate nella prima sono attribuite al caso; una coppia (13,58) ha dato due colture in cui si osserva notevole deficienza di maschi: il rapporto sessi complessivo è 0,5. Appare quindi altamente probabile che in questo caso la deficienza di maschi sia dovuta ad un letale legato al sesso. Rimangono due colture

(6 e 16,38), nelle quali il rapporto sessi è prossimo a due. Mancano per queste elementi di giudizio sussidiari. Un rapporto sessi vicino a due — quando non sia casuale — suggerisce l'esistenza di un fattore letale sul cromosoma X, avente un'omologo normale sul cromosoma Y. Questa ipotesi nei due casi in esame non è convalidata da altri elementi.

DECORSO DELL'ABBATTIMENTO NEI CEPPI PARENTALI E NELLE F_1

CEPPI PARENTALI.

Abbiamo visto in occasione della descrizione dei ceppi i risultati di ripetuti controlli; basti qui ricordare l'ambito di tempo in cui si svolse, alle dosi usate, l'abbattimento nei 3 ceppi parentali:

	Inizio	Fine
+ <i>Tripoli</i> :	15'	30' (1 caso 60')
+ <i>arancio</i> :	15'	75'
<i>kdr</i> ; <i>plx</i> :	6h	dopo 24h

F_1 : Il decorso dell'abbattimento nelle F_1 fu studiato su sei campioni, per complessivi 330 individui; quattro campioni furono ottenuti da incroci con il ceppo + *Tripoli* e due con + *arancio*; furono controllate per ogni incrocio le due combinazioni reciproche. I risultati furono molto omogenei. Infatti la caduta iniziò tra i 27' e 33' di contatto e terminò entro 55'; 65'; 65'; 75'; 75'; 80'.

L'abbattimento inizia e termina con ritardo significativo negli eterozigoti rispetto agli omozigoti sensibili. Però la differenza non è tale da permettere una discriminazione, almeno nelle condizioni sperimentali attuate; invece un intervallo di almeno 4 ore intercorre tra il termine della caduta degli eterozigoti e l'inizio della caduta dei resistenti. Perciò è possibile separare con certezza individui che presentino questi due livelli di tolleranza.

Il carattere *kdr* risulta quindi incompletamente recessivo, ma nel presente lavoro sarà considerato come recessivo essendo gli eterozigoti perfettamente discriminabili da una delle due classi di omozigoti.

DECORSO DELL'ABBATTIMENTO NELLE F_2 ININCROCIATE E REINCROCIATE

Su popolazioni di individui F_2 ottenuti da colture di massa (due inincrociate, una reincrociata) fu studiato il decorso dell'abbattimento. Tali popolazioni risultarono includere individui a comportamento analogo a

quello delle F_1 e individui a comportamento analogo all'omozigote recessivo. Infatti si ebbe un primo periodo di caduta (ambito nei tre casi: 25' — 75'; 35' — 95'; 25' — 75'; le differenze non sono attribuibili al tipo di incrocio), seguito da un lungo periodo di stasi. In un caso (reincrocio di femmina eterozigote per maschio omozigote recessivo) fu accertato che dopo 10 ore di contatto il secondo periodo di caduta non era ancora iniziato; negli altri due casi l'accertamento fu fatto dopo 2h 30' e 3h 15' di trattamento. Questi controlli confermarono un'arresto di ore nella caduta, e furono considerati sufficienti per dimostrare discontinuità nelle caratteristiche degli individui F_2 ; questi risultano classificabili in due classi, nelle quali il decorso dell'abbattimento corrisponde a quello osservato rispettivamente per gli eterozigoti e per gli omozigoti recessivi. Le frequenze relative di queste due classi discontinue generalmente si accordano, come vedremo particolareggiatamente, con rapporti mendeliani semplici. Gli individui delle due classi sono separabili con certezza dopo 1h 45' di trattamento.

CONTROLLO DELLA CLASSIFICAZIONE.

La discontinuità delle classi e le frequenze in accordo con rapporti mendeliani sono elementi altamente probativi per l'ipotesi che il carattere in esame abbia un controllo genetico monofattoriale. Tuttavia ho voluto eseguire controlli per accertare:

1) se l'appartenere ad una delle due classi è un carattere stabile per l'individuo;

2) se la tecnica usata per separare le due classi non dia luogo ad errori ed in particolare se con i sensibili cadano accidentalmente anche individui resistenti;

3) se figlie successive di una stessa coppia diano frequenze tra loro omogenee.

Allo scopo di rispondere ai quesiti 1) e 2) ho sottoposto ad un secondo trattamento i sopravvissuti di due F_2 allevate in coltura di massa (una inincrociata: $F_2 \text{ ♀} + \text{Tripoli} \times \text{♂ } kdr; plx$ ed una reincrociata: ($\text{♀♀ } F_1 (\text{♀ } kdr plx \times \text{♂} + \text{Tripoli}) \times \text{♂♂ } kdr; plx$), mantenendo separate le mosche risultate *kdr*-sensibili o resistenti al primo trattamento. Di ognuno dei 4 gruppi così formati (due classi per due F_2) interessava soltanto conoscere se era omogeneo, cioè se non includeva individui pertinenti all'altra classe (evento possibile per errore di classificazione o per sopravvenire di forti variazioni nella tolleranza individuale). Per questo mi limitai a registrare i limiti dei periodi di caduta. In un caso il numero degli individui trattati non fu esattamente controllato ma fu stimato ad occhio.

TABELLA 3. — Verifica della esattezza della classificazione e della stabilità del carattere
« tempo di abbattimento » in popolazioni F₂.

Tipo di incrocio	Trattamento	Primo periodo di caduta (individui sensibili)			Secondo periodo di caduta (individui resistenti)	N. Oss.
		Inizio	Fine	N° individui osservati		
Inincrocio	Primo	35'	1 h 35'	678	non iniziato entro 2h30'	241
	Secondo (dopo 2 gg.)	10'	1 h 30'	530	non iniziato entro 3h48' (dopo 48h n. 5 abbattute)	210
Reincrocio	Primo	35'	1 h 25'	97	non iniziato entro 2h	~ 100
	Secondo (dopo 4 gg.)	60'	1 h 00'	67 ⁽¹⁾	cadute reversibili dopo 3h30' (dopo 22h n. 16 abbattute)	~ 100

(1) Due ♀♀ resistono senza mostrare sintomi almeno 5h45'.

Le ripetizioni seguirono il primo trattamento a distanza di due giorni per la prima F_2 , di 4 per la seconda e confermarono pienamente i risultati precedenti — almeno per la esattezza e la stabilità della classificazione —, mentre vi è in un caso un anticipo nell'altro un ritardo nell'inizio del primo periodo di caduta. Non avendo altre osservazioni non posso discutere queste differenze; mi limito soltanto a rilevare che l'anticipo si è verificato nella F_2 inincrociata ed ha portato l'inizio della caduta a coincidere con quello del ceppo parentale sensibile, mentre in tutte le F_2 inincrociate — e trattate una sola volta — l'inizio dell'abbattimento non coincise mai con quello del ceppo parentale sensibile ma coincise con quello della F_1 . Questo fatto fu già osservato da altri ^(13, 22) e da qualche autore fu impugnato per deduzioni di ordine genetico [D'ALESSANDRO G. e MARIANI M. ⁽²²⁾]. Il non trovare nelle F_2 inincrociate individui sensibili quanto i più sensibili del ceppo parentale, deve, sulla traccia di questo reperto, essere sottoposta a più accurato esame prima di trarne deduzioni circa il determinismo.

I risultati della ripetizione del trattamento sono riepilogati nella Tabella 3; da essa risulta che al secondo controllo su 530 + 67 mosche già classificate sensibili due sole erano resistenti, mentre nessuna su circa 300 resistenti risultò sensibile. Se ne deduce che variazioni nelle condizioni fisiologiche individuali non sono sufficienti per provocare scambi tra le classi (la classe resistente risultò priva di errore) e che la tecnica seguita ammette un errore a carico della classe « sensibili » tanto piccolo da poter essere trascurato.

Le segregazioni in figlie successive di coppie singole (Tabella 4) in 8 casi su 9 esaminati a questo proposito presentano soltanto differenze

TABELLA 4. — Omogeneità delle segregazioni in figlie successive di coppie singole F_1 .

Coppia F_1	1ª ovodeposizione		2ª ovodeposizione		$\chi^2_{om.}$	χ^2_s
	kdr +	kdr	kdr +	kdr		
Serie 6:						
2,33	36	13	28	10	0.0005	0.09
2,34	29	4	38	9	0.35	3.26
2,35	23	3	33	3	0.18	7.76
Serie 13:						
13,52	38	30	26	16	0.18	16.58
13,53	32	5	38	15	1.97	0.37
13,54	23	12	23	19	0.18	9.56
13,57	76	27	42	30	3.93	5.35
13,58	12	3	48	13	0.12	11.70
13,60	15	9	15	16	0.59	12.27

attribuibili a campionamento casuale, ed anche nel caso anomalo siamo ai margini della significatività ($\chi^2 = 3,93$). Molte coppie diedero segregazioni che si scostano significativamente dai valori attesi: l'omogeneità tra le ovodeposizioni successive di ognuna suggerisce l'esistenza di fattori perturbatori aventi distribuzione familiare e conferma l'attendibilità dei dati raccolti.

SEGREGAZIONE DEL CARATTERE *KDR*.

I dati sperimentali e i saggi statistici delle segregazioni osservate sono estesi nella tabella 5. In questa sono riportati: nella prima colonna il numero della serie sperimentale, nella seconda colonna la descrizione degli incroci fatti con individui F_1 ; nella terza colonna il valore del χ^2 calcolato come saggio di omogeneità tra i sessi nella segregazione del carattere in esame; nelle colonne 4^a, 5^a, 6^a i dati sperimentali ottenuti dall'esame delle F_2 ; nelle colonne 7^a, 8^a, 9^a è saggiata la ipotesi di monofattorialità e nelle colonne 10^a, 11^a, 12^a è saggiata la omogeneità tra le colture di ogni serie.

Il saggio della omogeneità tra i sessi ha dato in tutti i casi χ^2 molto piccoli: le differenze riscontrate tra i sessi (non riportate) non sono perciò significative in quanto compatibili con differenze casuali. Questo autorizza a non fare distinzione tra i sessi nei trattamenti ulteriori (1).

L'accordo tra le segregazioni ottenute (col. 5^a, 6^a) e l'atteso nella ipotesi di monofattorialità (col. 7^a) è indicato dai valori dei χ^2 (col. 8^a). In due casi l'identità tra valore osservato e valore atteso esclude il saggio statistico; in 6 vi è buon accordo tra dati sperimentali e attesi; in 3 vi è disaccordo. Questi corrispondono a due F_2 inincrociate (serie 6, 13) ed una reincrociata (serie 11), tutte ottenute da coppie singole. Il saggio della omogeneità tra le colture (che dà una misura della uniformità di comportamento tra le colture di una stessa serie) è riportato nelle colonne 10^a, 11^a, 12^a. Esso rivela che nelle serie 6 e 13 (inincroci) che diedero segregazioni in disaccordo con l'ipotesi vi è anche grande eterogenità tra le colture mentre nella serie 11 (reincrocio) lo scostamento del totale rispecchia una condizione realizzatasi in tutte le colture che risultano tra loro omogenee: evidentemente in questa serie ha agito una causa sistematica di errore, mentre nelle altre non vi fu regolarità di comportamento.

(1) I $\sigma\sigma$ sono in tutti i casi più sensibili delle $\varphi\varphi$, ma le differenze non sono tali da interferire con quelle analizzate nel presente lavoro.

TABELLA 5. — Segregazione di *kdr*.

Serie speri- mentale	Tipo di incrocio in F ₁	Omoge- neità fra sessi chi ²	F ₂ individui esaminati			Ipotesi : <i>kdr</i> monofattoriale recessivo					
			Tot.	<i>kdr</i> +	<i>kdr</i>	Segregazioni mendeliane			Omogeneità fra culture		
						<i>kdr</i> attesi	chi ²	P	chi ²	gl.	P
1s	♀ ♀ × ♂ ♂ F ₁ (♀ + Tripoli × ♂ <i>kdr plx</i>)	<10 ⁻⁴	889	678	211	222.25	0.77	0.38	—	—	—
5	♀ ♀ × ♂ ♂ F ₁ (♀ + Tripoli × ♂ <i>kdr plx</i>)	<10 ⁻³	365	282	83	91.2	0.99	0.30	1.04	1	0.30
6	♀ × ♂ F ₁ (♀ + Tripoli × ♂ <i>kdr plx</i>)	1.60	265	223	42	66.2	11.83	<10 ⁻³	10.14	2	0.003
7	♀ × ♂ F ₁ (♀ <i>kdr plx</i> × ♂ + Tripoli)	0.30	169	137	32	42.2	3.31	0.07	4.54	3	0.20
8	♀ F ₁ (♀ + Tripoli × ♂ <i>kdr plx</i>) × ♂ <i>kdr plx</i>	0.52	70	35	35	35	—	—	0.93	1	0.32
9	♀ ♀ F ₁ (♀ <i>kdr plx</i> × ♂ + Tripoli) × ♂ ♂ <i>kdr plx</i>	0.77	232	119	113	116	0.15	0.7	—	—	—
10	♀ F ₁ (♀ <i>kdr plx</i> × ♂ + Tripoli) × ♂ <i>kdr plx</i>	0.13	104	54	50	52	0.16	0.68	0.46	1	0.50
11	♀ <i>kdr plx</i> × ♂ F ₁ (♀ <i>kdr plx</i> × ♂ + Tripoli)	<10 ⁻³	95	61	34	47.5	7.64	0.005	0.32	2	0.85
12	♀ ♀ × ♂ ♂ F ₁ (♀ <i>kdr plx</i> × ♂ + arancio)	0.33	36	27	9	9	—	—	—	—	—
13	♀ × ♂ F ₁ (♀ + arancio × ♂ <i>kdr plx</i>)	2.42	706	471	235	176.50	25.85	<10 ⁻³	31.22	7	<10 ⁻⁴
14	♀ F ₁ (♀ + arancio × ♂ <i>kdr plx</i>) × ♂ <i>kdr plx</i>	0.78	313	149	164	156.50	0.71	0.4	2.00	3	0.58
Totali			3244	2236	1008	1014.35					

Infine in tutti i casi in cui i valori cumulati si accordano con gli at-
tesi (serie 7, 8, 10, 14) anche i valori parziali risultano tra loro omogenei,
convalidando i valori cumulati.

Spingendo al livello delle colture l'esame delle serie in disaccordo
con l'ipotesi, si possono localizzare le cause dello scostamento del valore
cumulato e della eterogeneità tra le colture.

La serie 6 è formata di 7 colture ottenute da 4 coppie. E' così possi-
bile in tre casi confrontare tra loro due figliate successive della stessa
coppia: in tutti i casi vi fu ottimo accordo tra le figliate successive

TABELLA 6. — Segregazioni non in accordo con rapporti mendeliani semplici.
Dati parziali (colture).

Coppia F ₁	N. colture	<i>hdr</i> +	<i>hdr</i>	Totale	chi ²	chi ² _s	chi ² _{int.}
2,33	2	64	23	87	0.09		
2,34	2	67	13	80	3.26		
2,35	2	56	6	62	(7.76, ⁽¹⁾)		
2,36	1	36	0	36	18.62 ⁽²⁾		
Serie 6	7	223	42	265	21.97	11.83	10.14
16,8	2	31	19	50	2.89		
16,9	1	14	6	20	3.20		
16,10	1	16	9	25	1.90		
Serie 11	4	61	34	95	7.99	7.67	0.32
13,52	2	64	46	110	16.58		
13,54	2	46	31	77	9.56		
13,57	2	118	57	175	5.35		
13,59	1	15	16	31	11.70		
13,60	2	30	25	55	12.27		
	9	273	175	448	55.56	47.25	8.31
13,53	2	70	20	90	0.37		
13,55	1	68	24	92	0.58		
13,58	2	60	16	76	0.63		
	5	198	60	258	1.48	0.41	1.07
Serie 13	14	471	235	706	57.04	25.85	31.19

(*) Valore non utilizzato per il calcolo del chi².

(*) Valore calcolato cumulando i dati delle colture 2,35 e 2,36.

(v. tab. 4). Inoltre su 4 coppie feconde una (2, 33) diede segregazioni in accordo con l'ipotesi; una (2,34) si avvicina al limite di significatività con deficienza di omozigoti recessivi; una (2,35) diede ripetutamente deficienza significativa ed una (2,36) assenza di omozigoti recessivi. Si può presumere che talune coppie F_1 fossero portatrici di geni capaci di alterare la frequenza o la penetranza degli omozigoti recessivi.

La serie 11 è formata di 4 colture reincrociate, ottenute da tre coppie ognuna delle quali diede una deficienza — di per se non significativa — di omozigoti recessivi, che, cumulandosi, raggiunge la significatività a livello del totale: è ovvio che in questo caso agì sistematicamente una causa di errore non individuata.

Nella serie 13, inincrociata come la serie 6, ma derivata dal ceppo + *arancio*, troviamo tre coppie con due duplicazioni che danno risultati omogenei e in accordo con l'ipotesi (13,53; 13,55; 13,58) mentre 5 coppie di cui 4 controllate con due duplicazioni danno risultati tra loro omogenei ma in disaccordo con l'ipotesi per eccesso di recessivi (13,52; 13,54; 13,57; 13,59; 13,60).

Riepilogando possiamo delineare il complesso dei risultati sperimentali dicendo che:

1) tutte le F_2 ottenute da colture di massa, sia con inincrocio (serie fs, 5, 12) sia con reincrocio (serie 9) diedero segregazioni in accordo con rapporti mendeliani semplici.

2) Le serie di colture F_2 ottenute con inincrocio da coppie singole F_1 inclusero accanto a colture con segregazioni regolari, colture con segregazioni affette da errore.

3) Le deviazioni dall'atteso furono dello stesso segno, cioè le irregolarità furono dello stesso tipo, in tutte le colture anormali di una stessa serie, e in particolare lo furono per difetto di omozigoti recessivi della serie 6, per eccesso nella 13.

4) Una serie di F_2 reincrociate mostrò uno spostamento sistematico dai valori attesi.

5) Eterogeneità tra le colture fu osservata in tutte le serie formate con individui tra loro fratelli (e soltanto in esse).

Ne possiamo dedurre che in singole famiglie F_2 , ottenute per inincrocio di coppie possono verificarsi interferenze di natura genetica nella regolare ricomparsa di omozigoti recessivi. Gli elementi a disposizione non permettono di stabilire se ciò sia dovuto a perdita di zigoti o a fenomeni di natura fenotipica. La regolarità osservata nelle colture di massa può

essere attribuita al più completo rimescolamento del patrimonio genetico assicurato dalle libere possibilità di accoppiamento e a compensazione di errori (1).

RAPPORTI TRA LA RESISTENZA ALL'ABBATTIMENTO E LA SOPRAVVIVENZA

I rapporti tra resistenza all'abbattimento e sopravvivenza non possono essere analizzati su tutte le serie precedentemente considerate. Infatti la serie *fs* non fu studiata sotto questo aspetto e la serie 9 deve essere trattata a parte perchè gli individui *kdr* rimasero a contatto con l'insetticida per 24 ore anzichè due. Rimangono 9 serie i cui dati cumulati possono dare un primo orientamento. Questi sono presentati classificati secondo 3 criteri (tempo di abbattimento, mortalità, sesso) nella tabella 7.

TABELLA 7. — Abbattimento e mortalità. Dati cumulati.

Fenotipo	<i>kdr</i> + (sensibili all'abbattimento)				<i>kdr</i> (resistenti all'abbattimento)			
	Sopravvissuti	Morti	Totale	% morti	Sopravvissuti	Morti	Totale	% morti
♂♂	159	558	717	77.82	313	7	320	2.19
♀♀	335	387	722	53.60	359	1	360	0.27
Totale	494	945	1439	63.10	672	8	680	1.17

Per l'assenza di interazione tra sesso e mortalità nella classe *kdr* + : $\chi^2 = 92.82$.

La mortalità complessiva risulta profondamente diversa nelle due classi *kdr* + (sensibili all'abbattimento) e *kdr* (resistenti all'abbattimento). Nella prima raggiunge il 63%, nella seconda è di circa 1%. Questi valori sono basati su parecchie centinaia di individui e la differenza è tale da non richiedere l'uso di saggi statistici per accertarne la significatività.

Ne risulta che l'essere sensibile alla azione abbattente non esclude la possibilità di sopravvivere, mentre alla resistenza allo abbattimento si accompagna sempre anche capacità di sopravvivenza.

(1) E' accertato che sono possibili copule in successione anche a brevi intervalli; non è però noto se ciò comporti stratificazione o mescolanza degli spermatozoi di origine diversa.

In altri termini possiamo dire che gli individui omozigoti per il gene *kdr* sono risultati in grado di sopravvivere al trattamento; essi hanno presentato associate le due manifestazioni di resistenza (tipo b); invece una parte notevole (37%) degli individui sensibili, portatori dell'allele dominante *kdr*+ sono risultati sensibili soltanto all'abbattimento (tipo a).

Circa gli individui *kdr* omozigoti, basti aggiungere che la mortalità fu leggermente più elevata tra i maschi, e che dei 7 maschi morti, 6 furono trovati in due colture (4 su 10 e 2 su 2 *kdr* rispettivamente). La mortalità quindi tra gli individui *kdr*, oltre ad essere tanto bassa da potere essere trascurata, è concentrata in due colture su 43; è presumibile che fattori occasionali ne siano responsabili.

La mortalità nella classe « sensibili » (portatori di almeno un gene *kdr*+) merita un più approfondito esame. Possiamo raggruppare i dati secondo tre criteri: ceppo parentale normale; tipo d'incrocio; sesso. I dati sono presentati nella tab. 8 in cui oltre ai dati sperimentali sono indicati la incidenza percentuale della mortalità nelle varie categorie ed i χ^2 calcolati come saggio delle seguenti ipotesi:

1) Esistenza di differenze nella capacità di sopravvivenza in individui *kdr*+ (sensibili all'abbattimento) attribuibili al ceppo normale parentale (confronto tra le colonne). Questi saggi sono disposti nella colonna n. 4.

2) Esistenza di differenze attribuibili al tipo di incrocio (inincrocio o reincrocio, corrispondenti ad un contributo genico da parte del ceppo

TABELLA 8. — Mortalità tra gli individui *kdr*+ segregati nelle F_2 .

1		2			3			4	5		
Ceppo P		+ Tripoli			+ arancio			Omogeneità tra le F ₂ ottenute da ceppi + P diversi chi ²	Omogeneità tra i due tipi di incrocio chi ²		
Sesso	Tipo di incrocio	N. osser- vati	N. morti	% morti	N. osser- vati	N. morti	% morti		+ Tripoli chi ²	+ orange chi ²	
♀ ♀	Inincrocio	301	151	50.16	264	178	67.42	19.50	{	6.83	15.05
	Reincrocio	84	28	33.33	73	30	41.09	0.40			
♂ ♂	Inincrocio	341	289	84.75	234	172	73.50	10.7	{	1.25	15.00
	Reincrocio	66	60	90.90	76	37	48.68	27.13			
Omogeneità tra i due sessi : chi ²											
Inincrocio		113.00			1.98						
Reincrocio		48.00			0.58						

kdr; plx di $1/2$ e $3/4$ rispettivamente). Questi saggi sono disposti nella colonna n. 5.

3) Esistenza di differenze attribuibili al sesso. Sono riportati soltanto i saggi di significatività disposti sulle righe 5 e 6. Essi si riferiscono ai dati sperimentali disposti sulle righe 1 e 3, 2 e 4 rispettivamente.

Dall'esame della tabella risulta:

1) Il ceppo normale parentale influisce sulla incidenza della mortalità (χ^2 maggiore di 3,86 in tre casi su 4). Le serie in cui il ceppo parentale fu + *Tripoli* diedero forte discrepanza tra i sessi ed i valori di mortalità più bassi (femmine) e più elevati (maschi) riscontrati nel gruppo di esperimenti.

2) La mortalità è significativamente più elevata negli inincroci che nei reincroci ad eccezione dei maschi derivati dall'incrocio con il ceppo + *Tripoli*.

3) La mortalità è significativamente diversa tra i sessi nell'incrocio con + *Tripoli*; non lo è negli incroci con + *arancio*.

Ne possiamo dedurre che: a) i patrimoni genetici dei ceppi + *Tripoli* e + *arancio* differiscono tra loro nel contenuto in geni conferenti capacità di sopravvivenza; b) il ceppo *kdr; plx* è apportatore di fattori favorevoli: appare probabile, dato che il ceppo *kdr; plx* non fu selezionato per la DDT resistenza, che il gene *kdr* anche allo stato eterozigote possa conferire grande capacità di recupero; c) almeno una parte dei geni favorevoli pare legata o limitata al sesso e contribuisce a stabilire differenze tra i ceppi + *Tripoli* e + *arancio*. L'incidenza della mortalità tra i portatori di *kdr+* segregati dagli incroci con il ceppo + *arancio* ha, nei dati cumulati qui riportati, frequenze percentuali che si avvicinano a rapporti mendeliani semplici (67,42 e 73,50 tendono a 75%; 41,09 e 48,68 tendono a 50%). Tuttavia la ipotesi della esistenza di un genere recessivo autosomico indipendente da *kdr* capace di conferire attitudine alla sopravvivenza non viene considerata perchè i dati parziali (delle culture, non riportati) sono altamente eterogenei.

Negli incroci con il ceppo + *Tripoli*, nei maschi si ha quasi completa coincidenza tra abbattimento e morte; invece la mortalità è assai bassa tra le femmine, e diminuisce con l'aumentare del contributo genico del ceppo *kdr; plx* (minore nei reincroci). Questi sono sicuri indizi di una situazione genetica complessa che richiede per essere chiarita dati sperimentali che attualmente mancano poichè dal piano di raccolta dei dati

fu esclusa l'analisi del comportamento ereditario della resistenza alla mortalità.

A proposito della mortalità aggiungerò soltanto che su 43 colture F_2 ottenute da coppie singole, in 8 si verificò perfetta coincidenza tra sensibilità all'abbattimento e mortalità; qualora si considerino solo i maschi tale coincidenza è riscontrabile in 27 colture, cioè in più del 60% delle colture esaminate. Queste sono distribuite in tutte le serie sperimentali ad eccezione della serie 14 in cui in nessuna coltura vi fu mortalità totale tra gli individui $kdr+$. Ricordando quanto già abbiamo visto a proposito della resistenza dell'abbattimento — che ha coinciso sempre con capacità di sopravvivenza — ne consegue che una parte non trascurabile dei dati qui riportati, notevolmente diversa a seconda del metodo di esame (8 oppure 27 su 43 a seconda che si considerino i due sessi o i soli maschi) ha dato segregazioni che si accorderebbero con l'ipotesi che un singolo gene sia responsabile della DDT resistenza intesa come capacità di sopravvivenza.

EREDITARIETA' DEL CARATTERE *PLEXUS* (*plx*).

Il carattere *plexus* (*plx*), come abbiamo visto, può essere intensificato con la selezione; questo indica l'esistenza di geni con azione ausiliaria. Il comportamento ereditario fu diverso a seconda del ceppo normale usato, e nei due casi vi furono differenze nei rapporti di segregazione (Tabella 9).

Negli incroci con il ceppo + *Tripoli*, le F_1 diedero tutti individui normali (♀♀ e ♂♂). I mutanti segregati nelle F_2 e nei reincroci ebbero espressività molto variabile; solo per i maschi le proporzioni appaiono in accordo con l'ipotesi di monofattorialità; le ♀♀ diedero in tutti i casi un notevole eccesso di mutanti, in proporzioni non chiaramente riconducibili a rapporti mendeliani modificati.

Negli incroci con il ceppo + *arancio* (di origine remota comune al ceppo *plx*) le F_1 furono costituite da ♀♀ mutanti (espressività molto bassa) e ♂♂ normali. Nelle F_2 , anche considerando il carattere come dominante nelle ♀♀ e recessivo nei ♂♂ , vi fu in tutti i casi e nei due sessi un eccesso di mutanti. Tuttavia nell'unico reincrocio fatto, i ♂♂ mutanti, pur in eccesso, furono in proporzione compatibile con l'ipotesi di monofattorialità.

Se ne deduce che i genotipi dei due ceppi normali saggiati differiscono nel contenuto in geni ad azione ausiliaria al gene *plx*, e che presumibilmente almeno uno di questi, forse un modificatore della dominanza,

è legato al sesso, ed è presente nei due ceppi di origine comune (*plx* e + *arancio*). I dati raccolti non permettono però una analisi esauriente limitandosi a due generazioni.

TABELLA 9. — Segregazione del carattere *plexus*.

Ceppo <i>plx</i> + parentale	Tipo di incrocio	Serie	Femmine			Maschi		
			<i>plx</i> +	<i>plx</i>	totali	<i>plx</i> +	<i>plx</i>	totali
+ <i>Tripoli</i>	Inincrocio	5	71	111	182	128	55	183
		6	54	76	130	99	36	135
		7	33	35	68	69	32	101
	Reincrocio	8	2	36	38	6	26	32
		9	15	88	103	51	78	129
		10	11	39	50	43	11	54
		11	5	49	54	20	21	41
+ <i>arancio</i>	Inincrocio	12	7	10	17	16	3	19
		13	66	370	436	198	153	351
	Reincrocio	14	18	148	166	68	92	160

RAPPORTI TRA I CARATTERI *PLEXUS* E *KILL-RESISTANCE*

Il carattere *plexus* in *Musca domestica* L. non ha un comportamento ereditario semplice; tuttavia una parte dei dati di segregazione suggerisce l'esistenza di un gene avente azione direttiva nel suo determinismo.

Questo carattere può essere osservato attualmente manifesto in mosche raccolte in natura o quale segregante in seguito ad inincroci nei campionamenti di popolazioni naturali. Le mie osservazioni si limitano a popolazioni che hanno colonizzato regioni estensivamente trattate con DDT.

Questo mutante fu già osservato da G. BODENSTEIN ⁽²⁵⁾ precedentemente alla introduzione del DDT nell'uso comune e fu interpretato come mutazione indotta da irradiazione con raggi Roentgen. Questo suggerisce che se preesisteva al trattamento con raggi X, doveva essere molto raro nella popolazione studiata da questo autore.

Un processo di selezione mirante ad aumentarne la espressività fu

accompagnato da raggiungimento di grande tolleranza al DDT (determinata da un singolo gene recessivo autosomico (presente ricerca).

Inoltre è noto un caso inverso, verificatosi durante un esperimento di selezione con un insetticida fosforato. SNYDER (²⁶) infatti osservò in un ceppo selezionato per resistenza al parathion (DEP strain) una percentuale molto elevata di individui mostranti anormalità nelle venature alari (« little stubs coming off the fourth vein and so on »). I fenotipi indicati sono osservabili in *plexus* con cui il mutante di SNYDER sembra identificabile.

Questo complesso di osservazioni suggerisce che il carattere *plexus* possa essere associato a fattori favorevoli in condizioni particolari.

I dati da me raccolti sulla ereditarietà del carattere *plexus* non hanno permesso di chiarirne il determinismo genetico; la mortalità non è stata analizzata in termini di carattere ereditario ma è stata considerata come un epifenomeno nella segregazione di una caratteristica fisiologica riconoscibile perchè ritarda la comparsa di sintomi nelle intossicazioni da DDT. Perciò l'indagine sui rapporti tra presenza del carattere morfologico e attitudine alla sopravvivenza non può essere esauriente.

I dati sperimentali sono presentati nella tabella 10. Come nel paragrafo precedente possiamo raggruppare i dati in funzione del ceppo normale parentale, del tipo di incrocio, del sesso e dell'esito del trattamento, introducendo però anche le frequenze assolute e relative degli individui *plx+*. Oltre ai totali riferiti al tipo di incrocio — saggiati statisticamente — sono riportati i dati delle singole serie. I risultati possono essere così riepilogati:

1) Presenza di interazione fra fenotipo ed esito della intossicazione è stata riscontrata soltanto nelle F_2 derivate dagli incroci con il ceppo + *Tripoli* ($\chi^2 > 3,86$): la frequenza di individui *plx+* (normali) è maggiore tra gli individui morti.

2) e 3) Presenza di interazione è stata riscontrata sia negli inincroci, in ambo i sessi, sia nei reincroci, limitatamente alle femmine.

4) Su 14 dati parziali (7 serie sperimentali, 2 sessi) che contribuiscono alle osservazioni riferite al n. 2, in 11 è stata osservata eccedenza di individui *plx+* tra i morti.

Ne possiamo concludere con notevole margine di sicurezza che tra gli individui provenienti dagli incroci con il ceppo + *Tripoli* l'essere fenotipicamente normale oppure *plx* è accompagnato da una maggiore o minore probabilità di soccombere al contatto con il DDT, almeno nelle condizioni realizzate in questo gruppo di esperimenti.

TABELLA 10. — Interazione tra fenotipo e esito della intossicazione.

Ceppo <i>plx +</i>	Tipo di incrocio	Serie	Femmine sopravvissute		Femmine morte		chi ²	Maschi sopravvissuti		Maschi morti		chi ²
			N. <i>plx +</i>	% <i>plx +</i>	N. <i>plx +</i>	% <i>plx +</i>		N. <i>plx +</i>	% <i>plx +</i>	N. <i>plx +</i>	% <i>plx +</i>	
+ <i>Tripoli</i>	Inincrocio	5	54	36.48	17	50.00		54	62.79	74	76.29	
		6	17	32.69	37	47.43		13	76.47	86	72.88	
		7	14	48.27	19	48.71		11	44.00	58	76.31	
		tot.	85	37.12	73	48.34	4.29	78	60.94	218	74.91	7.71
+ <i>Tripoli</i>	Reincrocio	8	1	(2.70)	1	(—)		2	11.11	4	28.57	
		9	14	14.28	1	(20.00)		29	38.66	22	40.74	
		10	5	14.28	6	40.00		22	75.86	21	84.00	
		11	4	9.52	1	8.33		7	35.00	13	61.90	
		tot.	24	11.32	9	27.28	4.94	60	42.25	60	52.62	2.33
+ <i>arancio</i>	Inincrocio	12	4	36.36	3	50.00		8	80.00	8	88.88	
		13	33	15.42	23	13.37		86	57.72	93	55.68	
		tot.	37	16.44	26	14.60	0.13	94	59.11	101	57.38	0.06
+ <i>arancio</i>	Reincrocio	14	10	7.87	4	13.33	1.13	45	37.81	21	56.75	3.41

RIEPILOGO

Questo gruppo di esperimenti ha permesso:

di confermare che il tempo di insorgenza dei sintomi di intossicazione da DDT in *Musca domestica* è un carattere discontinuo, controllato da una singola coppia allelica;

tuttavia le segregazioni possono per interferenza di altri fattori ereditari non corrispondere ai rapporti mendeliani attesi, specialmente negli incroci;

la resistenza all'abbattimento è sempre associata a capacità di sopravvivenza ma anche nelle segregazioni mendeliane si verifica quanto era già noto per alcuni ceppi: la rapida comparsa di violenti sintomi di intossicazione non comporta necessariamente un esito letale;

in una parte dei dati sperimentali, non trascurabile e diversa a seconda che si considerino i due sessi o i soli maschi, vi fu completa coincidenza anche tra abbattimento precoce e morte, oltre che tra abbattimento ritardato e sopravvivenza. Questo spiega come lo studio della mortalità possa talora indicare, sia pure confusamente l'azione di un gene principale;

inoltre è stato dimostrato che i risultati degli incroci pur rimanendo sempre interpretabili in base all'ipotesi della monofattorialità, possono presentare differenze dipendenti dal ceppo normale usato;

l'importanza del ceppo normale sui risultati finali fu verificata anche nell'ereditarietà del carattere morfologico *plexus* (geneticamente complesso) e nella parziale associazione di questo carattere con l'attitudine alla sopravvivenza;

la mancanza di completa transvariazione tra i tempi di caduta nelle segregazioni delle F_2 e nei ceppi sensibili, generalmente osservata, non fu riscontrata quando i sopravvissuti ad un primo trattamento furono nuovamente esposti, dopo due giorni, al contratto con il DDT. Se questo risultato fosse ripetibile, un elemento nuovo dovrebbe essere introdotto per una esauriente interpretazione dei reperti.

DISCUSSIONE

Il disaccordo tra gli autori che si sono occupati della ereditarietà della DDT resistenza comprende i seguenti punti:

- 1) definizione del carattere in esame e modalità di trasmissione ereditaria;
- 2) controllo genetico del carattere *knock-down resistance*;
- 3) rapporti di dominanza tra i caratteri alternativi « resistenza » e « sensibilità all'abbattimento ».

Sintomatologia ed esito, conseguenze della introduzione di DDT nell'organismo che compaiono in successione, furono considerati nelle prime ricerche due aspetti della intossicazione [HARRISON C. M. ⁽¹²⁾; KEIDING J. ⁽¹³⁾] collegati tra loro da un rapporto biunivoco, ma la possibilità di separarli venne ben presto riconosciuta sia in termini genetici [HARRISON C. M. ⁽¹⁷⁻¹⁸⁾], sia in termini fisiologici [BUSVINE J. R. ⁽⁷⁻¹⁶⁾]. Per questo sono stati conati i due termini *knock-down resistance* e *kill-resistance*. Tuttavia in un lavoro molto recente [D'ALESSANDRO G e MARIANI M. ⁽²²⁾] la caduta in supinazione viene ancora interpretata come prova di morte futura, e con questa identificata nella presentazione di dati. Essendo inequivocabilmente provato [BRUCE W. N. e DECKER G. C. ⁽⁶⁾; BUSVINE J. R. ⁽⁷⁻¹⁶⁾; HARRISON C. M. ⁽¹⁷⁻¹⁸⁾; MÄLTZER D. A. e KIRK R. L. ⁽¹⁴⁾; MILANI R. ⁽²⁷⁾] che tale identificazione non è legittima, ne consegue che le conclusioni tratte da osservazioni sulla supinazione debbono essere considerati un contributo allo studio della ereditarietà dello abbattimento e non della sopravvivenza.

La resistenza all'abbattimento è risultata una proprietà accompagnata sempre da capacità di sopravvivenza. Ne consegue che selezione per il primo carattere (*kdr*) porta a ceppi omogenei resistenti all'abbattimento e anche in grado di sopravvivere a forti dosi. Invece la capacità di sopravvivenza è compatibile anche con sensibilità alla azione abbattente: la selezione per la sopravvivenza può portare alla formazione di ceppi eterogenei, almeno per il carattere *kdr*. Tuttavia la presenza di questo gene appare molto probabile nei ceppi altamente resistenti selezionati in funzione della sopravvivenza dato che sono descritti come resistenti anche all'abbattimento [BRUCE W. N. e DECKER G. C. ⁽⁶⁾]; da quest'ultima considerazione consegue che da esperimenti in cui sia stata studiata l'ereditarietà della sopravvivenza dovrebbe trapelare l'esistenza nel ceppo resistente di un gene recessivo capace allo stato omozigote di assicurare tolleranza di forti dosi.

Tra le ricerche a me note [BRUCE W. N. e DECKER G. C. ⁽⁶⁾; HARRISON C. M. ⁽¹⁷⁻¹⁸⁾; LA FACE L. ⁽¹¹⁾] nessuna analizza l'ipotesi della multifattorialità attribuita al carattere « resistenza » inteso come capacità di sopravvivenza. Tale ipotesi tuttavia è proposta soprattutto per giustificare erraticità di reperti e mancanza di rapporti mendeliani nelle segregazioni.

Può essere interessante vedere se i dati di BRUCE e DECKER (in base ai quali fu emessa l'ipotesi che la resistenza — intesa appunto come capacità di sopravvivenza — sia un carattere poligenico) siano compatibili con altra ipotesi.

Gli elementi portati a sostegno alla ipotesi di poligenia sono: 1) la F_1 ha caratteristiche intermedie ai due ceppi parentali; 2) l'eterogeneità riscontrata nella F_1 permane immutata fino alla F_{15} .

L'attributo « intermedio » (intermediate LD50) non è dovuto soltanto alla comparsa in questa generazione di individui aventi tolleranza intermedia ma soprattutto alla presenza di individui transvarianti con le tolleranze dei due ceppi usati nell'incrocio. Essendo questi profondamente diversi, la eterogeneità della F_1 risulta assai grande e maggiore che nei ceppi di origine: infatti include quasi tutto l'ambito di variabilità di quello resistente e si estende fino a raggiungere i plus-varianti del sensibile.

Quando una F_1 include fenotipi caratteristici dei due ceppi parentali è legittima l'ipotesi che almeno uno di questi non sia geneticamente omogeneo. Nel caso in esame la descrizione dei dati suggerisce come ammissibile l'ipotesi che il carattere « sensibilità » sia incompletamente dominante (corrispondenza fenotipica limitata ai plusvarianti del ceppo parentale sensibile con i minusvarianti della prima generazione incrociata); b) che l'incrocio ammetta formazione di individui omozigoti recessivi (resistenti) cioè che il ceppo sensibile fosse geneticamente impuro.

Il permanere dello stesso grado di eterogeneità nelle generazioni successive alla prima non si oppone alla ipotesi di monofattorialità essendo previsto quando i caratteri segreganti siano selettivamente indifferenti. La corrispondenza nella eterogeneità delle due prime generazioni (F_1 e F_2) potrebbe indicare soltanto che la comparsa di omozigoti recessivi nella F_1 aveva già portato la popolazione in prossimità di quell'equilibrio nella distribuzione degli alleli recessivi che solitamente è raggiunto nelle F_2 .

Gli autori che hanno scelto il tempo di abbattimento come criterio discriminante [HARRISON C. M. ⁽¹²⁾; KEIDING J. ⁽¹³⁾; MÄLTZER D. A. e KIRK R. L. ⁽¹⁴⁾; MILANI R. ⁽²⁷⁾] concordano nel ritenere dimostrato o molto probabile che il carattere osservato sia monofattoriale.

Come abbiamo già visto a questo tipo di ricerche si deve aggiungere per la metodologia seguita anche quella di D'ALESSANDRO e MARIANI ⁽²¹⁻²²⁾ di particolare interesse in una revisione critica perchè gli autori interpretano i loro reperti come prova che il carattere considerato è poligenico.

In primo luogo occorre accertare se le definizioni « supinazione irreversibile » e « caduta o abbattimento » si riferiscano allo stesso stato di intossicazione. Le definizioni verbali appaiono perfettamente corrispondenti (« caduta definitiva dell'insetto » secondo D'ALESSANDRO e MARIANI ⁽²²⁾ e « permanent loss of equilibrium » secondo JAEGER e MUNSON che primi definirono il « knock-down ») ⁽²⁸⁾.

Inoltre è possibile un confronto tra i dati sperimentali dato che i trattamenti furono fatti con dosi di efficacia vicina. Nel ceppo sensibile di D'ALESSANDRO e MARIANI la supinazione è totale entro 30' come la caduta nel mio ceppo + *Tripoli*; nelle F_1 la caduta si svolse entro 1h 30' negli esperimenti di D'A. e M.; entro un tempo massimo di 1h 20' nei miei. Essendo le dosi ed i tempi di caduta corrispondenti, ne consegue che abbattimento e supinazione sono due locuzioni che indicano lo stesso stadio di intossicazione e sono quindi sinonimi.

D'A. e M. non pubblicano i dati osservati nei conteggi ma percentuali; per le F_2 non è indicato il numero di osservazioni da cui sono ricavate. Tuttavia l'esame di un grafico (I) in cui è rappresentata « la curva integrale della mortalità (= supinazione, *n.R.M.*) media nel tempo » rivela che nelle F_2 questo carattere è rappresentato da una spezzata con due flessi di cui il secondo comporta una deviazione angolare molto forte, tanto da imporre alla curva un'andamento pressochè parallelo all'asse delle ascisse (tempi). Questo denota forte discontinuità nella distribuzione nei vari livelli di tolleranza all'interno delle popolazioni F_2 , le quali risultano chiaramente separabili in due gruppi di individui a seconda che cadano o no entro 1h 30' di contatto. Se il carattere « tempo di caduta » fosse poligenico la F_2 sarebbe caratterizzata da continuità nelle proprietà degli individui. Lo stillicidio di cadute che avviene tra 1h 30' e 10h 30' e forma la classe medio-resistente impedisce una separazione netta in funzione del tempo di caduta; tuttavia è evidente che l'intossicazione decorre con leggi diverse nei due periodi.

Osservazioni non pubblicate su ceppi di laboratorio e su popolazioni naturali (MILANI e FILIPPONI) hanno permesso di riconoscere che le popolazioni eterogenee per il carattere *kdr* possono essere separate in due classi o nettamente distinte (come nelle segregazioni da me osservate) o collegate da individui intermedi — relativamente pochi — come nel caso di D'ALESSANDRO e MARIANI. E' chiaro che tali differenze di com-

portamento rispecchiano differenze di natura genetica, che limitano le possibilità di una chiara discriminazione.

Gli argomenti per cui D'ALESSANDRO e MARIANI rigettano l'ipotesi che il carattere da loro preso in esame abbia un controllo monogenico sono:

1) mancanza di completa dominanza in F_1 ; 2) non corrispondenza delle segregazioni osservate con rapporti mendeliani attesi; 3) comparsa di individui sensibili e resistenti nelle F_3 quando le coppie F_2 siano formate con individui resistenti oppure sensibili; 4) mancanza di individui sensibili quanto i più sensibili del ceppo parentale nelle F_2 .

A parte il fatto che il grado di dominanza (completa o incompleta) attribuito ad un allele dipende generalmente dal livello cui l'indagine è spinta, (e comunque l'ereditarietà intermedia non è proprietà esclusiva dei poligeni) il non trovare corrispondenza tra valori osservati ed attesi nelle segregazioni non è elemento sufficiente per stabilire le modalità di controllo genetico del carattere; abbiamo visto come proprio per questo in esame le segregazioni possono essere disturbate; l'esistenza di interferenze di natura genetica con la segregazione di un carattere non indica necessariamente polimeria o poligenia: in questi casi infatti si deve verificare integrazione o additività degli effetti genici.

Infine la ricomparsa di individui resistenti (carattere recessivo) da coppie formate con individui sensibili non stupisce dato che omozigoti dominanti ed eterozigoti possono avere soglie di tolleranza eguali. Assai più importante appare il reperto di coppie di individui F_2 resistenti (presunti recessivi omozigoti) capaci di generare anche individui sensibili. Tuttavia la descrizione dell'esperimento autorizza a credere che accoppiamenti incontrollati possano avere preceduto la formazione delle coppie (« le superstiti... dopo 24 ore di permanenza nella gabbia al DDT furono prelevate ed allevate, ottenendosi ovodeposizioni, larve e adulti »). Qualora questa possibilità risultasse esclusa, rimarrebbe da vagliare la ipotesi che genotipo e fenotipo possano non essere in corrispondenza biunivoca, cioè considerare, contrariamente all'opinione degli autori, la possibilità che variazioni di espressività possano essere tanto forti da portare a penetranza incompleta (²⁹).

Naturalmente, mancando gli elementi obiettivi (valori osservati) non è possibile stimare le probabilità di errore delle varie ipotesi.

Rimane da esaminare la diversa valutazione della dominanza del gene *kdr*, giudicata incompleta da HARRISON, KEIDING, MILANI e completa da KIRK e MÄLTZER. Questi ultimi autori usarono nelle prove per contatto tarsale 10 mg/sq. foot, cioè approssimativamente 0,10 gr/mq.:

tale dose è uguale a circa $1/10$ di quella da me usata. Appare assai verosimile che le differenze di risultato possano non rispecchiare differenze obiettive nella tolleranza degli eterozigoti: avendo questi proprietà diverse dai due fenotipi parentali possono apparire più simili all'uno o all'altro a seconda del livello cui viene spinta l'analisi.

Il fatto che transvariazione tra le curve di abbattimento degli omozigoti sensibili e degli eterozigoti sia presente soltanto alla dose maggiore può indicare che i due genotipi in esame reagiscono in modo diverso ad uguali variazioni delle dosi.

Diminuendo le dosi i tempi di contatto necessari per l'abbattimento aumentano. Se tale aumento è proporzionalmente maggiore negli eterozigoti che negli omozigoti sensibili, teoricamente si può prevedere proporzionalità fra grado di transvariazione e dose; in altre parole le curve di abbattimento saranno più o meno o non sovrapposte in corrispondenza di dosi forti, medie o deboli. Ne conseguono diverse possibilità nella definizione del grado di dominanza senza che questo comporti differenze obiettive.

Le osservazioni di tutti gli autori portano concordemente alla constatazione che nelle F_2 non compaiono individui sensibili quanto i minus varianti del ceppo parentale. Soltanto D'ALESSANDRO e MARIANI hanno cercato di interpretare questo fatto assumendolo a prova di poligenia del carattere. Potrebbe però trattarsi di una variazione della specificità o della espressività del carattere conseguente all'aumento di eterogeneità nel genotipo residuo come avviene, per citare un solo esempio, nella ereditarietà della pezzatura del mantello in tutti i mammiferi su cui tale carattere sia studiabile; tuttavia, come abbiamo visto, questo fatto richiede più approfondito esame.

Il disaccordo tra gli autori che si sono occupati della ereditarietà della DTD-resistenza appare dovuto assai più a questioni formali che a fenomeni obiettivi. L'esistenza di un gene capace allo stato omozigote di conferire grande ritardo nella comparsa dei sintomi d'intossicazione, ritardo accompagnato sempre da capacità di sopravvivenza, appare incontrovertibilmente provato; tuttavia le caratteristiche genotipiche della specie in oggetto e le scarse conoscenze genetiche su di essa possono rendere di difficile interpretazione i risultati degli incroci.

La distinzione tra *kill-resistance* e *knock-down-resistance* ha indubbiamente molte giustificazioni sperimentali oltre ad una notevole utilità pratica: tuttavia, benchè accettabile, non risulta ancora esaurientemente analizzata nè in termini fisiologici nè in termini genetici. La difficoltà maggiore, allo stato attuale delle conoscenze, si incontra nello studio della capacità di sopravvivenza. In questo caso differenze indi-

viduali dovute a proprietà presumibilmente di natura biochimica si debbono studiare non in termini di « capacità di reazione » ma di « sopravvive o muore ». Mentre il susseguirsi dei sintomi, e quindi lo studio dell'abbattimento, permette di seguire sia pure indirettamente, fenomeni che avvengono all'interno dell'individuo e quindi permette di formulare confronti in termini alternativi o quantitativi, l'esito (anche se espresso dalle frequenze di morti o sopravvissuti — legate da una certa legge alle dosi —) è sempre accertato in base a due condizioni che, pur escludendosi a vicenda (vita o morte) non implicano necessariamente possesso di proprietà fisiologiche alternative o quantitativamente diverse negli individui trovati nell'una o nell'altra condizione, nè tanto meno implicano eguaglianza di caratteristiche tra gli individui per i quali l'esito sia stato uguale. Ne conseguono difficoltà nella preparazione del materiale necessario alle ricerche e nel riconoscimento delle caratteristiche individuali. Queste difficoltà inevitabilmente si riflettono sui reperti sperimentali rendendone ambigua l'interpretazione.

Ringraziamento. — Il presente lavoro rientra nel piano di ricerche sulla mosca domestica concordato tra la Rockefeller Foundation e l'Istituto Superiore di Sanità. E' mio gradito dovere ringraziare il Professore Domenico Marotta, Direttore Generale di questo Istituto, e il Dott. E. Mosna, Capo del Laboratorio di Parassitologia, per l'ospitalità offertami e le innumerevoli facilitazioni datemi per la realizzazione del lavoro. Ringrazio pure i Sigg. E. Pierdominici e A. M. Proietti per la assidua assistenza prestatami nella esecuzione degli esperimenti e negli allevamenti.

Roma — Istituto Superiore di Sanità - Laboratorio di Parassitologia.

BIBLIOGRAFIA

- (¹) WIESMANN R. Mitteilungen Schw. Entom. Gesellschaft, 20: 484 (1947).
- (²) SACCÀ, G. R.C. Ist. Sup. Sanità, 11: 123-4 (1948).
- (³) LINDQUIST, A. W. and WILSON, H. G. Science, 107: 276 (1948).
- (⁴) LA FACE, Lidia. R.C. Ist. Sup. Sanità, 11-VI: 1287 (1948).
- (⁵) MISSIROLI, A. Annali San. Pubblica, 10: 6 (1949).
- (⁶) BRUCE, W. N. and DECKER, G. C. Soap and San. Chem., 26, 3: 122 (1950).
- (⁷) BUSVINE, J. R. Nature, 171: 118 (1953).
- (⁸) MARCH, R. B. and METCALF, R. L. Soap and San. Chem., 26, 7: 121 (1950).
- (⁹) STERNBURG J. and KEARNS, C. W. Ann. Ent. Soc. America, 43: 444 (1950).
- (¹⁰) STERNBURG, J., KEARNS, C. W. and BRUCE, W. N. Journ. Econ. Ent., 43: 214 (1950).
- (¹¹) LA FACE, Lidia. Riv. Parass., 13: 57 (1952).
- (¹²) MÄLTZER, D. A. and KIRK, R. L. Austr. J. Biol. Science, 6: 244 (1953).
- (¹³) HARRISON, C. M. Nature, 167: 855 (1951).
- (¹⁴) KEIDING, J. Trans. IXth Int. Congr. Ent., 2: 340 (1953).
- (¹⁵) HARRISON, C. M. J. Econ. Ent., 46: 528 (1953).
- (¹⁶) BUSVINE, J. R. Nature, 163: 193 (1951).
- (¹⁷) —Trans. IXth Int. Congr. Ent., 2: 335 (1953).
- (¹⁸) HARRISON, C. M. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hygiene, 46: 255 (1952).

- (19) NORTON, R. J. Contr. Boyce Thompson Inst., 17: 103 (1953).
 - (20) —Rev. Appl. Ent. B, 42: 94 (1954).
 - (21) D'ALESSANDRO, G. and MARIANI, M. Boll. Soc. It. Biol. Sper., 29: 687 (1953).
 - (22) — Riv. Parass., 15: 83 (1954).
 - (23) D'ALESSANDRO, G., CATALANO, G., MARIANI, M., SCERRINO, E. and SMIRAGLIA-VALGUARNERA, C. Atti 12° Congr. Ass. It. Igiene, 323 (1948).
 - (24) BUSVINE, J. R. and NASH, R. Bull. Ent. Res., 44: 371 (1954).
 - (25) BODENSTEIN, G. Roux' Arch. Entw., 140: 614 (1940).
 - (26) SNYDER, F. Nat. Acad. Sci. (Nat. Res. Counc. publications, no. 219, 1952). (Discussion of the paper by L. E. CHADWICK).
 - (27) MILANI R. Atti 1ª Riunione Ass. Gen. It. Suppl. Ricerca Scientifica, 25: 67 (1955).
 - (28) JAEGER, J. F. and MUNSON, S. C. J. Econ. Ent., 42: 874 (1949).
 - (29) MILANI, R. 1° Simp. Int. Lotta Insetti vett. Malattie trasmiss. Ist. Sup. Sanità, 253 (Rome, 1954).
-