**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

Risco de evolução da resistência a espinosinas em *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) no Brasil

Sandy Spineli Silva

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestra em Ciências. Área de concentração:
Entomologia

**Piracicaba
2019**

Sandy Spinelí Silva
Engenheira Agrônoma

**Risco de evolução da resistência a espinosinas em *Helicoverpa armigera*
(Lepidoptera: Noctuidae) no Brasil**

Orientador:
Prof. Dr. **CELSO OMOTO**

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestra em Ciências. Área de concentração:
Entomologia

Piracicaba
2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA – DIBD/ESALQ/USP

Silva, Sandy Spineli

Risco de evolução da resistência a espinosinas em *Helicoverpa armigera*
(Lepidoptera: Noctuidae) no Brasil / Sandy Spineli Silva. - - Piracicaba, 2019.
61 p.

Dissertação (Mestrado) - - USP / Escola Superior de Agricultura "Luiz de
Queiroz".

1. Manejo da resistência de insetos 2. Bases genéticas 3. Resistência cruzada
4. Spinosad 5. Spinetoram I. Título

RESUMO

Risco de evolução da resistência a espinosinas em *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) no Brasil

Após a detecção de *Helicoverpa armigera* (Hübner, 1808) (Lepidoptera: Noctuidae) no Brasil em 2013, estudos para compreender o risco de evolução da resistência de *H. armigera* aos principais inseticidas registrados para o seu controle são de suma importância. Dentre esses inseticidas, destaca-se o grupo das espinosinas que apresentam mecanismo de ação único, atuando como moduladores alostéricos aos receptores nicotínicos da acetilcolina. Assim, para subsidiar programas proativos de manejo da resistência de *H. armigera* a inseticidas espinosinas no Brasil, no presente trabalho foram conduzidos estudos para (i) avaliar a suscetibilidade de populações de *H. armigera* a spinosad e spinetoram e (ii) entender as bases genéticas da resistência e verificar resistência cruzada a spinetoram, a partir de uma linhagem de *H. armigera* resistente a spinosad selecionada em condições de laboratório. O monitoramento da suscetibilidade foi realizado com populações de campo coletadas em regiões de grande representatividade na produção de soja e algodão no Brasil ao longo das safras agrícolas de 2017 a 2019. Para o inseticida spinosad utilizou-se a dose diagnóstica (DL_{99}) de $3,03 \mu\text{g i.a./cm}^2$ e para spinetoram a DL_{99} de $0,97 \mu\text{g i.a./cm}^2$. Todas as 17 populações de *H. armigera* monitoradas apresentaram alta suscetibilidade tanto para spinosad quanto para spinetoram. Os valores de sobrevivência larval nas doses diagnósticas variaram de 0,0 a 3,9% para spinosad e de 0,0 a 2,0% para spinetoram. A linhagem resistente a spinosad (Spin-R) foi selecionada a partir de uma população de campo coletada em Juscimeira, Mato Grosso, na segunda safra de 2017. Após doze gerações sob pressão de seleção com spinosad, a linhagem resistente apresentou uma razão de resistência de 27 vezes, baseado na DL_{50} (95% IC) da linhagem Spin-R de $3,24 (2,80 - 3,74) \mu\text{g i.a./cm}^2$ e da linhagem suscetível (Sus) de $0,12 (0,08 - 0,16) \mu\text{g i.a./cm}^2$. Cruzamentos recíprocos entre as linhagens Sus e Spin-R mostrou que a resistência de *H. armigera* a spinosad é autossômica e incompletamente dominante. Por meio dos retrocruzamentos entre os indivíduos heterozigotos com a linhagem Sus revelou que a resistência é poligênica. Além disso, Spin-R apresentou resistência cruzada para o inseticida spinetoram ($RR = 12$ vezes). Neste contexto, apesar da alta suscetibilidade de *H. armigera* a inseticidas espinosinas em populações monitoradas nas safras de 2017 a 2019, o risco de evolução da resistência pode ser considerado alto em populações de *H. armigera* a estes inseticidas em condições de campo, pois confirmou-se a presença de alelos que conferem resistência com caráter dominante para spinosad. Portanto, estratégias de manejo da resistência devem ser implementadas para preservar a vida útil de inseticidas espinosinas no controle de *H. armigera* no Brasil.

Palavras-chave: Manejo da resistência de insetos; bases genéticas; resistência cruzada; spinosad; spinetoram

ABSTRACT

Risk of resistance evolution to spinosyns in *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) in Brazil

After the detection of *Helicoverpa armigera* (Hübner, 1808) (Lepidoptera: Noctuidae) in Brazil in 2013, studies to understand the risk of resistance evolution of *H. armigera* to major insecticides registered for its control are very important. Among these insecticides, the spinosyns have a unique mechanism of action, acting as allosteric modulators to nicotinic acetylcholine receptors. Thus, to support proactive management programs of *H. armigera* resistance to spinosyns in Brazil, we conducted studies (i) to monitor the susceptibility to spinosad and spinetoram in *H. armigera* populations and (ii) select a spinosad-resistant strain under laboratory conditions to understand the genetic bases of resistance and to verify cross-resistance to spinetoram. Susceptibility monitoring was performed with field-populations collected from a major soybean and cotton producing regions in Brazil from 2017 to 2019 cropping seasons. For the spinosad insecticide the diagnostic dose (LD_{99}) of $3.03 \mu\text{g a.i./cm}^2$ and for spinetoram the LD_{99} of $0.97 \mu\text{g a.i./cm}^2$ were used. All 17 field-collected populations showed high susceptibility to both spinosad and spinetoram. The larval survival at diagnostic doses ranged from 0.0 to 3.9% for spinosad and 0.0 to 2.0% for spinetoram. The spinosad-resistant strain (Spin-R) was selected from a field-population collected in Juscimeira, Mato Grosso during the second cropping season of 2017. After twelve generations of selection pressure with spinosad, the spinosad-resistant strain showed resistance ration of 27-fold, based on the LD_{50} (95% CI) of Spin-R $3.24 (2.80 - 3.74) \mu\text{g a.i./cm}^2$ and of the susceptible strain (Sus) of $0.12 (0.08 - 0.16) \mu\text{g a.i./cm}^2$. Reciprocal crosses between the Sus and Spin-R strains revealed that resistance of *H. armigera* to spinosad is autosomal and incompletely dominant resistance. By performing the backcross of the heterozygous individuals with Sus strain showed that the resistance is polygenic. Moreover, Spin-R showed cross-resistance to spinetoram ($RR = 12$ -fold). Although high susceptibility of *H. armigera* populations to spinosyns were found from 2017 to 2019 cropping season, the risk of resistance evolution of *H. armigera* to these insecticides may be high under field conditions because we confirmed the presence of dominant resistance alleles to spinosad. Thus, resistance management strategies should be implemented to preserve the lifetime of spinosyns to control *H. armigera* in Brazil.

Keywords: Insect resistance management; genetic basis; cross-resistance; spinosad; spinetoram

1. INTRODUÇÃO

Helicoverpa armigera (Hübner, 1808) (Lepidoptera: Noctuidae) é uma praga de ampla distribuição geográfica, presente em regiões temperadas e tropicais do mundo, como na Europa, Ásia, África e Oceania (FITT, 1989; ANDERSON et al., 2018). Em 2013, esta praga foi oficialmente relatada no Brasil (CZEPAK et al., 2013; SPECHT et al., 2013) ocasionando elevadas infestações em diversas culturas de importância econômica, tais como na soja, feijão e algodão, resultando em significativas perdas econômicas (TAY et al., 2013). Trata-se de uma espécie altamente polífaga com possibilidades de se alimentar em mais de 180 espécies de plantas cultivadas e silvestres (FITT, 1989; TAY et al., 2013). Possui alta capacidade de reprodução e de dispersão (FARROW; DALY, 1987; COAKER, 1959; FITT, 1989). Essas características bioecológicas fazem com que *H. armigera* seja uma espécie de grande relevância e de difícil controle no mundo (SRIVASTAVA; JOSHI; TRIVEDI, 2010).

A dificuldade de controle de *H. armigera* no Brasil se agrava devido ao complexo sistema agrícola com cultivos sucessivos, além da alta frequência de resistência a alguns inseticidas como piretroides em populações de *H. armigera* que colonizaram o Brasil (DURIGAN et al., 2017). Além disso, as múltiplas introduções de *H. armigera* no Brasil foram originárias do Paquistão, Índia, China e alguns países europeus (TAY et al., 2013; LEITE et al., 2014; ANDERSON et al., 2018), com histórico de diversos casos de resistência a inseticidas (ARMES et al., 1992; TONG et al., 2013; QAYYUM et al., 2015; AHMAD et al., 2019), resultando na busca pela utilização de novos inseticidas para o manejo da praga no país. Uma das opções tem sido o uso de inseticidas do grupo das espinosinas, devido ao mecanismo de ação distinto dos inseticidas tradicionais e à eficácia no controle de *H. armigera* (TARIQ; MALIK; IQBAL, 2005; GHOSH; CHATTERJEE; ROY, 2010).

As espinosinas são lactonas macrocíclicas isoladas de metabólitos secundários obtidos da fermentação de uma bactéria de solo *Saccharopolyspora spinosa* (Mertz and Yao) (SALGADO; SPARKS, 2005; SPARKS et al., 2012). Dentre as diferentes espinosinas isoladas e caracterizadas, apenas dois inseticidas foram comercializados até o presente momento. O primeiro inseticida foi o spinosad, que possui como ingrediente ativo uma mistura de ocorrência natural entre as espinosinas

A (85%) e D (15%), lançado em 1997. O outro inseticida é o spinetoram, composto por uma mistura de duas espinosinas semi-sintéticas, 3'-O-ethyl-5,6-dihydro-spynosin J (principal componente) e 3'-O-ethyl spynosin L, que foi registrado em 2007 e com um maior potencial de ação inseticida que spinosad (SALGADO; SPARKS, 2005; HUANG et al., 2009; SPARKS et al., 2012). Esses inseticidas apresentam grande importância no Manejo da Resistência a Inseticidas (MRI) por apresentarem modo de ação único, agindo como moduladores alostéricos aos receptores nicotínicos da acetilcolina e por apresentar características ambientais e toxicológicas favoráveis, que contribuem para sua utilização em programas de Manejo Integrado de Pragas (MIP) (THOMPSON; DUTTON; SPARKS, 2000; KIRST, 2010; PUINEAN et al., 2013).

Diversos casos de resistência de pragas a inseticidas espinosinas já foram reportados (ROE et al., 2010; MARKUSSEN; KRISTENSEN, 2012; ISHTIAQ; SALEEM; WRIGHT, 2012; REHAN; FREED, 2014; OKUMA et al., 2018; LIRA, 2018), incluindo a evolução da resistência de *H. armigera* a spinosad em condições de laboratório no Paquistão (AHMAD; ARIF; AHMAD, 2003; QAYYUM et al., 2015), Índia (KRANTHI; ALI; BANERJEE, 2000), na Austrália (GUNNING; BALFE, 2002) e na China (WANG et al., 2009), no entanto, apesar do uso frequente de espinosinas para o controle de *H. armigera* no Brasil, ainda não há relatos de casos de resistência.

Diante disso, para compreender o risco de evolução da resistência de *H. armigera* a espinosinas no Brasil visando a implementação de um programa proativo de MRI, foram realizados estudos para (i) acompanhar a suscetibilidade a espinosinas em populações de *H. armigera* coletadas em diferentes regiões e safras agrícolas de 2017 a 2019 do Brasil e (ii) selecionar uma linhagem resistente ao inseticida spinosad em condições de laboratório para compreender as bases genéticas associadas à resistência e a relação de resistência cruzada com spinetoram.

2. CONCLUSÕES

- A suscetibilidade aos inseticidas spinosad e spinetoram em populações de *H. armigera* foi alta durante as safras agrícolas de 2017 a 2019 no Brasil.
- A linhagem de *H. armigera* resistente a spinosad selecionada em condições de laboratório apresentou razão de resistência de 27 vezes.
- O padrão de herança da resistência de *H. armigera* a spinosad é autossômica, incompletamente dominante e poligênica.
- Há resistência cruzada entre spinosad e spinetoram em *H. armigera*.

REFERÊNCIAS

- AHMAD, M.; ARIF, M. I.; AHMAD, Z. Susceptibility of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) to new chemistries in Pakistan. **Crop Protection**, v. 22, n. 3, p. 539–544, 2003.
- AHMAD, M.; RASOOL, B.; AHMAD, M.; RUSSELL, D. A. Resistance and Synergism of Novel Insecticides in Field Populations of Cotton Bollworm *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) in Pakistan. **Journal of Economic Entomology**, p. 1–13, 2019.
- ANDERSON, C. J.; OAKESHOTT, J. G.; TAY, W. T.; GORDON, K. H. J.; ZWICK, A.; WALSH, T. K. Hybridization and gene flow in the mega-pest lineage of moth, *Helicoverpa*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 115, n.19, p. 5034-5039, 2018.
- ARMES, N. J.; JADHAV, D. R.; BOND, G. S.; KING, A. B. S. Insecticide resistance in *Helicoverpa armigera* in South India. **Pesticide Science**, v. 34, n. 4, p. 355–364, 1992.
- COAKER, T. H. Investigations on *Heliothis armigera* (HB.) in Uganda. **Bulletin of Entomological Research**, v. 50, n. 03, p. 487–506, 1959.
- CZEPAK, C.; ALBERNAZ, K. C.; VIVAN, L. M.; GUIMARÃES, H. O.; CARVALHAIS, T. Primeiro registro de ocorrência de *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) no Brasil. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v.43, p.110-113, 2013.
- DURIGAN, M. R.; CORRÊA, A. S.; PEREIRA, R. M.; LEITE, N. A.; AMADO, D.; SOUSA, D. R.; OMOTO, C. High frequency of CYP337B3 gene associated with control failures of *Helicoverpa armigera* with pyrethroid insecticides in Brazil. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 143, p. 73–80, 2017.
- FARROW, R. A.; DALY, J. C. Long-Range Movements as an Adaptive Strategy in the Genus *Heliothis* (Lepidoptera, Noctuidae) - a Review of Its Occurrence and Detection in 4 Pest Species. **Australian Journal of Zoology**, v. 35, n. 1, p. 1–24, 1987.
- FITT, G. P. The ecology of *Heliothis* species in relation to agroecosystems. **Annual Review of Entomology**, v. 34, p. 17-52. 1989.
- GHOSH, A.; CHATTERJEE, M.; ROY, A. Bio-efficacy of spinosad against tomato fruit borer (*Helicoverpa armigera* Hub.) (Lepidoptera: Noctuidae) and its natural enemies. **Journal of Horticulture and Forestry**, v. 2, n. 5, p. 108–111, 2010.
- GUNNING, R. V.; BALFE, M. E. Spinosad resistance in Australian *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae). **Proceedings of 10th IUPAC International Congress on the Chemistry of Crop Protection (Japan)**, p. 290. 2002.
- HUANG, K. X.; XIA, L.; ZHANG, Y.; DING, X.; ZAHN, J. A. Recent advances in the biochemistry of spinosyns. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 82, n. 1, p. 13–23, 2009.

- ISHTIAQ, M.; SALEEM, M. A.; WRIGHT, D. J. Stability, cross-resistance and effect of synergists, PBO and def, on deltamethrin resistant strain of *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae) from Pakistan. **Pakistan Journal of Zoology**, v. 44, n. 6, p. 1677–1682, 2012.
- KIRST, H. A. The spinosyn family of insecticides: realizing the potential of natural products research. **The Journal of Antibiotics**, v. 63, n. 3, p. 101–111, 2010.
- KRANTHI, K. R.; ALI, S. S.; BANERJEE, S. K. Baseline toxicity of spinosad on the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera* (Hub.), in India. **Resistant Pest Management**, v. 11, n. 1, p. 9–12, 2000.
- LEITE, N. A.; ALVES-PEREIRA, A.; CORRÊA, A. S.; ZUCCHI, M. I.; OMOTO, C. Demographics and genetic variability of the new world bollworm (*Helicoverpa zea*) and the old-world bollworm (*Helicoverpa armigera*) in Brazil. **Plos One**, doi: 10.1371/journal.pone.0113286, v. 9, n. 11, 2014.
- LIRA, E. C. **Monitoramento e padrão de herança de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) a spinetoram**. Dissertação. Universidade de São Paulo Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, 2018.
- MARKUSSEN, M. D.; KRISTENSEN, M. Spinosad resistance in female *Musca domestica* L. from a field-derived population. **Pest Management Science**, v. 68, n. 1, p. 75–82, 2012.
- OKUMA, D. M.; BERNARDI, D.; HORIKOSHI, R. J.; BERNARDI, O.; SILVA, A. P.; OMOTO, C. Inheritance and fitness costs of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) resistance to spinosad in Brazil. **Pest Management Science**, v. 74, n. 6, p. 1441–1448, 2018.
- PUINEAN, A. M.; LANDSDELL, S. J.; COLLINS, T.; BIELZA, P.; MILLAR, N. S. A nicotinic acetylcholine receptor transmembrane point mutation (G275e) associated with resistance to spinosad in *Frankliniella occidentalis*. **Journal of Neurochemistry**, Malden, v. 124, n. 5, p. 590-601, 2013.
- QAYYUM, M. A.; WAKIL, W.; ARIF, M. J.; SAHI, S. T.; SAEED, N. A.; RUSSELL, D. A. Multiple resistances against formulated organophosphates, pyrethroids and newer-chemistry insecticides in populations of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) from Pakistan. **Journal of Economic Entomology**, p. 1-8, 2015.
- REHAN, A.; FREED, S. Selection, mechanism, cross resistance and stability of spinosad resistance in *Spodoptera litura* (Fabricius) (Lepidoptera: Noctuidae). **Crop Protection**, 2014.
- ROE, R. M.; YOUNG, H. P.; IWASA, T.; WYSS, C. F.; STUMPF, C. F.; SPARKS, T. C.; WATSON, G. B.; SHEETS, J. J.; THOMPSON, G. D. Mechanism of resistance to spinosyn

- in the tobacco budworm, *Heliothis virescens*. **Pestic. Biochem. Physiol**, v. 96, p. 8–13, 2010.
- SALGADO, V. L.; SPARKS, T. C. The Spinosyns: Chemistry, Biochemistry, Mode of Action, and Resistance. **Comprehensive Molecular Insect Science**, p. 137–173, 2005.
- SPARKS, T.C., DRIPPS, J.E., WATSON, G.B., PAROONAGIAN, D. Resistance and cross-resistance to the spinosyns – A review and analysis. **Pestic. Biochem. Physiol**, v. 102, p. 1–10. doi: 10.1016/j.pestbp.2011.11.004, 2012.
- SPECHT, A.; SOSA-GOMEZ, D. R.; PAULA-MORAES, S. V.; YANO, S. A. C. Morphological and molecular identification of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) and expansion of its occurrence record in Brazil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 48, p. 689–692, 2013.
- SRIVASTAVA, C. P.; JOSHI, N.; TRIVEDI, T. P. Forecasting of *Helicoverpa armigera* populations and impact of climate change. **Indian Journal of Agricultural Sciences**, v. 80, n. 1, p. 3–10, 2010.
- TARIQ, M. C.; MALIK, M. A.; IQBAL, N. Management of *Helicoverpa armigera* with different insecticides. **Pak. J. Agri**, v. 42, p. 75-77, 2005.
- TAY, W. T.; SORIA, M. F; WALSH, T.; THOMAZONI, D.; SILVIE, P.; BEHERE, G. T.; ANDERSON, C.; DOWNES, S. A Brave New World for an Old-World Pest: *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) in Brazil. **Plos One**, v. 8, n. 11, 2013.
- THOMPSON, G. D.; DUTTON, R.; SPARKS, T. C. Spinosad: a case study; an example from a natural products discovery programme. **Pest Management Science**, Sussex, v. 56, n. 8, p. 696-702, 2000.
- TONG, H.; QI, S.; ZHOU, X.; BAI, L. Field resistance of *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae) to organophosphates, pyrethroids, carbamates and four newer chemistry insecticides in Hunan, China. **Journal of Pest Science**, 2013.
- WANG, D.; QIU, X.; REN, X.; NIU, F.; WANG, K. Resistance selection and biochemical characterization of spinosad resistance in *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 95, p. 90-94, 2009.