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

Bases genéticas e moleculares da resistência de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) a spinosad

Daniela Miyuki Okuma

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

**Piracicaba
2015**

Daniela Miyuki Okuma
Engenheira Agrônoma

**Bases genéticas e moleculares da resistência de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith)
(Lepidoptera: Noctuidae) a spinosad**
versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

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

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

**Piracicaba
2015**

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

Okuma, Daniela Miyuki

Bases genéticas e moleculares da resistência de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) a spinosad / Daniela Miyuki Okuma. - - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2015.
104 p. : il.

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

1. Resistência de insetos a inseticidas 2. Spinosad 3. *Spodoptera frugiperda* 4. Herança
5. Custo adaptativo 6. Transcritoma 7. Expressão diferencial de genes I. Título

CDD 632.78
O41b

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"

Aos meus queridos pais Katsuyuki e Vanda, e aos meus irmãos Isa e Dudu, pelo afeto, incentivo e ensinamentos fundamentais em minha formação pessoal e profissional,

Ao meu namorado Makoto Okuno pelo companheirismo, afeto e apoio em todos os momentos,

DEDICO E AGRADEÇO

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Celso Omoto, pela orientação, por todos os ensinamentos, pela oportunidade de realização deste trabalho e pela confiança depositada em mim.

Ao Prof. Dr. Fernando L. Cônsoli pelos conselhos, orientação, apoio e pela disponibilização do laboratório para condução do trabalho.

Aos queridos amigos do Laboratório de Resistência de Artrópodes a Pesticidas (ESALQ/USP), Oderlei Bernardi, Daniel Bernardi, Renato J. Horikoshi, Antônio R. Nascimento, pela amizade, pela excelente convivência, companheirismo, conhecimentos transmitidos e auxílios prestados na condução deste trabalho. Foi uma grande satisfação poder trabalhar, aprender e conviver com vocês todos esses anos.

A Eloisa Salmeron e Gislaine A. A. de Oliveira Campos, por todos os ensinamentos, pela paciência e auxílio na condução das atividades do laboratório, pelos conselhos, por toda ajuda e carinho. Muito obrigada por todo apoio e amizade durante esses anos, os quais foram imprescindíveis para minha formação.

Aos amigos e colegas do Laboratório de Resistência de Artrópodes a Pesticidas (ESALQ/USP), Rogério Machado, Mariana Durigan, Rebeca Ribeiro, Natália Alves, Osmar Arias, Pablo Fresia Coronel, Patrick Marques Dourado, Douglas Amado e Dayana Souza, pelo convívio, companheirismo, pelos momentos de alegria e por toda ajuda fornecida.

Aos estagiários do Laboratório de Resistência de Artrópodes a Pesticidas (ESALQ/USP), Aline Pereira, Amanda Lemes, Leonardo Miraldo, Fernando Semmelroth, Mariana Valentim, Rodrigo Franciscatti, Luis Perazolo, Guilherme Picarelli, Alexandre Colli, Marcelo Mocheti, pelo convívio e auxílios prestados.

Aos amigos do Laboratório de Interações em Insetos (ESALQ/USP), Felipe A. Domingues, Bianca Carbogim, Fabio Dossi, Wanessa Scopel e Ana Flávia Martinez pela colaboração e auxílio prestados.

A todos os amigos e colegas do Programa de Pós-Graduação em Entomologia (ESALQ/USP) pelo agradável convívio, amizade e companheirismo.

À minha família, em especial aos meus pais Vanda e Paulo e aos meus irmãos Isabela e Paulo Eduardo, pelo amor, incentivo e por sempre me auxiliarem e contribuírem para meu crescimento pessoal e profissional.

Ao meu namorado Makoto Okuno, por todo amor, compreensão e apoio incondicionais. Muito obrigada pelo estimo e dedicação em me auxiliar e orientar sempre.

Aos amigos com quem morei em Piracicaba, Fernanda Canassa e Marilis Shimano, obrigado pela amizade, companheirismo e apoio em todos os momentos.

Aos queridos amigos Fernando Cabezas, Odimar Z. Zanardi, Ana Karolina Azevedo, Ravana Sfalcin, Eimi Arikawa pela amizade de todos esses anos, carinho e incentivo.

A todos os funcionários do Departamento de Entomologia e Acarologia da ESALQ/USP, pela dedicação e aos serviços prestados.

A Escola Superior de Agricultura ‘Luiz de Queiroz’ por todas as oportunidades concedidas e por ser um berço de conhecimento.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Entomologia da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ/USP), pelos conhecimentos transmitidos.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de estudo.

Ao IRAC-BR pelo auxílio e apoio na coleta e manutenção de populações de *Spodoptera frugiperda*.

À bibliotecária Eliana Maria Garcia da Biblioteca Central (ESALQ/USP), pelo auxílio na formatação deste trabalho.

A todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para o êxito deste trabalho,
os meus sinceros agradecimentos.

SUMÁRIO

RESUMO	11
ABSTRACT	13
LISTA DE FIGURAS	15
LISTA DE TABELAS	17
1 INTRODUÇÃO.....	19
Referências	20
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	23
2.1 Resistência de <i>Spodoptera frugiperda</i> (J. E. Smith, 1797) a inseticidas.....	23
2.2 Resistência de insetos a espinosinas	24
2.3 Bases genéticas da resistência de insetos a inseticidas.....	28
2.4 Bases moleculares da resistência de insetos a inseticidas	30
Referências	32
3 PADRÃO DE HERANÇA E CUSTO ADAPTATIVO DA RESISTÊNCIA DE <i>Spodoptera frugiperda</i> (J. E. SMITH, 1797) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE) A SPINOSAD.....	43
Resumo	43
Abstract.....	43
3.1 Introdução.....	44
3.2 Material e métodos	45
3.3 Resultados.....	51
3.4 Discussão	59
3.5 Conclusão	61
Referências	61
4 CARACTERIZAÇÃO DO TRANSCRITOMA E ANÁLISE COMPARATIVA DA EXPRESSÃO GÊNICA DE LINHAGENS SUSCETÍVEL E RESISTENTE DE <i>Spodoptera frugiperda</i> (J.E. SMITH, 1797) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE) A SPINOSAD.....	67
Resumo	67
Abstract.....	67
4.1 Introdução.....	68
4.2 Material e métodos	70
4.3 Resultados.....	76
4.4. Validação de genes candidatos por qRT-PCR.....	92

4.5 Avaliação do envolvimento das enzimas do complexo citocromo P450, glutathione S-transferases e esterases no processo de detoxificação do inseto na resistência de <i>S. frugiperda</i> a spinosad.....	93
4.6. Clonagem e sequenciamento da região $\alpha 6$ do receptor nicotínico de acetilcolina (nAChR)	94
4.6. Discussão	95
4.7. Conclusão.....	97
Referências.....	98

RESUMO

Bases genéticas e moleculares da resistência de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) a spinosad

O inseticida spinosad tem sido um dos mais utilizados para o controle de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) no Brasil, devido à sua eficácia e ao seu mecanismo de ação único (modulador alostérico de receptores nicotínicos da acetilcolina). Para fornecer subsídios a um programa de manejo da resistência, foram realizados estudos para compreender as bases genéticas e moleculares da resistência de *S. frugiperda* a este inseticida. Inicialmente, foi selecionada uma linhagem de *S. frugiperda* resistente a spinosad (Spin-res) em laboratório por meio da técnica “F₂ screen”. A razão de resistência, baseada na CL₅₀, foi de aproximadamente 890 vezes. A partir de cruzamentos recíprocos entre a linhagem suscetível (Sus) e Spin-res, constatou-se que o padrão de herança da resistência de *S. frugiperda* a spinosad é autossômica e incompletamente recessiva. Retrocruzamentos da progênie F₁ de cruzamentos recíprocos com a linhagem Spin-res confirmaram a hipótese de herança poligênica da resistência, com número mínimo de segregações independentes variando de 1,86 a 2,45. Além disso, observou-se um elevado custo adaptativo associado à resistência de *S. frugiperda* a spinosad, baseado nos parâmetros da tabela de vida e fertilidade. A partir dos dados de sequenciamento de quatro bibliotecas de cDNA de lagartas de quarto ínstar das linhagens Sus e Spin-res (expostas ou não a spinosad), utilizando a plataforma HiScan1000® (Illumina®), foi realizada a comparação do perfil de transcrição e expressão diferencial de genes entre as linhagens Sus e Spin-R. O transcrito foi montado utilizando a estratégia *de novo* contendo cerca de 19 milhões de leituras *single-end* com qualidades de score acima de 30, gerando 42406 transcritos com o N50 de 598 pb. A busca por similaridade no banco de dados não-redundante (nr) do NCBI, possibilitou a anotação funcional de 24980 (59%) transcritos, alinhando-se a *Bombyx mori* L., *Helicoverpa armigera* (Hübner) e *Spodoptera* spp. com 22,5; 3,81 e 3,6% das sequências respectivamente. Foram identificados 2903 transcritos apresentando expressão diferencial ($P \leq 0,05$, t-test; fold-change > 2) entre as linhagens Spin-res e Sus. Dentre os transcritos relacionados a enzimas do complexo metabólico, 23 P450 monooxigenases, 13 glutathiona S-transferases, uma carboxilesterase e uma esterase foram superexpressas na linhagem Spin-res. Além disso, foi observada a superexpressão de 15 genes relacionados à produção energética na linhagem Spin-res, o que pode estar relacionada ao elevado custo adaptativo associado à resistência. Análises de PCR quantitativo em tempo real confirmaram que os padrões de expressão foram consistentes com os resultados de RNA-seq. Bioensaios com os sinergistas PBO e DEM mostraram pouco envolvimento de enzimas P450 e nenhum envolvimento de glutathiona S-transferases na resistência de *S. frugiperda* a spinosad. O sequenciamento da subunidade $\alpha 6$ do receptor nicotínico de acetilcolina de ambas linhagens demonstrou a existência de uma mutação sinônima entre as duas linhagens (G567A), indicando que a subunidade $\alpha 6$ não é a única relacionada à resistência de *S. frugiperda* a spinosad.

Palavras-chave: Resistência de insetos a inseticidas; Spinosad; *Spodoptera frugiperda*; Herança; Custo adaptativo; Transcritoma; Expressão diferencial de genes

ABSTRACT

Genetic and molecular basis of *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) resistance to spinosad

Spinosad has been one of the most used insecticides to manage *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) in Brazil, due to its efficacy and unique mode of action (nicotinic acetylcholine receptor allosteric modulator). To support an insect resistance management program (IRM), we selected and characterized in laboratory a spinosad-resistant strain (Spin-res) of *S. frugiperda* using the F₂ screen method. The resistance ratio, based on LC₅₀, was $\approx$ 890-fold. Based on reciprocal crosses between susceptible (Sus) and Spin-res, the inheritance of spinosad resistance in *S. frugiperda* was autosomal incompletely recessive. Backcrosses between the F₁ from reciprocal crosses and the parental Spin-res revealed a polygenic resistance, with an estimation of at least 1.86 to 2.45 genes related to spinosad resistance. Furthermore, it was observed a strong fitness cost associated to spinosad-resistance in Spin-res strain, based on the life table and fertility parameters. The characterization of the transcriptional profile and the differential gene expression comparison between susceptible and spinosad-resistant strains of *Spodoptera frugiperda* were obtained from the sequencing of cDNA libraries from fourth instar larvae of Sus and Spin-res strains (exposed or not to spinosad) using a HiScan1000® platform (Illumina®). The transcriptome was *de novo* assembled using nearly 19 million single-end reads with quality score over 30, yielding 42,406 transcripts with a N50 of 598 bp. Based on similarity search in the non-redundant (nr) nucleotide database, 24,980 (59%) transcripts were annotated. Most of the transcripts aligned to *Bombyx mori* L., *Helicoverpa armigera* (Hübner) and *Spodoptera* spp., with 22.5%, 3.81, and 3.6, respectively. We identified 2,032 differentially expressed transcripts ($P \leq 0.05$, t-test; fold-change > 2) between the susceptible and spinosad-resistant strains. Among metabolic enzyme transcripts, 23 P450 monooxygenases, 13 glutathione S-transferases, one carboxylesterase and one esterase were up-regulated in the spinosad-resistant strain. In addition, it was observed 15 genes superexpressed in spinosad-resistant strain related to energy production, which can be related to the high fitness cost associated with resistance. Quantitative real-time PCR analysis showed that patterns of gene expression were consistent with RNA-seq results. Synergistic bioassays using PBO and DEM showed little involvement of P450s in spinosad-resistance and lack of involvement regarding the glutathione S-transferases. Furthermore, we sequenced and compared the subunit $\alpha 6$ from the nicotinic acetylcholine receptor of *S. frugiperda* Spin-res and Sus strains. Only one synonymous mutation within the two strains (G567A) was found, showing that the $\alpha 6$ is not the only subunit involved in *S. frugiperda* resistance to spinosad.

Keywords: Insecticide resistance; Spinosad, *Spodoptera frugiperda*; Inheritance; Fitness cost; Transcriptome analysis; Differential gene expression

LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1 - Concentração-mortalidade das linhagens suscetível (Sus), resistente (Spin-res) e heterozigotos de <i>S. frugiperda</i> expostas ao inseticida spinosad em bioensaio de aplicação na superfície da dieta artificial	52
Figura 3.2 - Efeito da dominância da resistência de <i>S. frugiperda</i> a spinosad em função da concentração do inseticida.....	53
Figura 3.3 - Sobrevivência larval das linhagens suscetível, heterozigoto e resistente de <i>S. frugiperda</i> em plantas de milho tratadas e não tratadas com inseticida spinosad em casa de vegetação	54
Figura 3.4 - Duração e viabilidade das fases de ovo, larva, pupa e ciclo total (ovo-adulto) ($\pm$ EP) de linhagens suscetível, resistente e heterozigóticas a spinosad em <i>Spodoptera frugiperda</i>	56
Figura 3.5 - Período de oviposição e fecundidade diária e total ($\pm$ EP) de linhagens suscetível, resistente e heterozigóticas a spinosad em <i>Spodoptera frugiperda</i>	57
Figura 4.1 - Distribuição do tamanho dos transcritos do transcrito de referência de novo de lagartas das linhagens suscetível e resistente de <i>S. frugiperda</i> a spinosad.....	79
Figura 4.2 - Distribuição das ontologias gênicas (GO) atribuídas ao transcrito de lagartas de linhagens suscetível e resistente de <i>S. frugiperda</i> a spinosad.....	80
Figura 4.3 - Distribuição dos alinhamentos de transcritos por espécie via BLAST do transcrito <i>de novo</i> de lagartas de quarto instar das linhagens suscetível e resistente de <i>S. frugiperda</i> a spinosad	80
Figura 4.4 - Distribuição de transcritos expressos nas linhagens suscetível e resistente de <i>S. frugiperda</i> a spinosad, com ou sem indução	81
Figura 4.5 - Expressão diferencial ($P \leq 0,05$, t-test; expressão relativa > 2) em número de transcritos (a) e em distribuição em $\log_2$ (b) entre as linhagens suscetível e resistente de <i>S. frugiperda</i> a spinosad	82
Figura 4.6 - Distribuição comparativa de transcritos das linhagens suscetível e resistente de <i>S. frugiperda</i> associados ao processo de detoxificação metabólica de insetos como enzimas do complexo citocromo P450, glutatona S-transferases, carboxilesterases e esterases que apresentaram diferenças significativas em sua expressão ($P \leq 0,05$, t-test; expressão relativa > 2).....	85
Figura 4.7 - Distribuição comparativa de transcritos de enzimas do complexo citocromo P450 das linhagens suscetível e resistente de <i>S. frugiperda</i> associadas ao processo de detoxificação	

metabólica de insetos que apresentaram diferenças significativas em sua expressão ($P \leq 0,05$, t-test; expressão relativa > 2)	86
Figura 4.8 - Distribuição comparativa de transcritos de glutathionas S-transferases associadas ao processo de detoxificação metabólica de insetos que apresentaram diferenças significativas em sua expressão ($P \leq 0,05$, t-test; expressão relativa > 2)	88
Figura 4.9 - Distribuição comparativa de transcritos de esterases e carboxilesterases das linhagens suscetível e resistente de <i>S. frugiperda</i> associadas ao processo de detoxificação metabólica de insetos que apresentaram diferenças significativas em sua expressão ($P \leq 0,05$, t-test; expressão relativa > 2)	89
Figura 4.10 - Distribuição dos transcritos relacionados ao metabolismo energético de insetos superexpressos ($P \leq 0,05$, t-test; expressão relativa > 2) na linhagem Spin-res	90
Figura 4.11 - Análise de qPCR demonstrando o valor de expressão relativa de genes selecionados entre indivíduos de linhagens suscetível e resistente de <i>S. frugiperda</i> a spinosad, induzidas ou não com spinosad.....	92
Figura 4.12 - Concentração-mortalidade das linhagens suscetível e resistente de <i>S. frugiperda</i> a spinosad com ou sem o uso dos sinergistas butóxido de piperonila (PBO) e maleato de etila (DEM)	94
Figura 4.13 - Sequência de nucleotídeos e aminoácidos da subunidade $\alpha 6$ do receptor nicotínico de acetilcolina (nAChR) das linhagens suscetível e resistente de <i>S. frugiperda</i> a spinosad.....	94

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1 - Concentração-mortalidade das linhagens de <i>S. frugiperda</i> suscetível (Sus), resistente (Spin-res) e heterozigotos ao inseticida spinosad em bioensaio de aplicação na superfície da dieta artificial	51
Tabela 3.2 - Efeito da dominância da resistência de <i>S. frugiperda</i> a spinosad em função da concentração do inseticida.....	53
Tabela 3.3 - Análise de χ^2 da mortalidade de retrocruzamentos entre a linhagem Spin-res e a progênie F ₁ (cruzamentos recíprocos entre as linhagens Spin-res e Sus) de <i>S. frugiperda</i> para diferentes concentrações de spinosad.....	55
Tabela 3.4 - Parâmetros da tabela de vida e fertilidade das linhagens de <i>Spodoptera frugiperda</i> suscetível, resistente e heterozigóticas provenientes de cruzamentos recíprocos ao inseticida spinosad.....	58
Tabela 3.5 - Custo adaptativo relativo das linhagens de <i>Spodoptera frugiperda</i> suscetível, resistente e heterozigotas	58
Tabela 4.1 - Iniciadores utilizados para a validação da expressão diferencial por PCR quantitativo em tempo real de genes candidatos selecionados da análise de RNASeq.....	74
Tabela 4.2 - Iniciadores utilizados na amplificação e sequenciamento da subunidade $\alpha 6$ do receptor nicotínico de acetilcolina das linhagens Sus e Spin-res de <i>S. frugiperda</i>	76
Tabela 4.3 - Pré-processamento de dados resultantes de sequenciamento de linhagens de <i>S. frugiperda</i> Sus, Sus induzida com spinosad, Spin-res e Spin-res induzida com spinosad.....	78
Tabela 4.4 - Resumo da montagem <i>de novo</i> do transcrito de linhagens suscetível e resistente de <i>S. frugiperda</i> a spinosad	78
Tabela 4.5 - Expressão diferencial ($P \leq 0,05$, t-test; expressão relativa > 2) dos 50 transcritos que apresentaram maiores alterações nos valores de expressão relativa entre lagartas de linhagens suscetível e resistente de <i>S. frugiperda</i> a spinosad	82
Tabela 4.6 - Expressão diferencial de enzimas do complexo citocromo P450 que apresentaram diferenças significativas ($P \leq 0,05$, t-test; expressão relativa > 2) nos valores de expressão relativa entre lagartas das linhagens suscetível e resistente de <i>S. frugiperda</i> a spinosad.....	87
Tabela 4.7 - Expressão diferencial de enzimas glutatônicas S-transferases que apresentaram diferenças significativas ($P \leq 0,05$, t-test; expressão relativa > 2) nos valores de expressão relativa entre lagartas das linhagens suscetível e resistente de <i>S. frugiperda</i> a spinosad.....	88

Tabela 4.8 - Expressão diferencial de enzimas do grupo das esterases que apresentaram diferenças significativas ($P \leq 0,05$, t-test; expressão relativa > 2) nos valores de expressão relativa entre lagartas das linhagens suscetível e resistente de <i>S. frugiperda</i> a spinosad	89
Tabela 4.9 - Expressão diferencial de genes relacionados ao metabolismo energético do inseto, que apresentaram diferenças significativas ($P \leq 0,05$, t-test; expressão relativa > 2) nos valores de expressão relativa entre lagartas das linhagens suscetível e resistente de <i>S. frugiperda</i> a spinosad.....	91
Tabela 4.10 - Análise de qPCR demonstrando o valor de expressão relativa de genes selecionados entre indivíduos suscetíveis e resistentes de <i>S. frugiperda</i> a spinosad que foram induzidas ou não.....	92
Tabela 4.11 - Concentração-mortalidade das linhagens Spin-res e Sus de <i>S. frugiperda</i> ao inseticida spinosad com ou sem o uso dos sinergistas butóxido de piperonila (PBO) e maleato de etila (DEM)	93

1 INTRODUÇÃO

As espinosinas são moléculas inseticidas derivadas da fermentação da actinobactéria *Saccharopolyspora spinosa* (Mertz & Yao). Sua descoberta teve origem a partir de um programa de seleção de produtos naturais, testando extratos de solo fermentados com potencial de utilização na agricultura e/ou na indústria farmacêutica (THOMPSON et al., 2000). Até o presente momento existem dois produtos comerciais à base de espinosinas no controle de pragas agrícolas, o spinosad que possui como ingredientes ativos a espinosina A (componente primário) e espinosina D (componente secundário) e o spinetoram, que possui a mistura de dois componentes semi-sintéticos derivados de espinosinas. O grande interesse nas espinosinas se deve ao fato de possuírem um mecanismo de ação diferente dos demais inseticidas, agindo como moduladores alostéricos do receptor nicotínico da acetilcolina (PUINEAN et al., 2013). As espinosinas apresentam elevada eficiência no controle de pragas com poucos efeitos indesejáveis ao homem, a vida selvagem e ao meio ambiente, além da seletividade a inimigos naturais, sendo, portanto, compatíveis com os princípios do Manejo Integrado de Pragas (MIP).

No atual sistema de produção agrícola no Brasil, o problema de resistência de insetos a inseticidas tem se tornado cada vez mais constante. Entre os problemas fitossanitários, *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) tem provocado prejuízos econômicos em uma série de culturas de importância econômica como milho, algodão e soja (CRUZ, 1995). Em virtude das elevadas infestações e dos grandes prejuízos econômicos causados, o controle químico tem sido uma das principais táticas utilizadas. No entanto, a utilização indiscriminada de inseticidas tem contribuído para o estabelecimento de resistência de *S. frugiperda* a diversos inseticidas (YU, 1991, 1992, 2006; DIEZ-RODRIGUEZ; OMOTO, 2001; CARVALHO et al., 2013; NASCIMENTO et al., 2015). Com a evolução da resistência de *S. frugiperda* aos inseticidas convencionais, tais como piretroides, organofosforados, carbamatos e inibidores da biosíntese de quitina, as espinosinas se tornaram uma opção para o controle desta praga no Brasil. Nesse contexto, o conhecimento prévio de fatores genéticos que afetam a evolução da resistência, tais como a frequência inicial de alelos, padrão de herança da resistência e custo adaptativo associado à resistência são de fundamental importância para se avaliar o risco de evolução da resistência e elaborar estratégias de manejo mais eficientes (GEORGHIOU; TAYLOR, 1977; TABASHNIK; CROFT, 1982).

Apesar de as espinosinas serem moléculas relativamente recentes no mercado, já foram relatados na literatura diversos casos de resistência a spinosad, tais como em *Frankliniella occidentalis* (Pergande) (BIELZA et al., 2007a, 2007b), *Drosophila melanogaster* (Meigen) (PERRY et al., 2007; WATSON et al., 2010), *Spodoptera exigua* (Hübner) (MOULTON et al., 2000), *Tuta absoluta* (Meyrick) (CAMPOS et al., 2014), *Plutella xylostella* (L.) (BAXTER et al., 2010; RINKEVICH et al., 2010), *Spodoptera litura* (F.) (REHAN; FREED, 2014), *Tribolium castaneum* (H.) (RINKEVICH; SCOTT, 2009) e *Anopheles gambiae* (Giles) (JONES et al., 2005), o que comprova o potencial de evolução da resistência a espinosinas.

Sendo assim, para subsidiar a implantação de um programa de manejo da resistência de *S. frugiperda* a espinosinas no Brasil, os objetivos deste estudo foram:

- Caracterizar o padrão de herança e o custo adaptativo associado à resistência de *S. frugiperda* a spinosad;
- Caracterizar o transcrito e o perfil de expressão gênica de linhagens suscetível e resistente de *S. frugiperda* a spinosad para identificar possíveis mecanismos associados a essa resistência.

Referências

- BAXTER, S.W.; MAO, C.; DAWSON, A.; ZHAO, J.Z.; VOGEL, H.; SHELTON, A.M.; HECKEL, D.G.; JIGGINS, C.D. Mis-spliced transcripts of nicotinic acetylcholine receptor $\alpha 6$ are associated with field evolved spinosad resistance in *Plutella xylostella* (L.). **PLoS Genetics**, San Francisco, v. 6, n. 1, p. 1-10, 2010.
- BIELZA, P.; QUINTO, E.F.; GRAVALOS, C.; CONTRERAS, J. Genetics of spinosad resistance in *Frankliniella occidentalis* (Thysanoptera: Thripidae). **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 100, n. 3, p. 916-920, 2007.
- BIELZA, P.; QUINTO, V.; CONTRERAS, J.; TORNE, M.; MARTIN, A.; ESPINOSA, P.J. Resistance to spinosad in the western flower thrips, *Frankliniella occidentalis* (Pergande), in greenhouse of south-eastern Spain. **Pest Management Science**, Sussex, v. 63, n. 7, p. 682-687, 2007.
- CAMPOS, M.R.; RODRIGUES, A.R.S.; SILVA, W.M.; SILVA, T.B.M.; SILVA, V.R.F.; GUEDES, R.N.; SIQUEIRA, H.A.A. Spinosad and the tomato borer *Tuta absoluta*: a bioinsecticide, an invasive pest threat, and high insecticide resistance. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 9, n. 8, 2014. Disponível em: <doi:10.1371/journal.pone.0103235>. Acesso: 09 jan. 2015.
- CRUZ, I. **A lagarta-do-cartucho na cultura do milho**. Sete Lagoas: EMBRAPA, CNPMS, 1995. 45 p. (Circular Técnica, 21).

GEORGHIOU, G.P.; TAYLOR, C.E. Genetic and biological influences in the evolution of insecticide resistance. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 70, n. 3, p. 319-323, 1977.

Insecticide resistance action committee (IRAC). Disponível em: <<http://www.irac-online.org>>. Acesso em: 08 jan. 2015.

JONES, T.; SCOTT-DUPREE, C.; HARRIS, R.; SHIPP, L.; HARRIS, B. The efficacy of spinosad against the western flower thrips, *Frankliniella occidentalis*, and its impact on associated biological control agents on greenhouse cucumbers in southern Ontario. **Pest Management Science**, Sussex, v. 61, p. 179-185, 2005.

MOULTON, J.K.; PEPPER, D.A.; DENNEHY, T.J. Beet armyworm (*Spodoptera exigua*) resistance to spinosad. **Pest Management Science**, Sussex, v. 56, p. 842-848, 2000.

ORR, N.; SHAFFNER, A.J.; RICHEY, K.; CROUSE, G.D. Novel mode of action of spinosad: receptor binding studies demonstrating lack of interaction with known insecticidal target sites. **Pesticide Biochemistry Physiology**, San Diego, v. 95, n. 1, p. 1-5, 2009.

PERRY, T.; McKENSIE, J.A.; BATTERHAM, P. A D α 6 knockout strain of *Drosophila melanogaster* confers high level of resistance to spinosad. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 37, p. 184-188, 2007.

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**, Bethesda, v. 124, n. 5, p. 590-601, 2013.

REHAN, A.; FREED, S. Selection, mechanism, cross resistance and stability of spinosad resistance in *Spodoptera litura* (Fabricius) (Lepidoptera: Noctuidae). **Crop Protection**, Guildford, v. 56, p. 10-15, 2014.

RINKEVICH, F.D.; SCOTT, J.G. Transcriptional diversity and allelic variation in nicotinic acetylcholine receptor subunits of the red flour beetle, *Tribolium castaneum*. **Insect Molecular Biology**, Malden, v. 18, n. 2, p. 233-242, 2009.

TABASHNIK, B.E.; CROFT, B.A. Managing pesticide resistance in crop-arthropod complexes: interactions between biological and operational factors. **Environmental Entomology**, College Park, v. 11, p. 1137-1144, 1982.

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.

WATSON, G.B.; CHOUINARD, S.W.; COOK, K.R.; GENG, C.X.; GIFFORD, J.M.; GUSTAFSON, G.D.; HASLER, J.M.; LARRINUA, I.M.; LETHERER, T.J.; MITCHELL, J.C.; PAK, W.L.; SALGADO, V.L.; SPARKS, T.C.; STILWELL, G.E. A spinosyn-sensitive *Drosophila melanogaster* nicotinic acetylcholine receptor gene identification and heterologous expression. **Insect Biochemistry and Physiology**, Malden, v. 40, n. 5, p. 376-384, 2010.

YU, S.J. Insecticide resistance in the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, San Diego, v. 39, p. 84-91, 1991.

_____. Detection and biochemical characterization of insecticide resistance in fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae). **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 85, p. 675-682, 1992.

_____. Insensitivity of acetylcholinesterase in a field strain of the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, San Diego, v. 84, p. 135-142, 2006.

YU, S.J.; NGUYEN, S.N.; ABO-ELGHAR, G.E. Biochemical characteristics of insecticide resistance in the fall armyworm *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, San Diego, v. 77, p. 1-11, 2003.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Resistência de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) a inseticidas

Spodoptera frugiperda (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) é considerada uma praga de grande importância econômica em culturas do milho, algodão, arroz, soja, amendoim, trigo e sorgo (CORTEZ; WAQUIL, 1997; BOTTON et al., 1998). Desse modo, *S. frugiperda* constitui-se em uma das pragas mais nocivas para as culturas anuais das regiões tropicais. No Brasil, a espécie é considerada a praga mais importante da cultura do milho (VALICENTE; TUELHER, 2009) e, nos últimos anos, tem ocasionado elevadas infestações e perdas econômicas na cultura do algodão, principalmente nas áreas agrícolas do cerrado brasileiro (MARTINELLI et al., 2006). As infestações em algodão, de um modo geral, ocorrem por meio da dispersão de mariposas provenientes de áreas com milho, milheto e outras gramíneas (SOARES; VIEIRA, 1998). As causas do aumento populacional da espécie em diferentes culturas estão diretamente relacionadas ao sistema de produção de cultivos, com plantios consecutivos ou sobrepostos de milho, soja, milheto e algodão. As gramíneas têm se mostrado espécies hospedeiras adequadas ao desenvolvimento do inseto, favorecendo a ocorrência dos surtos populacionais no algodoeiro, ao promover a manutenção do ciclo reprodutivo da praga (LUTTRELL; MINK, 1999).

Segundo Arthropod Pesticide Resistance Database (2014), os primeiros registros de resistência de *S. frugiperda* ocorreram em 1965 na Bolívia para metomil. No entanto, o primeiro caso constatado foi no estado da Flórida (USA), em que se verificou a resistência ao inseticida carbaril, em consequência do aumento de detoxificação metabólica (YOUNG; McMILIAN, 1979). Atualmente, há registros de 42 casos de resistência de *S. frugiperda* para 19 moléculas inseticidas pertencentes ao grupo de organofosforados (clorpirifós, diazinona, malationa, parationa-metílica e triclorfom), piretroides (permetrina, ciflutrina, lambda-cialotrina, cipermetrina, DDT, deltametrina, fenvalato e fluvalinato), carbamatos (carbaril, metomil e tiodicarbe), antagonistas dos canais de cloro mediados pelo GABA (dieldrin, aldrin e HCH-gama) e duas proteínas Bt (Cry1F, Cry1Ac) (ARTHROPOD PESTICIDE RESISTANCE DATABASE, 2014).

Populações de *S. frugiperda* do norte da Flórida (EUA) apresentaram razões de resistência de 2 a 216 para piretroides, de 12 a 271 para organofosforados e de 14 a 192 vezes para carbamatos (YU, 1991). A resistência de *S. frugiperda* também foi observada em populações selecionadas em laboratório, que apresentaram razão de resistência de 41 vezes a lambda-cialotrina (MORRILO; NOTZ, 2001). Em 2003, Yu, Nguyen e Abo-Elghar (2003),

identificaram populações com razão de resistência de 562 vezes a carbaril e 354 vezes a metilparation. No Brasil, a resistência também foi confirmada em uma população do estado do Mato Grosso para lambda-cialotrina com a razão de resistência (RR) de 28 vezes, para clorpirifós em Minas Gerais com uma RR de 18 vezes (CARVALHO et al., 2013) e mais recentemente para lufenuron com razão de resistência de ≈ 915 vezes (NASCIMENTO et al., 2015). Recentemente, estudos conduzidos em Porto Rico demonstraram a existência de populações de *S. frugiperda* resistentes à proteína Cry1F expressa em milho geneticamente modificado (STORER et al., 2010). Em 2014, a evolução da resistência de *S. frugiperda* a Cry1F também foi reportada no Brasil (FARIAS et al., 2014).

O principal mecanismo de resistência a inseticidas em *S. frugiperda* tem sido o aumento na degradação de inseticidas (CARVALHO et al., 2013; YU, 1992, 1993). Entretanto, Yu (2006) e Yu, Nguyen e Abo-Elghar (2003) também confirmaram o mecanismo de resistência devido à insensibilidade de sítios de ação. Sendo assim, é importante ressaltar que pragas polífagas como *S. frugiperda* apresentam ao longo de sua história evolutiva uma elevada variabilidade genética, que facilitam sua adaptação em diferentes condições. Com a evolução da resistência de *S. frugiperda* a inseticidas tradicionais como organofosforados, piretroides e inibidores de biossíntese de quitina, e também a proteínas Bt, as espinosinas se tornaram uma opção para o controle eficiente da praga e manejo da resistência no Brasil.

2.2 Resistência de insetos a espinosinas

As espinosinas são metabólitos secundários da fermentação aeróbica de uma actinobactéria de solo *Saccharopolyspora spinosa* (Mertz & Yao, 1990) (Actinomycetales: Pseudonocardaceae) em meio de cultura (SALGADO & SPARKS, 2005). Estruturalmente esses metabólitos são macrolídeos formados por um anel tetracíclico ligado a duas moléculas de açúcares diferentes (THOMPSON et al., 2000). Até 2009 existiam mais de 25 espinosinas, isoladas e caracterizadas a partir de *S. spinosa* (HUANG et al., 2009). A variação entre as moléculas se deve a diferentes padrões de substituição do radical metil no açúcar forosamine, a posição do radical metil no açúcar rhamnose, e a posição do anel tetracíclico (C6, C16, C21) (CROUSE et al., 2001). Ainda, foram sintetizados milhares de espinosídeos análogos sintéticos e semissintéticos em laboratório nos últimos anos (SALGADO; SPARKS, 2005). Os metabólitos de maior abundância na fermentação de *S. spinosa* são as espinosinas A (85%) e D (15%), as quais são ingredientes ativos do primeiro inseticida a base de espinosinas, chamado spinosad que foi lançado em 1997. Posteriormente, em 2007, foi liberado o

inseticida spinetoram, que é composto por duas espinosinas semissintéticas, 3'-*O*-ethyl-5,6-dihydro-spynosin J (principal componente) e 3'-*O*-ethyl spynosin L (HUANG et al., 2009).

A intoxicação de insetos por spinosad ou spinetoram está associada à excitação do sistema nervoso, devido à sua ação nos receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChRs). Os sintomas iniciais de insetos tratados com o inseticida são de contrações musculares involuntárias e tremores pela excitação de neurônios motores por efeito direto das espinosinas no sistema nervoso central (SALGADO, 1998). Além disso, foi comprovado que elas causam hiperexcitação diretamente no sistema nervoso central, uma vez que foram aplicadas concentrações muito baixas em gânglios isolados, e causaram a excitação dos mesmos (SALGADO, 1998). Após longos períodos de excitação induzidos pelo ativo, os insetos ficam paralisados, aparentemente devido à fadiga muscular (SALGADO, 1998; SALGADO et al., 1998). Em muitos ensaios químicos, a espinosina A exibiu resultados semelhantes ou melhores que piretroides como a cipermetrina, quando injetada, mas menos ativa quando aplicada topicamente. Esse fato é decorrente da menor penetração do produto no inseto (SPARKS et al., 2001). Além disso, se mostrou mais eficiente do que organofosforados, carbamatos e ciclodienos (SPARKS et al., 1998). As espinosinas agem nos receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChRs). Os nAChRs são da família de canais de íons Cys-loop, que são ativados mediante a ligação de neuroreceptores, sendo considerados muito importantes tanto em espécies de vertebrados como de invertebrados (LESTER et al., 2004). Os receptores da família Cys-loop podem ser excitatórios (selecionam cátions) como o nAChRs ativados pela acetilcolina, ou inibitórios (selecionam ânions) como os canais de cloro ativados pelo glutamato (GluCl). Os canais de nAChR e GluCl possuem estrutura similares, sendo ambos proteínas transmembranais com cinco unidades dispostas ao redor de um poro canalizador de íons. As espinosinas se ligam em um sítio alostérico ao da acetilcolina, diferindo do mecanismo de ação dos neonicotinoides (SALGADO; SARR, 2004; ORR et al., 2009).

Acredita-se ainda que as espinosinas também possuam efeito nos receptores do ácido γ -aminobutírico (GABA), assim como as avermectinas. Segundo Salgado (1998) é possível que as espinosinas exerçam ação nesses receptores devido a uma mudança na amplitude da condutância de cloro, que corresponde com a perda de função dos receptores de GABA em insetos tratados com spinosad. Entretanto, nota-se que as espinosinas não interagem diretamente com nenhum dos receptores de GABA conhecidos. Desse modo, tanto as espinosinas quanto os espinosoides possuem efeito em receptores nicotínicos e de γ -aminobutírico, por meio de sua ligação a sítios alostéricos ativadores dos respectivos

receptores via transmembrana (SPARKS et al., 2001; ORR et al., 2009). Outro fato que suporta essa hipótese é a ausência de relatos de que indivíduos resistentes a neonicotinoides ou avermectinas também sejam resistentes a espinosinas, ou seja, não há resistência cruzada entre espinosinas e neonicotinoides ou avermectinas. Apesar de as espinosinas estarem no mercado desde 1997, o surgimento de linhagens de insetos resistentes tem ameaçado a sustentabilidade dessas moléculas no controle de insetos, levando a possíveis perdas de eficiência. Casos de resistência a spinosad têm sido reportados em diversas espécies de insetos, incluindo representantes de Coleoptera *Leptinotarsa decemlineata* (Say) (MOTA-SANCHEZ et al., 2006), de Diptera *Drosophila melanogaster* (Meigen) (PERRY et al., 2007), *Musca domestica* L. (MARKUSSEN; KRISTENSEN, 2012) e *Bractrocera oleae* (Rossi) (SAGRI et al., 2014), de Lepidoptera *Spodoptera exigua* (Hübner) (MOULTON et al., 2000), *Heliothis virescens* (Fabricius) (ROE et al., 2010) de *Spodoptera litura* (Fabricius) (REHAN; FREED, 2014) e de Thysanoptera *Frankliniella occidentalis* (Pergande) (PUINEAN et al., 2013). Atualmente existem relatos de resistência a spinosad para 16 espécies (ARTHROPOD PESTICIDE RESISTANCE DATABASE, 2014). A resistência de insetos a spinosad pode ser tanto por detoxificação metabólica, quanto por mudanças no sítio de ação. Markussen e Kristensen (2011) verificou que a linhagem de *M. domestica* resistente a spinosad com uma razão de resistência (RR) de 88 vezes, quando tratada com o sinergista butóxido de piperonila (PBO), apresentou uma redução da RR em 8 vezes. Além disso, foram observados maiores níveis de expressão da enzima CYP6A1 na linhagem resistente em comparação à linhagem suscetível, indicando o forte envolvimento das enzimas do complexo P450s nessa resistência. Outro resultado semelhante foi constatado por Rehan e Freed (2014) para uma linhagem de *S. litura* (RR = 3921), em que a utilização do sinergista PBO aumentou a suscetibilidade da linhagem resistente em 2,3 vezes e de *S. litura* em 9,8 vezes (WANG et al., 2006). No entanto, Khan et al. (2014) e Campo et al. (2014) observaram que a resistência a spinosad das linhagens de *M. domestica* (RR = 155) e *Tuta absoluta* (Meyrick) (RR = 180.000) não estavam relacionadas a enzimas do complexo metabólico. A explicação é que a maioria dos casos de resistência a espinosinas está relacionada a mudanças nos sítios de ligação da molécula.

A partir de estudos conduzidos em organismos modelos como *D. melanogaster* (RR = 1181) foi comprovada que a subunidade Da6 de nAChR é o sítio determinante no desenvolvimento de resistência de insetos a espinosinas (PERRY et al., 2007; WATSON et al., 2010). Por exemplo, uma linhagem que possui a subunidade Da6 inoperante mostrou um elevado nível de resistência a spinosad (PERRY et al., 2007). Ainda, foram relatadas uma

variedade de mutações induzidas envolvendo a subunidade Da6 que originaram mutações sem sentido e/ou proteínas truncadas, conferindo resistência das linhagens a spinosad (WATSON et al., 2010). Mais evidências comprovando que a resistência a espinosinas se deve a mutações nesse sítio alvo (subunidade nAChR $\alpha 6$) foram observadas em estudos com *P. xylostella* (BAXTER et al., 2010; RINKEVICH et al., 2010). Verificou-se que a resistência de *P. xylostella* a spinosad é causada por um *splicing* alternativo de éxons (BAXTER et al., 2010), e também por mutações pontuais, o que gera códons de parada prematuros (RINKEVICH et al., 2010), resultando na expressão de uma proteína que possui menor afinidade pelas espinosinas. Puinean et al. (2013) observaram que a resistência de *F. occidentalis* a espinosinas se deve a uma mutação pontual, que resultou na expressão de um ácido glutâmico ou invés de glicina em indivíduos resistentes na subunidade Fo $\alpha 6$. Quando essa mutação foi gerada em um vertebrado, o receptor apresentou baixa afinidade a spinosad, mas não afetando a acetilcolina.

Além disso, devido ao mesmo mecanismo de ação, os insetos resistentes a spinosad possuem resistência cruzada ao spinetoram e outras espinosinas. Como por exemplo, uma população de *D. melanogaster* selecionada por sua resistência a spinosad, também demonstrou ser resistente a uma espinosina derivada 21 – butenil (WATSON et al., 2010). Similarmente, em outros estudos constatou-se a resistência cruzada de *P. xylostella* (ZHAO et al., 2002) e *H. virescens* (YOUNG et al., 2003; ROE et al., 2010) a análogos da espinosina J (3'-O-ethyl espinosina J) e a spinetoram, respectivamente. Entretanto, ainda não se observou resistência múltipla para nenhuma outra classe de inseticidas. Por exemplo, linhagens de *D. melanogaster* e *M. domestica* resistentes a spinosad e spinetoram não demonstraram resistência múltipla a neonicotinoides (imidacloprid), organofosforados (dimetoato), carbamatos (metomil), avermectinas (avermectina B_{1a}), piretroides (piretrina) e oxidiazinas (indoxacarb) (WATSON et al., 2010). Em geral, padrões similares foram observados para *H. virescens* (YOUNG et al., 2001; ROE et al., 2010), *Helicoverpa armigera* (Hübner) (AHMAD et al., 2003), *P. xylostella* (ZHAO et al., 2006) e *Spodoptera exigua* (Hübner) (WANG et al., 2006).

Atualmente, as espinosinas são consideradas de grande importância no manejo integrado de pragas por possuírem elevada eficiência, características ambientais e toxicológicas favoráveis, um mecanismo de ação único, além de apresentarem baixa toxidez a populações de insetos benéficos (SPARKS et al., 2001). Desse modo, é necessário que se conheça os mecanismos e as bases genéticas envolvidos na resistência de insetos a

espinosinas, a fim de se desenvolver estratégias de manejo e de monitoramento da resistência que auxiliem a prolongar a vida útil dessa molécula inseticida.

2.3 Bases genéticas da resistência de insetos a inseticidas

A resistência de insetos a inseticidas é um processo evolutivo decorrente da presença de variabilidade genética e da pressão de seleção pela exposição contínua a um determinado xenobiótico. Atualmente, dentre as estratégias utilizadas no manejo de pragas, o controle químico é ainda considerado uma das principais táticas. No entanto, o uso excessivo de pesticidas tem elevado o problema da resistência em grandes proporções. O número de casos de resistência documentado até 2014 foi de 12.905, associados a 586 espécies e 330 ingredientes ativos (SPARKS; NAUEN, 2014). Desse modo, muitas das tecnologias desenvolvidas estão perdendo sua eficiência, devido a falhas no controle, causando prejuízos econômicos e levando ao desuso de determinado produto. A evolução da resistência no campo pode ser afetada por fatores genéticos e bioecológicos intrínsecos à praga ou por fatores operacionais (GEORGHIOU; TAYLOR, 1977 a, b) relacionados ao uso do inseticida e ao mecanismo de ação da molécula (ROUSH; McKENZIE, 1987). Os fatores operacionais podem ser superados com práticas de manejo, no entanto, os fatores genéticos e bioecológicos são de difícil manipulação e essenciais para a melhor compreensão da evolução da resistência e, posterior elaboração e refinamento de estratégias de manejo da resistência (ROUSH; DALY 1990, TABASHNIK, 1991, McKENZIE, 2000). Essas informações podem ser exploradas a partir da avaliação do padrão de herança e custo adaptativo associado à resistência, em estudos de resistência cruzada, frequência inicial de alelos da resistência em populações de campo e modelos de simulação de evolução da resistência (ROUSH; McKENZIE, 1987; ROUSH; DALY 1990, TABASHNIK, 1991). Atualmente, os inseticidas possuem um mecanismo de ação muito específico, sendo assim, mutações pontuais nos insetos que afetem a degradação metabólica ou o sítio de ação do inseticida podem conferir um elevado nível de resistência.

Há vários estudos a respeito do número de genes envolvidos na resistência de insetos a inseticidas. A seleção de linhagens resistentes em laboratório poderá acumular vários genes, mas de pequeno efeito durante várias gerações, resultando em uma resistência poligênica (ROUSH; McKENZIE, 1987). Segundo Roush e McKenzie (1987), quando um gene proporciona um elevado nível de resistência, outros genes podem contribuir de maneira insignificante para a resistência. A resistência poligênica também acontece no campo, no entanto, a resistência monogênica pode ser muito mais facilmente disseminada (TAYLOR;

GEORGHIOU, 1979). Além disso, é importante conhecer a dominância da resistência, uma vez que ela se refere à expressão fenotípica de indivíduos heterozigotos em relação aos parentais homozigotos. Altas doses de inseticida podem fazer com que a resistência seja funcionalmente recessiva por eliminar os heterozigotos e uma baixa dose pode torná-la funcionalmente dominante. Sendo assim, a dominância se refere à resposta fenotípica em função da dose aplicada e não de alelo relacionados à resistência (FORD, 1975), e não há um padrão definido, pois dependerá da variabilidade genética presente na população de uma determinada espécie de inseto, da pressão de seleção com determinado inseticida e do mecanismo de resistência (ROUSH; McKENZIE, 1987). Há relatos de casos de resistência de *P. xylostella*, a piretroides e carbamatos que demonstram uma resistência incompletamente recessiva e autossômica a permetrina e, incompletamente dominante e autossômica para metomil (YU, 1993). Kaur e Dilawari (2011) avaliando as bases genéticas associadas à resistência de *H. armigera* a toxina Cry1Ac, observaram que a resistência é associada a um cromossomo autossômico, entretanto, *H. armigera* apresentou herança poligênica da resistência.

Outra característica importante a ser avaliada em estudos de resistência é a presença ou não de um custo adaptativo. O custo adaptativo é a capacidade de um indivíduo portador de uma carga genética específica sobreviver e reproduzir em relação a outros indivíduos da mesma espécie, que uma vez relacionada à resistência pode retardar o desenvolvimento da mesma na população sob certas condições (GASSMANN et al., 2009). Sayyed et al. (2008), avaliando parâmetros biológicos em populações de *H. virescens* resistentes a deltametrina e indoxacarb, observaram uma menor sobrevivência larval, menor número de ovos por fêmea e fertilidade, que impactou negativamente a taxa líquida de reprodução. Wang et al. (2010), estudando o custo adaptativo de *H. armigera* resistente a spinosad, observaram que o período de desenvolvimento nas populações resistentes aumentaram em 4-5 dias, sendo isso um reflexo do prolongamento na duração das fases de ovo, larva e pupa, além de menor taxa líquida de reprodução e taxa intrínseca de crescimento. A presença de custo adaptativo favorece o restabelecimento da suscetibilidade na ausência da pressão de seleção. Entretanto, existem casos em que não se observou a presença do custo, especialmente em linhagens resistentes a proteínas Bt expressas em plantas transgênicas (VÉLEZ et al., 2013; JAKKA et al., 2014; LU et al., 2014).

Os fatores genéticos e bioecológicos da praga associados às características do inseticida e ao mecanismo de resistência constituem a base dos programas de manejo de resistência. No entanto, devem sempre estar aliados ao sistema de cultivos e aos fatores

operacionais da região, a fim de se estabelecerem práticas mais eficientes e sustentáveis de manejo da resistência.

2.4 Bases moleculares da resistência de insetos a inseticidas

Nos últimos anos, novas ferramentas em biologia molecular facilitaram estudos envolvendo mecanismos moleculares atuando em diversos processos metabólicos de insetos. A partir de 2004, os sequenciadores de nova geração (Next-Generation Sequencing) (NGS), proporcionaram a obtenção de uma elevada quantidade de dados genéticos de maneira rápida e barata, chegando a sequenciar até um bilhão de sequências por corrida (METZKER, 2009). Dentre outras aplicações, o NGS possibilitou grandes avanços em estudos relacionados ao sequenciamento de transcriptomas inteiros (RNA-seq) (OZSOLAK; MILOS, 2011). O transcriptoma pode ser considerado como uma lista completa de todas as classes de moléculas de RNA, expressos em uma célula, um tecido ou mesmo em todo o organismo (WANG; GERSTEIN; SNYDER, 2009). Um transcrito de RNA pode sofrer diversos processos de regulação, sendo assim, o perfil de transcritos do RNA de um indivíduo pode variar de acordo com o desenvolvimento e estímulos ambientais. Portanto, as montagens de transcriptomas podem ser aplicadas a uma ampla gama de estudos biológicos e fisiológicos, fornecendo informações sobre determinado mecanismo fisiológico e quantificando a expressão de genes em diferentes tecidos, estágios de desenvolvimento e diferentes condições (WANG; GERSTEIN; SNYDER, 2009). A ausência de genomas de referências era um dos fatores limitantes no estudo genômico de espécies não modelos, como as pragas-agrícolas (SCHULZ et al., 2012). Entretanto, a partir da análise de RNA-seq foi possível realizar a montagem *de novo*, a qual seria a montagem do transcriptoma na ausência de um genoma de referência. Essa montagem é realizada a partir de algoritmos que buscam sobreposições nas sequências curtas obtidas no sequenciamento, permitindo a montagem de *contigs* (MARTIN; WANG, 2011). Um grande número de genes associados a específicos estágios de desenvolvimento e à resistência a inseticidas foram identificados em *Bractrocera dorsalis* (Hendel) (SHEN et al., 2011), *Locusta migratoria* (Mayen) (CHEN et al., 2010), *Bemisia tabaci* (Gennadius) (WANG et al., 2010), *Panonychus citri* (McGregor) (LIU et al., 2011) e *P. xylostella* (LIN et al., 2013), *Meligethes aeneus* F. (ZIMMER et al., 2014) utilizando a estratégia de montagem do transcriptoma *de novo*.

Nos últimos anos observou-se uma grande expansão da utilização de análises moleculares para caracterização de mecanismos de resistência de insetos a inseticidas e toxinas Bt, caracterizando genes e enzimas a fim de se elucidar os aspectos fisiológicos e

moleculares envolvidos nessa resistência (RANSON et al., 2002). Os principais mecanismos associados à resistência de insetos a inseticidas são o aumento da taxa de detoxificação metabólica, a redução da sensibilidade do sítio de ação e a redução da penetração cuticular do produto (GEORGHIOU, 1972; SCOTT, 1990; SCOTT, 1995). Dentre as enzimas do complexo metabólico do inseto, existem três famílias principais que compreendem as enzimas do complexo de citocromos P450 monooxigenases (CYPs), as glutatona S-transferases (GSTs) e as esterases. Devido a sua enorme variabilidade genética, a sua ampla especificidade de alvos e diversidade catalítica, as CYPs compreendem um sistema metabólico capaz de metabolizar quase todas as classes de inseticidas (FEYEREISEN, 2005). Foram observados mais de 25 P450s genes das famílias CYP3, CYP4, CYP6, CYP9 e CYP12 relacionados à resistência de insetos a inseticidas (TIJET et al., 2001; RANSON et al., 2002). Em todos os casos reportados observou-se a superexpressão dessas enzimas em insetos resistentes (LI et al., 2007). As monooxigenases são muito conhecidas pela degradação de piretroides, juntamente com a insensibilidade de sítios alvos provenientes de mutações, como em *H. armigera* na Austrália (JOUNBEN et al., 2012), *Meligethes aeneus* na Europa (ZIMMER et al., 2014). Algumas P450 como CYP4G2, CYP6A1, CYP6G4, CYP6D3 já foram associadas à resistência de *Musca domestica* L. a spinosad (HOJLAND et al., 2014). As GSTs são outro importante grupo de enzimas que participam da metabolização secundária de xenobióticos pela conjugação de uma molécula de glutatona reduzida, além disso, também participam de sequestro e transporte de moléculas naturais ou sintéticas, como piretroides em *Tenebrio molitor* L. (ATKINS et al., 1993; ENAYATI; RANSON; HEMINGWAY, 2005; KOSTAROPOULOS et al., 2001). Até o presente momento existem 6 genes de GSTs relacionados à resistência de insetos a inseticidas (LI; SCHULER; BERENBAUM, 2007), tanto por superexpressão, como em *M. domestica* (*MdGSTD3*) resistente a organofosforados (SYVANEN; ZHOU; WANG; 1994), como também por amplificação gênica, como por exemplo em *Nilaparva lugens* (Stal) (*NIGSTD1*) resistente a piretroide (VONTAS; SMALL; HEMINGWAY, 2001). As GSTs também estão envolvidas na resistência de *P. xylostella* a organofosforados (HUANG et al., 1998, SONODA; ASHFAQ; TSUKUMI, 2006), *Anopheles gambiae* Giles a organoclorados (RANSON et al., 2001), *N. luges* a piretroides (VONTAS; SMALL; HEMINGWAY, 2001) e a espinosinas em *Choristoneura rosaceana* (Harris) (SIAL; BRUNNER; GARCZYNSKI, 2011). O terceiro grupo de enzimas do complexo metabólico corresponde às esterases, que frequentemente estão envolvidas na resistência a organofosforados (CLAUDIANOS; RUSSELL; OAKESHOTT, 1999) em *M. domestica* e a carbamatos em *Myzus persicae* (Sulzer) (FIELD; DEVONSHIRE, 1998). A

resistência pode ser conferida por meio da superexpressão gênica, da amplificação gênica, por meio de mutações e também pela combinação desses mecanismos (LI; SCHULER; BERENBAUM, 2007).

O segundo mecanismo mais comum tem sido a mudança da sensibilidade do sítio de ação do inseticida. Essa resistência é decorrente da mudança estrutural do receptor da molécula inseticida, que pode ser originada por *splicing* alternativo de éxons, mutações pontuais, geralmente por transição ocasionando mutações de sentido trocado e pela formação de códons de parada prematuros (BAXTER et al., 2010; PERRY et al., 2007; PUINEAN et al., 2013). Isso foi verificado para spinosad em *F. occidentalis* (Foa6) (PUINEAN et al., 2013), *P. xylostella* (Pxα6) (BAXTER et al., 2010), *D. melanogaster* (Dα6) (PERRY et al., 2007), com a ocorrência comum na subunidade α6, o que pode evidenciar uma tendência na resistência dos insetos a essa molécula. Outro mecanismo de resistência conhecido é a redução da penetração do pesticida. Presume-se que a estrutura cuticular diminui a penetração de moléculas inseticidas. Além disso, alguns trabalhos indicam que essa característica, alinhada a mudanças de comportamento do inseto (considerada como resistência comportamental), contribui de maneira eficiente para resistência.

Sendo assim, entender os mecanismos moleculares básicos e a elucidação de processos evolucionários relacionados à resistência de insetos a inseticidas é de extrema importância. Ainda, a enorme quantidade de informação proporcionada pelo sequenciamento gênico e de transcritos representam uma nova ferramenta para elucidar os processos de detoxificação e para caracterizar os processos de regulação de transcrição que coordenam respostas de diversos genes. Com isso será possível utilizar o conhecimento de mecanismos de resistência a fim de se fundamentar estratégias de manejo da resistência.

Referências

AHMAD, M.; ARIF, M.I.; AHMAD, Z. Susceptibility of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) to new chemicals in Pakistan. **Crop Protection**, Guildford, v. 22, n. 3, p. 539-544, 2003.

AL-SARAR, A.S.; HALL, FR.; DOWNER, R.A. The impact of spray application methodology on the development of resistance to cypermethrin and spinosad by fall armyworm *Spodoptera frugiperda* (Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). **Pest Management Science**, Sussex, v. 62, n. 11, p. 141-149, 2006.

ARTHROPOD PESTICIDE RESISTANCE DATABASE. **Michigan State University**. Disponível: <<http://www.pesticideresistance.com>>. Acesso em: 08 jan. 15.

ATKINS, W.M.; WANG, R.W.; BIRD, A.W.; NEWTON, D.J.; LU, A.H.W. The catalytic mechanism of glutathione S-transferase (GST): spectroscopic determination of the pKa of Tyr-9 in rat alpha 1-1 GST. **Journal of Biological Chemistry**, Maryland, v. 268, n. 26, p. 19188-19191, 1993.

BASIT, M.; SAYYED, A.H.; SAEED, S.; SALEEM, M.A. Lack of fitness costs associated with acetamiprid resistance in *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae). **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 105, n. 4, p. 1401-1406, 2012.

BAXTER, S.W.; MAO, C.; DAWSON, A.; ZHAO, J.Z.; VOGEL, H.; SHELTON, A.M.; HECKEL, D.G.; JIGGINS, C.D. Mis-spliced transcripts of nicotinic acetylcholine receptor $\alpha 6$ are associated with field evolved spinosad resistance in *Plutella xylostella* (L.). **PLoS Genetics**, San Francisco, v. 6, n. 1, p. 1-10, 2010.

BIELZA, P.; QUINTO, E.F.; GRAVALOS, C.; CONTRERAS, J. Genetics of spinosad resistance in *Frankliniella occidentalis* (Thysanoptera: Thripidae). **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 100, n. 3, p. 916-920, 2007.

BIELZA, P.; QUINTO, V.; CONTRERAS, J.; TORNE, M.; MARTIN, A.; ESPINOSA, P.J. Resistance to spinosad in the western flower thrips, *Frankliniella occidentalis* (Pergande), in greenhouse of south-eastern Spain. **Pest Management Science**, Sussex, v. 63, n. 7, p. 682-687, 2007.

BOTTON, M.; CARBONARI, J.J.; GARCIA, M.S.; MARTINS, J.F. Preferência alimentar de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) em arroz e capim arroz. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Londrina, v. 27, p. 207-212, 1998.

BRUN-BARALE, A.; H'EMA, O.; MARTIN, T.; SURAPORN, S.; AUDANT, P.; SEZUTSU, H.; FEYEREISEN, R. Multiple P450 genes overexpressed in deltamethrin-resistant strains of *Helicoverpa armigera*. **Pest Management Science**, Sussex, v. 66, p. 900-909, 2010.

CAMPOS, M.R.; RODRIGUES, A.R.S.; SILVA, W.M.; SILVA, T.B.M.; SILVA, V.R.F.; GUEDES, R.N.; SIQUEIRA, H.A.A. Spinosad and the tomato borer *Tuta absoluta*: A bioinsecticide, an invasive pest threat, and high insecticide resistance. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 9, n. 8, 2014. Disponível em: <doi:10.1371/journal.pone.0103235>. Acesso: 09 jan. 2015.

CARVALHO, R.A.; OMOTO, C.; FIELD, L.M.; WILLIAMSON, M.S.; BASS, C. Investigating the molecular mechanisms of organophosphate and pyrethroid resistance in the fall armyworm *Spodoptera frugiperda*. **PloS ONE**, San Francisco, v. 8 n. 4, 2013. Disponível em: <doi:10.1371/journal.pone.0062268>. Acesso em: 06 out. 2014.

CHEN, S.; YANG, P.C.; JIANG, F.; WE, Y.Y.; MA, Z.; KANG, L. *De Novo* analysis of transcriptome dynamics in the migratory locust during the development of phase traits. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 5, n. 12, e15633, 2010. Disponível em: <doi:10.1371/journal.pone.0015633>. Acesso em: 09 dez 2014.

CLAUDIANOS, C.; RUSSELL, R.J.; OAKESHOTT, J.G. The same amino acid substitution in orthologous esterases confers organophosphate resistance on the house fly and a blowfly. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 29, p. 675-686, 1999.

CORTEZ, M.G.R.; WAQUIL, J.M. Influência de cultivar e nível de infestação de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) no rendimento de sorgo. **Anais da Sociedade Entomológica Brasileira**, Londrina, v. 26, p. 407-410, 1997.

CROFT, B.A. Developing a philosophy and program of pesticide resistance management, In: ROUSH, R.T.; TABASHNIK, B.E. (Ed.). **Pesticide resistance in arthropods**. London: Chapman and Hall, 1990. p. 277-196.

CROW, J.F. Genetics of insect resistance to chemicals. **Annual Review of Entomology**, Stanford, v. 2, p. 227-246, 1957.

CROUSE, G.D.; SPARKS, T.C.; SCHOONOVER, J.; GIFFORD, J.; DRIPPS, J.; BRUCE, T.; LARSON, L.L.; GARLICH, J.; HATTON, C.; HILL, R.L.; WORDEN, T.V.; MARTYNOW, J.G. Recent advances in the chemistry of spinosyns. **Pest Management Science**, Sussex, v. 57, p. 177-185, 2001.

DESPRÉS, L.; DAVID, J.P.; GALLET, C. The evolutionary ecology of insect resistance to plant chemicals. **Trends in Ecology and Evolution**, Cambridge, v. 22, p. 345-352, 2007.

DEVONSHIRE, A.L.; MOORES, G.D. Different forms of insensitive acetylcholinesterase in insect-resistance house flies (*Musca domestica*). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, San Diego, v. 21, p. 336-340, 1984.

DÍEZ-RODRÍGUEZ, G.I.; OMOTO, C. Herança da resistência de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) a lambda-cialotrina. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 30, p. 311-316, 2001.

ENAYATI, A.A.; RANSON, H.; HEMINGWAY, J. Insect glutathione transferases and insecticide resistance. **Insect Molecular Biology**, Malden, v. 14, p. 3-8, 2005.

FARIAS, J.R.; ANDOW, D.A.; HORIKOSHI, R.J.; SORGATTO, R.J.; FRESIA, P.; SANTOS, A.C.; OMOTO, C. Field-evolved resistance to Cry1F maize by *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in Brazil. **Crop Protection**, Guildford, v. 64, p. 150-158, 2014.

FEYEREISEN, R. Insect cytochrome P450. In: GILBERT, L.I.; LATROU, K.; GILL, S.S. (Ed.). **Comprehensive molecular insect science**. Oxford: Elsevier, 2005. v. 4, p. 1-77.

FFRENCH-CONSTANT, R.H.; ROUSH, R.T. Resistance detection and documentation: the relative roles of pesticidal and biochemical assays. In: ROUSH, R.T.; TABASHNIK, B.E. (Ed.). **Pesticide resistance in arthropods**. New York: Chapman and Hall, 1990. v. 303. p. 4-38.

FIELD, L.M.; DEVONSHIRE, A.L. Evidence that the E4 and FE4 esterase genes responsible for insecticide resistance in the aphid *Myzus persicae* (Sulzer) are part of a gene family. **Biochemical Journal**, Portland, v. 330, p. 169-173, 1998.

FORD, E.B. (Ed.). **Ecological genetics**. 4th ed. London: Chapman and Hall, 1975. 442 p.

GASSMANN, A.J.; CARRIÈRE, Y.; TABASHNIK, B.E. Fitness costs of insect resistance to *Bacillus thuringiensis*. **Annual Review Entomology**, Stanford, v. 54, p. 147-163, 2009.

GEORGHIOU, G.P. The evolution of resistance to pesticides. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**, Palo Alto, v. 3, p. 133-168, 1972.

GEORGHIOU, G.P.; TAYLOR, C.E. Genetic and biological influences in the evolution of insecticide resistance. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 70, p. 319-323, 1977a.

_____. Operational influences in the evolution of insecticide resistance. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 70, p. 653-658, 1977b.

GRAUSO, M.; REENAN, R.A.; CULETTO, E.; SATTELLE, D.B. Novel putative nicotinic acetylcholine receptor subunit genes, $D\alpha 5$, $D\alpha 6$ and $D\alpha 7$ in *Drosophila melanogaster*. **Genetics**, Bethesda, v. 160, n. 4, p. 1519-1533, 2002.

HOJLAND, D.H.; JENSEN, K.V.; KRISTENSEN, M. Expression of xenobiotic metabolizing cytochrome P450 genes in a spinosad-resistant *Musca domestica* L. strain. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 9, n. 8, e103689, 2014. Disponível em: <doi:10.1371/journal.pone.0103689>. Acesso em: 16 jun. 2015.

HUANG, H.S.; HU, N.T.; YAO, Y.E.; WU, C.Y.; CHIANG, S.W.; SUN, C.N. Molecular cloning and heterologous expression of a glutathione S-transferase involved in insecticide resistance from the diamondback moth, *Plutella xylostella*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 28, p.651-658, 1998.

HUANG, K.; XIA, L.; ZHANG, Y.; DING, X.; ZAHN, J.A. Recent advances in the biochemistry of spinosyns. **Applied Microbiology Biotechnology**, Cham, v. 82, p. 13-23, 2009.

HUANG, S.; HAN, Z. Mechanisms for multiple resistances in field populations of common cutworm, *Spodoptera litura* (Fabricius) in China. **Pesticide Biochemistry and Physiology**. San Diego, v. 87, p. 14-22, 2007.

Insecticide resistance action committee (IRAC). Disponível em: <http://www.irac-online.org>. Acesso em: 08 jan. 2015.

ISHTIAQ, M.; MUSHTAQ, A.S.; 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**, Punjab, v. 44, n. 6, p. 1677-1682, 2012.

JAGADEESAN, R.; COLLINS, P.J.; DAGLISH, G.J.; EBERT, P.R.; SCHLIPALIUS, D.I. Phosphine resistance in the rust red flour beetle, *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae): inheritance, gene interactions and fitness costs. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 7, n. 2, 2012. Disponível em: <doi:10.1371/journal.pone.0031582>. Acesso em: 06 jan. 2015

JAKKA, S.R.K.; KNIGHT, V.R.; JURAT-FUENTES, J.L. Fitness costs associated with field-evolved resistance to Bt maize in *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 107, n. 1, p. 342-351, 2014.

JOUNBEN, N.; AGNOLET, S.; LORENZ, S.; SCHÖNEA, S.E.; ELLINGERB, R.; SCHNEIDER, B.; HECKEL, D.G. Resistance of Australian *Helicoverpa armigera* to fenvalerate is due to the chimeric P450 enzyme CYP337B3. **Proceedings of the National Academy of Science of the USA**, Washington, v. 109, n. 38, p. 15206–15211, 2012.

KHAN, H.A.A.; AKRAM, W.; SHAD, S.A. Genetics, cross-resistance and mechanism of resistance to spinosad in a field strain of *Musca domestica* L. (Diptera: Muscidae). **Acta Tropica**, Miami, v. 130, p. 148-154, 2014.

KKAUR, P.; DILAWARI, V.K. Inheritance of resistance to *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin in *Helicoverpa armigera* (Hubner) (Lepidoptera: Noctuidae) from India. **Pest Management Science**, Sussex, v. 67, p. 1294–1302, 2011.

KOSTAROPOULOS, I.; PAPADOPOULOS, A.I.; METAXAKIS, A.; BOUKOUVALA, E.; PAPADOPOULOU-MOURKIDOU, E. Glutathione S-transferase in the defence against pyrethroids in insects. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 31, p. 313–319, 2001.

LESTER, H.A.; DIBAS, M.I.; DAHAN, D.S.; LEITE, J.F.; DOUGHERTY, D.A. Cys-loop receptors: new twists and turns. **Trends in Neurosciences**, Cambridge, v. 27, n. 6, p. 329-336, 2004.

LI, X.; SCHULER, M.A.; BERENBAUM, M.R. Molecular mechanisms of metabolic resistance to synthetic and natural xenobiotics. **Annual Review of Entomology**, Stanford, v. 52, p. 231-253, 2007.

LIN, Q.; JIN, F.; HU, Z.; CHEN, H.; YIN, F.; LI, Z.; DONG, X.; ZHANG, D.; REN, S.; FENG, X. Transcriptome analysis of chlorantraniliprole resistance development in the diamondback moth *Plutella xylostella*. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 8, n. 8, e72314, 2013. Disponível em: doi:10.1371/journal.pone.0072314. Acesso em: 10 jun. 2014.

LIU, B.; DOU, W.; DING, T.B.; ZHONG, R.; LIAO, C.Y.; XIA, W.K.; WANG, J.J. Na analysis of the small RNA transcriptome of four developmental stages of the citrus red mite (*Panonychus citri*). **Insect Molecular Biology**, Malden, v. 23, n. 2, p. 216–229, 2013.

LU, Z.; LIU, Y.; HAN, N.; TIAN, J.; PENG, Y.; HU, C.; GUO, Y.; YE, G. Transgenic cry1C or cry2A rice has no adverse impacts on the life-table parameters and population dynamics of the brown planthopper, *Nilaparvata lugens* (Hemiptera: Delphacidae). **Pest Management Science**, Sussex, 2014, Disponível em: <doi 10.1002/ps.3866>. Acesso em: 05 set. 2014.

LUTTRELL, R.G.; MINK, J.S. Damage to cotton structures by the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). **The Journal of Cotton Science**, Cordova, v. 3, p. 35-44, 1999.

- MARKUSSEN, M.D.K.; KRSITENSEN, M. Spinosad resistance in female *Musca domestica* L. from field-derived population. **Pest Management Science**, Sussex, v. 68, n. 6, p. 75-82, 2012.
- MARTIN, J.A.; WANG, Z. Next-generation transcriptome assembly. **Nature Reviews Genetics**, London, v. 12, p. 671-682, 2011.
- MARTINELLI, S.; BARATA, R.M.; ZUCCHI, M.I.; SILVA-FILHO, M.D.C.; OMOTO, C. Molecular variability of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) populations associated to maize and cotton crops in Brazil. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 99, p. 516-526, 2006.
- McKENZIE, J.A. The character or the variation: the genetic analysis of the insecticide-resistance phenotype. **Bulletin of Entomological Research**, Cambridge, v. 90, p. 3-7, 2000.
- METZKER, M.L. Sequencing technologies - the next generation. **Nature Reviews Genetics**, London, v. 11, p. 31-46, 2010.
- MOTA-SANCHEZ, D.; HOLLINGWORTH, R.M.; GRAFIUS, E.J.; MOYER, D.D. Resistance and cross-resistance to neonicotinoid insecticides and spinosad in the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata* (Say) (Coleoptera: Chrysomelidae). **Pest Management Science**, Sussex, v. 62, p. 30-37, 2006.
- MORRILLO, F.; NOTZ, A. Resistência de *Spodoptera frugiperda* a lambdacialotrina y metomil. **Entomotropica**, Maracay, v. 16, p. 79-87, 2001.
- NASCIMENTO, A.R.B.; FARIAS, J.R.; BERNARDI, D.; HORIKOSHI, R.J.; OMOTO, C. Genetic basis of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera:Noctuidae) resistance to the chitin synthesis inhibitor lufenuron. **Pest Management Science**, Sussex, 2015. Disponível em: <doi:10.1002/ps.4057>. Acesso em: 19 jun. 2015.
- ORR, N.; SHAFFNER, A.J.; RICHEY, K.; CROUSE, G.D. Novel mode of action of spinosad: receptor binding studies demonstrating lack of interaction with known insecticidal target sites. **Pesticide Biochemistry Physiology**, San Diego, v. 95, n. 1, p. 1-5, 2009.
- OZSOLAK, F.; MILOS, P.M. RNA sequencing: advances, challenges and opportunities. **Nature Reviews Genetics**, London, v. 87, n. 98, p. 756-762, 1985.
- PAYNE, G.T.; BLENK, R.G.; BROWN, T.M. Inheritance of permethrin resistance in the tobacco budworm (Lepidoptera: Noctuidae). **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 81, p. 65-73, 1988.
- PERRY, T.; McKENSIE, J.A.; BATTERHAM, P. A D α 6 knockout strain of *Drosophila melanogaster* confers high level of resistance to spinosad. **Insect Biochemistry and Biology**, Oxford, v. 37, p. 184-188, 2007.
- 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.

RANSON, H.; ROSSITER, L.; ORTELLI, F.; JESEN, B.; WANG, X.; ROTH, C.W.; COLLINS, F.H.; HEMINGWAY, J. Identification of a novel class of insect glutathione S-transferases involved in resistance to DDT in the malaria vector *Anopheles gambiae*. **Biochemical Journal**, Portland, v. 359, p. 295–304, 2001.

RANSON, H.; CLAUDIANOS, C.; ORTELLI, F.; ABGRALL, C.; HEMINGWAY, J.; SHARAKHOVA, M.V.; UNGER, M.F.; COLLINS, F.H.; FEYEREISEN, R.. Evolution of supergene families associated with insecticide resistance. **Science**, Washington, v. 298, p. 179–181, 2002.

REHAN, A.; FREED, S. Selection, mechanism, cross resistance and stability of spinosad resistance in *Spodoptera litura* (Fabricius) (Lepidoptera: Noctuidae). **Crop Protection**, Guildford, v. 56, p. 10-15, 2014.

RINKEVICH, F.D.; SCOTT, J.G. Transcriptional diversity and allelic variation in nicotinic acetylcholine receptor subunits of the red flour beetle, *Tribolium castaneum*. **Insect Molecular Biology**, Hoboken, v. 18, n. 2, p. 233-242, 2009.

_____. Limitations of rnai of $\alpha 6$ nicotinic acetylcholine receptor subunits for the assessing the in vivo sensitivity to spinosad. **Insect Science**, Oxford, v. 20, n. 1, p. 101-108, 2013.

RINKEVICH, F.D.; CHEN, M.; SHELTON, A.M.; SCOTT, J.G. Transcripts of the nicotinic acetylcholine receptor subunit gene *pxyl $\alpha 6$* with premature stop condon are associated with spinosad resistance in diamondback moth, *Plutella xylostella*. **Invertebrate Neuroscience**, Berlin, v. 10, n. 1, p. 25-33, 2010.

ROE, R.M.; YOUNG, I.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*. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, San Diego, v. 96, n. 1, p. 8-13, 2010.

ROUSH, R.T.; DALY, J.C. The role of population genetics in resistance research and management, In: ROUSH, R.T.; TABASHNIK, B.E. (Ed.). **Pesticide resistance in arthropods**. New York: Chapman and Hall, 1990. p. 97-152.

ROUSH, R.T.; MCKENZIE, J.A. Ecological genetics of insecticide and acaricide resistance. **Annual Review of Entomology**, Stanford, v. 32, p. 361-380, 1987.

SALGADO, V.L. Studies on the mode of action of spinosad: Insect symptoms and physiological correlates. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, San Diego, v. 60, n. 2, p. 91-102, 1998.

SALGADO, V.L.; SAAR, R. Desensitizing and non-desensitizing subtypes of α -bungarotoxin-sensitive nicotinic acetylcholine receptors in cockroach neurons. **Journal of Insect Physiology**, Oxford, v. 50, n. 10, p. 867-879, 2004.

SALGADO, V.L.; SPARKS, T.C. The spinosyns: chemistry, biochemistry, mode of action, and resistance. In: GILBERT, L.I.; IATROU, K.; GILL, S.S. (Ed.). **Comprehensive insect molecular sciences**. New York: Elsevier, 2005. v. 6, p. 136-173.

SALGADO, V.L.; SHEETS, J.J.; WATSON, G.B.; SCHMIDT, A.L. Studies on the mode of action of spinosad: the internal effective concentration and the concentration dependence of neural excitation. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, San Diego, v. 60, n. 2, p. 103-110, 1998.

SAYYED, A.H.; OMAR, D.; WRIGHT, D.J. Genetics of spinosad resistance in a multi-resistance field-selected population of *Plutella xylostella*. **Pest Management Science**, Sussex, v. 60, n. 8, p. 827-832, 2004.

SAYYED, A.H.; AHMAD, M.; CRICKMORE, N. Fitness costs limit the development of resistance to indoxacarb and deltamethrin in *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae). **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 101, n. 6, p. 1927-1933, 2008.

SCHULZ, M.H.; ZERBINO, D.R.; VINGRON, M.; BIRNEY, E. Oases: robust *de novo* RNA-seq assembly across the dynamic range of expression levels. **Bioinformatics**, Oxford, v. 28, n. 8, p. 1086-1092, 2012.

SCOTT, J.A. The molecular genetics of resistance: resistance as a response to stress. **Florida Entomologist**, Gainesville, v. 78, p. 399-414, 1995.

SCOTT, J.C. Investigating mechanisms of insecticide resistance: methods, strategies, and pitfalls. In: ROUSH, R.T.; TABASHNIK, B.E. (Ed.). **Pesticide resistance in arthropods**. New York: Chapman and Hall, 1990. p. 39-57.

SHEN, G.M.; DOU, W.; NIU, J.Z.; JIANG, H.B.; YANG, W.J.; JIA, F.X.; HU, F.; CONG, L.; WANG, J.J. Transcriptome analysis of the oriental fruit fly (*Bactrocera dorsalis*). **PLoS ONE**, San Francisco, v. 6, n. 12, e29127, 2011. Disponível em: <doi:10.1371/journal.pone.0029127>. Acesso em: 10 jun. 2015.

SHONO, T.; SCOTT, J.G. Spinosad resistance in the housefly, *Musca domestica*, is due to recessive factor on autosome 1. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, San Diego, v. 75, n. 1/2, p. 1-7, 2003.

SIAL, A.A.; BRUNNER, J.F.; GARCZYNSKI, S.F. Biochemical characterization of chlorantraniliprole and spinetoram resistance in laboratory-selected obliquebanded leafroller, *Choristoneura rosaceana* (Harris) (Lepidoptera: Tortricidae). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, San Diego, v. 99, p. 274-279, 2001.

SOARES, J.J.; VIEIRA, R.M. *Spodoptera frugiperda* ameaça a cotonicultura brasileira. Campina Grande: Embrapa, CNPA, 1998. 13 p. (Comunicado Técnico, 96).

SONODA, S.; ASHFAQ, M.; TSUMUKI, H. Genomic organization and developmental expression of glutathione S-transferase genes of the diamondback moth, *Plutella xylostella*. **Journal of Insect Science**, Oxford, v. 6, p. 1-9, 2006.

SPARKS, T.C.; NAUEN, R. IRAC: mode of action classification and insecticide resistance management. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, San Diego, 2014. Disponível em: <doi: 10.1016/j.pestbp.2014.11.014>. Acesso em: 10 jan. 2015.

SPARKS, T.C.; CROUSE, G.D.; DURST, G. Natural products as insecticides: The biology, biochemistry and quantitative structure-activity relationships of spinosyns and spinosoids. **Pest Management Science**, Sussex, 57, n. 10, p. 896-905, 2001.

SPARKS, T.C.; DRIPPS, J.E.; WATSON, G.B.; PAROONAGIAN, D. Resistance and cross-resistance to the spinosyns: a review and analysis. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, San Diego, v. 102, n. 1, p. 1-10, 2012.

SPARKS, T.C.; THOMPSON, G.D.; KIRST, H.A.; HERTLEIN, M.B.; LARSON, L.L.; WORDEN, T.V.; THIBAUT, S.T. Biological activity of the spinosyns, new fermentation derived insect control agents, on tobacco budworm (Lepidoptera: Noctuidae) larvae. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 91, n. 6, p. 1277-1283, 1998.

STORER, N.P.; BABCOCK, J.M.; SCHLENZ, M.; MEADE, T.; THOMPSON, G.D.; BING, J. W.; HUCKABA, R.M. Discovery and characterization of field resistance to Bt maize: *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in Puerto Rico. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 103, n. 4, p. 1031-1038, 2010.

SYVANEN, M.; ZHOU, Z.H.; WANG, J.Y. Glutathione transferase gene family from the *Musca domestica*. **Molecular and General Genetics MGG**, Berlin, v. 245, p. 25-31, 1994.

TABASHNIK, B.E. Determining the mode of inheritance of pesticide resistance with backcross experiments. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 84, p. 703-712, 1991.

TAYLOR, C.E.; GEORGHIOU, G.P. Suppression of insecticide resistance by alteration of gene dominance and migration. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 72, p. 105-109, 1979.

TIJET, N.; HELVIG, C.; FEYEREISEN, R. The cytochrome P450 gene superfamily in *Drosophila melanogaster*: annotation, intron-exon organization and phylogeny. **Gene**, Oxford, v. 262, p. 189-198, 2001.

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.

VALICENTE, F.H.; TUELHER, E.S. **Controle biológico da lagarta do cartucho, *Spodoptera frugiperda*, com Baculovírus**. Sete Lagoas: EMBRAPA, CNPMS, 2009. 14 p. (Circular Técnica, 114).

VÉLEZ, A.M.; SPENCER, T.A.; ALVES, A.P.; CRESPO, A.L.B.; SIEGFRIED, B. D. Fitness costs of cry1F resistance in fall armyworm, *Spodoptera frugiperda*. **Journal of Applied Entomology**, Malden, v. 138, p. 315-325, 2013.

VONTAS, J.; SMALL, J.G.; HEMINGWAY, J. Glutathione-S-transferases as antioxidant defense agents confer pyrethroid resistance in *Nilaparvata lugens*. **Biochemical Journal**, Portland, v. 357, p. 65-72, 2001.

WANG, Z.; GERSTEIN, M.; SNYDER, M. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. **Nature Reviews Genetics**, London, v. 10, p. 57-63, 2009.

WANG, D.; QIU, X.H.; REN, X.X.; NIU, F.; WANG, K.Y. Resistance selection and biochemical characterization of spinosad resistance in *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, San Diego, v. 95, n. 2, p. 90-94, 2009.

WANG, X.W.; LUAN, J.B.; LI, J.M.; BAO, Y.Y.; ZHANG, C.X.; LIU, S.S. *De novo* characterization of a whitefly transcriptome and analysis of its gene expression during development. **BMC Genomics**, London, v. 11, n. 400, 2010. Disponível em: <doi:10.1186/1471-2164-11-400 >. Acesso em: 19 jun. 2015.

WANG, W.; MO, J.; CHENG, J.; ZHUANG, P.; TANG, Z. Selection and characterization of spinosad resistance in *Spodoptera exigua* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, San Diego, v. 84, p. 180-187, 2006.

WATSON, G.B.; CHOUINARD, S.W.; COOK, K.R.; GENG, C.X.; GIFFORD, J.M.; GUSTAFSON, G.D.; HASLER, J.M.; LARRINUA, I.M.; LETHERER, T.J.; MITCHELL, J.C.; PAK, W.L.; SALGADO, V.L.; SPARKS, T.C.; STILWELL, G.E. A spinosyn-sensitive *Drosophila melanogaster* nicotinic acetylcholine receptor gene identification and heterologous expression. **Insect Biochemistry and Physiology**, Malden, v. 40, n. 5, p. 376-384, 2010.

YOUNG, H.P.; BAILEY, W.D.; ROE, R.M. Spinosad selection of a laboratory strain of the tobacco budworm, *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae), and characterization of resistance. **Crop Protection**, Guildford, v. 22, n. 2, p. 265-273, 2003.

YOUNG, J.R.; MCMILLIAN, W.W. Differential feeding by two strains of fall armyworm larvae on carbaryl surfaces. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, Lanham, v. 72, p. 202-204, 1979.

YU, S.J. Insecticide resistance in the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, San Diego, v. 39, p. 84-91, 1991.

_____. Detection and biochemical characterization of insecticide resistance in fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae). **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 85, p. 675-682, 1992.

_____. Inheritance of insecticide resistance and microsomal oxidases in the diamondback moth (Lepidoptera: Yponomeutidae). **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 86, p. 680-683, 1993.

_____. Insensitivity of acetylcholinesterase in a field strain of the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, San Diego, v. 84, p. 135-142, 2006.

YU, S.J.; NGUYEN, S.N.; ABO-ELGHAR, G.E. Biochemical characteristics of insecticide resistance in the fall armyworm *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, San Diego, v. 77, p. 1-11, 2003.

ZHANG, Y.; SHAO, Y.; JIANG, F.; LI, J.; LIU, Z. Identification of two acetylcholinesterases in *Pardosa pseudoannulata* and the sensitivity to insecticides. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 46, p. 25-30, 2014.

ZHAO, J.Z.; LI, Y.X.; COLLINS, H.L.; GUSUKUMA-MINUTO, L.; MAU, R.F.L.; THOMPSON, G.D.; SHELTON, A.M. Monitoring and characterization of diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae) resistance to spinosad. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 95, n. 2, p. 430-436, 2002.

ZIMMER, C.T.; MAIWALD, F.; SCHORN, C.; BASS, C.; OTT, M.C.; NAUEN, R. A *de novo* transcriptome of European pollen beetle populations and its analysis, with special reference to insecticide action and resistance. **Insect Molecular Biology**, Malden, v. 23, n. 4, p. 511-526, 2014.

3 PADRÃO DE HERANÇA E CUSTO ADAPTATIVO DA RESISTÊNCIA DE *Spodoptera frugiperda* (J. E. SMITH, 1797) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE) A SPINOSAD

Resumo

O conhecimento de bases genéticas da resistência de pragas a inseticidas é de fundamental importância para a implementação de estratégias de Manejo da Resistência de Insetos (MRI). Para o manejo de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) no Brasil, o inseticida spinosad tem sido bastante utilizado devido a sua eficácia e ao seu mecanismo de ação único (modulador alostérico de receptores nicotínicos de acetilcolina). No presente estudo foram realizados estudos para caracterização do padrão de herança e do custo adaptativo da resistência de *S. frugiperda* a spinosad. Inicialmente foi selecionada em laboratório, por meio da técnica F2 screen, uma linhagem de *S. frugiperda* resistente a spinosad (Spin-res). As CL_{50} (IC 95%) obtidas por meio de bioensaio de ingestão foram de 0,011 (0,009 - 0,025) $\mu\text{g.cm}^{-2}$ para a linhagem suscetível (Sus) e 9,8 (7,4 - 17,4) $\mu\text{g.cm}^{-2}$ de spinosad para a linhagem Spin-res, conferindo uma razão de resistência de ≈ 890 vezes. A partir de cruzamentos recíprocos da linhagem Spin-res com a linhagem Sus, constatou-se que a resistência de *S. frugiperda* a spinosad é autossômica e incompletamente recessiva. Os testes de retrocruzamentos das linhagens heterozigóticas com a linhagem Spin-res demonstraram um efeito poligênico, apresentando no mínimo 1,86 a 2,45 genes relacionados a essa resistência. Foram observados custos adaptativos associados à resistência de *S. frugiperda* a spinosad, porém ausente em indivíduos heterozigotos, baseado nos parâmetros da tabela de vida e fertilidade. O custo adaptativo para a linhagem Spin-res foi de 0,49 em relação à linhagem Sus. Portanto, há possibilidade de exploração da recessividade do padrão de herança e a presença de custos adaptativos da resistência de *S. frugiperda* a spinosad, mediante a manutenção de áreas de refúgio e rotação de inseticidas como estratégias de MRI para retardar a evolução da resistência em condições de campo.

Palavras-chave: Lagarta-do-cartucho; Manejo de resistência de insetos; Spinosad; Herdabilidade; Custo adaptativo

Abstract

Understanding genetic basis of insect resistance to insecticides is important for implementing Insect Resistance Management (IRM) strategies. Spinosad has been one of the most used insecticides to manage *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) in Brazil, due to its efficacy and unique mode of action (nicotinic acetylcholine receptor allosteric modulator). In this study, we characterized the inheritance of spinosad resistance in *S. frugiperda* and evaluated fitness cost associated with resistance. Initially, we selected a spinosad-resistant strain (Spin-res) of *S. frugiperda* under laboratory condition using the F2 screen method. In a diet-overlay bioassay, the estimated LC_{50} (95% C.I.) for the susceptible (Sus) strain was 0.011 (0.009 - 0.025) $\mu\text{g.cm}^{-2}$ and approximately 9.8 (7.4 - 17.4) $\mu\text{g.cm}^{-2}$ for the Spin-res strain, conferring a resistance ratio of ≈ 890 -fold. Based on reciprocal crosses between Sus and Spin-res strains, the inheritance of spinosad resistance in *S. frugiperda* was autosomal incompletely recessive. Backcrosses of the F_1 from reciprocal crosses and the parental Spin-res revealed a polygenic resistance, with an estimation of at least 1.86 to 2.45 genes related to spinosad resistance. Furthermore, a strong fitness cost associated to spinosad resistance was found, but not in heterozygous individuals, based on life history traits. The relative fitness cost for Spin-

res strain was 0.49 compared to Sus. Therefore, there will be some possibilities to exploit the recessiveness of spinosad resistance and fitness cost associated with resistance in *S. frugiperda*, by maintaining refuge areas and rotating insecticides as IRM strategies to delay the resistance evolution under field conditions.

Keywords: Fall armyworm; Insecticide resistance management; Spinosad; Heritability; Fitness cost

3.1 Introdução

Spodoptera frugiperda (J. E. Smith) é uma das pragas mais importantes do milho (*Zea mays* L.) no Brasil e tem apresentado elevadas infestações nos últimos anos, causando grandes perdas econômicas em diversas culturas no Brasil, principalmente em milho e algodão (VALICENTE, 2008; SANTOS, 2011). O sucesso de *S. frugiperda* como praga é consequência de sua polifagia e da elevada capacidade de dispersão dos adultos ao longo da faixa de distribuição de suas plantas hospedeiras. O uso de inseticidas tem sido uma das principais táticas de controle dessa praga em diversas culturas agrícolas. No entanto, o uso indiscriminado de produtos químicos tem levado à evolução da resistência de *S. frugiperda* para vários inseticidas, tais como lambda-cialotrina (DIEZ-RODRIGUEZ; OMOTO, 2001; CARVALHO et al., 2013), clorpirifós (CARVALHO et al., 2013), lufenuron (NASCIMENTO, 2014) e proteína Bt Cry1F (FARIAS et al., 2014).

Dentre os inseticidas mais utilizados para o controle de *S. frugiperda* está spinosad, o qual é composto de dois ingredientes ativos, a espinosina A (componente primário) e espinosina D (componente secundário) que são derivados da fermentação do actinobactéria de solo *Saccharopolyspora spinosa* (THOMPSON et al., 2000). Esse inseticida apresenta grande importância no manejo integrado de pragas por possuir características ambientais e toxicológicas favoráveis, modo de ação único, além de apresentarem baixa toxicidade para insetos benéficos (SPARKS et al., 2001). Diferentemente de outros agonistas de receptores da acetilcolina como os neonicotinoides, as espinosinas agem como moduladores alostéricos ao receptor nicotínico da acetilcolina (ORR et al., 2009). Acredita-se ainda que spinosad atue também nos receptores do ácido gama aminobutírico (GABA) como as abamectinas, entretanto, não há interação com nenhum dos receptores de GABA conhecidos.

Já foram relatados mais de 30 casos de resistência a spinosad (ARTHROPOD PESTICIDE RESISTANCE DATABASE, 2015) para diversas espécies de inseto, incluindo *Spodoptera litura* (F.) (REHAN; FREED, 2014), *Spodoptera exigua* (Hübner) (ISHTIAQ et

al., 2012; MOULTON et al., 2000), *Frankliniella occidentalis* (Pergande) (BIELZA et al., 2007a, 2007b) *Drosophila melanogaster* (Meigen) (PERRY et al., 2007; WATSON et al., 2010) *Plutella xylostella* (L.) (BAXTER et al., 2010; RINKEVICH et al., 2010), *Tribolium castaneum* (H.) (RINKEVICH; SCOTT, 2009) e *Anopheles gambiae* (Giles) (JONES et al., 2005). Até o momento, não foram relatados casos de resistência de spinosad em *S. frugiperda*.

Para o sucesso do manejo de resistência de insetos a inseticidas (MRI) é fundamental que se conheça as bases genéticas dessa resistência (GEORGHIOU; TAYLOR, 1977a; ROUSH; McKENZIE, 1987), uma vez que estas interferem diretamente na velocidade da evolução da resistência. Além disso, a existência de um custo adaptativo associado à resistência é um dos fatores que auxiliam no restabelecimento da suscetibilidade em programas de manejo da resistência (GEORGHIOU; TAYLOR, 1977a; ROUSH; McKENZIE, 1987; LENORMAND; RAYMOND, 1998; CARRIÈRE; TABASHNIK, 2001; CARRIÈRE et al., 2004). A verificação da presença de custo adaptativo em indivíduos heterozigotos é de extrema importância, pois os heterozigotos são mais frequentes no campo e os principais responsáveis por carrear o alelo da resistência no início dessa evolução (ROUSH; McKENZIE, 1987).

Nesse contexto, para fornecer subsídios a programas de MRI, foram realizados estudos para caracterizar as bases genéticas associadas à resistência de *S. frugiperda* a spinosad e os possíveis custos adaptativos associados à resistência.

3.2 Material e métodos

3.2.1 Insetos

A linhagem suscetível de referência (Sus) foi obtida na Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas – MG, e mantida no laboratório de Resistência de Artrópodes a Táticas de Controle (ESALQ-USP) na ausência da pressão de seleção com inseticidas por várias gerações. A linhagem resistente a spinosad (Spin-res) foi selecionada a partir de uma população de *S. frugiperda* coletada em áreas de produção de milho com histórico de altos índices de pulverização de spinosad, em São Desidério, Bahia, durante a safra 2012/13. Para a seleção da população Spin-res utilizou-se a técnica de F₂ screen proposta por Andow; Alstad (1998). As lagartas coletadas a campo foram levadas para o laboratório e mantidas em dieta artificial de Kasten et al. (1978), até a fase de pupa. Posteriormente, as pupas foram separadas por sexo, sendo individualizadas em copos plásticos (25 mL) invertido sobre um papel filtro

umedecido, permanecendo até a emergência dos adultos. Após a emergência, os adultos virgens foram separados em casais e acondicionados em gaiolas confeccionadas com copos plásticos transparentes (500 mL) (um casal por gaiola). As gaiolas foram colocadas sobre um prato plástico (10 cm de diâmetro $\times$ 1,5 cm de altura). Para a alimentação dos adultos foi oferecida uma solução de mel em água a 10% embebida em algodão hidrófilo. A cada 3 dias as posturas foram retiradas e as gaiolas substituídas. Cada casal representou uma isofamília e sua descendência foi criada separadamente das demais (80-100 isofamílias/população de campo). Os ovos obtidos de cada isofamília foram acondicionados em recipientes plásticos (100 mL) com um papel filtro umedecido (1 $\times$ 1 cm) para a manutenção da umidade e mantidos em sala climatizada a $25 \pm 1^\circ\text{C}$, umidade relativa $70 \pm 10\%$ e fotofase de 14 h.

Após a eclosão, aproximadamente 100 lagartas de cada isofamília foram criadas em copos plásticos (100 mL) contendo dieta artificial (5 lagartas/copo). Após a obtenção das pupas, as mesmas foram retiradas e acondicionadas separadamente por isofamília em gaiolas cilíndricas de PVC (20 cm de altura $\times$ 15 cm de diâmetro), revestidas internamente com papel do tipo sulfite e fechadas na parte superior com placas de Petri para acasalamento entre indivíduos da geração F₁. As lagartas de terceiro ínstar provenientes do cruzamento dos adultos em F₁ foram individualizadas e expostas a 0,23 μg de spinosad (Tracer®, 480 g de spinosad/L, Dow AgroSciences Industrial Ltda) por cm² aplicado na superfície da dieta artificial. Essa dose foi obtida a partir dos dados de linha básica de suscetibilidade. Aos três dias, as lagartas sobreviventes foram transferidas para recipientes plásticos contendo apenas dieta artificial, onde permaneceram até a fase de pupa.

3.2.2 Caracterização da resistência de *S. frugiperda* a spinosad

Para a caracterização da resistência de *S. frugiperda* a spinosad foram realizados bioensaios com tratamento superficial da dieta para obtenção de uma curva de concentração-resposta a spinosad para as linhagens Sus e Spin-res. Os bioensaios foram realizados em placas acrílicas com 24 células (COSTAR®), mediante a deposição de 1,25 mL de dieta artificial por célula e após a geleificação da dieta, 30 μL de solução inseticida foi aplicada sobre a superfície da dieta. Para a linhagem Sus foram utilizadas 8 a 10 concentrações de spinosad, variando de 0,002 a 0,227 $\mu\text{g}.\text{cm}^{-2}$ e para a linhagem Spin-res foram usadas concentrações de 0,02 a 12,71 $\mu\text{g}.\text{cm}^{-2}$. As diferentes concentrações de spinosad (Tracer®, 480 g de spinosad/L, Dow AgroSciences Industrial Ltda) foram preparadas em água destilada e com adição de surfactante Triton® a concentração de 0,1%. O tratamento controle foi

constituído de água destilada + surfactante. Após período de secagem, uma lagarta de terceiro ínstar foi transferida em cada célula. Posteriormente, as placas foram acondicionadas em câmara climatizada a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ e 14 h de fotofase. Após 72 h foi avaliada a mortalidade, sendo consideradas mortas as lagartas que não apresentaram movimentos coordenados quando tocadas com um pincel.

Os dados de mortalidade para cada linhagem de *S. frugiperda* foram submetidos à análise de Probit mediante o uso do software POLO PLUS (LeOra Software, 1997). Foram estimados os valores de concentração letal média (CL_{50}), intervalo de confiança (IC% 95) e o coeficiente angular. A razão de resistência foi estimada mediante a divisão da CL_{50} da linhagem resistente pela CL_{50} da linhagem suscetível.

3.2.3 Padrão de herança da resistência de *S. frugiperda* a spinosad

Para a determinação do padrão de herança da resistência de *S. frugiperda* a spinosad, as pupas das linhagens Sus e Spin-res foram separadas por sexo e mantidas em placas de Petri. Após a emergência de adultos, foram realizados cruzamentos recíprocos entre as linhagens Sus e Spin-res para a obtenção de heterozigotos H_1 para o cruzamento σ^1 Spin- Res $\times$ ϕ Sus e H_2 para Sus $\sigma^1 \times$ Spin-res ϕ . Os cruzamentos foram realizados em gaiolas de PVC (10 cm diâmetro por 20 cm de altura). O alimento dos adultos foi constituído de mel a 10%. A progênie dos cruzamentos recíprocos (geração F_1) foi submetida a várias concentrações de spinosad espaçadas logaritmicamente para a estimativa da CL_{50} para cada cruzamento recíproco, seguindo a mesma metodologia de bioensaio descrita no item 3.2.2. A possibilidade de a resistência ser autossômica ou não, foi verificada mediante a análise dos resultados obtidos nos cruzamentos recíprocos. O grau de dominância (D) foi estimado com base nas metodologias propostas por Bourguet et al. (2000) e Stone (1968). O grau médio de dominância foi obtido a partir da equação proposta por Bourguet et al. (2000):

$$D = \frac{M_{RS} - M_{SS}}{M_{RR} - M_{SS}}$$

Sendo: M_{RR} , M_{SS} e M_{RS} as mortalidades da linhagem resistente, suscetível e heterozigoto, respectivamente. Para valores de D próximos a 0 ($D = 0$) considera-se como herança completamente recessiva, e para valores próximos a 1 ($D = 1$) considera-se como resistência completamente dominante (BOURGUET et al., 2000).

Os dados foram também analisados pelo método proposto por Stone (1968):

$$D = \frac{(2X_F - X_R - X_S)}{(X_R - X_S)}$$

Sendo: X_F ; X_R e X_S os logarítmos das CL_{50} estimadas a partir das linhagens heterozigotas F_1 (resistente e suscetível), Spin-res e Sus respectivamente. Para valores de D próximos a 0 ($D = 0$) o padrão de herança é completamente recessiva, e para valores próximos a 1 ($D = 1$), a herança é completamente dominante.

Para se estimar o número de genes relacionados à resistência foram realizados retrocruzamentos da progênie F_1 (heterozigotos) com o parental que apresentou o fenótipo mais distinto de F_1 , nesse caso com indivíduos da linhagem Spin-res (TSUKAMOTO 1983; ROUSH; DALY, 1990). Para os bioensaios utilizou-se a mesma metodologia descrita acima. A possibilidade de herança monogênica foi avaliada a partir do teste χ^2 (SOKAL; ROHLF, 1995):

$$\chi^2 = \frac{(Ni - pni)^2}{pqni}$$

A variável Ni representa a mortalidade observada na concentração i , p a mortalidade esperada calculada a partir do modelo mendeliano (GEORGHIOU, 1969), ni numero de indivíduos testados e $q = 1 - p$.

$$p = \frac{a + b}{2}$$

Sendo: a = porcentagem de mortalidade da linhagem heterozigota e b = porcentagem de mortalidade da linhagem resistente em determinada concentração

A hipótese de herança monogênica será rejeitada quando o χ^2 calculado $\geq \chi^2$ tabelado a 1 grau de liberdade. Para se estimar o número de *loci* e o efeito aditivo de genes que contribuem para uma característica quantitativa, como a resistência de *S. frugiperda* a spinosad, utilizou-se o método proposto por Lande (1981):

$$n_E = \frac{(X_{RR} - X_{SS})^2}{8\sigma_s^2}$$

Em que X_{RR} e X_{SS} correspondem ao $\log_{10}$ da CL_{50} das linhagens Spin-res e Sus respectivamente, $\sigma_s^2 = \sigma_{B1}^2 + \sigma_{B2}^2 - [\sigma_{F1}^2 + 0,5\sigma_{RR}^2 + 0,5\sigma_{SS}^2]$ e σ_{B1}^2 , σ_{B2}^2 , σ_{F1}^2 , σ_{RR}^2 e σ_{SS}^2 correspondem as variações fenotípicas dos retrocruzamentos 1 e 2, da linhagem heterozigota F1 e das linhagens Spin-res e Sus, estimadas de acordo com Lande (1981) pelo inverso do coeficiente angular ao quadrado.

3.2.4 Sobrevivência em plantas de milho pulverizadas com Tracer® em casa de vegetação

Para esse estudo, o milho convencional (LH198 + LH172) foi semeado em vasos plásticos de 5 L (2 sementes/vaso). Após a germinação, uma única planta foi mantida em cada vaso. No estágio fenológico V₄ todas as plantas foram pulverizadas com a dose de campo de 100 mL.ha⁻¹ de Tracer® (volume de calda de 200 L.ha⁻¹), que corresponde a 0,55 µg.cm⁻² de spinosad. Após secagem do produto, foram infestadas com uma única lagarta de 3º ínstar de *S. frugiperda* da linhagem Sus, Spin-res ou heterozigotos provenientes dos cruzamentos recíprocos. Para evitar a movimentação larval, as plantas foram acondicionadas no interior de tubos plásticos transparentes (110 cm de altura × 25 cm de diâmetro), os quais foram fixados na borda dos vasos e vedados na parte superior por um tecido “voil”. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com 90 plantas por tratamento, sendo que cada planta representava uma repetição. Após sete dias, as lagartas sobreviventes foram recuperadas e, em laboratório, criadas em folhas de milho convencional sem inseticida até a emergência de adultos.

3.2.5 Parâmetros biológicos de *S. frugiperda* suscetível e resistente a spinosad

Os parâmetros biológicos foram avaliadas a partir de lagartas recém-eclodidas de *S. frugiperda* (< 24 h de idade) da linhagem resistente (Spin-res), linhagem suscetível (Sus) e de cruzamentos recíprocos designados de H₁ (Sus ♀ × Spin-res ♂) e H₂ (Sus ♂ × Spin-res ♀), que foram individualizadas nas células de bandejas plásticas com 16 células (5 cm largura × 3 cm altura) (Advento do Brasil, São Paulo, Brasil), contendo dieta artificial de Kasten et al. (1986). As bandejas foram mantidas em câmara climatizada a 27 ± 1°C, umidade relativa de 60 ± 10% e fotofase de 14 h. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com

10 repetições, sendo cada repetição constituída de 16 lagartas, totalizando 160 lagartas/tratamento.

Posteriormente as pupas foram individualizadas em copos plásticos transparentes (50 mL), invertido sobre um papel filtro umedecido, até a emergência dos adultos. Em seguida, os adultos foram separados em casais (20 casais por linhagem) e transferidos em gaiolas de PVC (23 cm altura $\times$ 10 cm de diâmetro) revestidas internamente com papel jornal para substrato de oviposição e fechadas na parte superior com um prato plástico transparente. As gaiolas foram colocadas sobre um prato plástico (15 cm de diâmetro) contendo um disco de papel jornal. O alimento dos adultos foi constituído de uma solução de mel a 10%, embebida em algodão hidrófilo. As posturas foram retiradas diariamente.

Para cada tratamento foram avaliados os seguintes parâmetros biológicos: duração e viabilidade das fases de ovo, larva, pupa, período ovo-adulto, peso de pupas com 24 h de idade, razão sexual, duração dos períodos de pré-oviposição, oviposição e pós-oviposição, longevidade de adultos, fecundidade e fertilidade. A duração e a viabilidade das fases de ovo, larva, pupa e período ovo-adulto foram determinadas a partir de observações diárias. Para determinação do período embrionário e viabilidade, foram obtidos ovos da segunda postura de cada casal, os quais foram acondicionados em copos plásticos transparentes (100 mL), juntamente com um pedaço de papel filtro (2×1 cm), que foi umedecido diariamente com água destilada. As posturas foram observadas diariamente contando-se o número de lagartas eclodidas.

Os dados de viabilidade, longevidade, fecundidade diária e total, duração de fases e período de oviposição foram submetidos à análise de variância e as médias dos tratamentos comparadas pelo t-test ($P \leq 0.05$) (PROC TTEST, SAS INSTITUTE, 2000), sendo considerados diferentes ao nível de 5% de significância. Quando os dados não apresentaram distribuição normal, eles foram transformados utilizando $\log(x + 1)$, os dados não transformados e respectivos erros padrão estão representados nas figuras e tabelas. Os resultados relativos à razão sexual foram analisados pelo teste de Qui-quadrado (χ^2) ($P \leq 0,05$) (PROC FREQ, SAS INSTITUTE, 2000). Adicionalmente foi calculada a tabela de vida e fertilidade estimando-se o intervalo médio entre gerações (T), a taxa líquida de reprodução (R_0), a taxa intrínseca de crescimento (r_m) e a razão finita de crescimento (λ). Os parâmetros da tabela de vida de fertilidade e respectivos erros padrão foram estimados por meio da programação “*Lifetable.sas*” (Maia et al. 2000) no software SAS® (SAS Institute 2000) e comparados utilizando o teste bilateral t-test ($P \leq 0.05$) (SAS Institute, 2000). O valor de

custo adaptativo relativo das populações Spin-res, H₁ e H₂ foram calculados de acordo com o método proposto por (Cao; Han, 2006).

$$\text{Custo adaptativo relativo} = \frac{R_0 \text{ Spin-res}}{R_0 \text{ Sus}}$$

3.3 Resultados

3.3.1. Caracterização da resistência de *Spodoptera frugiperda* a spinosad

A linhagem Spin-res de *S. frugiperda* apresentou elevada razão de resistência (≈ 890 vezes) ao inseticida spinosad. As CL₅₀ (IC 95%) foram de 0,011 (0,009 - 0,025) $\mu\text{g.cm}^{-2}$ para a linhagem Sus e de aproximadamente 9,8 (7,4 – 17,4) $\mu\text{g.cm}^{-2}$ de spinosad para a linhagem Spin-res (Tabela 3.1). Não houve diferença significativa entre as CL₅₀ dos cruzamentos recíprocos, variando de 0,182 (0,165 - 0,201) $\mu\text{g.cm}^{-2}$ para o H₁ e de 0,143 (0,121 - 0,586) $\mu\text{g.cm}^{-2}$ para o H₂ (Tabela 3.1). No entanto, a CL₅₀ dos heterozigotos foi significativamente inferior à CL₅₀ da linhagem Spin-res. Devido à sobreposição dos intervalos de confiança da CL₅₀ dos cruzamentos recíprocos, pode-se afirmar que os genes relacionados à resistência de *S. frugiperda* a spinosad estão situados em regiões autossômicas do cariótipo e não a cromossomos determinantes de sexo e/ou herança maternal (Tabela 3.1).

Tabela 3.1 - Concentração-mortalidade das linhagens de *S. frugiperda* suscetível (Sus), resistente (Spin-res) e heterozigotos ao inseticida spinosad em bioensaio de aplicação na superfície da dieta artificial

Linhagem	<i>n</i>	Coefficiente angular	CL ₅₀ (IC 95%) ($\mu\text{g.cm}^{-2}$)	CL ₉₀ (IC 95%) ($\mu\text{g.cm}^{-2}$)	χ^2	g.l. ^a	R.R. ^b
Sus	1352	1,97 $\pm$ 0,16	0,011 (0,009 - 0,025)	0,054 (0,034 - 0,154)	10,33	6	--
Spin-res	1325	2,53 $\pm$ 0,34	9,8 (7,4 – 17,4)	31,4 (17,5 - 195,8)	23,81	8	≈ 890
Spin-res ♂ $\times$ Sus ♀	1192	2,25 $\pm$ 0,11	0,182 (0,165 – 0,201)	0,674 (0,582 - 0,800)	2,70	7	15,16
Spin-res ♀ $\times$ Sus ♂	1000	2,65 $\pm$ 0,15	0,143 (0,121 - 0,170)	0,435 (0,345 - 0,586)	8,92	6	11,92

^aGraus de liberdade ^b Razão de resistência CL₅₀ do resistente/CL₅₀ do suscetível

Figura 3.1 - Concentração-mortalidade das linhagens suscetível (Sus), resistente (Spin-res) e heterozigotos de *S. frugiperda* expostas ao inseticida spinosad em bioensaio de aplicação na superfície da dieta artificial

3.3.2. Padrão de herança da resistência de *S. frugiperda* a spinosad

A resistência de *S. frugiperda* a spinosad foi incompletamente recessiva, pois o grau de dominância calculado a partir do método proposto por Stone (1968) variou entre - 0,18 e - 0,26. Entretanto, conforme a metodologia de Bourguet et al. (2000), a dominância diminuiu com o aumento da concentração de spinosad, apresentando uma herança codominante nas concentrações mais baixas e tendendo a uma herança incompletamente recessiva a totalmente recessiva nas concentrações mais altas, indicando que a dominância da resistência é dependente da concentração do inseticida (Tabela 3.2.).

Tabela 3.2 - Efeito da dominância da resistência de *S. frugiperda* a spinosad em função da concentração do inseticida

Concentração $\mu\text{g.cm}^{-2}$	Sus	Spin-res	Spin-res ♂ × Sus ♀		Spin-res ♀ × Sus ♂	
	Mortalidade	Mortalidade	Mortalidade	Dominância	Mortalidade	Dominância
	(%)	(%)	(%)	(D)	(%)	(D)
0,02	57,85	0,00	1,75	0,97	4,35	0,92
0,04	82,59	0,00	9,32	0,89	6,84	0,92
0,07	90,43	0,00	16,90	0,81	21,10	0,77
0,13	94,39	5,12	37,32	0,64	30,69	0,71
0,23	99,56	3,57	55,00	0,46	75,83	0,25
0,73	100,00	3,50	92,96	0,07	100,00	0,00
2,27	100,00	9,53	99,15	0,01	100,00	0,00

Figura 3.2 - Efeito da dominância da resistência de *S. frugiperda* a spinosad em função da concentração do inseticida

3.3.3 Sobrevivência em plantas de milho pulverizadas com Tracer®

Houve significativa sobrevivência larval (93%) da linhagem resistente (Spin-res) de *S. frugiperda* em plantas de milho tratadas com a dose de campo de Tracer®, não diferindo da sobrevivência larval em plantas não tratadas ($F_{3,52} = 176,1$, $P = 0,0625$) (Figura 3.2). Em contraste, para os descendentes provenientes de cruzamentos recíprocos (Heterozigoto) observou-se 5,5% de sobrevivência, não diferindo da linhagem suscetível. Também houve

diferença significativa na sobrevivência das linhagens suscetível ($F_{785,7} = 179,1$; $P < 0,0001$) e heterozigota ($F_{1179,9} = 175,1$; $P = 0,0001$) com 98% sobrevivência em plantas de milho não tratadas, quando comparadas com plantas de milho tratadas. Pela análise conjunta dos dados, não foram observadas diferenças na sobrevivência das linhagens (Sus, Spin-res, heterozigotos) em plantas não tratadas e da linhagem Spin-res em plantas tratadas, diferindo apenas da sobrevivência da linhagem heterozigótica em plantas tratadas ($F_{845,13} = 525$, $P < 0,0001$). Após as lagartas sobreviventes serem recuperadas depois de 7 dias de exposição, mais de 90% das lagartas sobreviventes da linhagem Spin-res sobreviveram em folhas de milho previamente tratadas com inseticida, o que comprova a sobrevivência dessa linhagem na dose de campo de spinosad.

Figura 3.3 - Sobrevivência larval das linhagens suscetível, heterozigoto e resistente de *S. frugiperda* em plantas de milho tratadas e não tratadas com inseticida spinosad em casa de vegetação

3.3.4. Número de genes associados à resistência de *S. frugiperda* a spinosad

A partir da mortalidade observada e esperada de indivíduos provenientes de retrocruzamentos das linhagens heterozigotas com o parental que apresentou o fenótipo mais distinto (Spin-res), rejeitou-se a hipótese da herança da resistência possuir efeito monogênico (Tabela 3.3). Os valores de mortalidade foram significativos pelo teste de Qui-quadrado (χ^2) ($P < 0,001$), o que permite caracterizar resistência de *S. frugiperda* como poligênica. Não foi observada diferença significativa nas concentrações de 0,02 e 0,04 $\mu\text{g.cm}^{-2}$, devido à baixa mortalidade observada nos cruzamentos recíprocos entre as linhagens Spin-res e Sus. A estimativa do número mínimo de segregações independentes foi entre 1,86 a 2,45, sugerindo que o número de *loci* associados à resistência de *S. frugiperda* a spinosad é baixo.

Tabela 3.3 - Análise de χ^2 da mortalidade de retrocruzamentos entre a linhagem Spin-res e a progênie F₁ (cruzamentos recíprocos entre as linhagens Spin-res e Sus) de *S. frugiperda* para diferentes concentrações de spinosad

Conc. μg.cm ⁻²	Spin-res ♀ × ♂ (Spin-res ♂ × Sus ♀)			Spin-res ♂ × ♀ (Spin-res ♂ × Sus ♀)			Spin-res ♀ × ♂ (Spin-res ♀ × Sus ♂)			Spin-res ♂ × ♀ (Spin-res ♀ × Sus ♂)		
	^a Obs	^b Exp	χ^2	Obs	Exp.	χ^2	Obs	Exp.	χ^2	Obs	Exp.	χ^2
0,02	1,7	4,75	3,15	0,7	4,75	3,18	5,2	2,25	1,37	3,9	2,25	1,39
0,04	4,3	5,6	3,71	2,6	5,6	3,74	4,3	4,25	2,75	5,4	4,25	2,73
0,07	5	6,5	4,34*	3,9	6,5	4,36*	5,1	11,4	8,12*	6,9	11,4	8,08*
0,13	15,1	22,8	18,51*	9,6	22,8	18,65*	8,8	11	7,71*	12,8	11	7,62*
0,23	18	29,29	25,99*	19,3	29,28	25,96*	20,3	39,68	41,44*	18,7	39,68	41,49*
0,73	28,1	48,7	59,67*	50,1	48,7	58,82*	40,6	50,65	64,05*	39,7	50,65	64,09*
2,27	50,1	53,52	71,54*	55,5	53,51	71,31*	49,6	54,76	75,31*	53	54,76	75,16*

^a Mortalidade observada ^b Mortalidade esperada baseada em herança mendeliana

*Diferença significativa ($P = 0,001$, graus de liberdade = 1) entre a mortalidade observada e a esperada

3.3.5 Parâmetros biológicos de *S. frugiperda* resistente e suscetível a spinosad

Não houve diferença significativa na duração da fase de ovo entre as linhagens Sus e Spin-res, no entanto, a linhagem Sus diferiu significativamente das linhagens H₁ e H₂ ($F = 4,48$; g.l. = 61; $P = 0,007$) (Figura 3.4). A linhagem Spin-res apresentou uma maior duração das fases de larva ($F = 29,7$; g.l. = 63; $P < 0,001$) e pupa ($F = 13,84$; g.l. = 63; $P < 0,001$), em comparação às linhagens Spin-R e heterozigóticas, o que ocasionou um aumento significativo do ciclo total ($F = 32,18$; g.l. = 63; $P < 0,001$) (Figura 3.4). A linhagem Sus apresentou a duração da fase larval de $\approx 2,5$ dias menor que a da linhagem Spin-res.

Figura 3.4 - Duração e viabilidade das fases de ovo, larva, pupa e ciclo total (ovo-adulto) ($\pm$ EP) de linhagens suscetível, resistente e heterozigóticas a spinosad em *Spodoptera frugiperda*

A viabilidade da linhagem Spin-res foi $\approx 31\%$ menor daquela observada para as linhagens Sus, H₁ e H₂ ($F = 32,18$; g.l. = 63; $P < 0,001$) (Figura 3.4). Em contraste, a viabilidade da fase larval das linhagens Spin-res (92%) e Sus (88%) ($F = 7,49$; g.l. = 63; $P = 0,002$) foram maiores em comparação com a das linhagens heterozigotas H₁ e H₂ que apresentaram viabilidades de 74,56 e 76,87%, respectivamente. Em contraste as linhagens H₁ e H₂ apresentaram $\approx 75\%$ de viabilidade larval. A linhagem Sus apresentou a maior viabilidade de pupa ($F = 11,94$; g.l. = 63; $P < 0,001$), com mais de 84% emergência de adultos. Não houve diferença significativa entre as viabilidades do ciclo total das linhagens

Sus (50%), H₂ (49%) e H₁ (41%). Em contraste, para a linhagem resistente a viabilidade do ciclo total foi de apenas 14%.

A biomassa de pupa média da linhagem H₁ (209,89 mg) foi menor que as obtidas nas outras linhagens (≈ 222 mg) ($F = 3,55$; g.l.= 63; $p < 0,019$). Além disso, a razão sexual das linhagens Sus, H₁, H₂ e Spin-res não apresentaram diferenças significativas ($\chi^2 = 104,78$; g.l.= 62; $P = 0,007$). Não foram observadas diferenças significativas na fecundidade diária entre as linhagens ($F = 0,87$; g.l.= 75; $P = 0,46$). No entanto, a linhagem Spin-res reduziu 63% da sua capacidade de oviposição (fecundidade total), não sendo capaz de manter o mesmo desempenho reprodutivo das linhagens Sus, H₁ e H₂ ($F = 6,06$; g.l.= 75; $P < 0,001$) (Figura 3.5).

Figura 3.5 - Período de oviposição e fecundidade diária e total ($\pm$ EP) de linhagens suscetível, resistente e heterozigóticas a spinosad em *Spodoptera frugiperda*

A linhagem Spin-res apresentou menor período de oviposição, não diferindo significativamente apenas da linhagem H₁ ($F = 5,07$; g.l.= 75; $P = 0,003$). Em contraste, também não houve diferença na longevidade de fêmeas entre as linhagens Sus e Spin-res ($F = 3,57$; g.l.= 80; $P = 0,018$).

O intervalo médio entre gerações (T) não diferiu significativamente entre as linhagens Sus, H₁ e H₂ de *S. frugiperda* (Tabela 3.4). Por outro lado, a linhagem Spin-res apresentou um maior tempo de desenvolvimento (≈ 39 dias). A taxa líquida de reprodução (R_0) da linhagem Spin-R foi afetada negativamente com uma redução de $\approx 48,9\%$ na capacidade das fêmeas dessa linhagem em gerar descendentes fêmeas, em comparação à linhagem suscetível. No entanto, a linhagem H₂ se destacou por possuir a maior taxa líquida de produção, ou seja,

decorridos ≈ 33 dias de desenvolvimento (T) são esperadas 511 fêmeas resultantes de cada fêmea em fase de reprodução (R_0). Em contraste, no mesmo período espera-se 321, 342 e 157 fêmeas/fêmea das linhagens Sus, H_1 e Spin-res. A linhagem Spin-res também apresentou a menor taxa intrínseca de crescimento (r_m), com redução de $\approx 58,8\%$ no número de fêmeas geradas por fêmea/dia, comparativamente às linhagens Sus e H_1 . Em contraste, a linhagem H_2 demonstrou a maior capacidade em gerar fêmeas/fêmea/dia (Tabela 3.4). A razão finita de aumento (λ) demonstrou uma redução no aumento populacional diário da linhagem Spin-res, em comparação às linhagens Sus, H_1 e H_2 (Tabela 3.4).

Tabela 3.4 - Parâmetros da tabela de vida e fertilidade das linhagens de *Spodoptera frugiperda* suscetível, resistente e heterozigóticas provenientes de cruzamentos recíprocos ao inseticida spinosad

Linhagem	T (dias)	R_0 (♀ / ♀)	r_m (♀ / ♀*dia)	λ
Sus	34,31 $\pm$ 0,26 b	321,67 $\pm$ 54,77 b	0,17 $\pm$ 0,005 b	1,18 $\pm$ 0,005 b
Spin-res	39,29 $\pm$ 0,28 a	157,95 $\pm$ 8,81 c	0,10 $\pm$ 0,004 c	1,11 $\pm$ 0,004 c
Spin-res ♂ $\times$ Sus ♀ $\times$	34,17 $\pm$ 0,16 b	342,18 $\pm$ 37,03 b	0,17 $\pm$ 0,003 b	1,19 $\pm$ 0,003 b
Spin-res ♀ $\times$ Sus ♂	33,04 $\pm$ 0,17 b	511,25 $\pm$ 40,89 a	0,19 $\pm$ 0,002 a	1,20 $\pm$ 0,003 b

^a Valores representam média $\pm$ EP. Médias seguidas pela mesma letra na coluna, não diferem entre si pelo teste bilateral t-test ($P \leq 0,05$).

O custo adaptativo relativo da linhagem Spin-res foi de 0,49, indicando que na ausência da pressão de seleção, esta possui desvantagem competitiva e menor sobrevivência no ambiente quando comparado com a linhagem Sus. Ainda, observou-se que as linhagens heterozigotas apresentaram custo adaptativo relativo de 1,06 e 1,59 (Tabela 3.5).

Tabela 3.5 - Custo adaptativo relativo das linhagens de *Spodoptera frugiperda* suscetível, resistente e heterozigotas

Linhagens	Custo adaptativo relativo
Sus	1,00
Spin-res	0,49
Spin-res ♂ $\times$ Sus ♀	1,06
Spin-res ♀ $\times$ Sus ♂	1,59

3.4 Discussão

Neste estudo foi observada uma elevada razão de resistência (≈ 890 vezes) de *S. frugiperda* a spinosad. Até o presente momento, não havia registros de populações de *S. frugiperda* resistentes a spinosad. Casos de resistência a spinosad já haviam sido reportados em *Tuta absoluta* (Meyrick) com razão de resistência (RR) maior que 180.000 vezes após sete gerações de pressão seletiva (CAMPOS et al., 2014), *Spodoptera litura* (F.) com RR = 3921 em onze gerações (REHAN; FREED, 2014) e *Heliothis virescens* (Fabricius) uma RR = 314 em 13 gerações (YOUNG; BAILEY; ROE, 2003). No Brasil, já se constatou elevada resistência de *Tuta absoluta* a spinosad (RR > 180.000) em Pernambuco, decorrente da aplicação constante desse inseticida na cultura do tomate (CAMPOS et al., 2014).

Os cruzamentos recíprocos confirmaram que a resistência de *S. frugiperda* a spinosad é autossômica, isso significa que os *loci* relacionados à resistência estão localizados em cromossomos autossômicos, não sendo de origem mitocondrial ou sexual. O padrão de herança foi codominante, quando os heterozigotos foram expostos a baixas concentrações de spinosad. Contudo, com o aumento da concentração, os indivíduos heterozigotos apresentaram resistência funcionalmente recessiva ($D \approx 0$), demonstrando que a dominância é variável em função da concentração do inseticida (BOURGUET et al., 2000; TABASHNIK et al., 2002). Na concentração de campo, a dominância da resistência foi incompletamente recessiva. Essa característica é muito importante para o manejo de resistência de insetos, uma vez que os indivíduos heterozigotos provenientes do cruzamento entre linhagens resistente e suscetível não irão sobreviver à aplicação do inseticida spinosad, retardando ou evitando a evolução da resistência. Essa hipótese é confirmada pelo experimento em casa de vegetação, no qual se observou 5,5% de sobrevivência de indivíduos heterozigotos em plantas de milho tratados com spinosad. Além disso, garantir a mortalidade de heterozigotos é fato chave para retardar ou evitar a evolução da resistência, pois esses são os principais responsáveis em difundir os alelos que conferem resistência (ROUSH; DALY, 1990). No entanto, vale ressaltar que em condições de campo, há redução na atividade biológica de qualquer inseticida no decorrer do tempo. Sendo assim, apesar de a dominância funcional na concentração de campo de spinosad ser incompletamente recessiva para *S. frugiperda*; com a queda da atividade biológica de spinosad, poderá alterar a dominância funcional e possibilitar maior sobrevivência de heterozigotos, o que favoreceria a evolução da resistência. Além disso, a resistência de *S. frugiperda* a spinosad é mediada por mais de um gene (herança poligênica), em contraste com a maioria dos estudos já reportados. Até 2012 foram relatados

16 casos de resistência de insetos a spinosad, dentre eles apenas dois casos, em *Musca domestica* (L.) e *F. occidentalis* estavam associados à resistência poligênica (ZHANG et al., 2008; SHI; ZANG; GAO, 2011; SPARKS et al., 2012). Essas diferenças podem estar relacionadas ao histórico das populações, uma vez que a resistência poligênica ocorre normalmente em populações de campo que sofrem seleção em laboratório, devido a variações anteriores como a seleção natural e a utilização de outros produtos. De acordo com Roush; McKenzie (1987), quando um gene proporciona um elevado nível de resistência, outros genes podem contribuir de maneira quase que insignificante para essa resistência. Embora a resistência associada a uma herança poligênica se espalhe mais lentamente que a monogênica, os padrões e mecanismos envolvidos são mais variados, dificultando o manejo (GEORGHIOU; TAYLOR, 1977). Além disso, casos de resistência a spinosad que apresentaram herança poligênica, também não possuíam envolvimento de enzimas metabólicas, indicando que a insensibilidade no sítio de ação pode ser o principal mecanismo de resistência (ZHANG et al., 2008; SHI; ZHANG; GAO, 2010). Para a maioria dos casos de resistência a espinosinas, o mecanismo mais comum de resistência está associado à mutação no sítio de ligação da molécula (67%), especialmente na subunidade $\alpha 6$ do receptor nicotínico de acetilcolina, seguidos de detoxificação metabólica (25%) e por múltiplos mecanismos (8%) (SPARKS et al., 2012).

Neste estudo, a linhagem Spin-res apresentou alto custo adaptativo em comparação à linhagem Sus, diminuindo os índices de crescimento populacional e favorecendo o restabelecimento da suscetibilidade a spinosad. Além disso, a maior taxa reprodutiva da linhagem suscetível pode gerar mais descendentes a cada ciclo, favorecendo o acasalamento com indivíduos resistentes e assim diluindo o alelo da resistência. As linhagens heterozigotas apresentaram um desenvolvimento semelhante ao da linhagem Sus.

O manejo da resistência de insetos a inseticidas se baseia nas premissas de que a resistência associada a um elevado custo adaptativo, exercendo um padrão de herança incompletamente recessivo, na ausência da pressão de seleção, terá a frequência de alelos no campo diminuída, dessa maneira irá retardar a evolução da resistência (TABASHNIK et al., 2003). Tabashnik et al. (1994) demonstraram que uma população de *P. xylostella* altamente resistente a Bt reverteu a resistência rapidamente na ausência do inseticida e que o aumento da suscetibilidade se devia ao custo adaptativo. Com base nos resultados deste estudo, pode-se prever que a resistência de *S. frugiperda* a spinosad pode ser efetivamente retardada caso estratégias de manejo (ex.: rotação de inseticidas) sejam utilizadas no campo. Desse modo, a caracterização das bases genéticas da resistência de *S. frugiperda* a spinosad, associados às

características bioecológicas da praga como elevada dispersão de adultos, podem favorecer o restabelecimento da suscetibilidade na ausência da pressão de seleção (DIEZ-RODRIGUEZ; OMOTO, 2001), contribuindo na tomada de decisão e implementação de um modelo eficiente de monitoramento e manejo da resistência de *S. frugiperda* a spinosad.

3.5 Conclusão

- ✓ A herança da resistência de *S. frugiperda* a spinosad é autossômica e incompletamente recessiva;
- ✓ A resistência de *S. frugiperda* a spinosad é uma característica poligênica associada a poucos *loci*;
- ✓ Há custo adaptativo associado à resistência de *S. frugiperda* a spinosad, porém ausente em indivíduos heterozigotos, baseado em parâmetros biológicos de tabela de vida e fertilidade.

Referências

- ABBAS, N.; MANSOOR, M.M.; SHAD, S.A.; PATHAN, A.K.; WAHEED, A.; EJAZ, M.; RAZAQ, M.; ZULFIQAR, M.A. Fitness cost and realized heritability of resistance to spinosad in *Chrysoperla carnea* (Neuroptera: Chrysopidae). **Bulletin of Entomological Society**, Cambridge, v. 104, p. 707–715, 2014.
- ABBOTT, W.S. A method of computing the effectiveness of an insecticide. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 18, n. 1, p. 265-266, 1925.
- AL-SARAR, A.; HALL, F.R.; DOWNER, R.A. Impact of spray application methodology on the development of resistance to cypermethrin and spinosad by fall armyworm *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith). **Pest management Science**, Sussex, v. 62, n. 11, p. 1023-1031, 2006.
- ANDOW, D.A.; ALSTAD, D.N. F₂ screen for rare resistance alleles. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 91, p. 572-578, 1998.
- ARTHROPOD PESTICIDE RESISTENCE DATABASE. **Michigan State University**. Disponível em: <<http://www.pesticideresistance.org/>> Acesso em: 12 jan. 2015.
- BAXTER, S.W.; MAO, C.; DAWSON, A.; ZHAO, J.Z.; VOGEL, H.; SHELTON, A.M.; HECKEL, D.G.; JIGGINS, C.D. Mis-spliced transcripts of nicotinic acetylcholine receptor $\alpha 6$ are associated with field evolved spinosad resistance in *Plutella Xylostella* (L.). **PLoS Genetics**, San Francisco, v. 6, n. 1, p. 1-10, 2010.

- BIELZA, P.; QUINTO, E.F.; GRAVALOS, C.; CONTRERAS, J. Genetics of spinosad resistance in *Frankliniella occidentalis* (Thysanoptera: Thripidae). **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 100, n. 3, p. 916-920, 2007.
- BIELZA, P.; QUINTO, V.; CONTRERAS, J.; TORNE, M.; MARTIN, A.; ESPINOSA, P.J. Resistance to spinosad in the western flower thrips, *Frankliniella occidentalis* (Pergande), in greenhouse of south-eastern Spain. **Pest Management Science**, Sussex, v. 63, n. 7, p. 682-687, 2007.
- BOURGHET, D.; GENISSEL, A.; RAYMOND, M. Insecticide resistance and dominance levels. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 93, n. 6, p. 1588-1595, 2000.
- CAMPOS, M.R.; RODRIGUES, A.R.S.; SILVA, W.M.; SILVA, T.B.M.; SILVA, V.R.F.; GUEDES, R.N.; SIQUEIRA, H.A.A. Spinosad and the tomato borer *Tuta absoluta*: a bioinsecticide, an invasive pest threat, and high insecticide resistance. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 9, n. 8, 2014. Disponível em: <doi:10.1371/journal.pone.0103235>. Acesso: 09 jan. 2015.
- CAO, G.; HAN, Z. Tebufenozide resistance selected in *Plutella xylostella* and its cross-resistance and fitness cost. **Pest Management Science**, Sussex, v. 62, p. 746-751, 2006.
- CARRIÈRE, Y.; ELLERS-KIRK, C.; BIGGS, R.; HIGGINSON, D.M.; DENNEHY, T.J.; TABASHNIK, B.E. Effects of gossypol on fitness costs associated with resistance to Bt cotton in pink bollworm. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 97, p. 1710-1718, 2004.
- CARRIÈRE, Y.; TABASHNIK, B.E. Reversing insect adaptation to transgenic insecticidal plants. **Proceedings of the Royal Society of London. Series B. Biological Science**, London, v. 268, p. 1475-1480, 2001.
- CARVALHO, R.A.; OMOTO, C.; FIELD, L.M.; WILLIAMSON, M.S.; BASS, C. Investigating the molecular mechanisms of organophosphate and pyrethroid resistance in the fall armyworm *Spodoptera frugiperda*. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 8, n. 4, 2013. Disponível em: <doi:10.1371/journal.pone.0062268>. Acesso: 06 out. 2014.
- CHAN, H.H.; ZAIRI, J. Permethrin resistance in *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) and associated fitness costs. **Journal of Medical Entomology**, Annapolis, v. 50, p. 362-370, 2013.
- CROW, F.J. Genetics of insect resistance to chemicals. **Annual Review of Entomology**, Stanford, v. 2, p. 227-246, 1957.
- DIEZ-RODRIGUEZ, G.I.; OMOTO, C. Herança da resistência de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) a lambda-cialotrina. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 30, p. 311-316, 2001.
- FARIAS, J.R.; ANDOW, D.A.; HORIKOSHI, R.J.; SORGATTO, R.J.; FRESIA, P.; SANTOS, A.C.; OMOTO, C. Field-evolved resistance to Cry1F maize by *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in Brazil. **Crop Protection**, Guildford, v. 64, p. 150-158, 2014.

GASSMANN, A.; CARRIÈRE, Y.; TABASHNIK, B.E. Fitness costs of insect resistance to *Bacillus thuringiensis*. **Annual Review of Entomology**, Stanford, v. 54, p. 147-163, 2009.

GEORGHIOU, G.P. Genetics of resistance to insecticides in houseflies and mosquitoes. **Parasitological Review**, San Diego, v. 26, n. 2, p. 224-255, 1969.

GEORGHIOU, G.P., TAYLOR, C.E. Genetic and biological influences in the evolution of insecticide resistance. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 70, p. 319-323, 1977a.

_____. Operational influences in evolution of insecticide resistance. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 70, p. 653-658, 1977b.

ISHTIAQ, M.; MUSHTAQ, A.S.; WRIGHT, D.J. Stability, cross-resistance effect of synergists, pbo and def, on deltamethrin resistant strain of *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae) from Pakistan. **Pakistan Journal of Zoology**, Punjab, v. 44, n. 6, p. 1677-1682, 2012.

JONES, T.; SCOTT-DUPREE, C.; HARRIS, R.; SHIPP, L.; HARRIS, B. The efficacy of spinosad against the western flower thrips, *Frankliniella occidentalis*, and its impact on associated biological control agents on greenhouse cucumbers in southern Ontario. **Pest Management Science**, Sussex, v. 61, p. 179-185, 2005.

KASTEN, J.P.; PRECETI, A.C.M.; PARRA, J.R.P. Dados biológicos comparativos de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) em duas dietas artificiais e substrato natural. **Revista de Agricultura**, Piracicaba, v. 53, p. 68-78, 1978.

KONNO, R.H.; OMOTO, C. Custo adaptativo associado à resistência de *Aphis gossypii* Glover (Hemiptera: Aphididae) ao inseticida Carbosulfam. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 35, n. 2, p. 246-250, 2006.

LANDE, R. The minimum number of genes contributing to quantitative variation between and within population. **Genetics**, Bethesda, v. 99, p. 541-553, 1981.

LEORA SOFTWARE. **POLO-PC**: a user's guide to probit or logit analysis. Berkeley, 1987. 20 p.

LENORMAND, T.; RAYMOND, M. Resistance management: the stable zone strategy. **Proceedings of the Royal Society of London. Series B. Biological Science**, London, v. 265, p. 1985-1990, 1998.

LI, Z. M.; LIU, S.S.; LIU, Y.Q.; YE, G.Y. Temperature-related fitness costs of resistance to spinosad in the diamondback moth, *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae). **Bulletin of Entomological Research**, Cambridge, v. 97, p. 627-635, 2007.

MARTINELLI, S.; BARATA, R.M.; ZUCCHI, M.I.; SILVA-FILHO, M.D.C.; OMOTO, C. Molecular variability of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) populations associated to maize and cotton crops in Brazil. **Journal of Economic Entomology**. Lanham, v. 99, p. 516-526, 2006.

McKENZIE, J.A.; BATTERHAM, P. The genetic, molecular and phenotypic consequences of selection for insecticide resistance. **Trends in Ecology and Evolution**, Cambridge, v. 9, p. 166-169, 1994.

MOULTON, J.K., PEPPER, D.A., DENNEHY, T.J. Beet armyworm (*Spodoptera exigua*) resistance to spinosad. **Pest Management Science**, Sussex, v. 56, p. 842-848, 2000.

NASCIMENTO, A.R.B. **Bases genéticas e moleculares da resistência de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) a lufenuron**. 2013. 104 p. Dissertação (Mestrado em Entomologia) – Escola Superior de Agricultura ‘Luiz de Queiroz’, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002.

ORR, N.; SHAFFNER, A.J.; RICHEY, K.; CROUSE, G.D. Novel mode of action of spinosad: receptor binding studies demonstrating lack of interaction with known insecticidal target sites. **Pesticide Biochemistry Physiology**, San Diego, v. 95, n. 1, p. 1-5, 2009.

PERRY, T.; McKENSIE, J.A.; BATTERHAM, P. A D α 6 knockout strain of *Drosophila melanogaster* confers high level of resistance to spinosad. **Insect Biochemistry and Biology**, Oxford, v. 37, p. 184-188, 2007.

REHAN, A.; FREED, S. Selection, mechanism, cross-resistance and stability of spinosad resistance in *Spodoptera litura* (Fabricius) (Lepidoptera: Noctuidae). **Crop Protection**, Guildford, v. 56, p. 10-15, 2014.

RIBEIRO, L.M.S.; WANDERLEY-TEIXEIRA, V.; FERREIRA, H.N.; TEIXEIRA, A.A.C.; SIQUEIRA, H.A.A. Fitness costs associated with field-evolved resistance to chlorantraniliprole in *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae). **Bulletin of Entomological Research**, Cambridge, v. 104, p. 88-96, 2014.

RINKEVICH, F.D.; SCOTT, J.G. Transcriptional diversity and allelic variation in nicotinic acetylcholine receptor subunits of the red flour beetle, *Tribolium castaneum*. **Insect Molecular Biology**, Malden, v. 18, n. 2, p. 233-242, 2009.

RINKEVICH, F.D.; CHEN, M.; SHELTON, A.M.; SCOTT, J.G. Transcripts of the nicotinic acetylcholine receptor subunit gene pxy α 6 with premature stop codon are associated with spinosad resistance in diamondback moth, *Plutella xylostella*. **Invertebrate Neuroscience**, Berlin, v. 10, n. 1, p. 25-33, 2010.

ROUSH, R.T.; DALY, J.C. The role population genetics in resistance research and management. In: ROUSH, R.T.; TABASHNIK, B.E. (Ed.). **Pesticide resistance in arthropods**. New York: Chapman and Hall, 1990. p. 97-152.

ROUSH, R.T.; McKENZIE, J.A. Ecological genetics of insecticide and acaricide resistance. **Annual Review of Entomology**, Stanford, v. 32, p. 361-380, 1987.

SALGADO, V.L. Studies on the mode of action of spinosad: Insect symptoms and physiological correlates. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, San Diego, v. 60, n. 2, p. 91-102, 1998.

SANTOS, W.J. Manejo de pragas no algodão com destaque para o cerrado brasileiro. In: FREIRE, E.C. **Algodão no Cerrado do Brasil**. 2 ed. Aparecida de Goiânia: Associação Brasileira dos Produtores de Algodão, 2011. p. 495–566.

SAS INSTITUTE. **SAS/STAT**: statistical analysis system: getting started with the SAS learning. Version 9.1. Cary, 2000.

SHI, J.; ZHANG, L.; GAO, X. Characterization of spinosad resistance in the housefly *Musca domestica* (Diptera: Muscidae). **Pest Management Science**, Sussex, v. 67, p. 335–340, 2011.

SHONO, T.; SCOTT, J.G. Spinosad resistance in the housefly, *Musca domestica*, is due to recessive factor on autosome 1. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, San Diego, v. 75, n. 1/2, p. 1-7, 2003.

SOKAL, R.R.; ROHLF, F.J. **Biometry**: the principles and practices of statistics in biological research. New York: W.H. Freeman, 1995. 880 p.

SPARKS, T.C.; DRIPPS, J.E.; WATSON, G.B.; PAROONAGIAN, D. Resistance and cross-resistance to the spinosyns: a review and analysis. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, San Diego, v. 102, n. 1, p. 1-10, 2012.

STONE, B.F. A formula for determining the degree of dominance in cases of monofactorial inheritance of resistance to chemicals. **Bulletin of the World Health Organization**, Geneva, v.38, p. 325-326, 1968.

TABASHNIK, B.E.; FINSON, N.; GROETERS, F.R.; MOAR, W.J.; JOHNSON, M.W.; LUO, K.; ADANG, M.J. Reversal of resistance to *Bacillus thuringiensis* in *Plutella xylostella*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 91, p. 4120–4124, 1994.

TABASHNIK, B.E.; LIU, Y.B.; DENNEHY, T.J.; SIMS, M.A.; SISTERSON, M.S.; BIGGS, R.W.; CARRIÈRE, Y. Inheritance of resistance to Bt toxin Cry1AC in a field-derived strain of pink bollworm (Lepidoptera: Gelechiidae). **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 95, p. 1018–1026, 2002.

TABASHNIK, B.E.; CARRIÈRE, Y.; DENEHY, T.J.; MORIN, S.; SISTERSON, M.S.; ROUSH, R.T.; SHELTON, A.M.; ZHAO, J.Z. Insect resistance to transgenic bt crops: lessons from the laboratory and field. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 96, n. 4, p. 1031-1038, 2003.

TAYLOR, M.; FEYEREISEN, R. Molecular biology and evolution of resistance to toxicants. **Molecular Biology and Evolution**, Oxford, v. 13, p. 719–134, 1996.

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.

TSUKAMOTO, M. Methods of genetic analysis of insecticide resistance. In: GEORGHIOU, G.P.; SAITO, T. (Ed.). **Pest resistance to pesticides**. New York: Plenum, 1983. p. 71-98.

VALICENTE, F.H. **Controle biológico da lagarta do cartucho, *Spodoptera frugiperda*, com *Bacillus thuringiensis***. Sete Lagoas: EMBRAPA, Centro Nacional de Pesquisa de Milho e Sorgo, 2008. 9 p. (Circular Técnica, 105).

VALICENTE, F.H.; TUELHER, E.S. **Controle biológico da lagarta do cartucho, *Spodoptera frugiperda*, com *Baculovirus***. Sete Lagoas: EMBRAPA, Centro Nacional de Pesquisa de Milho e Sorgo, 2009. 14 p. (Circular Técnica, 114).

WANG, D.; QIU, X.H.; REN, X.X.; NIU, F.; WANG, K.Y. Resistance selection and biochemical characterization of spinosad resistance in *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, San Diego, v. 95, n. 2, p. 90-94, 2009.

WANG, R.; WU, Y. Dominant fitness costs of abamectin resistance in *Plutella xylostella*. **Pest Management Science**, Sussex, v. 70, p. 1872–1876, 2014. Disponível em: <doi10.1002/ps.3741>. Acesso em: 15 dez. 2014.

WATSON, G.B.; CHOUINARD, S.W.; COOK, K.R.; GENG, C.X.; GIFFORD, J.M.; GUSTAFSON, G.D.; HASLER, J.M.; LARRINUA, I.M.; LETHERER, T.J.; MITCHELL, J.C.; PAK, W.L.; SALGADO, V.L.; SPARKS, T.C.; STILWELL, G.E. A spinosyn-sensitive *Drosophila melanogaster* nicotinic acetylcholine receptor gene identification and heterologous expression. **Insect Biochemistry and Physiology**, Malden, v. 40, n. 5, p. 376-384, 2010.

YOUNG, H.P.; BAILEY, W.D.; ROE, R.M. Spinosad selection of a laboratory strain of the tobacco budworm, *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae), and characterization of resistance. **Crop Protection**, Guildford, v. 22, p. 265–273, 2003.

ZHANG, S.Y.; KONO, S.; MURAI, T.; MIYATA, T. Mechanisms of resistance to spinosad in the western flower thrip, *Frankliniella occidentalis* (Pergande) (Thysanoptera: Thripidae). **Insect Science**, Beijing, v. 15, p. 125–132, 2008.

4 CARACTERIZAÇÃO DO TRANSCRITOMA E ANÁLISE COMPARATIVA DA EXPRESSÃO GÊNICA DE LINHAGENS SUSCETÍVEL E RESISTENTE DE *Spodoptera frugiperda* (J.E. SMITH, 1797) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE) A SPINOSAD

Resumo

O entendimento do mecanismo molecular da resistência é essencial para elaboração de novas abordagens em programas de manejo de resistência de insetos. Neste estudo foi caracterizado o perfil de transcrição gênica e analisada a expressão diferencial de genes entre as linhagens suscetível (Sus) e resistente (Spin-res) de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) a spinosad. Para tanto, quatro bibliotecas de cDNA obtidas de lagartas de quarto ínstar das linhagens Sus e Spin-res, expostas ou não a spinosad, foram sequenciadas utilizando a plataforma HiScan1000® (Illumina®). O transcriptoma foi montado utilizando a estratégia *de novo*, gerando 42.406 transcritos com tamanho mediano (N50) de 598 pb. Com base na busca por similaridade no banco de dados não-redundante (nr) do NCBI, foram anotados 24.980 (59%) desses transcritos. A maioria dos transcritos se alinhou àqueles de *Bombyx mori* L., *Helicoverpa armigera* (Hübner) e *Spodoptera* spp. com 22,5, 3,81 e 3,6% das sequências, respectivamente. Foram identificados 2.903 transcritos expressos diferencialmente ($P \leq 0,05$, t-test; expressão relativa > 2) entre as linhagens Spin-res e Sus. Dentre os transcritos relacionados a enzimas do complexo metabólico, 23 P450 mono-oxigenases, 13 glutatona-S-transferases (GST), uma carboxilesterase e uma esterase foram superexpressas na linhagem Spin-res. Além disso, foi observada a superexpressão de 15 genes relacionados à produção energética na linhagem Spin-res, os quais podem estar associados ao custo adaptativo da resistência. Análises de PCR quantitativo em tempo real confirmaram que os padrões de expressão foram consistentes com os resultados de expressão gênica comparativa (RNA-seq). Bioensaios utilizando os sinergistas butóxido de piperonila (PBO) e maleato de etila (DEM) indicaram pouco ou nenhum envolvimento das enzimas P450s e GSTs, respectivamente, na resistência de *S. frugiperda* a spinosad. A análise comparativa da sequência do transcrito da subunidade $\alpha 6$ do receptor nicotínico de acetilcolina das linhagens Spin-res e Sus indicou a existência de uma mutação sinônima entre as duas linhagens (G567A), indicando que a subunidade $\alpha 6$ não seria o único alvo relacionado à resistência de *S. frugiperda* a spinosad, devido à mutação no sítio-alvo de ação.

Palavras-chave: Resistência de insetos a inseticidas; Transcriptoma; Expressão diferencial de genes; Spinosad; *Spodoptera frugiperda*

Abstract

Understanding the molecular mechanisms of insect resistance is essential for designing new approaches for insect resistance management (IRM) programs. In this study we characterized the transcriptional profile and compared the differential gene expression between susceptible (Sus) and spinosad-resistant (Spin-res) strains of *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith). Four cDNA libraries obtained from fourth instar larvae of susceptible and spinosad-resistant strains (exposed or not to spinosad) were sequenced in a HiScan1000® platform (Illumina®). The transcriptome was *de novo* assembled yielding 42,406 transcripts with a mean length (N50) of 598 bp. Based on similarity search in the non-redundant (nr) nucleotide database, 24,980 (59%) transcripts were annotated. Most of the transcripts aligned

to *Bombyx mori* L., *Helicoverpa armigera* (Hübner) and *Spodoptera* spp., with 22.5%; 3.81% and 3.6% respectively. We identified 2,032 differentially expressed transcripts ($P \leq 0.05$, t-test; fold-change > 2) between the Sus and Spin-res strains. Among metabolic enzyme transcripts, 23 P450 monooxygenases, 13 glutathione S-transferases, one carboxylesterase and one esterase were up-regulated in the spinosad-resistant strain. In addition, it was observed 15 genes superexpressed in spinosad-resistant strain which might be related to fitness cost. Quantitative real-time PCR analysis showed that patterns of gene expression were consistent with RNA-seq results. Synergistic bioassays using PBO and DEM showed little involvement of P450s in spinosad-resistance and lack of involvement regarding the GSTs. Furthermore, a comparative analysis of the subunit $\alpha 6$ from the nicotinic acetylcholine receptor of Sus and Spin-res strains showed one synonymous mutation within the two strains (G567A), showing that the $\alpha 6$ is not the only involved in spinosad-resistance.

Keywords: Insect resistance; Transcriptome analysis; Differential gene expression; Spinosyns; *Spodoptera frugiperda*

4.1 Introdução

A resistência de insetos a inseticidas e proteínas Bt é um desafio constante na agricultura e um dos principais fatores que influenciam o manejo de pragas (TABASHNIK et al., 2014). Os principais mecanismos associados à resistência de insetos a pesticidas são o aumento da taxa de detoxificação metabólica e a redução da sensibilidade do sítio de ação (GEORGHIOU, 1972; SCOTT, 1990, 1995). A caracterização dos mecanismos fisiológicos/moleculares envolvidos na resistência de insetos pragas a tecnologias de controle disponíveis mostra-se fundamental para o desenvolvimento de marcadores que permitam monitorar de forma mais rápida e adequada o surgimento e estabelecimento de indivíduos resistentes, além de proporcionar informações mais adequadas ao desenvolvimento de estratégias bem sucedidas de manejo de resistência. Nos últimos anos, o surgimento e a crescente redução dos custos de sequenciamento em plataformas de sequenciamento em larga escala, como IlluminaTM (Illumina[®]), 454 (Roche[®]) e SOLIDTM (Applied Biosystems[®]), tornaram possíveis a investigação das bases moleculares envolvidas em diversos processos biológicos, incluindo a resistência a pesticidas, mesmo em organismos não-modelo (EKBLOM; GALINDO, 2011). Essas tecnologias permitem a montagem de transcritomas e, conseqüentemente, a descoberta de genes e a elucidação de mecanismos genéticos e fisiológicos envolvidos na resposta de organismos não-modelo a condições específicas, devido à possibilidade de estudos de transcrição gênica comparativa (MARINKOVIC et al., 2012). No caso específico do estudo dos mecanismos envolvidos na resistência de insetos a inseticidas, essa tecnologia foi aplicada para a identificação de grande número de genes em *Bractocera dorsalis* (Hendel) (SHEN et al., 2011), *Locusta migratoria* (Mayen) (CHEN et al.,

2010), *Bemisia tabaci* (Gennadius) (WANG et al., 2010), *Panonychus citri* (McGregor 1916) (LIU et al., 2011), *Plutella xylostella* (L.) (LIN et al., 2013) e *Meligethes aeneus* (F.) (ZIMMER et al., 2014).

No Brasil, a lagarta do cartucho, *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae), é considerada a principal praga da cultura do milho (*Zea mays* L.) (Pogue, 2002, CRUZ, 1995). Além disso, se alimenta de plantas nativas e cultivadas em todo o hemisfério ocidental (WYRCKHUYS; O'NEIL, 2006). O uso de inseticidas tem sido a principal tática de controle de *S. frugiperda*, mas, muitas vezes, o controle é insatisfatório devido à evolução de resistência dessa espécie a diversas moléculas inseticidas (DIEZ-RODRÍGUEZ; OMOTO, 2001). Com a evolução da resistência de *S. frugiperda* a inseticidas convencionais como organofosforados (CARVALHO et al., 2013), piretroides (CARVALHO et al., 2013) e inibidores de quitina (NASCIMENTO et al., 2015), as espinosinas se tornaram uma opção eficiente para o controle dessa praga e o manejo da resistência no Brasil. No entanto, devido ao uso intensivo em determinadas áreas, foi possível a seleção de uma população resistente a spinosad, apresentando razão de resistência elevada (≈ 890 vezes) (vide Capítulo 2). Casos de resistência a spinosad têm sido relatados em diversas espécies de insetos, incluindo representantes de Coleoptera como *Leptinotarsa decemlineata* (Say) (MOTA-SANCHEZ et al., 2006), de Diptera como *Drosophila melanogaster* (Meigen) (PERRY et al., 2007), *Musca domestica* L. (MARKUSSEN; KRISTENSEN, 2012), *Bractrocera oleae* (Rossi) (SAGRI et al., 2014), de Lepidoptera como *Heliothis virescens* (Fabricius) (ROE et al., 2010), *Spodoptera litura* (Fabricius) (REHAN; FREED, 2014), e de Thysanoptera como *F. occidentalis* (Pergande) (PUINEAN et al., 2013).

Atualmente existem relatos de resistência a spinosad para 16 espécies (ARTHROPOD PESTICIDE RESISTANCE DATABASE, 2014). A resistência de insetos às espinosinas pode ser tanto por detoxificação metabólica, quanto por mudanças no sítio-alvo de ação. Estudos conduzidos em organismos modelos como *D. melanogaster* (PERRY et al., 2007; WATSON et al., 2010) mostraram que a subunidade $\alpha 6$ do receptor nicotínico de acetilcolina (nAChR) é o sítio determinante da resistência de insetos às espinosinas. Foram observados também casos de resistência de *P. xylostella* a partir de *splicing* alternativo de éxons (BAXTER et al., 2010) ou por meio de mutações pontuais gerando códons de parada prematuros (RINKEVICH et al., 2010). Outro caso de resistência a spinosad envolvendo mutações na subunidade $\alpha 6$ foi relatado em linhagens de *F. occidentalis* (PUINEAN et al., 2013) e *Thrips palmi* Karny (BAO et al., 2014), resultando na substituição da glicina (G) por ácido glutâmico (E) na posição 275 (G275E) em indivíduos resistentes. Entretanto, outros registros indicaram que o mecanismo

de resistência também pode ser devido à detoxificação mediada por enzimas do complexo metabólico do inseto (WANG et al., 2006; MARKUSSEN; KRISTENSEN, 2011; REHAN; FREED, 2014). No entanto, pouco se conhece sobre o perfil de expressão gênica de linhagens resistentes e os mecanismos moleculares envolvidos na resistência de insetos às espinosinas.

Sendo assim, para esclarecer as bases moleculares envolvidas na resistência de *S. frugiperda* a spinosad, foi realizado neste estudo o sequenciamento do transcrito de linhagens suscetível e resistente de *S. frugiperda* utilizando a plataforma HiScan 1000® (Illumina®). Posteriormente, foi realizada a montagem *de novo* do transcrito a fim de identificar possíveis alvos e genes envolvidos na resistência a esse produto. A obtenção do transcrito *de novo* e dos perfis de expressão gênica fornecerão um grande recurso genético para o maior entendimento dos mecanismos moleculares envolvidos na resistência de *S. frugiperda* a spinosad.

4.2 Material e métodos

4.2.1. Insetos

A linhagem suscetível de referência (Sus) foi obtida do Laboratório de Resistência de Artrópodes a Pesticidas (ESALQ-USP). Já a linhagem resistente (Spin-res), selecionada a partir de uma população de *S. frugiperda* proveniente de campo, com razão de resistência de ≈ 890 vezes (Capítulo 2).

4.2.2 Extração e sequenciamento de RNA total de *S. frugiperda*

O delineamento experimental utilizado para caracterização do transcrito e estudo da expressão gênica diferencial para a identificação dos mecanismos moleculares envolvidos na resistência de *S. frugiperda* a spinosad foi constituído de quatro tratamentos, sendo eles compostos pelas linhagens suscetível (Sus) e resistente (Spin-res) de *S. frugiperda*, submetidas (induzidas) ou não (não-induzidas) ao contato com spinosad. Para obtenção dos tratamentos induzidos, lagartas no primeiro dia do quarto ínstar de cada linhagem foram deixadas por um período de jejum de 24 h e, em seguida, transferidas para dieta artificial tratada superficialmente com a concentração previamente definida de $0,13 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ de spinosad (Tracer®, 480 g de Spinosad/L, Dow AgroSciences Industrial Ltda) diluído em água destilada e 0,1% de surfactante Triton®, por um período de alimentação de uma hora. Para o

tratamento sem indução, foi oferecida dieta artificial tratada superficialmente com o mesmo diluente utilizado para o inseticida. Deste modo, os tratamentos para o sequenciamento foram constituídos de Sus não-induzida, Sus induzida, Spin-res não-induzida e Spin-res induzida.

O RNA total de cada tratamento foi extraído de cinco lagartas de *S. frugiperda* por meio do kit de extração SV RNA Isolation System® (Promega®), de acordo com as especificações do fabricante. A qualidade e a concentração do RNA foram verificadas em Nanodrop-1000 Spectrophotometer 3.7.1® (Thermo Scientific®).

As amostras das linhagens Spin-res e Sus de *S. frugiperda* enriquecidas em mRNA foram armazenadas a -80°C até serem encaminhadas ao Laboratório de Biotecnologia Animal, Departamento de Zootecnia da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ), Universidade de São Paulo (USP), Piracicaba/SP, onde realizou-se o sequenciamento *paired-end* (2x100 pb) das amostras na plataforma HiScan 1000® (Illumina®).

4.2.3 Montagem *de novo*

Os dados resultantes do sequenciamento da plataforma Illumina HiScan 1000® foram avaliados quanto a qualidade das sequências para a filtragem e remoção de leituras de baixa qualidade, adotando valores de qualidade (Phred) ≥ 30 . Posteriormente, foram excluídas as leituras duplicadas com a finalidade de maximizar o desempenho computacional, sendo essas utilizadas para a montagem de um transcrito único de referência.

As leituras únicas foram submetidas a uma montagem exploratória no software *Velvetoptimizer* versão 2.2.5 (European Bioinformatics Institute®) (ZERBINO; BIRNEY, 2008), visando avaliar a diversidade de transcritos montados em diferentes tamanhos de palavras (*k-mers*) e selecionar os mais adequados para a montagem *de novo* de cada tratamento. Em seguida, o algoritmo *Oases* versão 0.2.08 (European Bioinformatics Institute®) (SCHULZ et al., 2012) foi utilizado para a montagem *de novo* com o *k-mer* 26, por ser esse o tamanho de palavra que proporcionou maior diversidade e cobertura dos *contigs* montados. As bibliotecas das linhagens Sus e Spin-res foram clusterizadas utilizando o CD-HIT (Weizhong Li's Group®) utilizando o critério de 98%, com a finalidade de eliminar erros e redundâncias presentes na montagem final.

4.2.4 Anotação funcional

Os transcritos obtidos foram anotados após serem alinhados com o banco de dados de sequências não-redundantes (nr) do NCBI, utilizando a ferramenta BLASTx disponível junto ao programa BLAST2GO (CONESA et al., 2005), considerando o e-value de 10^{-3} . Para a classificação funcional, as proteínas preditas a partir dos transcritos foram comparados àqueles dos bancos de dados de assinatura proteica Interpro pelo InterproScan (ZDOBNV; APWEILER, 2001), utilizando-se e-value de 10^{-5} . Os códigos de classificação de enzimas (CE) e rotas metabólicas (KEGG – Kyoto Gene and Genomes) foram gerados pelo mapeamento direto da ontologia gênica (termo GO) para seus códigos equivalentes a enzimas.

4.2.5 Análise de expressão gênica diferencial

A expressão gênica diferencial entre as linhagens Spin-res e Sus de *S. frugiperda* foi avaliada utilizando-se da análise de RNA-Seq a partir do software CLC Genomic Workbench (CLC Bio®). O delineamento experimental foi constituído de dois grupos (Spin-res e Sus), os quais ainda foram divididos em dois sub-grupos, induzido (exposto ao inseticida) e não-induzido (sem exposição ao inseticida), para a formação de quatro bibliotecas de cDNA. A montagem *de novo* descrita anteriormente foi utilizada como transcrito de referência. A expressão relativa de cada transcrito foi calculada utilizando-se o número de leituras semelhantes por kilobase (kb) do alvo por milhão de leituras mapeadas (RPKM). Os valores de RPKM foram ajustados, normalizados, submetidos à comparação entre Spin-res (induzido e não-induzido) e Sus (induzido e não-induzido) pelo teste-t ($P < 0,05$) e sujeitos à correção pelo método de descoberta da taxa de falso-positivos (false discovery rate - FDR). Foram considerados como diferencialmente expressos, aqueles transcritos que apresentaram significância desejada pelo teste-t ($P < 0,05$) e expressão relativa superior a 2. A validação da análise comparativa foi realizada a partir de PCR quantitativa em Tempo Real (qPCR). Para isso, foram selecionados, dentre os genes candidatos, transcritos relacionados ao processo de detoxificação metabólica do inseto.

4.2.6 Validação de genes candidatos por qPCR

4.2.6.1 Extração de RNA total de *S. frugiperda*

O método de extração de RNA total foi realizado de acordo com o procedimento descrito anteriormente para as lagartas das linhagens Sus e Spin-res de *S. frugiperda* a spinosad.

4.2.6.2 Síntese do cDNA

A síntese de cDNA foi realizada utilizando 2 µg de RNA total tratado com DNase. Para a reação de transcriptase reversa foi utilizado o sistema comercial ImProm-II™ Reverse Transcription System (Promega®), de acordo com especificações do fabricante. O cDNA foi armazenado em freezer a -20 °C até o uso.

4.2.6.3 Validação de genes candidatos por qRT-PCR

O nível de expressão dos genes candidatos verificados pela análise de RNA-seq foi validado pelo PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR), utilizando-se o método de quantificação $\Delta\Delta C_t$ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001). A reação de qPCR foi constituída de 0,4 µL de cDNA, 12,5 µL de Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix® (Thermo Scientific®), 0,6 µM de cada um dos iniciadores e 10,3 µL de água, totalizando 25 µL. Os iniciadores específicos para cada gene de interesse foram construídos a partir do software Primer Express® versão 3.0.1 (Life Technologies®), baseando-se nas sequências do transcrito de *S. frugiperda*. As reações de qPCR foram realizadas na plataforma ViiA™ 7 Real Time PCR System (Applied Biosystems®, Life Technologies®). As condições de termociclagem utilizadas foram de 2 minutos de pré-aquecimento a 50°C, 10 minutos para desnaturação inicial a 95°C, 35 ciclos a 95°C por 15 segundos, 60°C por 30 segundos e 72°C por 30 segundos. As curvas de dissociação foram realizadas a fim de se verificar a especificidade da reação. A normalização da amplificação foi realizada utilizando-se do gene da beta-actina (ACTB) como gene de referência, já validado em *Spodoptera litura* (Fabricius) (LU et al., 2013).

Tabela 4.1 - Iniciadores utilizados para a validação da expressão diferencial por PCR quantitativo em tempo real de genes candidatos selecionados da análise de RNASeq

Gene	Transcrito	Senso/Antissenso Sentido 5' – 3'	Sequência
Beta-actina	Nº Acesso DQ494753	Senso	GATCATGTTTGAGACCTT
		Antissenso	GATCTTCATGAGGTAGTC
Glutathiona S-transferase	L839_T4/6_C0.5_L903	Senso	CATCGATACCATCCAGCCATT
		Antissenso	ATCCGAAAGACGTCAAAAAACG
Glutathiona S-transferase	L1558_T1/1_C1.0_L758	Senso	ATATGGCGGCCCACTGTCT
		Antissenso	GGTGATGTGATTGCTCCACTCA
Citocromo P450 (CYP4I4)	L899_T2/2_C0.8_L1066	Senso	CTGCTCTTCCTGATAGCAACGA
		Antissenso	TTGTGTCATGACCCCTCGAACA
Citocromo P450(CYP9A9)	L11_T1/4_C0.55_L345	Senso	TGGCCACCTGGATTTGTTCT
		Antissenso	GAAGTACTTTGGATCACGGTGGAT

4.2.6.4 Avaliação do envolvimento das enzimas do complexo citocromo P450, glutathiona S-transferases e esterases envolvidas no processo de detoxificação na resistência de *S. frugiperda* a spinosad

Para esse estudo foram utilizadas lagartas de terceiro ínstar das linhagens Sus e Spin-res de *S. frugiperda* em bioensaios de concentração-resposta com spinosad, spinosad + butóxido de piperonila (PBO) e spinosad + maleato de etila (DEM) para a avaliação do envolvimento de enzimas do complexo metabólico na resistência de *S. frugiperda* às espinosinas. Os sinergistas PBO e DEM foram escolhidos por serem inibidores de enzimas do complexo P450 e de glutathiona S-transferases, respectivamente. Para isso foram realizados bioensaios de tratamento superficial da dieta, conforme descrito no capítulo 2. Entretanto, nesses bioensaios foram utilizadas lagartas previamente tratadas com PBO (0,1 µg por lagarta) e DEM (1,0 µg por lagarta). A quantidade de sinergista foi definida em bioensaios preliminares. Os sinergistas foram dissolvidos em acetona pura (P.A.) na concentração de 10 µg de PBO e 100 µg de DEM e, posteriormente, 1 µL de cada solução foi aplicado no pronoto de uma lagarta de terceiro instar utilizando-se de microaplicador (Burkard Manufacturing, Rickmansworth, England). No tratamento controle, as lagartas foram tratadas somente com acetona.

Os dados de mortalidade foram submetidos à análise de Probit no software POLO PLUS (LEORA SOFTWARE, 1997) para estimativa da Concentração Letal média (CL₅₀) e

respectivo intervalo de confiança (IC% 95). A razão de sinergismo foi estimada mediante a divisão da CL_{50} da linhagem com sinergista/ CL_{50} da linhagem sem sinergista.

4.2.7 Clonagem e sequenciamento da subunidade $\alpha 6$ do receptor nicotínico de acetilcolina (nAChR)

A caracterização completa dos transcritos da subunidade $\alpha 6$ do receptor nicotínico de acetilcolina das linhagens suscetível e resistente de *S. frugiperda* a spinosad foi realizada após amplificação, clonagem e sequenciamento dos amplicons obtidos. O transcrito foi caracterizado utilizando-se de um conjunto de iniciadores (Sf1F1-Sf1R1) baseados na sequência completa do amplicon disponível, junto ao Consórcio Internacional para o Sequenciamento do Genoma de *Spodoptera frugiperda*, o qual dá origem a um produto de amplificação de 606 pb. Os fragmentos amplificados por cada conjunto de iniciadores foram inseridos em plasmídeo vetor disponível no sistema pGEM[®]-T Easy Vector System (Promega[®]) e utilizado na transformação de células competentes OneShot[®] TOP10 (Invitrogen[®]) para a multiplicação de plasmídeos, seguindo as recomendações do fabricante.

Os transformantes foram selecionados em meio de cultura LB acrescido de 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de ampicilina e 20 μL 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosídeo (X-GAL 20 mg.mL^{-1}) como substrato para a ação da enzima β -galactosidase, indicadora de transformação. Colônias positivas foram isoladas, cultivadas em meio LB líquido acrescido de ampicilina (100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) e utilizadas para a extração de plasmídeos pelo método de lise alcalina (SAMBROOK; RUSSELL, 2001). Os plasmídeos obtidos foram utilizados em reações de amplificação dos insertos, utilizando os iniciadores específicos para cada gene de interesse (Tabela 4.2), sendo a eficiência da reação de amplificação verificada via eletroforese em gel de agarose a 1,5% acrescido 6 μL brometo de etídio, em solução tampão tris-acetato-EDTA (TAE) (40 mM Tris-acetato, 1 mM EDTA, pH 7,2) em voltagem constante de 100 V e posterior visualização em transiluminador. As reações de amplificação foram conduzidas a 95°C por 5 min (1 ciclo), 95°C por 30 s, 60°C por 30 s e 70°C por 40 s (40 ciclos), seguidos de extensão final a 72°C por 5 minutos. Os plasmídeos contendo insertos de tamanho esperado foram utilizados para o sequenciamento da subunidade $\alpha 6$ do receptor nicotínico de acetilcolina, utilizando-se dos iniciadores usados nas amplificações originais e de um conjunto de iniciadores internos (Sf2F2-SfR2) (Tabela 4.2). As regiões sequenciadas foram

analisadas no programa FinchTV v. 1.4.0 (Geospiza Inc.) e as sequências obtidas alinhadas manualmente utilizando-se do programa Mega6 v. 6.0 (TAMURA et al., 2013).

Tabela 4.2 - Iniciadores utilizados na amplificação e sequenciamento da subunidade $\alpha 6$ do receptor nicotínico de acetilcolina das linhagens Sus e Spin-res de *S. frugiperda*

Gene	Primer	Senso/Antissenso Sentido 5' – 3'	Sequência
Receptor nicotínico de acetilcolina subunidade $\alpha 6$	<i>Sf</i> 1F1	Senso	ATGTTTCATGGTAGCTCGTCA
	<i>Sf</i> 1R1	Antissenso	TCATTGCACGATGATATCGGT
Receptor nicotínico de acetilcolina subunidade $\alpha 6$	<i>Sf</i> 2F2	Senso	TCCTAACAGTACAGCATCGACT
	<i>Sf</i> 1R1	Antissenso	TCATTGCACGATGATATCGGT
Receptor nicotínico de acetilcolina subunidade $\alpha 6$	<i>Sf</i> 1F1	Senso	ATGTTTCATGGTAGCTCGTCA
	<i>Sf</i> 2R2	Antissenso	TTGCAGTGATGAACTGCAGCT

4.3 Resultados

4.3.1 Montagem *de novo*

A partir do sequenciamento na plataforma Illumina HiScan1000[®], foi obtido um total de 26.198.670 leituras para a linhagem Sus, 19.268.904 para a linhagem Sus induzida, 20.025.366 para a linhagem Spin-res e 15.606.546 para a linhagem Spin-res induzida (Tabela 4.23). No total foram adquiridas 53.434.489 leituras com aproximadamente 100 pb, sendo descartadas 44% de leituras devido ao padrão de qualidade adotado (

Tabela 4.3). Após a remoção das leituras duplicadas, aproximadamente 19 milhões de leituras com cerca de 90 pb foram utilizadas para a montagem *de novo* do transcrito de referência. O transcrito de referência obtido após o processo de clusterização resultou na produção de 42.406 transcritos (Tabela 4.4).

Tabela 4.3 - Pré-processamento de dados resultantes de sequenciamento de linhagens de *S. frugiperda* Sus, Sus induzida com spinosad, Spin-res e Spin-res induzida com spinosad

Tratamento	Total de sequências	Número de bases
Sus	26.198.670	2.619.867.000
Sus induzida	19.268.904	1.926.890.400
Spin-res	20.025.366	2.002.536.600
Spin-res induzida	15.606.546	1.560.654.600
	Após filtragem	Número de bases
Sus	15.637.694	1.407.392.460
Sus induzida	13.290.411	1.196.136.990
Spin-res	13.753.179	1.237.786.110
Spin-res induzida	10.753.205	967.788.450
	Após remoção leituras duplicadas	Número de bases
Sus	5.014.922	451.342.980
Sus induzida	5.206.965	468.626.850
Spin-res	4.513.650	406.228.500
Spin-res induzida	4.332.308	389.907.720

Tabela 4.4 - Resumo da montagem *de novo* do transcrito de linhagens suscetível e resistente de *S. frugiperda* a spinosad

Resumo	Montagem
Número total de transcritos	42.406
Número de transcritos anotados	24.980
Tamanho mínimo (pb)	102
Tamanho máximo (pb)	3.011
Total de bases	19.947.261
Transcritos tamanho > 1000 (pb)	20.758
Tamanho médio de transcritos (pb)	470
N50	598
N90	231

Figura 4.1 - Distribuição do tamanho dos transcritos do transcrito de referência de novo de lagartas das linhagens suscetível e resistente de *S. frugiperda* a spinosad

4.3.2. Anotação funcional

A anotação funcional da proteína predita pela tradução da sequência de nucleotídeos dos transcritos obtidos foi comparada com base na similaridade com transcritos já descritos no banco de dados não-redundantes (*nr*) de nucleotídeos do NCBI. A partir de 42.406 transcritos obtidos, 24.980 (58,9%) foram anotados. Na distribuição dos transcritos por espécie, a maioria dos transcritos (22,5%) foi alinhada àqueles de *Bombyx mori*, 3,81% a *Helicoverpa armigera* e 3,6% ao gênero *Spodoptera* (Lepidoptera: Noctuidae), sendo 1,1% correspondentes a *S. frugiperda*. A designação funcional pela análise da ontologia gênica (GO) dos 24.980 transcritos anotados permitiu agrupar 7.940 transcritos em 12 grupos funcionais dentro da categoria de funções moleculares, dentre deles, 56% dos transcritos corresponderam à atividade catalítica e 42% à atividade de ligação. Além disso, 11.910 transcritos foram identificados em 13 grupos funcionais da categoria de componentes celulares, e 10.682 transcritos identificados na categoria processos biológicos, sendo eles divididos em 23 grupos funcionais (Figura 4.2).

Figura 4.2 - Distribuição das ontologias gênicas (GO) atribuídas ao transcrito de lagartas de linhagens suscetível e resistente de *S. frugiperda* a spinosad

Figura 4.3 - Distribuição dos alinhamentos de transcritos por espécie via BLAST do transcrito *de novo* de lagartas de quarto instar das linhagens suscetível e resistente de *S. frugiperda* a spinosad

4.3.3. Expressão diferencial entre a linhagem Spin-res e Sus de *S. frugiperda* a spinosad

A análise de expressão diferencial demonstrou diferenças no perfil de expressão gênica entre as linhagens Spin-res e Sus de *S. frugiperda* (Figura 4.4). Foi observado que 20.167 transcritos foram comuns a todos os tratamentos (Sus, Spin-res), induzidas ou não. Em contraste, 2.062 transcritos foram expressos somente na linhagem Spin-res, enquanto 1.451 transcritos foram expressos somente na linhagem Sus. Além disso, foi observada diferença nos transcritos expressos nos tratamentos induzidos e não-induzidos de ambas linhagens. A linhagem Spin-res apresentou a expressão de 1.031 transcritos únicos quando não-induzida e 589 transcritos quando induzida. Já a linhagem Sus apresentou a expressão de 367 transcritos únicos quando não-induzida e 797 transcritos quando induzida. No total, 1.725 transcritos foram expressos somente nas linhagens Spin-res e Sus induzidas, em comparação aos 1.627 transcritos expressos somente nos tratamentos não-induzidos.

Figura 4.4 - Distribuição de transcritos expressos nas linhagens suscetível e resistente de *S. frugiperda* a spinosad, com ou sem indução

Além disso, foram identificados 2.903 transcritos com expressão diferencial ($P \leq 0,05$, t-test; expressão relativa > 2), dentre eles, 2.028 (70%) foram superexpressos na linhagem Spin-res (Figura 4.5), com expressão relativa de 2 a 8.790 vezes àquela observada na linhagem Sus (Tabela 4.5). Entretanto, não foi possível a identificação de muitos dos transcritos (57,5%) superexpressos na linhagem Spin-res em relação à linhagem Sus, com base nas buscas no banco de dados *nr* do NCBI. Sendo assim, a partir dos 861 transcritos superexpressos e anotados (42,5%), foi possível selecionar transcritos candidatos que poderiam estar relacionados ao mecanismo de resistência de *S. frugiperda* a spinosad por

meio de detoxificação metabólica. Além disso, foi observada a superexpressão de 15 genes relacionadas ao metabolismo energético na linhagem Spin-res (Tabela 4.9).

Figura 4.5 - Expressão diferencial ($P \leq 0,05$, t-test; expressão relativa > 2) em número de transcritos (a) e em distribuição em $\log_2$ (b) entre as linhagens suscetível e resistente de *S. frugiperda* a spinosad

Tabela 4.5 - Expressão diferencial ($P \leq 0,05$, t-test; expressão relativa > 2) dos 50 transcritos que apresentaram maiores alterações nos valores de expressão relativa entre lagartas de linhagens suscetível e resistente de *S. frugiperda* a spinosad

(continua)

Transcrito	Expressão relativa*	p-valor	Alinhamento	e-valor	ACC
L_178_T_2/2_C_0.750_L_563	-3523,54	0,04	---NA---**	-	-
L_1197_T_1/1_C_1.000_L_272	-597,09	0,04	---NA---	-	-
L_769_T_1/1_C_1.000_L_727	-404,09	0,03	proteína ribossomal mitocondrial 28s	2,07E-53	XP_004930138
L_730_T_4/5_C_0.143_L_499	-385,88	0,01	subunidade parcial citocromo oxidase	1,56E-60	ACB42113
L_4228_T_1/1_C_1.000_L_472	-333,24	0,04	---NA---	-	-
L_4579_T_1/1_C_1.000_L_707	-322,57	0,01	---NA---	-	-
L_5395_T_1/1_C_1.000_L_325	-293,73	0,00	---NA---	-	-
L_1305_T_2/3_C_0.500_L_1159	-271,51	0,04	citocromo p450	0,0	AAL48300
L_4672_T_1/1_C_1.000_L_367	-230,00	0,00	---NA---	-	-
L_6068_T_1/1_C_1.000_L_372	-218,80	0,03	---NA---	-	-
L_1938_T_3/4_C_0.357_L_501	-215,02	0,04	---NA---	-	-

Tabela 4.5 - Expressão diferencial ($P \leq 0,05$, t-test; expressão relativa > 2) dos 50 transcritos que apresentaram maiores alterações nos valores de expressão relativa entre lagartas de linhagens suscetível e resistente de *S. frugiperda* a spinosad

(continuação)					
Transcrito	Expressão relativa*	p-valor	Alinhamento	e-valor	ACC
L_857_T_2/2_C_0.667_L_725	-207,94	0,04	---NA---	-	-
L_3211_T_1/1_C_1.000_L_1321	-185,43	0,04	proteína dominio cral-trio	1,86E-09	XP_004933930
L_2320_T_1/2_C_0.667_L_820	-159,98	0,02	---NA---	-	-
L_3065_T_1/1_C_1.000_L_774	-144,36	0,01	---NA---	-	-
L_840_T_1/2_C_0.750_L_700	-134,50	0,02	proteína ribossomal l13a	7,49E-103	Q962U0
L_3870_T_1/1_C_1.000_L_569	-132,05	0,04	---NA---	-	-
L_2801_T_1/1_C_1.000_L_607	-128,82	0,02	---NA---	-	-
L_5680_T_1/1_C_1.000_L_655	-124,15	0,02	---NA---	-	-
L_3212_T_1/1_C_1.000_L_628	-122,98	0,00	---NA---	-	-
L_11447_T_1/1_C_1.000_L_304	-99,92	0,04	homeostase de cobre proteína-homóloga cutc	1,96E-09	XP_004931352
L_329_T_1/1_C_1.000_L_540	-89,99	0,03	---NA---	-	-
L_6290_T_1/1_C_1.000_L_486	-89,95	0,04	proteína homóloga kti12	2,80E-07	XP_004933264
L_8144_T_1/2_C_0.667_L_769	-84,64	0,00	---NA---	-	-
L_6992_T_1/1_C_1.000_L_506	-83,57	0,01	provável rna helicase dependente de atp dbp45a-like	3,37E-51	XP_004922675
L_1092_T_1/2_C_0.750_L_1008	1211,49	0,02	flavoproteína beta- polipeptídeo	7,41E-153	EHJ78721
L_706_T_3/10_C_0.405_L_1471	1211,57	0,01	udp-glicosiltransferase ugt33j1	4,57E-160	AEW43118
L_1942_T_1/5_C_0.636_L_817	1215,24	0,01	ácido graxo- redutase 1- tipo	6,74E-50	XP_004925981
L_1067_T_2/2_C_0.667_L_363	1222,22	0,01	proteína esteróide ligante de membrana	2,36E-04	BAM17904
L_310_T_6/7_C_0.406_L_1553	1299,83	0,02	udp-glicosiltransferase ugt33j1	0.0	AEW43118
L_5359_T_2/2_C_0.947_L_880	1326,73	0,04	subunidade da proteína 1 complexo-t	1,27E-10	BAM18737
L_731_T_1/1_C_1.000_L_332	1341,19	0,00	proteína ribossomal l36a	1,92E-41	BAD26653
L_3321_T_1/2_C_0.750_L_422	1354,53	0,04	---NA---	-	-

Tabela 4.5 - Expressão diferencial ($P \leq 0,05$, t-test; expressão relativa > 2) dos 50 transcritos que apresentaram maiores alterações nos valores de expressão relativa entre lagartas de linhagens suscetível e resistente de *S. frugiperda* a spinosad

(conclusão)					
Transcrito	Expressão relativa*	p-valor	Alinhamento	e-valor	ACC
L_104_T_1/2_C_0.667_L_537	1357,08	0,02	proteína não caracterizada LOC101746422	2,42E-47	XP_004925870
L_2349_T_1/1_C_1.000_L_829	1358,10	0,04	serina protease snake-tipo	2,57E-25	NP_001243984
L_1564_T_1/3_C_0.600_L_554	1664,74	0,02	proteína hipotética KGM_12967	3,33E-93	EHJ67171
L_659_T_3/4_C_0.625_L_534	1770,08	0,01	proteína ligante de odores	1,10E-77	AAR28762
L_3632_T_2/2_C_0.857_L_507	1809,76	0,02	hmg176 isoforma a	1,86E-81	AFH57155
L_2044_T_1/2_C_0.857_L_789	1902,07	0,03	proteína ligante do hormônio juvenil	2,02E-85	XP_004932669
L_2385_T_1/3_C_0.600_L_557	2141,36	0,03	hidroxibutirato desidrogenase	1,58E-50	XP_004931809
L_603_T_1/3_C_0.714_L_1065	2355,14	0,03	serine protease snake-tipo	4,06E-150	XP_004922188
L_2648_T_2/2_C_0.800_L_485	2380,45	0,02	---NA---	-	-
L_382_T_3/6_C_0.385_L_843	2392,57	0,03	subunidade 2- oxoisovalerate de	5,94E-94	ACX85225
L_4246_T_1/2_C_0.750_L_1343	2645,87	0,02	glutathione S-transferase isoforma x2desidrogenase mitocondrial-tipo	0,0	XP_004930726
L_607_T_1/2_C_0.750_L_699	2814,16	0,03	af117578_1 hormônio juvenil proteína ligante de hormônio	0,0	AAF16700
L_781_T_3/3_C_0.400_L_375	3221,46	0,04	peptídeo cisteína salivar subunidade g do	6,36E-40	NP_001040277
L_2076_T_1/1_C_1.000_L_303	4666,93	0,00	transportador h+ de atp sintase	2,20E-52	ADV36663
L_751_T_2/4_C_0.556_L_893	8236,77	0,04	takeout-tipo jhbp proteína	1,13E-47	XP_004932673
L_1880_T_4/9_C_0.586_L_1678	8538,83	0,05	aldeído desidrogenase	0,0	XP_004931115
L_1623_T_1/2_C_0.500_L_300	8790,64	0,01	proteína ribossomal s12	9,61E-48	BAD26670

* (+) indica superexpressão na linhagem Spin-res em relação à linhagem Sus, (-) indica supressão na linhagem Spin-res em relação à linhagem Sus.

** ---NA--- não obteve anotação funcional

4.3.3.1 Expressão diferencial de enzimas do complexo metabólico de insetos a inseticidas

Foram identificados, no total, 47 transcritos associados ao metabolismo de detoxificação de xenobióticos, sendo 38 (81%) deles superexpressos na linhagem Spin-res, e apenas 7 foram supressos. Em geral, foram observados 23 deles associados às monooxigenases P450 (CYP), 13 às glutathione-S-transferases (GST), 1 a carboxilesterases (CCE) e 1 esterase (EST) (Figura 4.6).

*Escala de proporcionalidade de valores transformados de RPKM, em que a cor branca indica 0% de expressão e o vermelho extremo 50% do total de RPKM para cada transcrito nos subgrupos.

Figura 4.6 - Distribuição comparativa de transcritos das linhagens suscetível e resistente de *S. frugiperda* associados ao processo de detoxificação metabólica de insetos como enzimas do complexo citocromo P450, glutathione S-transferases, carboxilesterases e esterases que apresentaram diferenças significativas em sua expressão ($P \leq 0,05$, t-test; expressão relativa > 2)

A maioria das enzimas identificadas está associada ao complexo do citocromo P450. Foi observada uma grande diversidade de enzimas, com destaque para as famílias CYP3 (8), CYP4 (5), CYP6 (6), CYP9 (4) (Tabela 4.6). Entre os transcritos relacionados às P450s, a maioria foi superexpressa na linhagem Spin-res (23 transcritos) em comparação à linhagem Sus (4 transcritos) (Figura 4.7).

*Escala de proporcionalidade de valores transformados de RPKM, em que a cor branca indica 0% de expressão e o vermelho extremo 50% do total de RPKM para cada transcrito nos subgrupos.

Figura 4.7 - Distribuição comparativa de transcritos de enzimas do complexo citocromo P450 das linhagens suscetível e resistente de *S. frugiperda* associadas ao processo de detoxificação metabólica de insetos que apresentaram diferenças significativas em sua expressão ($P \leq 0,05$, t-test; expressão relativa > 2)

Tabela 4.6 - Expressão diferencial de enzimas do complexo citocromo P450 que apresentaram diferenças significativas ($P \leq 0,05$, t-test; expressão relativa > 2) nos valores de expressão relativa entre lagartas das linhagens suscetível e resistente de *S. frugiperda* a spinosad

Transcrito	Alinhamento	Expressão relativa	p-valor	e-valor	ACC
L_11327_T_1/1_C_1.000_L_350	CYP337B1.2	-11,39	0,01	1,63E-07	AFO72902
L_13340_T_1/1_C_1.000_L_185	CYP321B1.2	-7,13	0,03	2,92E-16	ADA68175
L_11897_T_1/1_C_1.000_L_390	CYP340L1.1	-4,05	0,05	1,21E-43	BAM73878
L_3226_T_1/2_C_0.833_L_484	CYP4AU2	-2,46	0,02	2,76E-75	AAP80766
L_1378_T_1/2_C_0.667_L_917	CYP49A9	2,49	0,02	1,52E-157	AFP20595
L_1246_T_3/4_C_0.500_L_669	CYP9A40	3,08	0,03	2,06E-126	ABC72321
L_3565_T_3/4_C_0.500_L_1186	CYP340L1.2	4,89	0,02	0	AEL87781
L_4055_T_2/2_C_1.000_L_1219	CYP9A51	4,92	0,03	0	AAP80766
L_2327_T_2/3_C_0.667_L_877	CYP6AB13 parcial	5,20	0,05	3,12E-104	AFP20595
L_8397_T_1/1_C_1.000_L_301	CYP337B1.1	9,05	0,03	1,26E-21	EHJ73168
L_2866_T_1/1_C_1.000_L_1131	CYP6AB14	9,12	0,03	1,52E-79	AET11927
L_11036_T_1/1_C_1.000_L_405	CYP6AB4	9,12	0,01	2,41E-26	AFO72902
L_1074_T_1/2_C_0.750_L_1360	CYP4M6	10,38	0,00	0	AFP20592
L_1575_T_2/3_C_0.714_L_1209	CYP321A10	14,01	0,02	0	AAM54722
L_375_T_1/7_C_0.458_L_563	CYP340L1.3	24,57	0,04	5,90E-71	AAP80766
L_9851_T_1/1_C_1.000_L_471	CYP4V2-tipo	25,72	0,02	1,10E-98	AGO62011
L_1970_T_2/3_C_0.600_L_1550	CYP6AB31	41,11	0,00	6,91E-147	AFP20591
L_4464_T_1/1_C_1.000_L_1104	CYP6AE9	86,67	0,00	1,60E-27	AFP20594
L_6365_T_1/1_C_1.000_L_527	CYP321B1.1	104,16	0,02	9,91E-36	AGO62009
L_899_T_2/2_C_0.800_L_1066	CYP4L4	113,72	0,01	0	AAL48300
L_3131_T_2/2_C_0.800_L_1420	CYP6AB12	121,37	0,02	0	AGO62002
L_2263_T_1/1_C_1.000_L_233	CYP9A12	143,55	0,01	2,47E-31	ACB30273

* (+) indica superexpressão na linhagem Spin-res em relação à linhagem Sus

(-) indica supressão na linhagem Spin-res em relação à linhagem Sus.

O segundo grupo mais abundante foi o de enzimas do grupo das glutathione S-transferases, com representantes de diversas famílias, como as famílias sigma (2), epsilon (4), omega (1) e theta (6). De maneira similar, a maioria dos transcritos (13) foram superexpressos na linhagem Spin-res (Figura 4.8), em contraste à linhagem Sus (apenas 2 transcritos superexpressos).

*Escala de proporcionalidade de valores transformados de RPKM, em que a cor branca indica 0% de expressão e o vermelho extremo 50% do total de RPKM para cada transcrito nos subgrupos.

Figura 4.8 - Distribuição comparativa de transcritos de glutationas S-transferases associadas ao processo de detoxificação metabólica de insetos que apresentaram diferenças significativas em sua expressão ($P \leq 0,05$, t-test; expressão relativa > 2)

Tabela 4.7 - Expressão diferencial de enzimas glutationas S-transferases que apresentaram diferenças significativas ($P \leq 0,05$, t-test; expressão relativa > 2) nos valores de expressão relativa entre lagartas das linhagens suscetível e resistente de *S. frugiperda* a spinosad

Transcrito	Alinhamento	Expressão relativa*	<i>p</i> -valor	<i>e</i> -valor	ACC
L_3236_T_1/1_C_1.000_L_950	gst theta.5	-10,88	0,05	2,54E-87	ACX85225
L_97_T_1/1_C_1.000_L_924	gst omega	-4,70	0,02	0	AEG75845
L_121_T_2/2_C_0.833_L_2152	gst s3 protein	8,82	0,00	1,97E-05	AEG75844
L_5663_T_2/2_C_0.750_L_457	gst theta.4	12,65	0,03	4,04E-53	ACX85225
L_9134_T_1/1_C_1.000_L_679	gst epsilon2.4	14,71	0,00	5,66E-64	ACU09495
L_11656_T_1/1_C_1.000_L_748	gst epsilon 2.3	30,12	0,02	2,77E-72	ACZ73898
L_839_T_4/6_C_0.471_L_903	gst theta.6	32,86	0,03	3,42E-80	ACX85225
L_234_T_1/3_C_0.667_L_752	gst epsilon 2.2	54,79	0,01	6,80E-110	ACZ73898
L_2398_T_1/1_C_1.000_L_693	gst sigma	136,80	0,03	1,22E-75	AAF23078
L_1558_T_1/1_C_1.000_L_758	gst epsilon2.1	213,44	0,01	3,20E-108	AAS79891
L_1840_T_2/3_C_0.667_L_758	gst theta.3	405,69	0,04	1,11E-95	ACX85225
L_2635_T_2/6_C_0.615_L_730	gst theta.2	406,91	0,04	1,67E-91	ACX85225
L_382_T_3/6_C_0.385_L_843	gst theta.1	2392,57	0,03	5,94E-94	ACX85225

* (+) indica superexpressão na linhagem Spin-res em relação à linhagem Sus

(-) indica supressão na linhagem Spin-res em relação à linhagem Sus.

Outros grupos de enzimas que também demonstraram expressão diferencial, no entanto, em menor quantidade, como as carboxilesterases e as esterases. Nesse caso, os transcritos próximos a esterase fe4 e a carboxilesterase-7 foram superexpressos na linhagem Spin-res, enquanto o transcrito próximo a carboxilesterase cxe 28 foi supresso (Figura 4.9).

*Escala de proporcionalidade de valores transformados de RPKM, em que a cor branca indica 0% de expressão e o vermelho extremo 50% do total de RPKM para cada transcrito nos subgrupos.

Figura 4.9 - Distribuição comparativa de transcritos de esterases e carboxilesterases das linhagens suscetível e resistente de *S. frugiperda* associadas ao processo de detoxificação metabólica de insetos que apresentaram diferenças significativas em sua expressão ($P \leq 0,05$, t-test; expressão relativa > 2)

Tabela 4.8 - Expressão diferencial de enzimas do grupo das esterases que apresentaram diferenças significativas ($P \leq 0,05$, t-test; expressão relativa > 2) nos valores de expressão relativa entre lagartas das linhagens suscetível e resistente de *S. frugiperda* a spinosad

Transcrito	Alinhamento	Expressão relativa*	p-valor	e-valor	ACC
L_8600_T_1/1_C_1.0_L_926	carboxilesterase cxe28	-7,43	0,03	3,14E-62	AEL33701
L_9374_T_1/1_C_1.0_L_391	esterase fe4-tipo	10,86	0,01	1,37E-24	XP_004933503
L_8164_T_1/1_C_1.0_L_428	carboxilesterase -7	240,73	0,03	6,62E-43	XP_004923428

* (+) indica superexpressão na linhagem Spin-res em relação à linhagem Sus
(-) indica supressão na linhagem Spin-res em relação à linhagem Sus.

4.3.3.2 Expressão diferencial de genes relacionados ao metabolismo energético

A análise de expressão diferencial realizada entre as linhagens Spin-res e Sus de *S. frugiperda* a spinosad também demonstrou diferenças no perfil de expressão entre genes relacionados ao metabolismo energético do inseto. Foi observada a superexpressão de 15 transcritos ($P \leq 0,05$, t-test; expressão relativa > 2) na linhagem Spin-res, com níveis de expressão relativa variáveis de 4 a 664 vezes (Tabela 4.9). Dentre eles, foram encontradas 5 NADH desidrogenases, 6 transportadores de trealose, 2 atp-sintases, 1 hidroxidobutirato desidrogenase e 1 transportador de H^+ atp-sintase (mitocondrial) (Figura 4.10).

Figura 4.10 - Distribuição dos transcritos relacionados ao metabolismo energético de insetos superexpressos ($P \leq 0,05$, t-test; expressão relativa > 2) na linhagem Spin-res

Tabela 4.9 - Expressão diferencial de genes relacionados ao metabolismo energético do inseto, que apresentaram diferenças significativas ($P \leq 0,05$, t-test; expressão relativa > 2) nos valores de expressão relativa entre lagartas das linhagens suscetível e resistente de *S. frugiperda* a spinosad

Transcrito	Alinhamento	Expressão relativa*	p-valor	e-valor	ACC
L_2076_T_1/1_C_1.0_L_303	subunidade g de transportador h ⁺ de atp sintase	664,02	0,00	2,20E-52	ADV36663.1
L_2385_T_2/3_C_0.6_L_655	hidroxibutirato desidrogenase	471,56	0,02	1,05E-62	EHJ67940.1
L_528_T_1/1_C_1.0_L_660	nadh desidrogenase	291,93	0,03	8,21E-45	EHJ70996.1
L_3200_T_3/3_C_0.6_L_735	nadh desidrogenase	287,68	0,05	8,34E-68	EHJ75497.1
L_8377_T_1/1_C_1.0_L_332	transportador facilitador de trealose tret1-tipo	280,39	0,03	1,49E-05	EHJ73890.1
L_1239_T_1/2_C_0.67_L_457	subunidade 5 de nadh desidrogenase alpha1	259,26	0,05	2,19E-41	EHJ76053.1
L_721_T_1/1_C_1.0_L_451	atp sintase delta mitocondrial	220,13	0,04	8,97E-58	AAV91353.1
L_4622_T_1/1_C_1.0_L_579	subunidade 5 de nadh desidrogenase alpha1	199,18	0,04	3,27E-59	EHJ76053.1
L_908_T_1/3_C_0.6_L_734	transportador facilitador de trealose tret1-tipo	123,55	0,00	7,77E-46	EHJ75057.1
L_3863_T_1/2_C_0.67_L_468	transportador facilitador de trealose tret1-tipo	13,77	0,04	2,85E-09	EHJ72396.1
L_5010_T_1/1_C_1.0_L_680	transportador facilitador de trealose tret1-tipo	8,07	0,01	1,19E-45	EHJ73889.1
L_13268_T_1/1_C_1.0_L_249	complexo nadh desidrogenase fator 6-tipo	7,34	0,03	7,24E-10	EFX87698.1
L_3160_T_1/1_C_1.0_L_414	transportador facilitador de trealose tret1-tipo	6,60	0,03	1,24E-32	EHJ70841.1
L_13446_T_1/1_C_1.0_L_160	subunidade 6 da atp sintase f0	4,41	0,02	5,13E-12	P14862.2CA A31791.1
L_1936_T_3/4_C_0.4_L_736	subunidade de succinato desidrogenase citocromo b mitocondrial	4,10	0,03	3,60E-75	EHJ78667.1

* (+) indica superexpressão na linhagem Spin-res em relação à linhagem Sus
(-) indica supressão na linhagem Spin-res em relação à linhagem Sus.

4.4. Validação de genes candidatos por qRT-PCR

O padrão de expressão diferencial entre as linhagens Sus e Spin-res de *S. frugiperda* a spinosad foi confirmado pela expressão relativa identificada por qPCR (Tabela 4.10; Figura 4.11). Todos os transcritos apresentaram maior expressão na linhagem Spin-res, variando entre 7 e 20 vezes, em relação à linhagem Sus (Tabela 4.11).

Tabela 4.10 - Análise de qPCR demonstrando o valor de expressão relativa de genes selecionados entre indivíduos suscetíveis e resistentes de *S. frugiperda* a spinosad que foram induzidas ou não

Tratamento	Expressão relativa (Média ± EP)			
	glutathiona S- transferase	glutathiona S- transferase	citocromo P450	citocromo P450
	(L839_T4/6_C0.5_L903)	(L1558_T1/1_C1.0_L758)	(L899_T2/2_C0.8_L1066)	(L11_T1/4_C0.55_L345)
Sus				
(induzido)	0,88 ± 0,41	0,92 ± 0,28	0,75 ± 0,44	0,93 ± 0,33
Spin-res				
(não-induzido)	8,14 ± 3,57	9,97 ± 5,84	7,92 ± 3,08	14,25 ± 4,46
Spin-res				
(induzido)	14,63 ± 4,00	9,78 ± 2,27	7,90 ± 1,12	15,37 ± 5,49

Figura 4.11 - Análise de qPCR demonstrando o valor de expressão relativa de genes selecionados entre indivíduos de linhagens suscetível e resistente de *S. frugiperda* a spinosad, induzidas ou não com spinosad

4.5 Avaliação do envolvimento das enzimas do complexo citocromo P450, glutathione S-transferases e esterases no processo de detoxificação do inseto na resistência de *S. frugiperda* a spinosad

Não foram observadas diferenças significativas na resposta da linhagem Sus a spinosad com a utilização dos sinergistas DEM e PBO, a qual apresentou aumento de suscetibilidade de 1,15 e 1,25 vezes, respectivamente. Para a linhagem Spin-res houve aumento na suscetibilidade de 0,86 e 3,41 vezes devido à inibição das enzimas P450s e glutathione S-transferases quando utilizados os sinergistas PBO e DEM, respectivamente. O aumento da suscetibilidade da linhagem Spin-res quando tratado com PBO difere dos demais resultados, pois não há sobreposição dos intervalos de confiança (Tabela 4.11). Esse resultado sugere que as enzimas metabólicas do complexo P450 possuem influência na resistência de *S. frugiperda* a spinosad.

Tabela 4.11 - Concentração-mortalidade das linhagens Spin-res e Sus de *S. frugiperda* ao inseticida spinosad com ou sem o uso dos sinergistas butóxido de piperonila (PBO) e maleato de etila (DEM)

Linhagem	<i>n</i>	Coefficiente angular ($\pm$ EP)	CL ₅₀ (IC 95%) ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	χ^2	g.l.	RS*
Sus	1312	3,07 $\pm$ 0,26	0,015 (0,011 - 0,021)	10,25	5	-
Sus + DEM	861	2,26 $\pm$ 0,32	0,012 (0,008 - 0,014)	8,90	5	1,25
Sus + PBO	916	2,19 $\pm$ 0,25	0,013 (0,009 - 0,018)	3,05	5	1,15
Spin-res	1135	1,05 $\pm$ 0,07	1,130 (0,646 - 1,928)	13,39	6	-
Spin-res + DEM	840	0,95 $\pm$ 0,10	0,972 (0,531 - 1,340)	8,17	6	1,16
Spin-res + PBO	863	0,94 $\pm$ 0,08	0,331 (0,236 - 0,445)	4,42	5	3,41

* RS = razão de resistência sinergismo (CL₅₀ da linhagem com sinergista/CL₅₀ da linhagem sem sinergista)

4.6. Clonagem e sequenciamento da região $\alpha 6$ do receptor nicotínico de acetilcolina (nAChR)

O fragmento de 606 pb sequenciado da região $\alpha 6$ do receptor nicotínico de acetilcolina (nAChR) mostrou elevada similaridade com sequências de nAChR $\alpha 6$ de *H. virescens* (99%) (GenBank: AAD32698.1) e *B. mori* (98%) (GenBank: ABV45518.1). Foi observada apenas uma mutação entre a linhagem Spin-res e Sus na posição nucleotídica 567 pb, a qual é uma alteração sinônima, com ambas as sequências traduzindo o aminoácido valina (Figura 4.13).

Figura 4.13 - Sequência de nucleotídeos e aminoácidos da subunidade $\alpha 6$ do receptor nicotínico de acetilcolina (nAChR) das linhagens suscetível e resistente de *S. frugiperda* a spinosad

4.6. Discussão

O inseticida spinosad tem sido um dos inseticidas mais utilizados no manejo de *S. frugiperda* no Brasil devido a sua eficácia e ao mecanismo de ação único (ativador alostérico de receptores nicotínicos de acetilcolina). A fim de fornecer subsídios a um programa de Manejo da Resistência de Insetos (MRI) a moléculas inseticidas do grupo das espinosinas, foi realizado neste estudo o sequenciamento de linhagens resistentes e suscetíveis de *S. frugiperda* a spinosad. A partir do sequenciamento foi possível a realização da montagem *de novo* do transcrito com 42.406 transcritos, obtendo 24.980 transcritos com anotação funcional. Por meio da análise de expressão diferencial foi observada a superexpressão de 15 transcritos relacionados ao metabolismo energético e de 32 enzimas relacionadas ao processo de detoxificação de xenobióticos. A superexpressão de enzimas metabólicas acarreta um grande dispêndio energético, reduzindo a quantidade de energia disponível para outras atividades biológicas (ROUSH; McKENSIE, 1987). Em *Culex pipiens* apresentando superexpressão de esterases, foi observada a redução de 30% da reserva energética (RIVERO et al. 2011). A superexpressão enzimática pode chegar até 50 vezes como na resistência de *Culex pipiens* L. a organofosforados (RAYMOND et al., 2001), e até 8.790 vezes em *S. frugiperda* como visto neste estudo. Além disso, a redução nas reservas de energia também pode ser decorrente de mutação em sítios-alvo como demonstrado pela redução em 20% das reservas energéticas de *C. pipiens* decorrente de mutações na acetilcolinesterase (RIVERO et al. 2011). As mutações do sítio de ligação resultam em custos metabólicos quando esses processos forem essenciais para a viabilidade do inseto ou quando diminuírem seu desenvolvimento, chegando próximos da sua perda de função (COUSTAU et al., 2000). Na maioria das vezes, os lipídios são os componentes energéticos principais desse superinvestimento metabólico (RIVERO et al., 2010); no entanto, o envolvimento de carboidratos e lipídios no processo de detoxificação metabólica de inseticidas também já foi reportado por Nath (2002) e Guedes et al. (2006), respectivamente.

Dentre as enzimas com expressão diferencial, verificou-se uma elevada quantidade de enzimas do complexo do citocromo P450 (CYP) e de glutathione S-transferases (GST). As monooxigenases são conhecidas pela metabolização de piretroides. Algumas P450 como CYP4G2, CYP6A1, CYP6G4 e CYP6D3 já foram associadas à resistência de *M. domestica* a spinosad (HOJLAND et al., 2014). Ainda, a superexpressão de enzimas das famílias CYP3, CYP4, CYP6 e CYP9 foram observadas em linhagens de *S. frugiperda* resistentes a

organofosforados (CARVALHO et al., 2013) e a benzoilureias (NASCIMENTO, 2013), indicando o envolvimento dessas enzimas em diversos casos de resistência.

As GSTs são outro importante grupo de enzimas que participam da metabolização secundária de xenobióticos pela conjugação de uma molécula de glutathione reduzida; além disso, também participam do sequestro e transporte de moléculas naturais ou sintéticas, como de piretroides em *Tenebrio molitor* L. (ATKINS et al., 1993; ENAYATI; RANSON; HEMINGWAY, 2005; KOSTAROPOULOS et al., 2001). As GSTs também estão envolvidas em casos de resistência a organofosforados, como em *P. xylostella* (HUANG et al., 1998, SONODA; ASHFAQ; TSUKUMI, 2006), organoclorados em *Anopheles gambiae* Giles (RANSON et al., 2001), piretroides em *Nilaparva lugens* (Stal) (VONTAS; SMALL; HEMINGWAY, 2001) e espinosinas em *Choristoneura rosaceana* (Harris) (SIAL; BRUNNER; GARCZYNSKI, 2011). Neste estudo, o sinergista butóxido de piperonila (PBO) contribuiu para a restauração da suscetibilidade da linhagem Spin-res, sugerindo que as enzimas do complexo P450 contribuem para a resistência de *S. frugiperda* a spinosad, mas não é o principal mecanismo envolvido nessa característica. De fato, o mecanismo de resistência a spinosad mais conhecido é devido a mutações na subunidade $\alpha 6$ do receptor nicotínico de acetilcolina (nAChR). Os casos de resistência de insetos às espinosinas que foram observados com os mais elevados níveis de resistência estavam todos relacionados a mutações na subunidade $\alpha 6$, como a linhagem de *D. melanogaster* (RR $\approx$ 1.200) na Austrália (PERRY; McKENSIE; BATTERHAM, 2007), *B. dorsalis* (RR > 2.000) em Taiwan (HSU et al., 2012), *F. occidentalis* (RR > 350.000) na Espanha (PUINEAN et al., 2013) e *P. xylostella* (RR $\approx$ 18.600) (BAXTER et al., 2010) no Havaí. No entanto, a análise comparativa dos transcritos da subunidade $\alpha 6$ entre as linhagens Spin-res e Sus de *S. frugiperda* não indicou a ocorrência de mutações que pudessem explicar a resistência de *S. frugiperda* a spinosad no Brasil. Esse resultado é similar a resistência de *F. occidentalis* (RR 170.000) a spinosad na China e nos Estados Unidos, assim como a de *M. domestica*, nos quais a resistência não foi superada pela utilização de sinergistas e também não apresentaram mutações na subunidade $\alpha 6$ das linhagens resistentes (GAO; DEACUTIS; SCOTT, 2007a; WENJIE et al., 2013). Em *M. domestica* também não se observou o envolvimento das subunidades *Md* $\alpha 5$ e *Md* $\beta 3$ (GAO; DEACUTIS; SCOTT, 2007b). Além disso, existem casos de resistência, em que foi detectada a existência de transcritos faltando um ou mais éxons, formando proteínas truncadas, cuja função ainda é desconhecida e que não estão relacionados

à resistência a spinosad, como em *Tribolium castaneum* (Herbst, 1797) (SCOTT; RINCHEVICH, 2009).

O fato de as espinosinas serem muito utilizadas no controle de pragas facilitou a evolução de resistência em apenas alguns anos após sua introdução no mercado (SPARKS et al., 2012). A rapidez no desenvolvimento de resistência de insetos a inseticidas e a dificuldade na produção de moléculas que apresentam diferentes mecanismos de ação, reforçam a importância de se prolongar a vida útil e a eficiência das moléculas ainda existentes. Sendo assim, a identificação da mutação responsável pela resistência de *S. frugiperda* a spinosad continua sendo uma informação muito importante a fim de desenvolver estratégias de monitoramento mais eficientes. Uma vez conhecida a sequência responsável pela resistência, seria possível utilizá-la em monitoramentos rápidos utilizando pirosequenciadores, o que proporcionaria o screening rápido e barato de centenas de amostras em um curto período de tempo e, desse modo, auxiliariam nas tomadas de decisões no campo, como rotação de produtos com diferentes modo de ação. Além disso, pode facilitar a predição da frequência e distribuição de indivíduos resistentes e auxiliar na predição da evolução da resistência. Ainda, a montagem do transcrito *de novo* e a análise do perfil de transcrição genética na linhagem resistente e suscetível fornecem muitas informações que podem ser utilizadas para estudos de resistência a outros inseticidas pela quantidade de genes anotados e descritos, e também em estudos futuros para a elucidação da resistência a spinosad.

4.7. Conclusão

- ✓ As linhagens suscetível e resistente de *Spodoptera frugiperda* a spinosad diferem no seu padrão de expressão gênica;
- ✓ A linhagem Spin-res apresentou superexpressão de enzimas do complexo energético relacionadas possivelmente ao custo adaptativo associado à resistência de *S. frugiperda* a spinosad;
- ✓ A linhagem Spin-res apresentou superexpressão de enzimas do complexo metabólico de maneira constitutiva;
- ✓ A resistência de *S. frugiperda* a spinosad não está relacionada à subunidade $\alpha 6$ e também não está relacionada à detoxificação por meio de enzimas metabólicas.

Referências

ARTHROPOD PESTICIDE RESISTANCE DATABASE. **Michigan State University**.

Disponível: <<http://www.pesticideresistance.com>>. Acesso em: 01 jun. 2015.

ATKINS, W.M.; WANG, R.W.; BIRD, A.W.; NEWTON, D.J.; LU, A.H.W. The catalytic mechanism of glutathione S-transferase (GST): spectroscopic determination of the pKa of Tyr-9 in rat alpha 1-1 GST. **Journal of Biological Chemistry**, Maryland, v. 268, n. 26, p. 19188 -19191, 1993.

BAO, W.X.; NARAI, Y.; NAKANO, A.; KANEDA, T.; MURAI, T.; SONODA, S. Spinosad resistance of melon thrips, *Thrips palmi*, is conferred by G275E mutation in $\alpha 6$ subunit of nicotinic acetylcholine receptor and cytochrome P450 detoxification. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, San Diego, v. 112, p. 51-55, 2014.

BAXTER, S.W.; MAO, C.; DAWSON, A.; ZHAO, J.Z.; VOGEL, H.; SHELTON, A.M.; HECKEL, D.G.; JIGGINS, C.D. Mis-spliced transcripts of nicotinic acetylcholine receptor $\alpha 6$ are associated with field evolved spinosad resistance in *Plutella Xylostella* (L.). **PLoS Genetics**, San Francisco, v. 6, n. 1, p. 1-10, 2010.

CARVALHO, R.A.; OMOTO, C.; FIELD, L.M.; WILLIAMSON, M.S.; BASS, C. Investigating the molecular mechanisms of organophosphate and pyrethroid resistance in the fall armyworm *Spodoptera frugiperda*. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 8, n. 4, 2013. Disponível em: <[doi:10.1371/journal.pone.0062268](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0062268)>. Acesso em: 06 out. 2014.

CHEN, S.; YANG, P.C.; JIANG, F.; WE, Y.Y.; MA, Z.; KANG, L. *De Novo* analysis of transcriptome dynamics in the Migratory Locust during the development of phase traits. **PLoS One**, San Francisco, v. 5, n. 12, e15633, 2010. Disponível em: <[doi:10.1371/journal.pone.0015633](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0015633)>. Acesso em: 09 dez. 2014.

CONESA, A.; GOTZ, S.; GARCÍA-GÓMEZ, J.M.; TEROL, J.; TALÓN, M.; ROBLES, M. Blast2GO: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research. **Bioinformatics**, Oxford, v. 21, n. 18, p. 3674-3676, 2005.

COTTER, S.C.; KRUUK, L.E.B.; WILSON, K. Costs of resistance: genetic correlations and potential trade-offs in an insect immune system. **Journal Evolutionary Biology**, Malden, v. 17, p. 421-429, 2003.

COUSTAU, C.; CHEVILLON, C.; FFRENCH-CONSTANT, R. Resistance to xenobiotics and parasites: can we count the cost? **Trends in Ecology and Evolution**, Cambridge, v. 15, p. 378-383, 2000.

CRUZ, I. **A lagarta-do-cartucho na cultura do milho**. Sete Lagoas: EMBRAPA, CNPMS, 1995. 45 p. (Circular Técnica, 21).

DIEZ-RODRIGUEZ, G.I.; OMOTO, C. Herança da resistência de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) a lambda-cialotrina. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 30, p. 311-316, 2001.

EKBLOM, R.; GALINDO, J. Applications of next generation sequencing in molecular ecology of non-model organisms. **Heredity**, London, v. 107, n. 1, p. 1-15, 2011.

ENAYATI, A.A.; RANSON, H.; HEMINGWAY, J. Insect glutathione transferases and insecticide resistance. **Insect Molecular Biology**, Malden, v. 14, p. 3-8, 2005.

FARIAS, J.R.; ANDOW, D.A.; HORIKOSHI, R.J.; SORGATTO, R.J.; FRESIA, P.; SANTOS, A.C.; OMOTO, C. Field-evolved resistance to Cry1F maize by *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in Brazil. **Crop Protection**, Guildford, v. 64, p. 150-158, 2014.

FEYEREISEN, R. Insect cytochrome P450. In: GILBERT, L.I.; LATROU, K.; GILL, S.S. (Ed.). **Comprehensive molecular insect science**. Oxford: Elsevier, 2005. v. 4, p. 1-77.

GAO, J.R.; DEACUTIS, J.M.; SCOTT, J.G. The nicotinic acetylcholine receptor subunit Mdelta6 from *Musca domestica* is diversified via post transcriptional modification, **Insect Molecular Biology**, Malden, v. 16, p. 325-334, 2007a.

_____. Characterization of the nicotinic acetylcholine receptor subunits Mdelta5 and Mdelta3 on autosome 1 of *Musca domestica* indicate they are not involved in spinosad resistance. **Insect Molecular Biology**, Malden, v. 16, p. 691-701, 2007b.

HOJLAND, D.H.; JENSEN, K.V.; KRISTENSEN, M. Expression of xenobiotic metabolizing cytochrome P450 genes in a spinosad-resistant *Musca domestica* L. strain. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 9, n. 8, e103689, 2014. Disponível em: <doi:10.1371/journal.pone.0103689>. Acesso em: 16 jun. 2015.

HSU, J.C.; FENG, H.T.; WU, W.J.; GEIB, S.M.; MAO, C.; VONTAS, J. Truncated transcripts of nicotinic acetylcholine subunit gene Bdelta6 are associated with spinosad resistance in *Bactrocera dorsalis*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 42, p. 806-815, 2012.

HUANG, H.S.; HU, N.T.; YAO, Y.E.; WU, C.Y.; CHIANG, S.W.; SUN, C.N. Molecular cloning and heterologous expression of a glutathione S-transferase involved in insecticide resistance from the diamondback moth, *Plutella xylostella*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 28, p. 651-658, 1998.

HUANG, K.; XIA, L.; ZHANG, Y.; DING, X.; ZAHN, J.A. Recent advances in the biochemistry of spinosyns. **Applied Microbiology Biotechnology**, Cham, v. 82, p. 13-23, 2009.

JONES, T.; SCOTT-DUPREE, C.; HARRIS, R.; SHIPP, L.; HARRIS, B. The efficacy of spinosad against the western flower thrips, *Frankliniella occidentalis*, and its impact on associated biological control agents on greenhouse cucumbers in southern Ontario. **Pest Management Science**, Sussex, v. 61, p. 179-185, 2005.

KONNO, R.H.; OMOTO, C. Custo adaptativo associado à resistência de *Aphis gossypii* Glover (Hemiptera: Aphididae) ao inseticida Carbosulfam. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 35, n. 2, p. 246-250, 2006.

KOSTAROPOULOS, I.; PAPADOPOULOS, A.I.; METAXAKIS, A.; BOUKOUVALA, E.; PAPADOPOULOU-MOURKIDOU, E. Glutathione S-transferase in the defence against pyrethroids in insects. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 31, p. 313–319, 2001.

LAI, T.; LI, J.; SU, J. Monitoring of beet armyworm *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae) resistance to chlorantraniliprole in China. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, San Diego, v. 101, p. 198-205, 2011.

LEORA SOFTWARE. **POLO-PC**: a user's guide to probit or logit analysis. Berkeley, 1987. 20 p.

LI, X.; SCHULER, M.A.; BERENBAUM, M.R. Molecular mechanisms of metabolic resistance to synthetic and natural xenobiotics. **Annual Review of Entomology**, Stanford, v. 52, p. 231–253, 2007.

LIN, Q.; JIN, F.; HU, Z.; CHEN, H.; YIN, F.; LI, Z.; DONG, X.; ZHANG, D.; REN, S.; FENG, X. Transcriptome analysis of chlorantraniliprole resistance development in the diamondback moth *Plutella xylostella*. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 8, n. 8, e72314, 2013. Disponível em: doi:10.1371/journal.pone.0072314. Acesso em: 10 jun. 2014.

LIU, B.; DOU, W.; DING, T.B.; ZHONG, R.; LIAO, C.Y.; XIA, W.K.; WANG, J.J. Na analysis of the small RNA transcriptome of four developmental stages of the citrus red mite (*Panonychus citri*). **Insect Molecular Biology**, Malden, v. 23, n. 2, p. 216–229, 2013.

LIVAK, K.J.; SCHMITTGEN, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-2\Delta\Delta Ct}$ method. **Methods**, Orlando, v. 25, n. 4, p. 402-408, 2001.

LU, Y.; YUAN, M.; GAO, X.; KANG, T.; ZHAN, S.; WAN, H.; LI, J. Identification and validation of reference genes for gene expression analysis using quantitative PCR in *Spodoptera litura*. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 8, n. 7, e68059, 2013. Disponível em: doi:10.1371/journal.pone.0068059. Acesso em: 15 ago. 2014.

MARINKOVIC, M.; LEEUW, W.C. de; JONG, M.; KRAAK, M.H.S.; ADMIRAAL, W.; BREIT, T.M.; JONKER, M.J. Combining next-generation sequencing and microarray technology into a transcriptomics approach for the non-model organism *Chironomus riparius*. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 7, n. 10, e48096, 2012. Disponível em: doi:10.1371/journal.pone.0068059. Acesso em: 20 jul. 2015.

MARKUSSEN, M.D.K.; KRISTENSEN, M. Spinosad resistance in female *Musca domestica* L. from field-derived population. **Pest Management Science**, Sussex, v. 68, n. 6, p. 75-82, 2012.

MARTINELLI, S.; BARATA, R.M.; ZUCCHI, M.I.; SILVA-FILHO, M.D.C.; OMOTO, C. Molecular variability of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) populations associated to maize and cotton crops in Brazil. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 99, p. 516-526, 2006.

NASCIMENTO, A.R.B. **Bases genéticas e moleculares da resistência de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) a lufenuron**. 2013. 104 p.

Dissertação (Mestrado em Entomologia) – Escola Superior de Agricultura ‘Luiz de Queiroz’, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2013.

NASCIMENTO, A.R.B.; FARIAS, J.R.; BERNARDI, D.; HORIKOSHI, R.J.; OMOTO, C. Genetic basis of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera:Noctuidae) resistance to the chitin synthesis inhibitor lufenuron. **Pest Management Science**, Sussex, 2015. Disponível em: <doi: 10.1002/ps.4057>. Acesso em: 19 jun. 2015.

ORR, N.; SHAFFNER, A.J.; RICHEY, K.; CROUSE, G.D. Novel mode of action of spinosad: receptor binding studies demonstrating lack of interaction with known insecticidal target sites. **Pesticide Biochemistry Physiology**, San Diego, v. 95, n. 1, p. 1-5, 2009.

PERRY, T.; McKENSIE, J.A.; BATTERHAM, P. A D $\square$ 6 knockout strain of *Drosophila melanogaster* confers high level of resistance to spinosad. **Insect Biochemistry and Biology**, Oxford, v. 37, p. 184-188, 2007.

PU, X.; YANG, Y.H.; WU, S.W.; WU, Y.D. Characterisation of abamectin resistance in a field-evolved multi resistant population of *Plutella xylostella*. **Pest Management Science**, Sussex, v. 66, p. 371-378, 2010.

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.

RANSON, H.; ROSSITER, L.; ORTELLI, F.; JESEN, B.; WANG, X.; ROTH, C.W.; COLLINS, F.H.; HEMINGWAY, J. Identification of a novel class of insect glutathione S-transferases involved in resistance to DDT in the malaria vector *Anopheles gambiae*. **Biochemical Journal**, Portland, v. 359, p. 295–304, 2001.

RANSON, H.; CLAUDIANOS, C.; ORTELLI, F.; ABGRALL, C.; HEMINGWAY, J.; SHARAKHOVA, M.V.; UNGER, M.F.; COLLINS, F.H.; FEYEREISEN, R. Evolution of supergene families associated with insecticide resistance. **Science**, Washington, v. 298, p. 179–181, 2002.

RAYMOND, M.; BERTICAT, C.; WEILL, M.; PASTEUR, N.; CHEVILLON, C. Insecticide resistance in the mosquito *Culex pipiens*: what have we learned about adaptation? **Genetica**, Cham, v. 112, p. 287-296, 2001.

REHAN, A.; FREED, S. Selection, mechanism, cross resistance and stability of spinosad resistance in *Spodoptera litura* (Fabricius) (Lepidoptera: Noctuidae). **Crop Protection**, Guildford, v. 56, p. 10-15, 2014.

RINKEVICH, F.D.; SCOTT, J.G. Transcriptional diversity and allelic variation in nicotinic acetylcholine receptor subunits of the red flour beetle, *Tribolium castaneum*. **Insect Molecular Biology**, Malden, v. 18, n. 2, p. 233-242, 2009.

RINKEVICH, F.D.; CHEN, M.; SHELTON, A.M.; SCOTT, J.G. Transcripts of the nicotinic acetylcholine receptor subunit gene *pxylα6* with premature stop condon are associated with spinosad resistance in diamondback moth, *Plutellla xylostella*. **Invertebrate Neuroscience**, Berlim, v. 10, n. 1, p. 25-33, 2010.

RIVERO, A.; VE'ZILIER, J.; WEILL, M.; READ, A.F.; GANDON, S. Insecticide control of vector-borne diseases: when is insecticide resistance a problem? **PLoS Pathogens**, San Francisco, v. 6, n. 8, 2010. Disponível em: <doi: 10.1371/journal.ppat.1001000>. Acesso em: 5 set. 2014.

ROUSH, R.T.; MCKENZIE, J.A. Ecological genetics of inseticide and acaricide resistance. **Annual Review of Entomology**, Stanford, v. 32, p. 361-380, 1987.

SALGADO, V.L.; SAAR, R. Desensitizing and non-desensitizing subtypes of α -bungarotoxin-sensitive nicotinic acetylcholine receptors in cockroach neurons. **Journal of Insect Physiology**, Oxford, v. 50, n. 10, p. 867-879, 2004.

SAGRI, E.; RECZKO, M.; GREGORIOU, M.; TSOUMANI, K.T.; ZIGOURIDIS, N.E.; SALPEA, K.D.; ZALOM, F.G.; RAGOUSSIS, J.; MATHIOPOULOS, K.D. Olive fly transcriptomics analysis implicates energy metabolism genes in spinosad resistance. **BMC Genomics**, London, v. 15, n. 174, 2014. Disponível em: <doi:10.1186/1471-2164-15-714>. Acesso em: 20 nov. 2014.

SAMBROOK, J.J.; RUSSELL, D.D.W. **Molecular cloning**: a laboratory manual. New York: Cold Spring Harbor, 2001. 2344 p.

SCOTT, J.G.; RINKEVICH, F.D. Transcriptional diversity and allelic variation in nicotinic acetylcholine receptor subunits of the red flour beetle, *Tribolium castaneum*. **Insect Molecular Biology**, Malden, v. 18, n. 2, p. 233–242, 2009.

SHEN, G.M.; DOU, W.; NIU, J.Z.; JIANG, H.B.; YANG, W.J.; JIA, F.X.; HU, F.; CONG, L.; WANG, J.J. Transcriptome analysis of the oriental fruit fly (*Bactrocera dorsalis*). **PLoS One**, San Francisco, n. 6, v. 12, e29127, 2011. Disponível em: <doi:10.1371/journal.pone.0029127>. Acesso em: 10 jun. 2015.

SONODA, S.; ASHFAQ, M.; TSUMUKI, H. Genomic organization and developmental expression of glutathione S-transferase genes of the diamondback moth, *Plutella xylostella*. **Journal of Insect Science**, Oxford, v. 6, p. 1-9, 2006.

SPARKS, T.C.; CROUSE, G.D.; DURST, G. Natural products as insecticides: The biology, biochemistry and quantitative structure-activity relationships of spinosyns and spinosoids. **Pest Management Science**, Sussex, v. 57, n. 10, p. 896-905, 2001.

SPARKS, T.C.; DRIPPS, J.E.; WATSON, G.B.; PAROONAGIAN, D. Resistance and cross-resistance to the spinosyns: a review and analysis. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, San Diego, v. 102, n. 1, p. 1-10, 2012.

SPARKS, T.C.; THOMPSON, G.D.; KIRST, H.A.; HERTLEIN, M.B.; LARSON, L.L.; WORDEN, T.V.; THIBAUT, S.T. Biological activity of the spinosyns, new fermentation

derived insect control agents, on tobacco budworm (Lepidoptera: Noctuidae) larvae. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 91, n. 6, p. 1277-1283, 1998.

SCHULZ, M.H.; ZERBINO, D.R.; VINGRON, M.; BIRNEY, E. Oases: Robust de novo RNA-seq assembly across the dynamic range of expression levels. **Bioinformatics**, Oxford, 2012. Disponível em: <doi.10.1093/bioinformatics/btso94>. Acesso em: 04 jun. 2014.

SIAL, A.A.; BRUNNER, J.F.; GARCZYNSKI, S.F. Biochemical characterization of chlorantraniliprole and spinetoram resistance in laboratory-selected obliquebanded leafroller, *Choristoneura rosaceana* (Harris) (Lepidoptera: Tortricidae). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, San Diego, v. 99, p. 274-279, 2001.

TABASHNIK, B.E.; MOTA-SANCHEZ, D.; WHALON, M.E.; HOLLINGWORTH, R.M.; CARRIERE, Y. Defining terms for proactive management of resistance to Bt crops and pesticides. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 107, p. 496-507, 2014.

TAMURA, K.; STECHER, G.; PETERSON, D.; FILIPSKI, A.; KUMAR, S. Mega6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. **Molecular Biology and Evolution**, Oxford, v. 30, p. 2725-2729, 2013.

VONTAS, J.; SMALL, J.G.; HEMINGWAY, J. Glutathione-S-transferases as antioxidant defense agents confer pyrethroid resistance in *Nilaparvata lugens*. **Biochemical Journal**, Portland, v. 357, p. 65-72, 2001.

WANG, W.; MO, J.; CHENG, J.; ZHUANG, P.; TANG, Z. Selection and characterization of spinosad resistance in *Spodoptera exigua* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, San Diego, v. 84, p.180-187, 2006.

WANG, X.W.; LUAN, J.B.; LI, J.M.; BAO, Y.Y.; ZHANG, C.X.; LIU, S.S. *De novo* characterization of a whitefly transcriptome and analysis of its gene expression during development. **BMC Genomics**, London, v. 11, n. 400, 2010. Disponível em: <doi:10.1186/1471-2164-11-400 >. Acesso em: 19 jun. 2015.

WATSON, G.B.; CHOUINARD, S.W.; COOK, K.R.; GENG, C.X.; GIFFORD, J.M.; GUSTAFSON, G.D.; HASLER, J.M.; LARRINUA, I.M.; LETHERER, T.J.; MITCHELL, J.C.; PAK, W.L.; SALGADO, V.L.; SPARKS, T.C.; STILWELL, G.E. A spinosyn-sensitive *Drosophila melanogaster* nicotinic acetylcholine receptor gene identification and heterologous expression. **Insect Biochemistry and Physiology**, Malden, v. 40, n. 5, p. 376-384, 2010.

WEIZONG, L.; GODZIK, A. Cd-hit: a fast program for clustering and comparing large sets of protein or nucleotide sequences. **Bioinformatics**, Oxford, v. 22, p. 1658-1659, 2006.

WENJIE, H.; LIU, Q.; TIAN, L.; WU, Q.; ZHANG, Y.; XIE, W.; WANG, S.; MIGUEL, K.S.; FUNDERBURK, J.; SCOTT, J.G. The $\alpha 6$ acetylcholine is not involved in resistance to spinosad. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, Malden, v. 111, p. 60-67, 2014.

WHELAN, J.A.; RUSSELL, N.B.; WHELAN, M.A. A method for the absolute quantification of cDNA using real-time PCR. **Journal of Immunological Methods**, Amsterdam, v. 278, n. 1/2, p. 261-269, 2003.

ZERBINO, D.R., BIRNEY, E. Velvet: algorithms for the novo short read assembly using de Bruijn graphs. **Genome Research**, Cold Spring Harbor, v. 18, p. 821-829, 2008.

ZDOBNOV, E.M.; APWEILER, R. InterProScan: an integration platform for the signature-recognition methods in InterPro. **Bioinformatics**, Oxford, v. 17, n. 9, p. 847–848, 2001.

ZIMMER, C.T.; MAIWALD, F.; SCHORN, C.; BASS, C.; OTT, M.C.; NAUEN, R. A *de novo* transcriptome of European pollen beetle populations and its analysis, with special reference to insecticide action and resistance. **Insect Molecular Biology**, Malden, v. 23, n. 4, p. 511-526, 2014.