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

Monitoramento e padrão de herança da resistência de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) a spinetoram

Ewerton da Costa Lira

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

**Piracicaba
2018**

Ewerton da Costa Lira
Engenheiro Agrônomo

Monitoramento e padrão de herança da resistência de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) a spinetoram
versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

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

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

Piracicaba
2018

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

Lira, Ewerton da Costa

Monitoramento e padrão de herança da resistência de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) a spinetoram / Ewerton da Costa Lira. - - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2018.

78 p.

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

1. Espinosinas 2. Monitoramento 3. Bases genéticas da resistência 4. Frequência alélica 5. Manejo de resistência I. Título

A Deus, pelo dom da vida e proteção em todos os momentos.

Agradeço

Aos meus pais José Lira Filho e Roseli Pereira da Costa Lira, e irmãos Fabio Gustavo Ramos Lira, Evandro da Costa Lira e Tiago da Costa Lira por todo amor, carinho, dedicação e incentivo incondicional;

Aos meus avós José Lira de Sousa (in memoriam), Expedita Pereira de Sousa, Maria de Lourdes Silva e Adonias Pereira da Costa por todos os ensinamentos, amor e incentivo em minha formação;

À Annellyse da Cunha Pereira Tonan, pelo amor, carinho, incentivo incondicional e palavras de ânimo e coragem nos momentos mais difíceis;

À Fabricia Zimmermann Vilela Torres e José Raul Valério pela amizade, ensinamentos e incentivo em minha formação;

Dedico e Agradeço

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Celso Omoto pela orientação, ensinamentos, confiança e oportunidade para realização deste estudo.

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

Ao Comitê Brasileiro de Ação à Resistência a Inseticidas (IRAC-BR) pelo apoio logístico e financeiro para a realização desta pesquisa.

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

A Dow AgroSciences pelo fornecimento de amostras de inseticidas utilizados na presente pesquisa.

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

Aos amigos, Fernando Semmelroth de Assunção e Amaral, Anderson Bolzan, Antônio Rogério Bezerra do Nascimento, Rubens Hideo Kanno, Ingrid Schmidt Kaiser, Fernando Padovez e Aline Sartori Guidolin, pelo trabalho em grupo e suporte na condução deste estudo.

Aos amigos e colegas que são ou foram do Laboratório de Resistência de Artrópodes (USP/ESALQ): Fernando Semmelroth de Assunção e Amaral, Anderson Bolzan, Antônio Rogério Bezerra do Nascimento, Rubens Hideo Kanno, Ingrid Schmidt Kaiser, Douglas Amado, Mariana Durigan, Dyrson Abbade Neto, Sandy Spineli Silva e Aline Sartori Guidolin, Oderlei Bernardi, Rogério Machado Pereira, Osmar Arias e Daniela Miyuki Okuma pela amizade, pelo convívio, companheirismo, auxílios prestados e troca de conhecimentos.

A Dr. Eloisa Salmeron, pesquisadora assistente do Laboratório de Resistência de Artrópodes (USP/ESALQ), pela amizade, ensinamentos e suporte durante todo o estudo.

A todos os estagiários com quem convivi no Laboratório de Resistência de Artrópodes (USP/ESALQ).

Aos amigos com quem morei em Piracicaba, Oderlei Bernardi, Lucas Silva Barros, João Boa Vida da Cruz, pelos ótimos momentos, orientações e incentivos.

A todos os funcionários do Departamento de Entomologia e Acarologia (USP/ESALQ) por todo o empenho e dedicação nos serviços prestados.

Às bibliotecárias Eliana Maria Garcia e Silvia Maria Zinsly da Biblioteca Central da USP/ESALQ pela formatação deste trabalho.

A todos aqueles, que direta ou indiretamente, tiveram participação na realização deste trabalho, meu sincero agradecimento.

RESUMO

Monitoramento e padrão de herança da resistência de *Spodoptera frugiperda*

(J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) a spinetoram

O uso de inseticidas do grupo das espinosinas tem sido crescente no manejo de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) no Brasil. Sendo assim, o objetivo do presente trabalho foi fornecer subsídios para a implementação de estratégias de Manejo da Resistência de Insetos (MRI), mediante a condução de estudos de monitoramento e de padrão de herança da resistência de *S. frugiperda* a spinetoram. Inicialmente foram realizadas linhas-básica de suscetibilidade para definições de concentrações diagnósticas para o monitoramento da resistência, e posteriormente foram conduzidos estudos para estimar a frequência do alelo que confere resistência a este inseticida de *S. frugiperda* a spinetoram. A caracterização da suscetibilidade foi realizada por meio bioensaio de ingestão mediante tratamento superficial da dieta com o inseticida. Os valores de CL_{50} estimadas variaram de 0,97 a 2,98 μg de spinetoram /mL (variação de 3 vezes) entre as populações de *S. frugiperda* testadas. A concentração diagnóstica baseada na CL_{99} foi de 5,6 μg de spinetoram /mL. Foram verificadas diferenças significativas nas suscetibilidades das populações de *S. frugiperda* nas safras 2016/17 e 2017/18, com sobrevivência variando de 0 a 30,2% na concentração diagnóstica. Os resultados obtidos evidenciam o aumento da sobrevivência de *S. frugiperda* a spinetoram ao longo das safras, com maiores sobrevivências registradas em populações coletadas na região Oeste do estado da Bahia. As frequências do alelo que confere resistência a spinetoram, estimadas pelo método de F_2 screen, variaram de 0,0107 a 0,1688 nas populações testadas. A linhagem de *S. frugiperda* resistente a spinetoram foi isolada a partir do método de F_2 screen realizado em uma população proveniente da cultura do milho da região Oeste da Bahia coletada na safra de 2016. Os valores de CL_{50} (95% IC) obtidos pelos bioensaios de concentração-resposta foram de 0,635 (0,555 – 0,730) μg de spinetoram /mL para a linhagem suscetível (SUS) e de 1170,96 (1041,61 – 1323,89) μg de spinetoram/mL para a linhagem resistente a spinetoram (SPT-R), resultando em uma razão de resistência de 1844 vezes. A população SPT-R apresentou alta resistência cruzada com spinosad. Os cruzamentos recíprocos entre as linhagens SUS e SPT-R revelaram que a resistência de *S. frugiperda* a spinetoram é autossômica e incompletamente recessiva. Os retrocruzamentos da progênie F_1 com a linhagem SPT-R evidenciaram que a resistência possui efeito poligênico. A estimativa do número efetivo de loci com contribuições iguais de efeito para a resistência foi de 1,18 a 1,76, sugerindo que a resistência de *S. frugiperda* a spinetoram está associada a poucos genes. Os resultados apresentados nesse estudo fornecem subsídios para elaboração de programas de MRI para preservar a vida útil de spinetoram para o manejo de *S. frugiperda* no Brasil.

Palavras-chave: Lagarta-do-cartucho; Espinosinas; Padrão de herança; Manejo de resistência de insetos

ABSTRACT

Monitoring and inheritance of the resistance of *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) to spinetoram

The use of spinosin insecticides has increased to manage *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) in Brazil. Then, the objective of this study was to provide information to implement Insect Resistance Management (IRM) by conducting studies to characterize the baseline susceptibility to spinetoram in Brazilian populations of *S. frugiperda*, to conduct resistance monitoring and to understand the inheritance of the resistance. Initially, baseline susceptibility studies were conducted to define diagnostic concentration for resistance monitoring, and then we conducted to estimate the frequency of alleles conferring resistance to this insecticide in *S. frugiperda*. The baseline susceptibility was performed by feeding bioassays using diet-overly treatment with the insecticide. The LC_{50} values ranged from 0.97 to 2.98 μg spinetoram / mL (3-fold variation). The diagnostic concentration based on LC_{99} was 5.6 μg spinetoram / mL. There were significant differences in the susceptibilities of *S. frugiperda* populations in the 2016/17 and 2017/18 growing seasons, with survival rates varying from 0 to 30.2%. These results showed the increase in survival of *S. frugiperda* to spinetoram across the growing seasons, with highest survival rates in populations of *S. frugiperda* collected in the Western region of Bahia state. The frequency of alleles conferring resistance to spinetoram, estimated by F_2 screen, varied from 0.0107 to 0.1688 in tested *S. frugiperda* populations. The spinetoram-resistant strain was selected using F_2 screen method in a maize field-collected population from Western Bahia region during 2016 growing season. LC_{50} values (95% CI) obtained from concentration-response bioassays were 0.63 (0.55-0.73) μg spinetoram/mL for the susceptible strain (SUS) and 1170.96 (1041.61 - 1323.89) μg spinetoram/mL for the SPT-R strain, resulting in a resistance ratio of 1,844-fold. The SPT-R strain showed high cross-resistance to spinosad. The reciprocal crosses between SUS and SPT-R showed that the *S. frugiperda* resistance to spinetoram is autosomal and incompletely recessive. The backcrossing of the progeny F_1 with the SPT-R strain showed that the resistance has a polygenic effect. The estimation of the effective number of *loci* with equal resistance effect contributions was from 1.18 to 1.76, suggesting that the resistance of *S. frugiperda* to spinetoram is associated to few genes. The results obtained in this study provide information to implement IRM strategies to preserve the lifetime of spinetoram for managing *S. frugiperda* in Brazil.

Keywords: Fall armyworm; Spinosyns; Inheritance pattern; Management of insect resistance

1. INTRODUÇÃO

A lagarta-do-cartucho-do-milho, *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae), é a principal praga da cultura do milho e tem como possível centro de origem as regiões tropical e subtropical do hemisfério ocidental (LUGINBILL, 1928; SPARKS, 1979). Recentemente, foi relatada como espécie invasora na África Ocidental e Central, com os primeiros surtos registrados no início de 2016. Em amostras coletadas em cultivos de milho na Nigéria e em São Tomé, foram encontrados pelo menos dois haplótipos distintos (GOERGEN et al., 2016). A partir de amostras coletadas na região de Togo, foi confirmada a presença de haplótipos da região do Caribe e da costa leste dos Estados Unidos da América (NAGOSHI et al., 2017). Trata-se de uma praga polífaga, com elevada capacidade de dispersão e amplamente distribuída no território brasileiro (CRUZ, 1995).

No Brasil, a presença de *S. frugiperda* no campo é constatada em praticamente todos os estados e durante o ano todo em regiões com condições edafoclimáticas favoráveis (CRUZ; FIGUEIREDO; SILVA, 2010). Além disso, a elevada capacidade de dispersão dos adultos e a grande oferta de hospedeiros ao longo do ano com sucessão de culturas hospedeiras tornam mais difícil o manejo desta praga em condições tropicais (BARROS; TORRES; BUENO, 2010; CRUZ, 1995; SPARKS, 1979).

O controle químico tem sido uma das principais táticas de manejo de *S. frugiperda*, mesmo após a liberação comercial de milho geneticamente modificado. O uso intensivo de inseticidas contribuiu para a evolução da resistência de *S. frugiperda* a diferentes grupos químicos. De acordo com os registros do Arthropod Pesticide Resistance Database, Michigan State University ("Arthropod Pesticide Resistance Database, Michigan State University", 2018), há 125 casos reportados de resistência de *S. frugiperda* a diversos grupos químicos de inseticidas, tais como piretroides, organofosforados, carbamatos e benzoilureias (DIEZ-RODRÍGUEZ; OMOTO, 2001; NASCIMENTO et al., 2016; YOUNG; MCMILLIAN, 1979; YU, 1991; YU; NGUYEN; ABO-ELGHAR, 2003).

A utilização de grupos químicos com diferentes mecanismos de ação é de fundamental importância para a implantação de um programa de Manejo de Resistência de Insetos (MRI). Um dos grupos relativamente recentes de inseticidas utilizados no manejo de *S. frugiperda* tem sido as espinosinas. As espinosinas foram

isoladas a partir da fermentação de uma actinobactéria de solo *Saccharopolyspora spinosa* Mertz and Yao (MERTZ; YAO, 1990; THOMPSON; DUTTON; SPARKS, 2000). Atualmente, existem dois ingredientes ativos no grupo das espinosinas, o spinosad que foi lançado em 1997 e o spinetoram lançado em 2007.

O inseticida spinetoram é uma molécula semi-sintética com maior atividade inseticida, maior eficácia, maior controle residual e atributos toxicológicos positivos que seu antecessor, spinosad (DRIPPS et al., 2008). No entanto, casos de resistência já foram relatados para *Drosophila melanogaster* (Meigen) (Diptera: Drosophilidae) (WATSON et al., 2010), *Choristoneura rosaceana* (Harris) (Lepitoptera: Tortricidae) (SIAL; BRUNNER; GARCZYNSKI, 2011), *Diaphorina citri* (Kuwayama) (Hemiptera: Liviidae) (TIWARI et al., 2011), *Plutella xylostella* (Linnaeus) (Lepidoptera: Plutellidae) (LIMA NETO et al., 2016) e *Frankliniella occidentalis* (Pergande) (Thysanoptera: Thripidae) (WANG et al., 2016). Recentemente, foi registrado um caso de resistência de *S. frugiperda* a spinosad no Brasil (OKUMA et al. 2017).

Para a implementação de estratégias de MRI é imprescindível alguns conhecimentos básicos para fornecer subsídios na tomada de decisões, obtidos a partir de alguns estudos como; caracterização e monitoramento da suscetibilidade em populações de campo da praga alvo, estimativa da frequência do alelo de resistência que fornece informações sobre o risco de evolução da resistência e estudos para compreensão das bases genéticas envolvidas na resistência. Na literatura existem diversos métodos de monitoramento de acordo com a realidade do estudo, divididos em métodos fenotípicos e genotípicos. Dentre os métodos fenotípicos o mais recomendado é com a utilização de concentrações diagnósticas, onde são testados maior número de indivíduos em apenas uma concentração (ROUSH; MILLER, 1986). Para estimativa da frequência de alelos de resistência em uma população são recomendados os métodos genotípicos de F₁ e F₂ screen, onde no F₁ screen é necessária a utilização de uma população resistente e no F₂ screen apenas populações de campo (ANDOW; ALSTAD, 1998; GOULD et al., 1997). O conhecimento das bases genéticas associadas à resistência, como o grau de dominância e o número de genes envolvidos são extremamente necessários para compreensão da evolução da resistência no campo e no estabelecimento de estratégias de manejo da resistência de insetos (ROUSH; MCKENZIE, 1987).

Portanto, com o registro de spinetoram para o controle de *S. frugiperda* no Brasil, o objetivo do presente trabalho foi fornecer subsídios para a implementação de estratégias de MRI, mediante a condução de estudos de monitoramento da frequência de resistência e de padrão de herança da resistência de *S. frugiperda* a spinetoram.

Referências

- ANDOW, D. A.; ALSTAD, D. N. F₂ screen for rare resistance alleles. **Journal of Economic Entomology**, v. 91, n. 3, p. 572–578, 1 jun. 1998.
- Arthropod Pesticide Resistance Database, Michigan State University.**
Disponível em: <<http://www.pesticideresistance.org/index.php>>. Acesso em: 17 ago. 2017.
- BARROS, E. M.; TORRES, J. B.; BUENO, A. F. Oviposição, desenvolvimento e reprodução de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) em diferentes hospedeiros de importância econômica. **Neotropical Entomology**, v. 39, n. 6, p. 996–1001, dez. 2010.
- CRUZ, I. **A lagarta-do-cartucho na cultura do milho.** Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo. Circular Técnica 21, p. 45, 1995. Disponível em: <<https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/handle/doc/475779>>. Acesso em: 17 ago. 2017.
- CRUZ, I.; FIGUEIREDO, M. DE L. C.; SILVA, R. B. **Monitoramento de adultos de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) e *Diatraea saccharalis* (Fabricius) (Lepidoptera: Pyralidae) em algumas regiões produtoras de milho no Brasil.** Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, Documentos 93, p. 42, 2010.
- DIEZ-RODRÍGUEZ, G. I.; OMOTO, C. Herança da resistência de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) a lambda-cialotrina. **Neotropical Entomology**, v. 30, n. 2, p. 311–316, jun. 2001.
- DRIPPS, J. et al. Spinetoram: how artificial intelligence combined natural fermentation with synthetic chemistry to produce a new spinosyn insecticide. **Plant Health Progress**, 2008.

- GOERGEN, G. et al. First report of outbreaks of the fall armyworm *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae), a new alien invasive pest in west and Central Africa. **Plos One**, v. 11, n. 10, p. e0165632, 27 out. 2016.
- GOULD, F. et al. Initial frequency of alleles for resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins in field populations of *Heliothis virescens*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 94, n. 8, p. 3519–23, 15 abr. 1997.
- LIMA NETO, J. E. et al. Resistance monitoring of *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Plutellidae) to risk-reduced insecticides and cross resistance to spinetoram. **Phytoparasitica**, v. 44, n. 5, p. 631–640, 16 nov. 2016.
- LUGINBILL, P. The fall armyworm. **USDA Technical Bulletin**, v. 34, p. 91, 1928.
- MERTZ, F. P.; YAO, R. C. *Saccharopolyspora spinosa* sp. nov. Isolated from soil collected in a sugar mill rum still. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 40, n. 1, p. 34–39, 1 jan. 1990.
- NAGOSHI, R. N. et al. Comparative molecular analyses of invasive fall armyworm in Togo reveal strong similarities to populations from the eastern United States and the Greater Antilles. **Plos One**, v. 12, n. 7, p. e0181982, 24 jul. 2017.
- NASCIMENTO, A. R. B. DO et al. Genetic basis of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) resistance to the chitin synthesis inhibitor lufenuron. **Pest Management Science**, v. 72, n. 4, p. 810–815, abr. 2016.
- OKUMA, D. M. et al. Inheritance and fitness costs of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) resistance to spinosad in Brazil. **Pest Management Science**, 14 dez. 2017.
- ROUSH, R. T.; MCKENZIE, J. A. Ecological genetics of insecticide and acaricide resistance. **Annual Review of Entomology**, v. 32, n. 1, p. 361–380, jan. 1987.
- 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**, v. 99, n. 3, p. 274–279, mar. 2011.
- SPARKS, A. N. A review of the biology of the fall armyworm. **The Florida Entomologist**, v. 62, n. 2, p. 82, jun. 1979.

- THOMPSON, G. D.; DUTTON, R.; SPARKS, T. C. Spinosad - a case study: an example from a natural products discovery programme. **Pest Management Science**, v. 56, n. 8, p. 696–702, ago. 2000.
- TIWARI, S. et al. Insecticide resistance in field populations of Asian citrus psyllid in Florida. **Pest Management Science**, v. 67, n. 10, p. 1258–1268, out. 2011.
- WANG, Z.-H. et al. Field-evolved resistance to insecticides in the invasive western flower thrips *Frankliniella occidentalis* (Pergande) (Thysanoptera: Thripidae) in China. **Pest Management Science**, v. 72, n. 7, p. 1440–1444, 1 jul. 2016.
- WATSON, G. B. et al. A spinosyn-sensitive *Drosophila melanogaster* nicotinic acetylcholine receptor identified through chemically induced target site resistance, resistance gene identification, and heterologous expression. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 40, n. 5, p. 376–384, maio 2010.
- YOUNG, J. R.; MCMILLIAN, W. W. Differential feeding by two strains of fall armyworm larvae on carbaryl treated surfaces¹²³. **Journal of Economic Entomology**, v. 72, n. 2, p. 202–203, 1 abr. 1979.
- YU, S. J. Insecticide resistance in the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 39, n. 1, p. 84–91, jan. 1991.
- 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**, v. 77, n. 1, p. 1–11, set. 2003.

2. CONCLUSÕES

- Houve diminuição na suscetibilidade ao inseticida spinetoram nas populações brasileiras de *S. frugiperda* no decorrer das safras de 2016 a 2018;
- O alelo da resistência de *S. frugiperda* ao inseticida spinetoram foi encontrado em altas frequências nas principais regiões produtoras de milho do Brasil.
- A razão de resistência a spinetoram em linhagem de *S. frugiperda* selecionada em condições de laboratório foi elevada;
- O padrão de herança da resistência de *S. frugiperda* a spinetoram é autossômico e incompletamente recessivo;
- A resistência de *S. frugiperda* a spinetoram possui caráter poligênico, porém associado a poucos *loci*;
- Há resistência cruzada entre spinetoram e spinosad em *S. frugiperda*.