



## CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E MOLECULAR DA RESISTÊNCIA DA HELICOVERPA ARMIGERA HÜBNER AOS PIRETROIDES NO BURKINA FASO. ESTRATÉGIAS DE PROTEÇÃO DO ALGODOEIRO.

Omer HEMA, Hugues SOME, Blaise ZAGRE, Gnissa KONATE, Oumar TRAORE e Karim TRAORE

Instituto do Meio Ambiente e Pesquisas Agrícolas (Institut de l'Environnement et de Recherches Agricoles - INERA) - Burkina Faso.

**Resumo:** A *Helicoverpa armigera* é a principal praga do algodoeiro na maioria dos países produtores de algodão. Foram estudados os mecanismos bioquímicos e moleculares da resistência dessa praga aos piretroides, por meio da comparação entre as linhagens de campo e uma linhagem sensível de referência, a BK77. Avaliou-se a resistência à deltametrina por meio de bioensaios. Os resultados mostraram que as linhagens de campo eram de 11 a 43 vezes mais resistentes que a linhagem sensível BK77. A medida da atividade enzimática mostrou que a oxidase era significativamente mais elevada nas linhagens de campo que na BK77. A quantificação da expressão dos citocromos P450, por meio de PCR quantitativa em tempo real, permitiu verificar a superexpressão do CYP4M6, CYP4M7, CYP6AE11, CYP9A12, CYP332A1 e CYP337B1 nas linhagens de campo. As estratégias atuais de proteção do algodão no Burkina Faso incluem dois principais componentes, com vistas a diminuir os níveis de resistência aos piretroides: a utilização de algodão transgênico que produzam as toxinas Cry1Ac e Cry2Ab, e a diminuição do número de tratamentos com piretroides do algodoeiro convencional.

**Palavras-chave:** sensibilidade, atividades enzimáticas, oxidases, citocromos P450, toxinas Cry1Ac e Cry2Ab.

### INTRODUÇÃO

O algodão é uma planta da família das malváceas e é cultivado para a produção de fibra e caroço. Constitui uma das principais fontes de geração de divisas no Burkina Faso, respondendo por 40 a 50% do total das exportações (VOGNAN et al., 2002). Um grande número de insetos é atraído pelo algodão, alimentando-se de suas folhas, seiva e frutos. As perdas de produtividade, em sistemas sem proteção fitossanitária, podem alcançar 90% do potencial produtivo local das variedades cultivadas (TRAORE et al., 1998).

Entre as pragas do algodão, a *Helicoverpa armigera*, um lepidóptero da família Noctuidae, é uma das mais importantes (VAISSAYRE e CAUQUIL, 2000) e está presente na Europa, Ásia, Oceania e África (PEARSON, 1958 apud ALAUX, 1994).

A forma larvária, polífaga, é encontrada nas culturas de inverno, como o algodão, o milho, o sorgo e em certas plantas silvestres como a *Cleome viscosa*. Entretanto, também, é encontrada durante a época seca, em hortaliças como o tomate e o quiabo (NIBOUCHE, 1994).

A partir da década de 1980, nessa sub-região, os programas clássicos de proteção do algodoeiro indicavam o uso de quatro a cinco tratamentos, com aplicações de inseticidas binários compostos de piretroides e organofosforados a cada catorze dias. Por volta de 1995-1996, tais programas de tratamento já não conseguiam controlar de maneira eficaz as populações larvárias da *H. armigera* (MARTIN et al., 2000). Tal situação causou o aumento do número dos tratamentos e a diminuição do intervalo entre as aplicações. Por meio de testes de sensibilidade com aplicação tópica de deltametrina nas linhagens do Burkina Faso, foram verificados fatores de resistência de 50 em 1991 e de 120 em 1992 (NIBOUCHE, 1991 e 1992), em comparação com uma linhagem sensível de referência.

A comissão de especialistas em inseticidas da Organização Mundial de Saúde definiu resistência, em 1957, como “a resistência de uma linhagem (raça) de um inseto em relação a um inseticida corresponde ao desenvolvimento de uma capacidade de tolerar doses de tóxicos que seriam letais para a maioria dos indivíduos de uma população normal da mesma espécie”.

Foram verificados no mundo vários casos de resistência de *H. armigera*. McCAFFERY (1998) relatou casos de resistência da *H. armigera* a diversos grupos de inseticidas, entre eles os organofosforados, os carbamatos, os ciclodienos e os piretroides. Em relação a esse último grupo, verificou-se que esse lepidóptero desenvolveu resistência na Austrália em 1983 (McCAFFERY 1998), na Tailândia em 1985 (AHMAD et al., 1988), na China e na Índia em 1987 (McCAFFERY, 1998), No Paquistão em 1991 (AHMAD et al., 1995) e na Costa do Marfim em 1995 (VASSAL et al., 1997). Diferentes pesquisas sobre o tema, conduzidas por MARTIN et al. (2000, 2002 et 2003) na Costa do Marfim, obtiveram os seguintes resultados: o mecanismo relacionado com a resistência da *H. armigera* na Costa do Marfim é de natureza enzimática. A superprodução de monooxigenases no citocromo P450 é a principal causa da desintoxicação em relação aos piretroides.

A fim de resolver o problema da falta de sensibilidade de certas pragas aos inseticidas químicos utilizados, buscaram-se alternativas, principalmente o uso de biopesticidas. A FAO e o Comitê Saheliano de Pesticidas definiram biopesticida como “um agente de combate biológico formulado e aplicado de maneira semelhante ao pesticida químico, cujo princípio ativo é um microorganismo pertencente ao grupo dos fungos, bactérias, vírus e protozoários. Não sendo considerados para esse fim os nematóides, os produtos bioquímicos, os feromônios, os hormônios, os inibidores de

crescimento, os organismos geneticamente modificados e os extratos vegetais (FAO, 1990; CSP, 1999)". O uso em grande escala desses biopesticidas nos cultivos comerciais, como o algodão, logo apresenta dificuldades. Tais limitações não permitiram sua aplicação prolongada, exceto na arboricultura e no cultivo de hortaliças.

Uma vez que os biopesticidas, como o Bt, apresentaram certo nível de eficácia contra essas pragas, mas também dificuldades de serem aplicados como pulverização foliar, grandes empresas de agroquímica foram estimuladas a desenvolverem pesquisas direcionadas à produção de plantas transgênicas capazes de produzir essas toxinas de maneira permanente, como forma de combate a pragas. Dessa forma, no começo da década de 1990, foram comercializadas as primeiras plantas transgênicas desenvolvidas contra pragas.

Os objetivos desse estudo são:

Determinar o nível de sensibilidade das linhagens de campo em relação à deltametrina (um piretroide), por meio de aplicação tópica, a fim de se estabelecer a dose capaz de matar a metade da população larvária (DL50) e os fatores de resistência, em comparação com uma linhagem sensível de referência, a BK77;

Determinar, por meio de medida das atividades enzimáticas, os mecanismos bioquímicos envolvidos na resistência da *H. armigera* aos piretroides;

Determinar, por meio de testes moleculares, os genes envolvidos nessa resistência;

Encontrar soluções alternativas ao uso de piretroides, com vistas a contornar, na cotonicultura da África ocidental, o problema de resistência a esse grupo químico.

## METODOLOGIA

### Material biológico

O material biológico compreende linhagens de campo da *H. armigera* coletadas em diferentes datas e zonas agroecológicas. Em 2003, três linhagens de *H. armigera* foram utilizadas: uma linhagem de referência, sensível aos piretroides, denominada BK77, capturada em Bouaké, na Costa do Marfim, em 1977, e criada, livre de qualquer tratamento químico, no CIRAD em Montpellier; uma primeira linhagem de campo, denominada DAT03, capturada em 2003, em Datomo, na principal região algodoeira do Burkina Faso; e uma

segunda linhagem de campo, denominada BIT03, capturada em Bittou, na fronteira entre Togo e Gana.

Em 2006, seis linhagens dessa praga foram utilizadas: duas linhagens de Burkina Faso (Dotomo e Diabo), duas linhagens do Mali (Koutiala e Kita) e uma do Benim (Angaradébou). A linhagem sensível utilizada nos testes moleculares foi a Heliar, que é originária do cruzamento entre a linhagem BK77 e outra, criada no laboratório da Bayer em Leverkusen, na Alemanha.

Para os testes de sensibilidade às toxinas Bt e à deltametrina, foram usadas três linhagens de campo, regularmente capturadas nos algodoeiros, durante dois anos (2007 e 2008). São as linhagens originárias de Datomo, de Bittou e de Kompienga.

### **Reprodução em laboratório**

As larvas coletadas no campo foram colocadas em quarentena, isoladas sala de reprodução, até alcançarem a fase de crisálida. A fim de evitar contaminação das linhagens produzidas no laboratório, essas crisálidas foram desinfetadas com hipoclorito de sódio antes de serem transferidas à sala de reprodução. As borboletas foram alimentadas com água açucarada. Os ovos coletados foram colocados em local escuro, em meio nutritivo artificial de acordo com o método de COUILLOUD e GIRET (1978 e 1980). A primeira geração produzida no laboratório foi utilizada nos diferentes testes.

### **Método**

#### **Bioensaios**

#### **Aplicação tópica da deltametrina**

Os bioensaios foram realizados em larvas da primeira geração produzida em laboratório, cujo peso variava de 35 e 44mg. De seis a sete lotes de 60 larvas (quatro repetições de 15 larvas) foram utilizados para testar cinco a seis doses crescentes, e um lote controle foi tratado com acetona, um solvente que, em pequenas doses, não causa toxicidade nas larvas. Depois da aplicação do inseticida, as larvas foram colocadas em cubículos individuais e alimentadas artificialmente. A mortalidade foi verificada 24, 48 e 72 horas após o tratamento. Considerou-se apenas a mortalidade após 48 horas para fins de

análise. Foi considerada morta qualquer lagarta que não se movimentava mais e que, quando colocada de lado, não retornava mais à posição original.

### **Contaminação da dieta com toxinas Bt**

As larvas coletadas no campo foram reproduzidas, e os testes foram realizados na primeira geração de larvas recém-nascidas, criadas em laboratório. Para cada linhagem, foram constituídos oito (08) lotes de 50 larvas cada, sendo que sete foram utilizados para as sete concentrações de cada toxina, e o oitavo como controle, tratado com solução tampão fostatada. Um volume de 100µl de cada diluição da toxina foi aplicado na superfície do meio artificial, previamente colocado nos cubículos, e o excesso de umidade foi eliminado por evaporação. Utilizaram-se larvas recém-nascidas no teste. Essas larvas foram privadas de alimento pelo mínimo de cinco horas e colocadas individualmente nos cubículos. Em seguida, as caixas foram fechadas e colocadas sob condições de criação. A contagem da mortalidade das larvas foi realizada sete dias após o tratamento.

Para os dois tipos de bioensaios, descartou-se o teste cuja mortalidade do controle foi superior a 10%.

### **A bioquímica**

#### **Preparação de extratos de larvas**

Utilizaram-se larvas de *H. armigera* no segundo estágio de desenvolvimento, com 10 a 15mg. Cada larva foi colocada em um tubo eppendorf de 500µl, em suporte colocado no gelo para evitar a degradação das enzimas a serem ensaiadas. Em cada tubo eppendorf, foram colocados 200µl de água destilada e, com o auxílio de um triturador as larvas foram fragmentadas na água. Os tubos foram então centrifugados durante quatro minutos a 12.000 rcf (força centrífuga relativa), em uma centrífuga previamente mantida a 4°C. As micro-placas (8x12 poços) utilizadas para conservar os extratos e para uso nos testes foram colocadas no congelador antes da extração, a fim de evitar a degradação das enzimas das amostras durante a medição. Com o auxílio de uma pipeta com ponteira de 200µl, 190µl do sobrenadante foram cuidadosamente removidos e colocados em um poço da micro-placa conservada no gelo. A ponteira foi mantida para uso na remoção de amostra para os testes.

*Depois da extração, as micro-placas foram preparadas para a leitura de densidade ótica em um espectrofotômetro acoplado a um computador. Todas as micro-placas possuíam, no mínimo, dois poços contendo 10µl de água destilada para servir como controle blank (interferência de fundo ou background).*

*A tabela 1 resume as características dos testes enzimáticos.*

A biologia molecular

Extração e quantificação de RNA

Em uma câmara de fluxo laminar, esmagou-se uma larva de *Helicoverpa armigera* em 1ml de Trizol, que foi depois centrifugada a 12.000 x G por 10 minutos a 4°C; o sobrenadante foi removido e incubado à temperatura ambiente por 5 minutos; 200µl de clorofórmio foram adicionados ao conteúdo do tubo, que foi agitado por 15 segundos antes da incubação por 3 minutos à temperatura ambiente; em seguida, o conjugado foi centrifugado a 12.000 x G a 4°C durante 15 minutos e o sobrenadante é novamente retirado; repetiu-se mais uma vez a operação com o clorofórmio, a fim de se eliminar o máximo de proteínas; para precipitar o RNA, foram adicionados 500µl de isopropanol, agitando-se levemente, depois incubando-se à temperatura ambiente por 10 minutos; em seguida, centrifugou-se a 12.000 x G a 4°C por 15 minutos e o álcool foi cuidadosamente removido; incubou-se a 65°C por 2 a 3 minutos para secar o álcool; 1ml de etanol a 70% então foi adicionado para limpar o RNA; centrifugou-se a 7.500 x G por 5 minutos e depois retirou-se o álcool; incubou-se em seguida a 65°C por 5 a 10 minutos para secar o álcool; finalmente, adicionou-se 100µl de água estéril e incubou-se a 65°C por 15 minutos.

Quando o RNA estava novamente suspenso na água, foi realizada a quantificação. Foram utilizados dois recipiente de sílica; foi colocado 1ml de água em cada recipiente, que depois foram colocadas no espectrofotômetro; com o auxílio do programa CARY DNA/RNA, se ajustou a absorbância em 0. No recipiente da amostra, colocou-se 4µl do extrato de RNA e depois a leitura foi realizada em dois comprimentos de onda, 260 e 380nm; 260nm corresponde ao RNA e 280nm, às proteínas. Para uma boa qualidade do RNA, a relação deve variar entre 1,8 e 2. Em seguida, calculou-se, a partir da absorbância em 260nm, a concentração de RNA com base na unidade de DO por 40µg de RNA/µl. Procedeu-se então à diluição, para se obter 1µg/µl, e, depois, a concentração foi novamente medida, a fim de se confirmar que a diluição foi realizada satisfatoriamente, antes de se proceder à síntese do DNA complementar.

RT-PCR

Em um tubo eppendorf de 0,5ml, colocou-se 1µl de oligo dT (iniciadores – primers forward and reverse) 100mM, 1µl de dNTP 10mM, volume equivalente a 1µg de RNA e quantidade de água estéril suficiente para 12µl. O aparelho THERMOJET foi utilizado para as incubações nas temperaturas apropriadas. Incubou-se o conjugado a 65°C por 5 minutos. Em seguida, colocou-se no tubo 4µl de 5x First strand Buffer, 2µl de DTT 0,1M e 1µl de RNAase IN, depois incubou-se a 42°C por 2 minutos. Adicionou-se, então, a enzima polimerase, SuperScript II, e levou-se à incubadora a 42°C por 90 minutos. Após essa incubação, realizou-se outra a 70°C por 15 minutos. Dessa forma, obtiveram-se 20µl de cDNA, que foi diluído para o teste de PCR quantitativa.

#### PCR quantitativa em tempo real

O cDNA sintetizado foi diluído em 500 vezes. Utilizou-se 5µl dessa diluição, 7,5µl de qPCR Mastermix plus for SYBR Green I, e 1,25µl de cada iniciador (primer) a 3,6µM. Dessa forma, o volume total reagente em cada tubo era de 15µl. Foram estudados 15 genes P450 e dois genes de referência. Foram realizadas quatro extrações de RNA para cada uma das cinco linhagens estudadas. As amostras foram utilizadas em três tiras e, para cada extrato, foram realizadas três repetições. Utilizou-se um controle negativo, água estéril. O composto de iniciadores (primers) e de qPCR foram preparados de acordo com o número de poços necessários. Primeiro, colocaram-se as amostras e depois, o composto. A seguir, centrifugou-se para evitar a formação de bolhas e colocaram-se adequadamente as tiras em um termociclador conectado a um computador para controlar o programa.

Os dados foram coletados e tratados no Excel. Utilizou-se actina e RNA ribossômico como referência.

#### Análises bioinformáticas

#### Bioensaios

A análise dos dados foi feita por meio do programa WIN DL 2.0, seguindo o método de máxima verossimilhança ou método Probit (FINNEY, 1971 apud ALAUX, 1994). A escala Probit representa a projeção linear das porcentagens acumuladas de uma curva de distribuição normal (curva de GAUSS). O programa WIN DL também faz as transformações; os cálculos de DL10, DL50, DL90; as linhas de regressão linear; e a análise do desvio dessas linhas. Os fatores de resistência são determinados pela relação entre a DL50 da linhagem de campo e a DL50 da linhagem sensível de referência, a BK77.

#### Bioquímica

Os dados coletados foram transferidos para o Excel, a fim de serem tratados por meio do programa XL-STAT 6.1. A análise foi feita de acordo com testes não parametrizados. Os testes de comparação de várias amostras independentes de Kruskal-Wallis e aqueles de duas amostras independentes de Mann-Whitney permitiram isolar as médias.

#### Biologia molecular

Todos os resultados foram analisados por meio do programa geNorm e qBase. O programa facilita a validação dos genes de referência e permite a normalização de cada nível de expressão gênica em relação a uma média geométrica dos genes de referência, bem como a integração das repetições técnicas e a eficácia da amplificação e erros relacionados. A análise estatística foi realizada por meio do teste t de Student.

## RESULTADOS

#### Bioensaios

A tabela 2 mostra os resultados dos bioensaios para as três linhagens. A DL50 da deltametrina na linhagem sensível BK77 é de 0,087µg/g; para a linhagem BIT03, é de 1,241µg/g, sendo o coeficiente de resistência (CR) de 14 em relação à BK77. Para a linhagem DAT03, a DL50 da deltametrina é de 3,765µg/g, com CR de 43 em relação à BK77. Destaca-se que o CR da linhagem de Datomo é três vezes maior que aquele da linhagem de Bittou.

O gráfico 1 apresenta as linhas de regressão linear das doses de tóxicos (em log sobre o eixo das abscissas) e a mortalidade das larvas (em Probit sobre o eixo das ordenadas).

A linha mais próxima ao eixo das ordenadas representa a curva da linhagem sensível BK77; a do meio, a linhagem BIT03 e a mais distante do eixo das ordenadas representa a linhagem DAT03. Isso significa que a linhagem BK77 possui mais indivíduos sensíveis à deltametrina e que a linhagem de Bittou possui indivíduos menos resistentes que aqueles da linhagem de Datomo.

A tabela 3 traz os resultados dos bioensaios realizados nas linhagens de campo em 2006. Constatou-se que as linhagens de campo possuem coeficientes de resistência variando entre 11 e 21, em comparação com a linhagem sensível de referência, BK77. A linhagem de Kita, de Diabo e de Angaradébou são estatisticamente mais resistentes que a linhagem



sensível de referência, BK77, pois os intervalos de confiança a 95% da DL50 da deltametrina aplicados nas linhagens não se sobrepõem.

O gráfico 2 traz as linhas de regressão linear dose-mortalidade das linhagens de campo coletadas em 2006 em relação à deltametrina.

### **Bioquímica**

A determinação das concentrações de proteínas totais tem o objetivo de determinar as concentrações de oxidase e a atividade da esterase e da GST por unidade protéica para fins de comparação, não possuindo as larvas utilizadas nos vários testes exatamente o mesmo peso.

As concentrações de oxidase

As concentrações médias de monooxigenase no citocromo p450 de 2,746nmol equivalentes unidade P450/mg para a BK77; 3,110nmol equivalentes unidade P450/mg para a linhagem BIT03; e 5,038nmol equivalentes unidade P450/mg para a linhagem DAT03 (Tabela 4). A linhagem DAT03 possui quase duas vezes mais de monooxigenase no citocromo P450 que a linhagem sensível, e a linhagem BIT03 possui uma quantidade média equivalente àquela da linhagem sensível.

O gráfico 3 apresenta as frequências da distribuição das taxas de monooxigenase no citocromo P450 das diferentes linhagens: os altos números de larvas de BK77 encontram-se entre as categorias de 0 a 2nmol/mg e de 2 a 4nmol/mg; para a linhagem BIT03, os indivíduos estão distribuídos de uma forma bastante uniforme nas três primeiras categorias (0-2, 2-4 e 4-6nmoles/mg). As larvas da linhagem DAT03 são menos frequentes na primeira categoria, sendo principalmente encontradas nas categorias 2 a 4, 4 a 6 e 6 a 8nmol/mg.

A atividade da esterase não específica (alfa e beta naftil acetato)

A atividade média da esterase alfa e beta das larvas das diferentes linhagens de *Helicoverpa armigera* estão resumidas na tabela 5. Em relação à esterase alfa, as atividades

médias são equivalentes nas três linhagens, sendo de 0,166 $\mu$ mol/min/mg; 0,139 $\mu$ mol/min/mg; e 0,164 $\mu$ mol/min/mg, para BK77, BIT03 e DAT03, respectivamente.

Em relação à esterase beta, as quantidades médias de beta naftol acetato produzidas são de 0,286 $\mu$ mol/min/mg para BK77; 0,284 $\mu$ mol/min/mg para BIT03; e 0,232 $\mu$ mol/min/mg para DAT03. A diferença de atividade desse tipo de esterase entre as três linhagens é altamente significativa. Não há diferença significativa entre as atividades da linhagem sensível e da BT03. Diferentemente, a atividade da linhagem DAT03 é a menor.

#### A atividade da glutatona S-transferase (GST)

A tabela 6 apresenta o resumo das atividades médias da GST nas duas linhagens de campo e na linhagem sensível. As quantidades de produto formado são de 0,160 $\mu$ mol/min/mg para BK77; 0,116 $\mu$ mol/min/mg para BIT03; e 0,145 $\mu$ mol/min/mg para DAT03. A análise estatística mostra uma equivalência entre as atividades da linhagem sensível e aquelas da linhagem DAT03, sendo estas duas maiores que as atividades na linhagem BIT03.

#### Biologia molecular

A análise por meio do programa qBASE mostrou que a linhagem Heliar é uma boa referência para oito genes P450 (CYP332A1, CYP337B1, CYP4M6, CYP4M7, CYP4L5, CYP4L11, CYP6AE11 e CYP9A12), em comparação com os níveis de expressão encontrados nas linhagens de campo, a saber, seis. Os resultados da RT-PCR quantitativa para os genes encontram-se resumidos no gráfico 4. Sobre esses resultados, pode-se dizer que não há relação direta entre o nível de expressão de um gene específico CYP e o nível de resistência ou origem geográfica das linhagens, apesar de que, nas linhagens de campo, muitos genes CYP apresentarem superexpressão. Quatro genes apresentam, de maneira significativa, superexpressão em todas as seis linhagens (CYP6AE11, CYP9A12, CYP4M6 e CYP4M7). CYP332A1 e CYP337B1 também apresentam significativa superexpressão em três das quatro linhagens, respectivamente (Tabela 7).

### DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

**Bioensaio e bioquímica:** O presente estudo mostra uma diferença significativa entre a DL50 da linhagem Datomo e aquelas da linhagem sensível de referência, BK77, e da linhagem de Bittou.

Uma vez que as duas linhagens de campo não foram submetidas a nenhuma pressão de seleção em laboratório e foram capturadas no mesmo período do ano, quando havia grande população da praga, caberia questionar a razão dessa diferença de sensibilidade.

De fato, Datomo é uma localidade pequena situada na província de Mouhoun, uma região tradicionalmente dedicada à cultura do algodão a partir da década de 1950, com aplicação de inseticidas do tipo piretroide a partir da década de 1970. Ao longo de cada ano agrícola, são feitos de cinco a seis tratamentos com inseticida contendo piretroides. Além disso, a proximidade do rio Mouhoun permite a horticultura durante a estação seca. Também no cultivo de legumes há aplicação contínua de pesticidas contendo piretroides, agrotóxicos acessíveis aos produtores e eficazes contra as larvas de lepidópteros que causam danos às lavouras. O uso desses inseticidas causa uma pressão de seleção sobre as populações de *Helicoverpa armigera* (HAN et al., 1999). Por outro lado, em Bittou, na província de Boulgou, os produtores de algodão iniciaram esse cultivo em larga escala a partir da política de estímulo à produção de algodão adotada pelo setor em 1995. Dessa forma, faz menos de dez anos que o algodão é cultivado por vários produtores nessa região de Burkina Faso. A pressão de seleção é menor também porque a horticultura não é muito desenvolvida. Isso poderia explicar a diferença de sensibilidade em relação à deltametrina.

PRUDENT et al. (1999) pesquisaram no Benim a sensibilidade de linhagens de campo à deltametrina. Para duas linhagens coletadas no mesmo período, mas em localidades diferentes, a DL50 era de 2,50µg/g para a primeira localidade e de 17,44µg/g para a segunda. A relação das DL50 dessas duas localidades é de, aproximadamente, 7. Esse resultado confirma o que obtivemos para as duas linhagens de Burkina estudadas.

O coeficiente de resistência (CR) da linhagem de Bittou (14) se compara àquele que MARTIN et al. (2000) encontraram para uma linhagem de Bouaké em 1996 (CR=12) e em 1997 (CR=18); a linhagem de Datomo tem um CR claramente maior que essas duas últimas (CR=43).

A quantificação das concentrações de monooxigenase no citocromo P450 mostrou de maneira significativa que os indivíduos da linhagem de Datomo possuem as mais elevadas taxas dessas enzimas. O aumento da concentração de monooxigenase no citocromo P450 na linhagem de Datomo, em relação à linhagem de Bittou e a de referência BK77, poderia estar na base do nível mais elevado da resistência à deltametrina observado nessa linhagem. COON e PERSSON (1980), HODGSON e KULKARNI (1983), MARTIN et al. (2000 e 2002) e KRANTHI et al. (2001) demonstraram, por meio de testes bioquímicos e testes de sensibilidade com o sinérgico butóxido de piperonilo (PBO), que a

monooxigenase no citocromo P450 é responsável pela metabolização dos inseticidas piretroides na *H. armigera*, encontrando-se aí a razão de sua resistência a esse grupo químico.

Na quantificação das atividades da esterase, foi constatado o fenômeno contrário: os indivíduos da linhagem de Datomo apresentaram significativamente as concentrações mais baixas de beta naftol acetato produzido. Esses resultados são congruentes com aqueles de KRANTHI et al. (1997) na Índia: de fato, esses autores descobriram que os níveis elevados de citocromo P450 coincidiam com a pouca atividade da esterase e vice versa. Mais ainda, MARTIN et al. (2002) na Costa do Marfim encontraram, em uma linhagem selecionada em laboratório, resistente à deltametrina, concentrações elevadas de monooxigenase no citocromo P450 e atividades de esterase significativamente menores que aquelas da linhagem sensível BK77.

SABOURAULT et al. (2001) constataram pouca atividade da esterase na mosca doméstica, na qual resistência aos piretroides ocorre em virtude da oxidase e da GST. Eles propuseram um modelo no qual a esterase teria uma ação de regulação dos genes da oxidase. GUNNING et al. (1996), ZHAO et al. (1996) e KRANTHI et al. (1997) citados por MARTIN (2003) desenvolveram uma hipótese na qual a esterase não reagiria com os substratos cromogênicos normalmente usados pela *H. armigera* e *Heliothis virescens*. MARTIN (2003) apresentou a hipótese de que a eficiência catalítica da esterase poderia ter sido modificada nessas linhagens resistentes aos piretroides graças a elevadas concentrações de oxidase.

Por outro lado, TAN e GUO (1996) na China e GUNNING et al. (1998) na Austrália demonstraram que a resistência das populações de *H. armigera* coletadas no campo aos piretroides se devia principalmente à superprodução de isoenzimas de esterase que metabolizavam ou sequestravam esses inseticidas piretroides.

O mecanismo bioquímico envolvido na resistência da *H. armigera* aos piretroides difere da África ocidental para a Austrália: na Costa do Marfim e no Burkina Faso, a oxidase parece ser responsável, ao passo que, na Austrália, é a esterase que está envolvida. Sendo as condições experimentais de medição das enzimas similares nas duas regiões, resta saber quais as condições de tratamento a que foram submetidas as diferentes linhagens. De fato, nos países da África ocidental produtores de algodão, os tratamentos sempre são realizados com inseticidas binários compostos por um piretroide associado a um organofosforado, a fim de se obter uma sinergia. Na Austrália, entretanto, os tratamentos são realizados com inseticidas usados isoladamente (GUNNING, 2000, comunicação pessoal). Essas diferenças, mesmo na composição de inseticidas a serem aplicados, poderia ter um

papel determinante no mecanismo enzimático desenvolvido pelas diferentes linhagens para resistir aos piretroides.

A medição da atividade da GST demonstrou uma equivalência entre a linhagem de Datomo e a linhagem sensível BK77; a linhagem de Bittou apresentou menos atividade dessa enzima. Esses resultados destoam daqueles de MARTIN et al. (2002) da Costa do Marfim, que mostraram que elevadas concentrações de monooxigenase coincidiam com atividade significativamente mais importante da GST na linhagem resistente. Essa situação poderia ser explicada pelo fato de que as linhagens estudadas não apresentavam um nível de resistência tão alto quanto aquele da linhagem selecionada por MARTIN et al. (2002).

YU (1996), que purificou a GST de 24 espécies de insetos, destacou que essas enzimas são principalmente induzidas por inseticidas do grupo dos organoclorados, como o endossulfan. Apesar de bioensaios com o endossulfan não terem sido realizados nas linhagens estudadas, a equivalência entre a BK77 e a DAT03, em relação à atividade da GST, sugerem possibilidade do uso dessa molécula como alternativa aos piretroides no Burkina Faso nos próximos anos.

HEMINGWAY et al. (1997), no México, e PRAPANTHADARA et al. (1998), na Tailândia demonstraram que a GST está relacionada com a resistência de mosquitos aos piretroides. O aumento da atividade da GST contribuiu para fortalecer a resistência dos insetos aos piretroides.

Podemos dizer que as linhagens de campo utilizadas no presente estudo não apresentam nível de resistência muito elevado aos piretroides, de forma que as concentrações de monooxigenase no citocromo P450 e atividade da GST não são tão elevadas quanto aquelas encontradas na linhagem selecionada para a deltametrina por MARTIN et al. (2002). De fato, a linhagem resistente selecionada na Costa do Marfim possuía uma concentração de monooxigenase no citocromo P450 de 12,352nmol equivalentes unidade P450/mg de proteína e atividade da GST de 0,554  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  proteína.

**Biologia molecular:** Este estudo permitiu demonstrar que as linhagens de *H. armigera* de origens geográficas variadas possuem diferentes tipos de expressão (ou superexpressão) de genes CYP.

Vários fatores devem ser considerados na avaliação desses resultados. Primeiramente, nossa incapacidade de obter conjugados confiáveis de iniciadores (primers) para a qRT-PCR de alguns genes limitou a abrangência de nossa pesquisa. Tais limitações resultaram não apenas da proximidade da sequência de genes CYP recentemente duplicadas, mas provavelmente também do polimorfismo da sequência de genes CYP em relação às regiões geográficas (ou seja, África e Europa x Austrália e

China que obtiveram as sequências). Foi detectado o polimorfismo em um gene altamente conservado, a acetilcolinesterase 1, na *H. armigera* de diversas origens (SURAPORN et al., em preparação). O polimorfismo na *H. armigera* também inclui alteração no número de genes CYP (CASIDA, 1970). Além disso, testamos diferentes conjugados de iniciadores (primers) para dois genes e obtivemos resultados semelhantes, porém não idênticos. De fato, os resultados da qRT-PCR dependem dos iniciadores (primers) e das sequências de amplicons, que são diferentes para cada gene testado. A comparação entre os níveis de expressão do gene, mesmo entre as diferentes linhagens, é, dessa forma, provavelmente mais pertinente que os níveis relativos de expressão de genes diferentes em uma mesma linhagem. Além disso, medimos os níveis de transcrição total nas larvas inteiras, como primeira abordagem para a detecção de genes CYP com superexpressão. Devem-se levar em conta as diferenças importantes de biomassa relativa e de atividade dependente do P450 relativo em diferentes tecidos da *H. armigera* (QIU et al., 2003). Alterações nos níveis de expressão de um gene P450 em um único tecido (por exemplo, os tubos de Malpighi) podem ser suficientes para conferir uma resistência como demonstrado na drosófila transgênica. Em uma linhagem chinesa selecionada em laboratório, verificou-se um aumento de 400 vezes da expressão de CYP9A12 na gordura corporal, porém apenas 20 vezes no intestino (YANG et al., 2006). Tais alterações específicas nos tecidos poderiam ser mascaradas durante a transcrição, uma vez que se misturam todos os tecidos. Esses elementos devem ser considerados na interpretação dos resultados e para estudos futuros.

Para confirmar a função de um gene CYP que apresenta superexpressão na resistência metabólica aos inseticidas, são necessários estudos genéticos ou bioquímicos. A relação genética do CYP337B1 com o gene da resistência ao fenvalerato, *Rfen1*, na linhagem (WEE et al., 2008) australiana AN02 sugere que esse gene P450 pode ser um fator importante de resistência ao fenvalerato. O CYP337B1 apresenta superexpressão de cerca de 1,6 vezes, mas quase 300 transcrições apresentam superexpressão nessa linhagem e a ainda não se conhece a atividade catalítica do CYP337B1. Muito recentemente, foi demonstrado que o CYP9A12 e o CYP9A14 da *H. armigera* metabolizam o esfenvalerato (YANG et al., 2008) e a sua superexpressão na linhagem selecionada em laboratório poderia assim contribuir para a resistência.

Outros estudos podem mostrar que apenas um dos genes CYP possui relação de causalidade com a resistência, possuindo os outros genes níveis de expressão independentes da resistência. Nesse caso, a mutação da resistência pode ser uma mutação no promotor do gene, talvez análoga à superexpressão do *Cyp6g1* nas drosófilas (DABORN et al., 2002). Um elemento transportável é responsável pela resistência ao DDT e aos neonicotinoides nas linhagens que apresentam superexpressão do *Cyp6g1*, (CATANIA et al., 2004), (FFRENCH-CONSTANT et al., 2006). Nos

lepidópteros, os elementos transportáveis normalmente se encontram próximos aos genes CYP (CHEN e LI, 2007). Entretanto, é muito mais provável que, entre as linhagens aqui estudadas, a resistência à deltametrina represente uma ou mais mutações em um ou mais genes que regulam a expressão de certos genes CYP (e talvez outros). Tal situação seria semelhante à mutação do cromossomo 2 na mosca, conferindo resistência ao diazinon por meio da superexpressão do CYP6A1 e de outros genes (SABOURAULT et al., 2001). Em resposta a desafios químicos, alterações na planta hospedeira ou exposição a inseticidas, os insetos regulam a expressão dos genes que codificam as enzimas responsáveis pela desintoxicação (ou seja, indução) e essa rede complexa de regulação poderia ser altamente favorável às mutações que produzem à resistência aos inseticidas. (LeGOFF et al., 2003). Os presentes autores propõem que a resistência metabólica à deltametrina dependente do P450 na *H. armigera*, sendo assim o resultado de uma ou mais mutações resultantes da evolução da expressão de vários genes CYP. As opções práticas de monitoramento da resistência dependem da identificação genética e molecular da mutação da própria resistência ou da medição precisa da superexpressão do gene CYP ou das proteínas P450. O presente estudo forneceu várias contribuições para futuras pesquisas.

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHMAD, M.; Mccaffery, A. R. Resistance to insecticides in a Thailand strain of *Heliothis armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae). **J. Econ. Entomol.**, 81 (1), 1988. p. 45-48.
- AHMAD, M. Insecticide resistance mechanisms and their management in *Helicoverpa armigera* (Hübner) a review. In: **J. Agric. Res.**, 45(4), 2007. p. 319-335.
- AHMAD, M.; ARIF, M. I.; AHMAD, Z. Monitoring insecticide resistance of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) in Pakistan. **J. Econ. Entomol.**, 88 (4), 1995. p. 771-776.
- ALAUX, T. **Prevention pyrethroid resistance in *Helicoverpa armigera* (Hübner, 1808) (Lepidoptera: Noctuidae) in Côte d'Ivoire**. 1994. PhD Thesis, Institut National Polytechnique de Toulouse, Toulouse, France.
- CASIDA, J.E. Mixed-function oxidase involvement in the biochemistry of insecticide synergists. **J Agric Food Chem**, 18, 1970. p. 753–772.
- CATANIA F.; KAUER, M.O.; DABORN, P.J.; YEN, J.L.; FFRENCH-CONSTANT, R.H.; SCHLOTTERER, C., 2004. World-wide survey of an Accord insertion and its association with DDT resistance in *Drosophila melanogaster*. **Mol Ecol**, 13, 2004. p. 2491–2504.
- CHEN, S.; LI, X. Transposable elements are enriched within or in close proximity to xenobiotic-metabolizing cytochrome P450 genes. **BMC Evolutionary Biology**, 7, 2007. p. 46–58.
- COUILLOUD, R.; GIRET, M. Améliorations possibles dans l'élevage d'*Heliothis armigera*. **Note n° 7**. Montpellier: LENI/CIRAD, 1978.

- COUILLOUD, R.; GIRET, M. Multiplication d'*Heliothis armigera* (Hübner). (Lepidoptera, Noctuidae): Améliorations possibles grâce à l'adoption d'une technique d'élevage en groupe des chenilles. **Cot. Fib. Tropic.**, 35, 1980. p. 217-224
- DABORN, P.J.; YEN, J.L.; BOGWITZ, M.R.; GOFF, G.L.; FEIL, E.; JEFFERS, S. A single P450 allele associated with insecticide resistance in *Drosophila*. **Science**, 297, 2002. p. 2253–2256;
- FFRENCH-CONSTANT, R.; DABORN, P.; FEYEREISEN, R. Resistance and the jumping gene. **Bioessay**, 28, 2006. p. 6–8;
- FINNEY, D.J. **Probit Analysis** (3rd Ed.). London: Cambridge University Press, 1971.
- HABIG, W. H.; PABST, M. J.; JAKOBY, W. B. Glutathione S-transferases, the first enzymatic step in mercapturic acid formation. **J. Biol. Chem.**, 249, 1974, p. 7130.
- HAN, Z.; WANG, Y.; ZHANG, Q.; LI, X.; LI, G. Dynamics of pyrethroid resistance in a field population of *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae). **Pest. Sci.**, 55, 1999. p. 462-466;
- LEGOFF, G.; BOUNDY, S.; DABORN, P.J.; YEN, J.L.; SOFER, L.; LIND, R.; et al. Microarray analysis of cytochrome P450 mediated insecticide resistance in *Drosophila*. **Insect BiochemMol Biol** 33, 2003. p. 701–708.
- MARTIN, T.; CHANDRE, F.; OCHOU, G. O.; VAISSAYRE, M.; FOURNIER, D. Pyrethroid resistance mechanisms in the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) from West Africa. **Pest. Biochem. Physiol.**, 74, 2002. p. 17-26.
- MARTIN, T.; OCHOU, G. O.; HALA-N'KLO, F.; VASSAL, J.M.; VAISSAYRE, M. Pyrethroid resistance in the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) in West Africa. **Pest. Manag. Sci.**, 56, 2000. p. 549-554.
- MARTIN, T.; OCHOU, G. O.; VAISSAYRE, M.; FOURNIER, D. Organophosphorus insecticides synergize pyrethroids in the resistant strain of cotton bollworm, *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) from West Africa. **J. Econ. Entomol.**, 96, 2003. p. 468-474.
- MARTIN, T.; OCHOU, G. O.; VAISSAYRE, M.; FOURNIER, D. Oxidases responsible for resistance to pyrethroids sensitize *Helicoverpa armigera* (Hübner) to triazophos in West Africa. **Insect Biochem. Mol. Biol.**, 33, 2003. p. 883-887.
- MCCAFFERY, A. R. Resistance to insecticides in heliothine Lepidoptera: a global view. **Proc. Roy. Soc. B**, 353, 1998. p. 1735-1750.
- NIBOUCHE, S. Rapport d'activité UR Entomologie Appliquée CIRAD-CA Burkina Faso. **Rapport intermédiaire**. Bobo-Dioulasso, Burkina Faso: **INERA-CIRAD**, 1992.
- NIBOUCHE, S. **Life cycle of *Helicoverpa armigera* (Hübner, 1808) (Lepidoptera: Noctuidae) in Western Burkina Faso**: Biology, ecology and geographical variability of populations. 1994. PhD Thesis, Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie de Montpellier, Montpellier, France.
- PEARSON, E. O.; MAXWELL, R. C.; DARLING, O. B. E. 1958. The insect pests of cotton in tropical Africa. **Emp. Cot. Grow. Corp.**, 1958. p. 142-146.



PRUDENT, P.; KATARY, A.; DJIHINTO, A.; PATHINVO, E. Résultats des études conduites sur la résistance de *Helicoverpa armigera* aux pyréthrinoïdes au Bénin durant la campagne 1999/2000. **Rapport de synthèse PR-PRAO 1999-2000**. Ouagadougou, Burkina Faso, 1999.

QIU, X.; LI, W.; TIAN, Y.; LENG, X. Cytochrome P450 monooxygenases in the cotton bollworm (Lepidoptera: Noctuidae) tissue difference and induction. **J Econ Entomol**, 96, 2003. p. 1283–1289.

SABOURAULT, C.; GUZOV, V.M.; KOENER, J.F.; CLAUDIANOS, C.; PLAPP, F.W.J.; FEYEREISEN, R. Overproduction of a P450 that metabolizes diazinon is linked to a loss-of-function in the chromosome 2 ali-esterase (MdeltaE7) gene in resistant houseflies. **Insect Mol. Biol.**, 10, 2001, p. 609–618.

TANG, F.; YUE, Y.; HUA, R. The relationships among MFO, glutathione S-transferases, and phoxim resistance in *Helicoverpa armigera*. **Pest. Biochem. Physiol.**, 68, 2000. p. 96–101.

TRAORE, D.; HEMA, O.; ILBOUDO, O.; Entomologie et expérimentation phytosanitaire. **Rapport annuel campagne agricole 1998-1999**. Bobo-Dioulasso, Burkina Faso, 1998.

VAISSAYRE, M.; CAUQUIL, J. **Principaux ravageurs et maladies du cotonnier en Afrique au sud du Sahara**. Wageningen, The Netherlands: CIRAD, CTA. 2000.

VAISSAYRE, M. Résistance des ravageurs du cotonnier aux pesticides. **Cot. Dev.**, 17, 1996. p. 25-28.

VASSAL, J. M.; VAISSAYRE, M.; MARTIN, T. Decrease in the susceptibility of *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) to pyrethroids in Côte d'Ivoire. **Resist. Pest Manag.**, 9, 1997. p. 14-15.

VOGNAN, G.; OUEDRAOGO M.; OUEDRAOGO, S. Description de la filière cotonnière au Burkina Faso. **Rapport intermédiaire**. Bobo-Dioulasso, Burkina Faso: INERA, 2002.

WEE, C.W.; LEE, S.F.; ROBIN, C.; HECKEL, D.G. Identification of candidate genes for fenvalerate resistance in *Helicoverpa armigera* using cDNA-AFLP. **Insect Mol. Biol.**, 17, 2008. p. 351–360.

YANG, Y.; CHEN, S.; WU, S.; YUE, L.; WU, Y. Constitutive overexpression of multiple cytochrome P450 genes associated with pyrethroid resistance in *Helicoverpa armigera*. **J Econ. Entomol.**, 99, 2006. p. 1784–1789.

YANG, Y.; YUE, L.; CHEN, S.; WU, Y. Functional expression of *Helicoverpa armigera* CYP9A12 and CYP9A14 in *Saccharomyces cerevisiae*. **Pestic Biochem. Physiol.**, 92, 2008. p. 101–105.

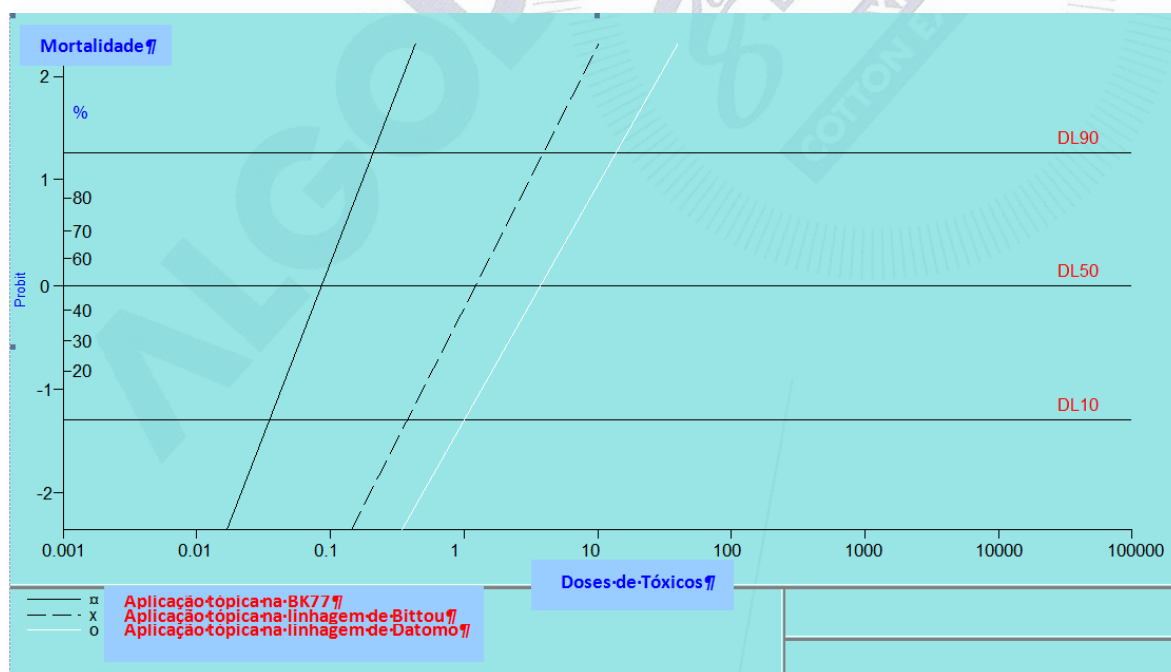
**Tabela 1:** Características dos testes enzimáticos

	Proteínas totais	Oxidases	Esterases não-específicas	Glutaciona-S-transferases
Substrato	Ácido bicinconinico + sulfato de cobre	Tetrametilbenzidina + peróxido de hidrogênico	Acetato de naftila + Fast Garnett Salt	Glutaciona reduzida + cloro-dinitrobenzeno
Duração da incubação	30 min a 36°C	30 min a 20°C	10 min a 25°C	Zero
Comprimento da onda de leitura	Ponto final em 590nm	Ponto final em 630nm	Ponto final em 550nm	Cinética por 10 min a 340nm

**Tabela 2:** Comparação da DL50 das três linhagens de *H. armigera* coletadas em 2003

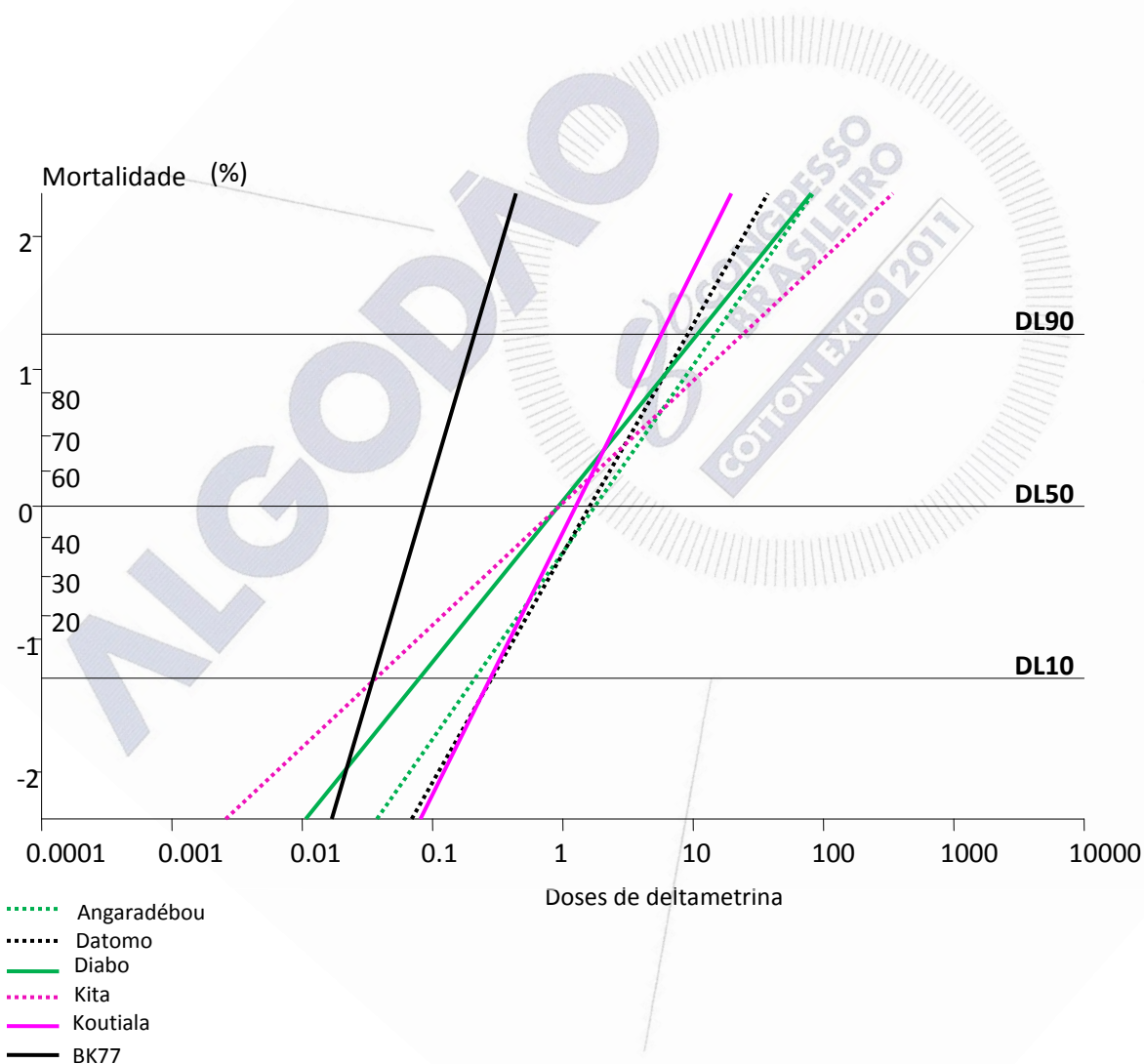
Linhagem	DL50 (µg/g)	Intervalos de confiança a 95%	CR
BK77	0,087	0,051 – 0,146	-
BIT03	1,241	0,037 – 2,365	14
DAT03	3,765	1,574 – 5,579	43

CR = Coeficiente de resistência

**Gráfico 1:** Relação dose-mortalidade da deltametrina nas linhagens BK77, BIT03 e DAT03.

**Tabela 3:** Comparação da DL50 das linhagens de *H. armigera* coletadas em 2006

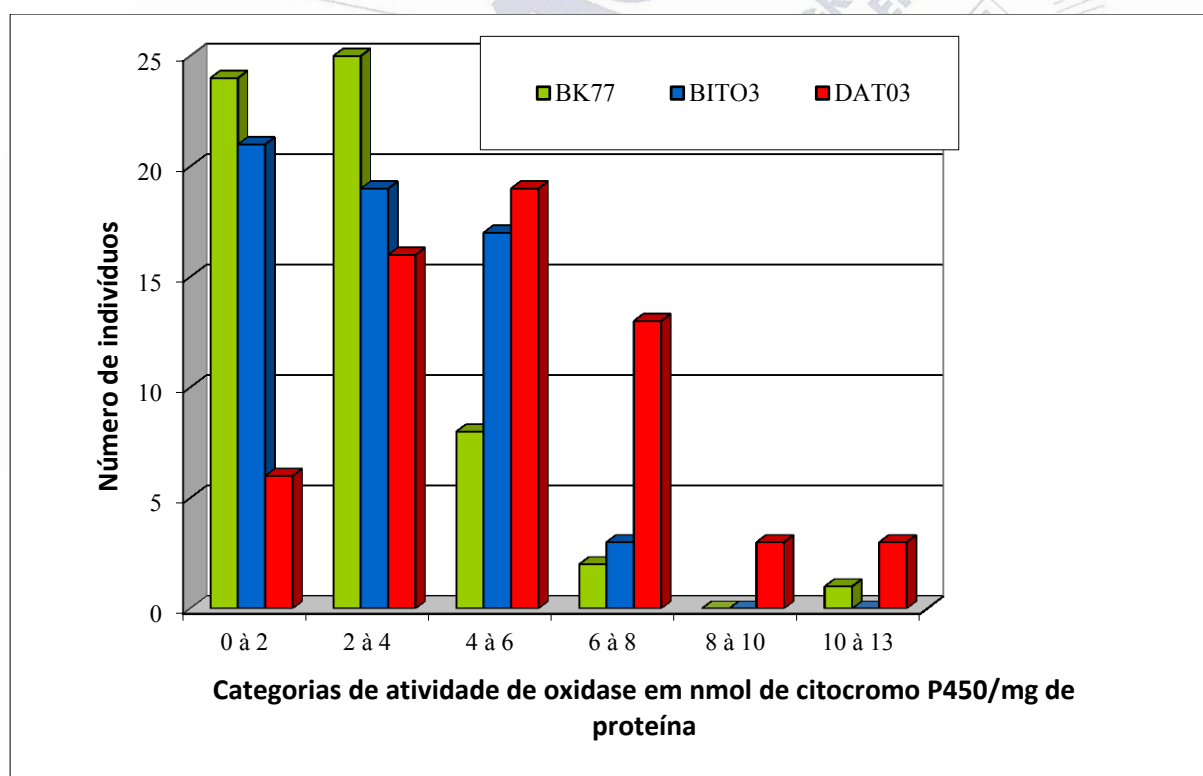
Linhagem	DL50 (µg/g)	Intervalos de confiança a 95%	CR
BK77	0,087	0,051 – 0,146	-
Koutiala	1,28	0,015-2,85	15
Kita	0,942	0,457-1,396	11
Datomo	1,63	0,0003-3,79	19
Diabo	0,93	0,59-1,24	11
Angaradébou	1,802	0,725-3,013	21



**Gráfico 2:** Relação dose-mortalidade da deltametrina nas diferentes linhagens

**Tabela 4:** Taxas médias de oxidase em BK77, BIT03 e DAT03 (n=60, limite de 5%)

Linhagens	Oxidase (nmol P450/mg proteínas)
BK77	2,746 b
BIT03	3,11 b
DAT03	5,038 a
Valor observado	32,790
p-valor	< 0,0001
Valor crítico	5,991
Alpha	0,050

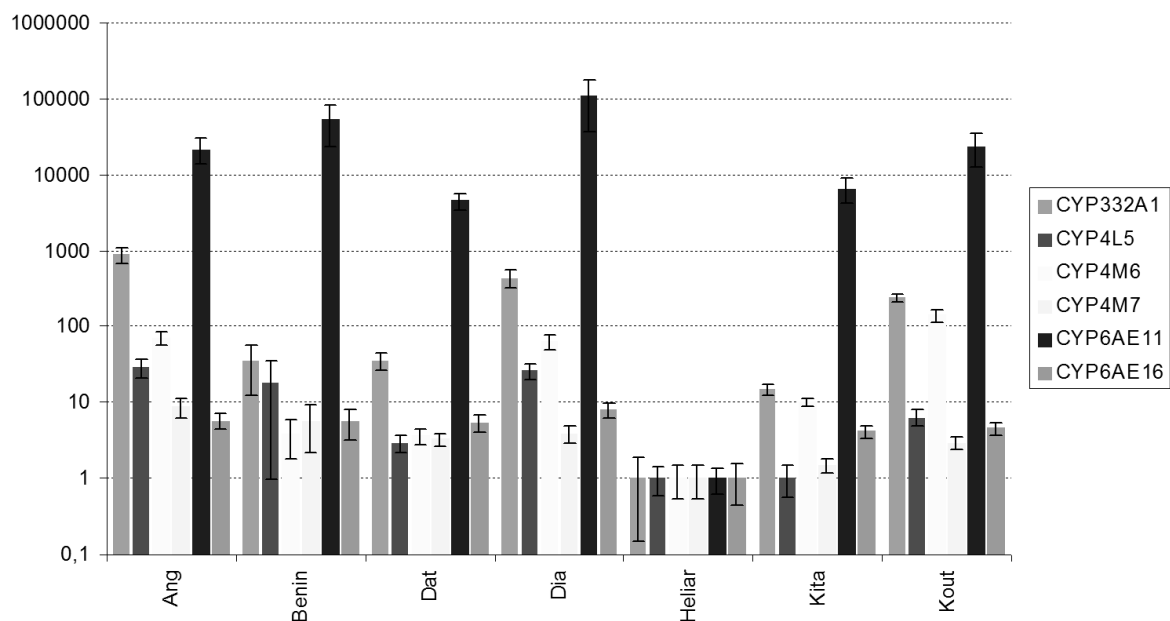
**Gráfico 3 :** Frequência da distribuição das taxas de oxidase (nmol/mg) nas larvas de BK77, BIT03 e DAT03 (n=60 para cada linhagem).

**Tabela 5:** Atividades médias das esterases  $\alpha$  e  $\beta$  em BK77, BIT03 e DAT03 (n=60, limite 5%)

Linhasgens	Esterase $\alpha$ ( $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ proteína)	Esterase $\beta$ ( $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ proteína)
BK77	0,166	0,286 a
BIT03	0,139	0,284 a
DAT03	0,164	0,232 b
Valor observado	4,237	11,486
p-valor	0,120	0,003
Valor crítico	5,991	5,991
Alpha	0,050	0,050

**Tabela 6:** Atividades médias de GST em BK77, BIT03 e DAT03 (n=60, limite 5%)

Linagem	Atividade GST ( $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ proteína)
BK77	0,160 a
BIT03	0,116 b
DAT03	0,145 a
Valor observado	18,204
p-valor	0,000
Valor crítico	5,991
Alpha	0,050



**Gráfico 4:** Nível de expressão gênica nas linhagens de campo da *H. armigera*

**Tabela 7:** Identificação dos níveis de expressão gênica por linhagem

	Heliar	Kita	Kout	Dia	Dat	Ang	Benin
Cyp332A1	a	a	b	bc	a	c	a
Cyp4L5	a	a	b	b	b	a	a
Cyp4M6	a	b	c	b	a	b	a
Cyp4M7	a	a	a	a	a	a	a
Cyp6AE11	a	b	b	b	b	b	b
Cyp6AE16	a	a	a	a	a	a	a