



UvA-DARE (Digital Academic Repository)

Genetic basis of acaricide resistance

Identification and characterization of the risk and mechanisms of resistance to bifenthrin, acequinocyl, and the novel acaricide pyflubumide in Tetranychus urticae

Fotoukiai, S.M.

Publication date

2020

Document Version

Other version

License

Other

[Link to publication](#)

Citation for published version (APA):

Fotoukiai, S. M. (2020). *Genetic basis of acaricide resistance: Identification and characterization of the risk and mechanisms of resistance to bifenthrin, acequinocyl, and the novel acaricide pyflubumide in Tetranychus urticae*.

General rights

It is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), other than for strictly personal, individual use, unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

Disclaimer/Complaints regulations

If you believe that digital publication of certain material infringes any of your rights or (privacy) interests, please let the Library know, stating your reasons. In case of a legitimate complaint, the Library will make the material inaccessible and/or remove it from the website. Please Ask the Library: <https://uba.uva.nl/en/contact>, or a letter to: Library of the University of Amsterdam, Secretariat, Singel 425, 1012 WP Amsterdam, The Netherlands. You will be contacted as soon as possible.

Summary

The evolution of pesticide resistance in arthropod pest species is a long-standing and increasing problem for crop production, human health, and the environment. The spider mite *Tetranychus urticae* is a cosmopolitan key pest on a wide range of crops. This species is notorious for its ability to rapidly develop resistance to a large number of pesticides with different chemical structures and modes of action. Despite the high resistance risk, management programs of *T. urticae* are largely based on the application of chemical acaricides. In **Chapter 1**, I outlined how food security is threatened by arthropod pests and how humankind has dealt with these challenges. I further introduced the destructive effects of improper use of pesticides with a focus on the evolution of pesticide resistance. I explained the mechanisms of resistance and the implications for resistance management strategies. One of these implications is a need to develop novel acaricides with new modes of action. In this thesis, the risk and molecular basis of resistance to novel acaricides were explored in *T. urticae*. In **Chapter 2**, two novel mutations were identified in the mitochondrial cytochrome b Q0 site of *T. urticae*: G132A (equivalent to G143A in fungi resistant to strobilurins, a successful family of fungicides) and G126S+A133T (previously reported to cause bifenthrin and acequinocyl resistance in the spider mite *Panonychus citri*). Several lines of evidence were provided for the causal role of the two mutations in resistance to Q0 inhibitor acaricides, bifenthrin and acequinocyl. Near isogenic lines carrying G132A showed several fitness penalties including a lower R_0 , r_m , and LM, a higher DT, and a more male biased sex ratio. This suggests that the resistant populations might be less competitive in a bifenthrin-free environment, offering opportunities for resistance management.

Pyflubumide is a novel carboxanilide acaricide that inhibits mitochondrial complex II of spider mites. In **Chapter 3** a thorough resistance risk assessment of this compound was performed using a reference panel of *T. urticae* strains resistant to various acaricides with different modes of action. The cyenopyrafen-resistant strain JPR was identified as the only strain with low-to-moderate level of cross-resistance to pyflubumide. I selected for high levels of pyflubumide resistance in JPR through two different laboratory selection regimes resulting in two highly resistant strains JPR-R1 and JPR-R2. Several steps were taken to characterize the mechanisms underpinning pyflubumide resistance. First, the sequence of complex II subunits of resistant (JPR-R2) and susceptible mites were compared, but no target-site insensitivity was detected. Synergism experiments strongly suggested that cytochrome P450 monooxygenases are involved in pyflubumide resistance. To test this hypothesis, a

series of genome-wide gene expression experiments were performed. Overexpression of five cytochrome P450 and four carboxyl/cholinesterase genes were observed in JPR-Rs after pyflubumide exposure. However, the gene-expression patterns were complex and failed to clearly identify which cytochrome P450(s) might be involved in resistance. In **Chapter 4**, classic genetic crosses revealed that more than one gene was involved in pyflubumide resistance and that the mode of inheritance was incomplete recessive. Subsequently, a combination of high-resolution BSA genetic mapping and transcriptomic analysis was performed to characterize the genetic architecture of pyflubumide resistance in JPR-R1. Genetic mapping uncovered three QTL that were associated with pyflubumide resistance. The narrow genomic intervals of the QTL centered on CYP392A16, a cluster of CYP392E genes, and cytochrome P450 reductase (CPR). We identified copy number variation at the CPR locus as the likely causal structural variance underpinning the different transcription levels of CPR. CYP392A16 was functionally expressed and in vitro assays showed that CYP392A16 demethylates the active deacylated pyflubumide metabolite, producing a compound that is no longer toxic to *T. urticae*. Together, these results indicate that pyflubumide is detoxified by cytochrome P450s and suggest that cytochrome P450 metabolism is strengthened by gene amplification of CPR. In **Chapter 5**, all results were discussed in light of existing knowledge on the identification of acaricide resistance mechanisms and strategies for resistance management.

Samenvatting

De evolutie van pesticidenresistentie in geleedpotige plaaginsecten is een reeds lang bestaand en toenemend probleem voor de gewasproductie, de menselijke gezondheid en het milieu. De spintmijt *Tetranychus urticae* is een kosmopolitische sleutelsoort die leeft op een breed scala aan gewassen. Deze soort is berucht om zijn vermogen tot het snel ontwikkelen van resistentie tegen een groot aantal pesticiden met verschillende chemische structuren en werkingsmechanismen.

Gezien het hoge risico op resistentie zijn bestrijdingsprogramma's van *T. urticae* voornamelijk gebaseerd op de toepassing van chemische acariciden. In **Hoofdstuk 1** zet ik uiteen hoe de voedselveiligheid bedreigd wordt door geleedpotige plagen en hoe de mens gereageerd heeft op deze uitdagingen. Verder beschrijf ik de desastreus effecten van onoordeelkundig gebruik van pesticiden met de nadruk op de evolutie van pesticidenresistentie. Bovendien leg ik de mechanismen van de resistentie uit alsmede de gevolgen voor strategieën voor bestrijdingsprogramma's. Een van de consequenties is de noodzaak om nieuwe acariciden met nieuwe werkingsmechanismen te ontwikkelen. In dit proefschrift worden de moleculaire basis alsmede het risico op resistentie tegen nieuwe acariciden onderzocht. In **Hoofdstuk 2** worden twee nieuwe mutaties geïdentificeerd in het mitochondriale cytochroom b Q0 gen van *T. urticae*: G132A (equivalent aan G143A in schimmels die resistent zijn tegen strobilurinen, een succesvolle familie van fungiciden) en G126S+A133T (waarvan bekend is dat ze in de spintmijt *Panonychus citri* resistentie verschaffen tegen bifenazaat en acequinocyl). Diverse onafhankelijke bewijzen worden geleverd voor de causale rol die deze twee mutaties spelen in de resistentie tegen de Q₀inhibitor acariciden bifenazaat en acequinocyl. Bijna-isogene lijnen die de G132A mutatie bezitten laten nadelige effecten op de fitness zien, zoals een lagere R₀, rm en LM, een hogere DT, en een scheve geslachtsverhouding (meer mannetjes dan vrouwtjes). Dit alles suggereert dat de resistente populatie mogelijk minder competitief is in een bifenazaat-vrije omgeving; dit biedt mogelijkheden voor resistentie-management.

Pyflubumide is een nieuwe carboxanilide acaricide die het mitochondriale complex II van spintmijten inhibeert. In **Hoofdstuk 3** wordt een grondige risicoanalyse van de resistentie van deze stof uitgevoerd met gebruikmaking van een referentiepanel bestaande uit *T. urticae* stammen die resistent zijn tegen verscheidene acariciden met verschillende werkingsmechanismen. De cyenopyrafen-resistente JPR stam blijkt de enige stam te zijn met een laag tot middelmatig niveau van kruisresistentie tegen pyflubumide. Ik selecteerde op hoge niveaus van pyflubumideresistentie in JPR met behulp van twee verschillende experimentele selectieregimes, hetgeen resulteerde in twee hoog-resistente stammen, te weten JPR-R1 en JPR-R2. Verschillende stappen

werden gezet om de mechanismen achter de pyflubumide-resistentie bloot te leggen. Allereerst werden de sequenties van de complex II subeenheden van resistente (JPR-R2) en gevoelige mijten vergeleken, maar ongevoeligheid van de doelplaats werd niet gevonden. Synergisme experimenten suggereren sterk dat cytochroom P450 monooxygenasen bij de pyflubumideresistentie betrokken zijn. Om deze hypothese te testen zijn een aantal genoombrede genexpressie-experimenten uitgevoerd. Na blootstelling aan pyflubumide blijken in JPR-Rs vijf cytochroom P450's en vier carboxyl/cholinesterase genen tot overexpressie te komen. De genexpressiepatronen waren evenwel complex en bleken niet in staat om duidelijk aan te geven welke cytochroom P450(s) betrokken zouden kunnen zijn bij de resistentie.

Klassiek genetische kruisingen onthullen in **Hoofdstuk 4** dat meer dan een gen betrokken is bij pyflubumideresistentie en dat de wijze van overerving incompleet recessief is. Vervolgens is een combinatie van hoge resolutie BSA genetische kartering en transcriptoomanalyse gebruikt om de genetische architectuur van pyflubumideresistentie in JPR-R1 te karakteriseren. De genetische kartering onthulde drie QTL die geassocieerd zijn met pyflubumideresistentie. De enge genomische intervallen van de QTL concentreren zich rond CYP392A16, een cluster van CYP392E genen, en cytochroom P450 reductase (CPR). Variatie in het aantal kopieën van het CPR gen is waarschijnlijk de causale structurele variatie die ten grondslag ligt aan de verschillende transcriptieniveaus van CPR.

CYP392A16 komt functioneel tot expressie en demethyleert *in vitro* de actieve gedeacyleerde pyflubumide metabooliet, en produceert aldus een stof die niet langer toxisch is voor *T. urticae*. In gezamenlijkheid geven deze resultaten aan dat pyflubumide gedetoxificeerd wordt door cytochroom P450s en suggereren dat het cytochroom P450 metabolisme versterkt wordt door genamplificatie van CPR. In **Hoofdstuk 5** worden de resultaten uit hoofdstukken 2, 3 en 4 bediscussieerd in het kader van de bestaande kennis over de identificatie van mechanismen van acaricideresistentie en strategieën voor resistentie-management.