

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

**Caracterização da resistência a teflubenzuron em raças de *Spodoptera
frugiperda* (J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae)**

Juliana Gonzales Rodrigues

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

**Piracicaba
2021**

Juliana Gonzales Rodrigues
Bióloga

Caracterização da resistência a teflubenzuron em raças de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae)

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
2021

Dados internacionais de Catalogação da Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA – DIBD/ESALQ/USP

Rodrigues, Juliana Gonzales

Caracterização da resistência a teflubenzuron em raças de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) / Juliana Gonzales Rodrigues. - - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2021.

102 p.

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

1. Manejo da resistência de insetos 2. Teflubenzuron 3. Lagarta-do-cartucho 4. Raças 5. Variabilidade intraespecífica 6. Custo adaptativo 7. Expressão diferencial de genes I. Título

DEDICATÓRIA

Dedico esta dissertação a todos que percorreram comigo esta trajetória.

AGRADECIMENTOS

À Ele pelo dom da vida.

Ao Prof. Dr. Celso Omoto pela orientação e oportunidade para realização deste trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Entomologia da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” - Universidade de São Paulo (ESALQ/USP) pelo suporte profissional e oportunidades concedidas.

Ao Prof. Dr. Fernando Luís Cônsoli pela orientação, apoio, aconselhamento e disponibilização da estrutura do Laboratório de Interações em Insetos para realização de parte deste trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001 e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) – processo nº 2019/06215-5 pela concessão da bolsa de estudos.

Aos professores do Departamento de Entomologia e Acarologia (LEA) da ESALQ por todo o conhecimento transferido durante essa caminhada e aos funcionários por todo auxílio prestado.

À minha família, em especial aos meus pais Cláudia e José Luís, pelo amor incondicional, apoio e por sempre acreditarem no meu potencial.

À minha segunda família, amigos do Laboratório de Resistência de Artrópodes, Aline Guidolin, Anderson Bolzan, Antônio Rogério Nascimento, Dionei Muraro, Douglas Amado, Dyrson Abbade Neto, Eloisa Salmeron, Fábio Führ, Fernando Padovez, Fernando Semmelroth, Ingrid Kaiser, Janice Soares, Leonardo Thiessen, Pedro Henrique Campos, Rubens Kanno e Sandy Spineli; e aos estagiários Anne Küll, Carolina Monteiro, Daniel Trench, Giovana Campos, Gustavo Zambon, João Vitor Cruz, Nicole Yumiko, Mateus Vitti, Murilo Basso, Pedro Camargo, Thaini Gonçalves e aos demais que por lá passaram, pela amizade, convívio, companheirismo e “cafés” diários.

Aos meus queridos colaboradores e grandes amigos Aline, Rogério e Rubens por todo auxílio prestado, amparo e discussões produtivas.

Ao meu parceiro de vida José Paulo Franco Bentivenha por ser apoio e calma.

Às amigas cultivadas no departamento durante minha trajetória no mestrado.

Às amigas que a biologia me deu, Graziela e Júlia pela amizade e apoio independente da distância.

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

Às minhas queridas Dominique e Ariel (*in memoriam*) e a tantos outros que fizeram meus dias melhores.

E a todos que direta ou indiretamente estiveram comigo durante estes anos mesmo que despercebidos: Minha sincera gratidão!

EPIGRAFE

“Nós apenas espelhamos o mundo. Todas as tendências presentes no mundo exterior estão para ser encontradas no mundo do nosso corpo. Se pudéssemos mudar a nós mesmos, as tendências do mundo também mudariam. À medida que um homem muda sua própria natureza, o mesmo acontece com a atitude do mundo em relação a ele. Este é o mistério divino supremo. É algo maravilhoso e a fonte da nossa felicidade. Não precisamos esperar para ver o que os outros fazem.”

Mahatma Gandhi

SUMÁRIO

RESUMO	10
ABSTRACT	11
LISTA DE FIGURAS	12
LISTA DE TABELAS	14
1. INTRODUÇÃO.....	15
REFERÊNCIAS	19
2. CARACTERIZAÇÃO DA SUSCETIBILIDADE A DIFERENTES INSETICIDAS E DA RESISTÊNCIA A TEFLUBENZURON EM RAÇAS DE <i>Spodoptera frugiperda</i> (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE)	25
RESUMO	25
ABSTRACT	25
2.1. Introdução.....	26
2.2. Material e métodos	27
2.2.1. Insetos.....	27
2.2.2. Identificação de raças por meio dos marcadores <i>COI</i> e <i>Tpi</i>	28
2.2.3. Seleção de linhagens resistentes a teflubenzuron em raças de <i>S. frugiperda</i>	30
2.2.4. Caracterização da suscetibilidade de raças de <i>S. frugiperda</i> a inseticidas de diferentes grupos químicos.....	31
2.2.5. Caracterização da resistência de raças de <i>S. frugiperda</i> a teflubenzuron.....	33
2.2.6. Análise estatística	33
2.3. RESULTADOS	34
2.3.1. Identificação de raças por meio de marcadores <i>COI</i> e <i>Tpi</i>	34
2.3.2. Caracterização da suscetibilidade de raças de <i>S. frugiperda</i> a inseticidas de diferentes grupos químicos.....	36
2.3.3. Caracterização da resistência de raças de <i>S. frugiperda</i> a teflubenzuron.....	41
2.4. DISCUSSÃO	42
2.5. CONCLUSÕES	45
REFERÊNCIAS	45

3. AVALIAÇÃO DO CUSTO ADAPTATIVO ASSOCIADO À RESISTÊNCIA A TEFLUBENZURON EM RAÇAS DE <i>Spodoptera frugiperda</i> (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE).....	51
RESUMO.....	51
ABSTRACT.....	51
3.1. INTRODUÇÃO.....	52
3.2. MATERIAL E MÉTODOS.....	53
3.2.1. Insetos.....	53
3.2.2. Biologia de linhagens suscetíveis, resistentes e heterozigotas de <i>S. frugiperda</i>	54
3.2.3. Análise estatística.....	55
3.3. RESULTADOS.....	56
3.3.1. Duração das fases biológicas.....	56
3.3.2. Sobrevivência das fases biológicas.....	57
3.3.3. Peso de pupa.....	58
3.3.4. Razão sexual.....	59
3.3.5. Fecundidade.....	59
3.3.6. Períodos de pré-oviposição, oviposição e pós-oviposição.....	60
3.3.7. Longevidade de adultos.....	61
3.3.8. Parâmetros de crescimento populacional.....	62
3.4. Discussão.....	64
3.5. Conclusões.....	67
REFERÊNCIAS.....	68
4. ANÁLISE COMPARATIVA DA EXPRESSÃO GÊNICA ENVOLVIDA NA RESISTÊNCIA A TEFLUBENZURON EM RAÇAS DE <i>Spodoptera frugiperda</i> (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE).....	71
RESUMO.....	71
ABSTRACT.....	71
4.1. INTRODUÇÃO.....	72
4.2. MATERIAL E MÉTODOS.....	73
4.2.1. Insetos.....	73
4.2.2. Extração de RNA e síntese de cDNA.....	74
4.2.3. Análise de expressão gênica por PCR em tempo real.....	75
4.2.4. Análise estatística.....	76

4.3. RESULTADOS	80
4.3.1. Análise de expressão gênica por PCR em tempo real	80
4.4. DISCUSSÃO	89
4.5. CONCLUSÕES	94
REFERÊNCIAS	94
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	101

RESUMO

Caracterização da resistência a teflubenzuron em raças de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae)

O conhecimento da variabilidade intraespecífica em populações de insetos-praga é de fundamental importância para a implementação de programas efetivos de manejo integrado, principalmente para pragas polífagas. O impacto da diferenciação de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) em duas raças associadas a hospedeiros denominadas de raças “arroz” e “milho”, assim como “híbridos” resultantes do cruzamento entre estas raças, no manejo desta praga precisa ser melhor entendido. Sendo assim, o objetivo da presente pesquisa foi o de verificar se as raças de *S. frugiperda* podem influenciar na evolução da resistência a inseticidas, principalmente a teflubenzuron. Foram realizados estudos para (i) caracterizar a suscetibilidade de raças de *S. frugiperda* a diferentes inseticidas (chlorantraniliprole, chlorfenapyr, chlorpyrifos, spinetoram, indoxacarb, lambda-cyhalothrin, methomyl, methoxyfenozide, teflubenzuron e thiodicarb); (ii) selecionar e caracterizar a resistência a teflubenzuron em raças de *S. frugiperda*; (iii) avaliar o custo adaptativo associado à resistência a teflubenzuron em raças de *S. frugiperda*; e (iv) investigar o padrão de expressão de genes potencialmente relacionados ao mecanismo de resistência a teflubenzuron em raças de *S. frugiperda*. As raças de *S. frugiperda* utilizadas nesta pesquisa foram isoladas a partir de uma população de *S. frugiperda* coletada na cultura do milho no Estado do Rio Grande do Sul, mediante o uso de marcadores genéticos do DNA mitocondrial (*COI*) e nuclear (*Tpi*). Foram encontrados apenas indivíduos das raças milho (77%) e híbrida (23%) nesta população. A raça milho apresentou maior suscetibilidade que a raça híbrida para a maioria dos inseticidas testados, exceto para indoxacarb e spinetoram. Houve resposta à pressão de seleção para resistência a teflubenzuron nas raças milho e híbrida de *S. frugiperda*, sendo que a linhagem resistente da raça híbrida apresentou CL_{50} cerca de 5 vezes maior que a da raça milho. A análise de custo adaptativo, baseado nos parâmetros da tabela de vida de fertilidade, indicou que há custo adaptativo associado à resistência a teflubenzuron nas raças milho e híbrida de *S. frugiperda* e que o fator raça não influenciou na magnitude do custo adaptativo. A análise de expressão de genes potencialmente relacionados à resistência de *S. frugiperda* a teflubenzuron indicou que as raças milho e híbrida apresentaram padrão de expressão gênica distinto para a maioria dos transcritos avaliados; sendo que as proteínas cuticulares RR-1 e RR-2 foram superexpressas na raça híbrida resistente a teflubenzuron e as enzimas CYPs foram superexpressas na raça milho resistente a teflubenzuron. Os resultados obtidos no presente trabalho reforçam a relevância da identificação de raças de *S. frugiperda* para a caracterização da suscetibilidade a inseticidas e na elaboração de estratégias de manejo da resistência.

Palavras-chave: Manejo da resistência de insetos, Teflubenzuron, Lagarta-do-cartucho, Raças associadas a hospedeiros, Variabilidade intraespecífica, Custo adaptativo, Expressão diferencial de genes

ABSTRACT

Characterization of resistance to teflubenzuron in host-strains of *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae)

The knowledge of intraspecific variability in insect pest populations is crucial for implementing effective integrated management programs, mainly for polyphagous pests. The impact of the differentiation of *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) in two host-associated strains named “rice” and “corn” strains, as well as “hybrids” resulting from the interstrain matings, on the management of this pest needs a better understanding. Therefore, the objective of this research was to verify if the host-associated strains of *S. frugiperda* can influence the resistance evolution to insecticides, mainly to teflubenzuron. Studies were conducted to (i) characterize the susceptibility of the host-strains of *S. frugiperda* to different insecticides (chlorantraniliprole, chlorfenapyr, chlorpyrifos, indoxacarb, lambda-cyhalothrin, methomyl, methoxyfenozide, spinetoram, teflubenzuron and thiodicarb); (ii) select and characterize the resistance to teflubenzuron in host-strains of *S. frugiperda*; (iii) evaluate the fitness cost associated with teflubenzuron resistance in host-strains of *S. frugiperda*; and (iv) investigate the expression pattern of genes potentially related to the mechanism of resistance to teflubenzuron in host-strains of *S. frugiperda*. The host-strains of *S. frugiperda* used in this study were isolated from a population of *S. frugiperda* collected on cornfields in Rio Grande do Sul State using mitochondrial (*COI*) and nuclear (*Tpi*) DNA genetic markers. Only individuals from corn (77%) and hybrid (23%) strains were found in this population. The corn strain presented higher susceptibility than the hybrid strain to most of the insecticides tested, except for indoxacarb and spinetoram. There was selection response for resistance to teflubenzuron in both corn and hybrid strains, with LC_{50} for the hybrid strain approximately 5 times higher than for the corn strain. The fitness cost analysis, based on the fertility life table parameters, indicated that there is a fitness cost associated to teflubenzuron resistance in corn and hybrid strains of *S. frugiperda* and the host-strain factor did not influence the magnitude of the fitness cost. The expression analysis of genes potentially related to the teflubenzuron resistance in *S. frugiperda* indicated that the hybrid and corn host-strains presented distinct gene expression patterns to most of the evaluated transcripts; such as the cuticular proteins RR-1 and RR-2 were superexpressed in the teflubenzuron-resistant hybrid host-strain and the CYPs enzymes were superexpressed in the teflubenzuron-resistant corn strain. The results obtained here reinforce the relevance of identification of the host-strains of *S. frugiperda* to characterize the susceptibility to insecticides and to design resistance management strategies.

Keywords: Insect resistance management, Teflubenzuron, Fall armyworm, Host-strains, Intraspecific variability, Fitness cost, Differential gene expression

LISTA DE FIGURAS

- Figura 2.1.** Gel de agarose (1,5%) mostrando o padrão de fragmentos após a digestão enzimática com *MspI* da amplificação do gene *COI*, o qual permite a diferenciação entre os haplótipos (1) *COI*-R de aproximadamente 569 pb e (2) *COI*-C (com dois fragmentos de aproximadamente 497 e 72 pb) comparando ao (4) Gene Ruler 100 pb plus DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific). (3) Controle negativo. A seta indica o menor fragmento (72 pb) do haplótipo *COI*-C produzido após digestão. (5-6) Insetos identificados como *COI*-C após identificação visual. O gel foi corado com brometo de etídio ($0,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e fotografado sob luz UV. 38
- Figura 2.2.** Gel de agarose (1,5%) mostrando o padrão de fragmentos após a digestão enzimática com *MspI* da amplificação do gene *Tpi*, o qual permite a diferenciação entre os haplótipos (1) *Tpi*-R (aproximadamente 203 pb) e (2) *Tpi*-C (com dois fragmentos de aproximadamente 170 e 30 pb) comparando ao (3) Gene Ruler 100 pb plus DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific). A seta indica o menor fragmento do haplótipo *Tpi*-C produzido após digestão. (4-6) Insetos identificados como *Tpi*-C após identificação visual. O gel foi corado com brometo de etídio ($0,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e fotografado sob luz UV. 39
- Figura 2.3.** Curvas de concentração-mortalidade em escala logarítmica das linhagens suscetíveis das raças milho (C-Sus) e híbrida (RC-Sus) em 10 diferentes inseticidas: (A) Chlorantraniliprole, (B) Chlorfenapyr, (C) Chlorpyrifos, (D) Spinetoram, (E) Indoxacarb, (F) Lambda-cyhalothrin, (G) Methomyl, (H) Methoxyfenozide, (I) Teflubenzuron e (J) Thiodicarb. 40
- Figura 2.4.** Curvas de concentração-resposta em escala logarítmica das raças milho (C) e híbrida (RC) suscetíveis (Sus) e resistentes (Res) ao inseticida teflubenzuron. Cada gráfico representa diferentes contrastes: (A) C-Sus e RC-Sus, (B) C-Res e RC-Res, (C) RC-Res e RC-Sus e (D) C-Res e C-Sus. 42
- Figura 3.1.** Tempo de duração das fases biológicas de ovo, larva e pupa das linhagens suscetível (Sus), heterozigotas (H1 E H2) e resistente (Res) A teflubenzuron das raças híbrida (RC) e milho (C) de *S. frugiperda*. Grupos de barras (\pm DP) seguidos de mesma letra não diferem significativamente entre si (Tukey; $p > 0,05$). Letras maiúsculas indicam comparação entre raças e letras minúsculas entre linhagens. 57
- Figura 3.2.** Viabilidade das fases biológicas de ovo, larva e pupa das linhagens suscetível (Sus), heterozigotas (H1 E H2) e resistente (RES) a teflubenzuron das raças híbrida (RC) e milho (C) de *S. frugiperda*. Grupos de barras (\pm EP) seguidos de mesma letra não diferem significativamente entre si (Tukey; $p > 0,05$). Letras maiúsculas indicam comparação entre raças e letras minúsculas entre linhagens. 58
- Figura 3.3.** Fecundidade de fêmeas das linhagens suscetível (Sus), heterozigotas (H1 e H2) e resistente (Res) a teflubenzuron das raças híbrida (RC) e milho (C) de *S. frugiperda*. Grupos de barras (\pm EP) seguidos de mesma letra não diferem significativamente entre si (Tukey; $p > 0,05$). Letras maiúsculas indicam comparação entre raças e letras minúsculas entre linhagens. 60

Figura 3.4. Longevidade de adultos das diferentes linhagens suscetível (Sus), heterozigotas (H1 e H2) e resistente (Res) a teflubenzuron das raças híbrida (RC) e milho (C) de *S. frugiperda*. Grupos de barras (\pm EP) seguidos de mesma letra não diferem significativamente entre si (Tukey; $p > 0,05$). Letras maiúsculas indicam comparação entre raças e letras minúsculas entre linhagens..... 62

Figura 4.1. Expressão relativa das linhagens resistentes ao inseticida teflubenzuron das raças híbrida (RC-Res) e milho (C-Res) de *S. frugiperda* obtida pela análise de qPCR. Os valores de expressão relativa foram obtidos através do método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ utilizando a respectiva linhagem suscetível de cada raça como referência. Barras horizontais representam a média \pm EP (N=3). Nível de significância (*): $p < 0,05$. Genes com expressão relativa > 1 com “*” foram mais expressos em relação a linhagem suscetível de referência. Na linhagem C-Res não foi possível obter expressão relativa dos transcritos ILP2b e RR-1b, visto que não houve amplificação em reação de qPCR 81

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1. Oligonucleotídeos iniciadores e condições de PCR para identificação de raças de <i>S. frugiperda</i>	30
Tabela 2.2. Produtos utilizados nos ensaios de caracterização da suscetibilidade de <i>S. frugiperda</i> a inseticidas.....	32
Tabela 2.3. Suscetibilidade das raças híbrida (RC-Sus) e milho (C-Sus) de <i>S. frugiperda</i> a diferentes inseticidas.	39
Tabela 2.4. Concentração-mortalidade das linhagens suscetíveis (Sus) e resistentes (Res) das raças milho (C) e híbrida (RC) de <i>S. frugiperda</i> ao inseticida teflubenzuron.	41
Tabela 3.1. Peso de pupa com 24h e razão sexual das linhagens suscetível (Sus), heterozigotas (H1 e H2) e resistente (Res) a teflubenzuron das raças híbrida (RC) e milho (C) de <i>S. frugiperda</i>	59
Tabela 3.2. Duração dos períodos de pré-oviposição, oviposição e pós-oviposição das linhagens suscetível (Sus), heterozigotas (H1 e H2) e resistente (Res) a teflubenzuron das raças híbrida (RC) e milho (C) de <i>S. frugiperda</i>	61
Tabela 3.3. Parâmetros de tabela de vida das linhagens suscetível (Sus), heterozigotas (H1 e H2) e resistente (Res) a teflubenzuron das raças híbrida e milho de <i>S. frugiperda</i>	68
Tabela 4.1. Lista de iniciadores construídos com base nos transcritos diferencialmente expressos para validação por qPCR.	78
Tabela 4.2. Estatística proveniente da análise ANOVA 1-fator da expressão relativa das linhagens resistentes raça híbrida (RC-Res) e milho (C-Res) de <i>S. frugiperda</i> , em relação as suas respectivas suscetíveis.	82
Tabela 4.3. Valores médios de Δct obtidos em reação de qPCR utilizando as linhagens suscetível (Sus) e resistente (Res) a teflubenzuron das raças híbrida (RC) e milho (C) de <i>S. frugiperda</i>	86

1. INTRODUÇÃO

A evolução da resistência de insetos a inseticidas é um dos grandes desafios da agricultura mundial (SPARKS; NAUEN, 2015; TABASHNIK; BRÉVAULT; CARRIÈRE, 2013). Desde a documentação do primeiro caso de resistência em 1914 até o ano de 2021, cerca de 17.000 casos de resistência a inseticidas foram relatados para diferentes pragas ao redor do mundo (SPARKS et al., 2021). A resistência é uma característica genética que permite que um inseto e seus descendentes tolerem doses maiores de um determinado inseticida que os demais indivíduos da mesma população (TABASHNIK et al., 2014). Devido à variabilidade genética presente em uma população de qualquer espécie de organismo vivo, alguns indivíduos são pré-adaptados a determinadas alterações, como por exemplo maior tolerância a inseticidas (GEORGHIOU, 1972; GEORGHIOU; TAYLOR, 1977). Na presença da pressão de seleção do inseticida, os insetos munidos dessa adaptação serão selecionados e uma vez atingida uma determinada frequência crítica de resistência, irá refletir em falhas de controle da espécie com o uso deste inseticida (GEORGHIOU, 1969, 1972; ROUSH; MCKENZIE, 1987).

A frequência de alelos resistentes na população de insetos-praga é um dos fatores que deve ser considerado para estabelecer programas adequados de manejo (GEORGHIOU; TAYLOR, 1977; TABASHNIK; BRÉVAULT; CARRIÈRE, 2013). Em geral, os alelos resistentes a um determinado inseticida na população de uma dada espécie está associada à presença de custo adaptativo, permitindo assim a manutenção destes alelos em baixa frequência (GEORGHIOU, 1972; GEORGHIOU; TAYLOR, 1977; MORRIS; GEORGHIOU; SAITO, 1984). Porém, qualquer distúrbio nessa população, como um acréscimo da pressão de seleção, causa uma mudança em favor do aumento da frequência de alelos resistentes, principalmente se este ativar as mesmas vias de resposta dos insetos que os inseticidas ativam (FFRENCH-CONSTANT, 2013). Isto é frequentemente observado em insetos polí-fagos, que ao longo da evolução ao se adaptarem a diversas plantas hospedeiras também diversificaram os genes ligados a enzimas de desintoxicação de inseticidas (HARDY et al., 2018).

A lagarta-do-cartucho, *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae), é uma espécie de origem tropical endêmica do hemisfério ocidental (POGUE, 2002). A espécie é considerada altamente polí-faga, com ocorrência relatada em 353 espécies de plantas em 76 famílias (MONTEZANO et al., 2018). Entre essas plantas encontram-se várias culturas agrícolas de grande importância econômica, como o milho, algodão, arroz,

soja e sorgo (MONTEZANO et al., 2018). Esta espécie apresenta ocorrência em toda a América, desde o Canadá até a Argentina (POGUE, 2002; CABI, 2021). No entanto, não se encontra mais restrita apenas ao continente Americano, visto que desde o ano de 2016 sua presença foi relatada na maioria dos países dos continentes Africano e Asiático e, mais recentemente, da Oceania (CABI, 2021).

Devido à alta variabilidade genética em populações de *S. frugiperda*, foram identificadas duas raças associadas a plantas hospedeiras, sendo uma encontrada se alimentando preferencialmente em culturas de milho, sorgo e algodão (raça milho), e a outra usualmente encontrada se alimentando em arroz e outras gramíneas (raça arroz) (BUSATO et al., 2004; PASHLEY, 1986; PASHLEY; MARTIN, 1987). No entanto, estas raças podem coexistir em uma determinada cultura, conforme relatado em estudos realizados no Brasil (SILVA-BRANDÃO et al., 2018), nas Américas do Norte e Central (PROWELL et al., 2004), na África (JACOBS; VUUREN; RONG, 2018; OTIM et al., 2018) e na Ásia (SHARANABASAPPA et al., 2018; SWAMY et al., 2018). As raças arroz e milho são morfologicamente semelhantes, contudo, apresentam diferenças em diversos aspectos fisiológicos e comportamentais, como diferentes números de genes relacionados a processos de desintoxicação de xenobióticos (GOUIN et al., 2017), metabolização de compostos secundários vegetais (SILVA-BRANDÃO et al., 2020), desempenho biológico (ORSUCCI et al., 2020; SILVA-BRANDÃO et al., 2017), composição feromonal (GROOT et al., 2008; UNBEHEND et al., 2013), divisão alocrônica de cópula (SCHÖFL; HECKEL; GROOT, 2009), entre outros.

Em virtude da semelhança dos caracteres morfológicos partilhados entre as duas raças, a identificação por meio de marcadores moleculares tem se mostrado mais promissora, tais como os marcadores do DNA mitocondrial, principalmente o gene Citocromo oxidase subunidade I (*COI*) (LEVY; GARCIA-MARUNIAK; MARUNIAK, 2002; NAGOSHI et al., 2019). Mais recentemente, tem se adotado também o uso de marcadores nucleares, com foco no gene Triose fosfato isomerase (*Tpi*) (NAGOSHI, 2010; NAGOSHI et al., 2019). O *Tpi* é um marcador ligado ao cromossomo sexual Z (NAGOSHI, 2010), sendo assim, considerando o sistema de determinação sexual ZW em Lepidoptera (SAHARA; YOSHIDO; TRAUT, 2012), fêmeas apresentam o gene em hemizigose, carregando apenas uma cópia, enquanto que machos carregam duas cópias, podendo apresentar o gene em homozigose ou heterozigose, com uma cópia *Tpi*-Arroz e outra *Tpi*-Milho para o SNP e4₁₈₃ (NAGOSHI et al., 2018). O uso conciliado de marcadores mitocondrial e nuclear permitiu a identificação de indivíduos

denominados de “híbridos”, fruto do acasalamento interracial. Esses indivíduos apresentam discordância entre marcadores, ou seja, DNA mitocondrial referente a uma raça e nuclear referente a outra (NAGOSHI, 2019; NAGOSHI et al., 2019).

A elevada pressão exercida por essa praga nos agroecossistemas tem acarretado na utilização excessiva de inseticidas e plantas geneticamente modificadas para o controle de *S. frugiperda*. Como consequência, casos de resistência de *S. frugiperda* já foram relatados para inseticidas de diferentes grupos químicos, como organofosforados (CARVALHO et al., 2013; GARLET et al., 2021), piretroides (CARVALHO et al., 2013; DIEZ-RODRÍGUEZ; OMOTO, 2001), diamidas (BOLZAN et al., 2019), espinosinas (LIRA et al., 2020; OKUMA et al., 2017), benzoilureias (NASCIMENTO et al., 2021, 2016), avermectinas (MURARO et al., 2021), e tecnologias que expressam proteínas inseticidas de *Bacillus thuringiensis* Berliner (Bt) (CHEN et al., 2019; FARIAS et al., 2014; HORIKOSHI et al., 2016; OMOTO et al., 2016).

Um grupo de inseticidas bastante utilizado no controle de *S. frugiperda* tem sido as benzoilureias. Estes inseticidas datam da década de 1970, e vem sendo empregados no controle de pragas desde então (DAALEN; MULDER; WELLINGA, 1972; MERZENDORFER, 2013; WELLINGA; MULDER; DAALEN, 1973). O inseticida diflubenzuron foi o protótipo das benzoilureias, e a partir dele foram desenvolvidos outros derivados com maior atividade inseticida, como triflumuron, clorfluazuron, hexaflumuron, flufenoxuron, lufenuron, novaluron e por fim, teflubenzuron (MERZENDORFER, 2013). Estudos recentes demonstraram que as benzoilureias podem estar agindo na quitina sintase I (*CHS1*) (DOURIS et al., 2016), enzima que catalisa a reação de incorporação de N-acetilglicosamina durante a síntese de quitina. A quitina é um polissacarídeo essencial para a manutenção estrutural e rigidez do tegumento do inseto, e é encontrada em diversas estruturas internas, incluindo o revestimento interno do canal alimentar (matriz peritrófica), dutos genitais, sistema traqueal e dutos de glândulas dérmicas. As principais características de insetos contaminados por benzoilureias são a ocorrência de deformações estruturais no tegumento e matriz peritrófica, retenção de estruturas e tecidos pós-ecdise, rompimento do tegumento recém-formado e extravasamento de hemolinfa, podendo inclusive ter efeitos sob a fertilidade e fecundidade de fêmeas adultas (MERZENDORFER, 2013; MERZENDORFER et al., 2012).

As benzoilureias agem principalmente via ingestão, comprometendo a síntese de quitina nos insetos, e devido ao seu mecanismo de ação específico, apresentam baixa toxicidade a organismos não-alvo (SUN et al., 2015), diferentemente da grande maioria dos

inseticidas disponíveis que agem principalmente no sistema nervoso, o qual é compartilhado entre os animais (LIEBESKIND et al., 2016). Sua seletividade aliada a alta atividade biológica contra espécies-praga, fizeram com que as benzoilureias se tornassem uma ótima alternativa para o controle de pragas (SUN et al., 2015), o que possibilita a utilização destas no esquema de uso rotacionado de inseticidas, estratégia esta que pode retardar a evolução de resistência (MATSUMURA, 2010). Contudo, alguns inibidores da biossíntese de quitina vêm apresentando falhas no controle de *S. frugiperda* no Brasil, e dentre eles destacam-se lufenuron e teflubenzuron (NASCIMENTO et al., 2016, 2021).

A resistência a benzoilureias em *S. frugiperda* foi relatada como sendo majoritariamente metabólica, a qual é dada principalmente pela regulação da expressão de enzimas de desintoxicação (NASCIMENTO et al., 2021, 2015), dentre elas as citocromo P450s (CYPs), glutathione-S-transferases (GSTs), esterases (CCEs) e UDP-glicosiltransferases (UGTs) (GOUIN et al., 2017). Estas enzimas também atuam na desintoxicação a compostos secundários de plantas e na adaptação a plantas hospedeiras distintas, tais como milho e arroz. Recentemente, foi relatado que as raças arroz e milho apresentam diferentes números de genes ligados à processos de desintoxicação e digestão (GOUIN et al., 2017). A abundância de genes CYP altamente expressos já foi descrita como sendo um dos principais mecanismos que conferem a resistência de *S. frugiperda* a benzoilureias (NASCIMENTO, 2018) (NASCIMENTO et al., 2015).

A variabilidade genética intraespecífica que deu origem às raças arroz e milho de *S. frugiperda* pode influenciar na suscetibilidade desses herbívoros às defesas das plantas e também às táticas empregadas para o controle da espécie em campo. Estudos têm indicado que raças de *S. frugiperda* apresentam diferenciação no padrão de suscetibilidade a inseticidas, proteínas Bt e baculovírus (ADAMCZYK et al., 1997; BUSATO et al., 2006; INGBER et al., 2021; INGBER; MASON; FLEXNER, 2018; POPHAM; ROWLEY; HARRISON, 2021; RÍOS-DÍEZ; SALDAMANDO-BENJUMEA, 2011). As diferenças fisiológicas entre as duas raças podem influenciar no custo adaptativo associado à resistência a inseticidas. O conjunto de características, sendo um deles a alta expressão de diferentes genes resultantes da evolução da resistência acarreta em um custo adaptativo para o inseto, devido à realocação de recursos e energia em processos metabólicos e do desenvolvimento (KLIOT; GHANIM, 2012). Qualquer alteração molecular nesses processos pode interferir em parâmetros da tabela de vida de fertilidade, além de outros como redução na capacidade de

defesa a inimigos naturais, sobrevivência e/ou sucesso reprodutivo na ausência da pressão de seleção (KLIOT; GHANIM, 2012; RAYMOND; WRIGHT; BONSALL, 2011).

No presente trabalho foi proposta a investigação para compreender se a existência de raças de *S. frugiperda* pode influenciar nos processos de evolução da resistência a inseticidas, com ênfase a teflubenzuron. Para tanto, a partir de uma população de *S. frugiperda* coletada na cultura do milho no Estado do Rio Grande do Sul foram isoladas as raças com o uso de marcadores genéticos do DNA mitocondrial (*COI*) e nuclear (*Tpi*) para: (1) caracterizar a suscetibilidade de raças de *S. frugiperda* a diferentes inseticidas, (2) selecionar e caracterizar a resistência a teflubenzuron em raças de *S. frugiperda*; (3) avaliar o custo adaptativo associado à resistência a teflubenzuron em raças de *S. frugiperda*; e (4) investigar o padrão de expressão de genes potencialmente relacionados ao processo de resistência a teflubenzuron em raças de *S. frugiperda*. Com a realização desses estudos, será possível entender as possíveis implicações de raças de *S. frugiperda* no manejo da resistência e estabelecer medidas proativas a serem tomadas em âmbito global visto a recente invasão de *S. frugiperda* para países de outros continentes.

REFERÊNCIAS

- ADAMCZYK, J. J. et al. Susceptibility of fall armyworm collected from different plant hosts to selected insecticides and transgenic Bt cotton. **Journal of Cotton Science**, v. 1, n. 1, p. 21–28, 1997.
- BOLZAN, A. et al. Selection and characterization of the inheritance of resistance of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) to chlorantraniliprole and cross-resistance to other diamide insecticides. **Pest Management Science**, v. 75, n. 10, p. 2682–2689, 2019.
- BUSATO, G. R. et al. Análise da estrutura e diversidade molecular de populações de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) associadas às culturas de milho e arroz no Rio Grande do Sul. **Neotropical Entomology**, v. 33, n. 6, p. 709–716, 2004.
- BUSATO, G. R. et al. Susceptibilidade de lagartas dos biótipos milho e arroz de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) a inseticidas com diferentes modos de ação. **Ciencia Rural**, v. 36, n. 1, p. 15–20, 2006.

- CABI, 2021. Invasive Species Compendium Datasheets - *Spodoptera frugiperda* (fall armyworm). Online em <<https://www.cabi.org/isc/datasheet/29810>>. Acesso em 31/03/2021.
- CARVALHO, R. A. et al. Investigating the Molecular Mechanisms of Organophosphate and Pyrethroid Resistance in the Fall Armyworm *Spodoptera frugiperda*. **PLoS ONE**, v. 8, n. 4, p. 1–11, 2013.
- CHEN, X. et al. Fitness costs of Vip3A resistance in *Spodoptera frugiperda* on different hosts. **Pest Management Science**, v. 75, n. 4, p. 1074–1080, 2019.
- DAALEN, J. J. VAN; MULDER, R.; WELLINGA, K. A selective insecticide with a novel mode of action. **Naturwissenschaften**, v. 59, n. 7, p. 312–313, 1972.
- DOURIS, V. et al. Resistance mutation conserved between insects and mites unravels the benzoylurea insecticide mode of action on chitin biosynthesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 113, n. 51, p. 14692–14697, 2016.
- DOWNIE, D. A. Baubles, bangles, and biotypes: A critical review of the use and abuse of the biotype concept. **Journal of Insect Science**, v. 10, n. 176, p. 1–18, 2010.
- FFRENCH-CONSTANT, R. H. The molecular genetics of insecticide resistance. **Genetics**, v. 194, n. 4, p. 807–815, 2013.
- GARLET, C. G. et al. Fitness Cost of Chlorpyrifos Resistance in *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) on Different Host Plants . **Environmental Entomology**, n. Xx, p. 1–11, 2021.
- GEORGHIOU, G. P. Genetics of resistance to insecticides in houseflies and mosquitoes. **Experimental Parasitology**, v. 26, n. 2, p. 224–255, 1969.
- GEORGHIOU, G. P. The evolution of resistance to pesticides. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v. 3, n. 1, p. 133–168, 1972.
- GEORGHIOU, G. P.; TAYLOR, C. E. Genetic and Biological Influences in the Evolution of Insecticide Resistance. **Journal of Economic Entomology**, v. 70, n. 3, p. 319–323, 1977.
- GOUIN, A. et al. Two genomes of highly polyphagous lepidopteran pests (*Spodoptera frugiperda*, Noctuidae) with different host-plant ranges. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1–12, 2017.
- GROOT, A. T. et al. Host strain specific sex pheromone variation in *Spodoptera frugiperda*. **Frontiers in Zoology**, v. 5, p. 1–13, 2008.

- HARDY, N. B. et al. Does a plant-eating insect's diet govern the evolution of insecticide resistance? Comparative tests of the pre-adaptation hypothesis. **Evolutionary Applications**, v. 11, n. 5, p. 739–747, 2018.
- HORIKOSHI, R. J. et al. Near-isogenic Cry1F-resistant strain of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) to investigate fitness cost associated with resistance in Brazil. **Journal of Economic Entomology**, v. 109, n. 2, p. 854–859, 2016.
- INGBER, D. A. et al. Oviposition preferences, Bt susceptibilities, and tissue feeding of fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) host strains. **Pest Management Science**, 2021.
- INGBER, D. A.; MASON, C. E.; FLEXNER, L. Cry1 Bt Susceptibilities of Fall Armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) Host Strains. **Journal of Economic Entomology**, v. 111, n. 1, p. 361–368, 2018.
- JACOBS, A.; VUUREN, A. VAN; RONG, I. H. Characterisation of the Fall Armyworm (*Spodoptera frugiperda* J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) from South Africa. **African Entomology**, v. 26, n. 1, p. 45–49, 2018.
- KLIOT, A.; GHANIM, M. Fitness costs associated with insecticide resistance. **Pest Management Science**, v. 68, n. 11, p. 1431–1437, 2012.
- LEVY, H. C.; GARCIA-MARUNIAK, A.; MARUNIAK, J. E. Strain Identification of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) Insects and Cell Line: PCR-RFLP of Cytochrome Oxidase C Subunit I Gene. **Florida Entomologist**, v. 85, n. 1, p. 186–190, 2002.
- LIEBESKIND, B. J. et al. Complex Homology and the Evolution of Nervous Systems. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 31, n. 2, p. 127–135, 2016.
- LIRA, E. C. et al. Resistance of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) to spinetoram: inheritance and cross-resistance to spinosad. **Pest Management Science**, v. 76, n. 8, p. 2674–2680, 2020.
- MATSUMURA, F. Studies on the action mechanism of benzoylurea insecticides to inhibit the process of chitin synthesis in insects: A review on the status of research activities in the past, the present and the future prospects. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 97, n. 2, p. 133–139, 2010.
- MERZENDORFER, H. et al. Genomic and proteomic studies on the effects of the insect growth regulator diflubenzuron in the model beetle species *Tribolium castaneum*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 42, n. 4, p. 264–276, 2012.
- MERZENDORFER, H. Chitin synthesis inhibitors: Old molecules and new developments. **Insect Science**, v. 20, n. 2, p. 121–138, 2013.

- MONTEZANO, A. D. G. et al. Host Plants of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in the Americas. **African Entomology**, v. 26, n. 2, p. 286–300, 2018.
- MORRIS, M. G.; GEORGHIOU, G. P.; SAITO, T. **Pest Resistance to Pesticides**. [s.l.: s.n.]. v. 21
- MURARO, D. S. et al. Inheritance patterns, cross-resistance and synergism in *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) resistant to emamectin benzoate. **Pest Management Science**, v. Accepted A, 2021.
- NAGOSHI, R. N. The Fall Armyworm Triose Phosphate Isomerase (Tpi) Gene as a Marker of Strain Identity and Interstrain Mating. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 103, n. 2, p. 283–292, 2010.
- NAGOSHI, R. N. et al. Analysis of strain distribution, migratory potential, and invasion history of fall armyworm populations in northern Sub-Saharan Africa. **Scientific Reports**, v. 8, 2018.
- NAGOSHI, R. N. et al. Genetic characterization of fall armyworm infesting South Africa and India indicate recent introduction from a common source population. **PLoS ONE**, v. 14, n. 5, p. 1–16, 2019.
- NAGOSHI, R. N. Evidence that a major subpopulation of fall armyworm found in the Western Hemisphere is rare or absent in Africa, which may limit the range of crops at risk of infestation. **PLoS ONE**, v. 14, n. 4, p. 1–18, 2019.
- NASCIMENTO, A. R. B. et al. There is more than chitin synthase in insect resistance to benzoylureas: Molecular markers associated with teflubenzuron resistance in *Spodoptera frugiperda*. **Journal of Pest Science**, 2021.
- NASCIMENTO, A. R. B. DO et al. Comparative transcriptome analysis of lufenuron-resistant and susceptible strains of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). **BMC Genomics**, v. 16, n. 1, p. 1–12, 2015.
- 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, 2016.
- OKUMA, D. M. et al. Inheritance and fitness costs of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) resistance to spinosad in Brazil. **Pest Management Science**, 2017.
- OMOTO, C. et al. Field-evolved resistance to Cry1Ab maize by *Spodoptera frugiperda* in Brazil. **Pest Management Science**, v. 72, p. 1727–1736, 2016.

- ORSUCCI, M. et al. Transcriptional differences between the two host strains of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). **bioRxiv**, 2020.
- OTIM, M. H. et al. Detection of sister-species in invasive populations of the fall armyworm *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) from Uganda. **PLoS ONE**, v. 13, n. 4, p. 1–18, 2018.
- PASHLEY, D. P. Host-associated Genetic Differentiation in Fall Armyworm (Lepidoptera: Noctuidae): A Sibling Species Complex? **Annals of the Entomological Society of America**, v. 79, n. 3, p. 898–904, 1986.
- PASHLEY, D. P.; MARTIN, J. A. Reproductive Incompatibility Between Host Strains of the Fall Armyworm (Lepidoptera: Noctuidae). **Annals of the Entomological Society of America**, v. 80, n. 6, p. 731–733, 1987.
- POGUE, M. G. A world revision of the genus *Spodoptera* (Guenée) Lepidoptera: Noctuidae. **Memoirs of the American Entomological Society**, v. 43, p. 1–201, 2002.
- PROWELL, D. P.; MCMICHAEL, M.; SILVAIN, J.-F. Multilocus Genetic Analysis of Host Use, Introgression, and Speciation in Host Strains of Fall Armyworm (Lepidoptera: Noctuidae). **Annals of the Entomological Society of America**, v. 97, n. 5, p. 1034–1044, 2004.
- RAYMOND, B.; WRIGHT, D. J.; BONSALL, M. B. Effects of host plant and genetic background on the fitness costs of resistance to *Bacillus thuringiensis*. **Heredity**, v. 106, n. 2, p. 281–288, 2011.
- RÍOS-DÍEZ, J. D.; SALDAMANDO-BENJUMEA, C. I. Susceptibility of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) Strains From Central Colombia to Two Insecticides, Methomyl and Lambda-Cyhalothrin: A Study of the Genetic Basis of Resistance. **Journal of Economic Entomology**, v. 104, n. 5, p. 1698–1705, 2011.
- SAHARA, K.; YOSHIDO, A.; TRAUT, W. Sex chromosome evolution in moths and butterflies. **Chromosome Research**, v. 20, n. 1, p. 83–94, 2012.
- SCHÖFL, G.; HECKEL, D. G.; GROOT, A. T. Time-shifted reproductive behaviours among fall armyworm (Noctuidae: *Spodoptera frugiperda*) host strains: Evidence for differing modes of inheritance. **Journal of Evolutionary Biology**, v. 22, n. 7, p. 1447–1459, 2009.
- SHARANABASAPPA et al. First report of the Fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (J E Smith) (Lepidoptera: Noctuidae), an alien invasive pest on maize in India. **Pest Management in Horticultural Ecosystem**, 2018.

- SILVA-BRANDÃO, K. L. et al. Transcript expression plasticity as a response to alternative larval host plants in the speciation process of corn and rice strains of *Spodoptera frugiperda*. **BMC Genomics**, v. 18, n. 1, p. 1–15, 2017.
- SILVA-BRANDÃO, K. L. et al. Loci under selection and markers associated with host plant and host-related strains shape the genetic structure of Brazilian populations of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera, Noctuidae). **PLoS ONE**, v. 13, n. 5, p. 1–28, 2018.
- SILVA-BRANDÃO, K. L. et al. Transcriptome differential co-expression reveals distinct molecular response of fall-armyworm strains to DIMBOA. **Pest Management Science**, 2020.
- SPARKS, T. C. et al. Insecticide resistance management and industry: the origins and evolution of the Insecticide Resistance Action Committee (IRAC) and the mode of action classification scheme. **Pest Management Science**, v. 77, n. 6, p. 2609–2619, 2021.
- SPARKS, T. C.; NAUEN, R. IRAC: Mode of action classification and insecticide resistance management. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 121, p. 122–128, 2015.
- SUN, R. et al. Benzoylurea Chitin Synthesis Inhibitors. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 63, n. 31, p. 6847–6865, 2015.
- TABASHNIK, B. E.; BRÉVAULT, T.; CARRIÈRE, Y. Insect resistance to Bt crops: Lessons from the first billion acres. **Nature Biotechnology**, v. 31, n. 6, p. 510–521, 2013.
- TABASHNIK, B. E. et al. Defining Terms for Proactive Management of Resistance to Bt Crops and Pesticides. **Journal of Economic Entomology**, v. 107, n. 2, p. 496–507, 2014.
- UNBEHEND, M. et al. Pheromonal Divergence Between Two Strains of *Spodoptera frugiperda*. **Journal of Chemical Ecology**, v. 39, n. 3, p. 364–376, 2013.
- WELLINGA, K.; MULDER, R.; DAALLEN, J. J. VAN. Synthesis and laboratory evaluation of 1-(2,6-disubstituted benzoyl)-3-phenylureas, a new class of insecticides. II. Influence of the acyl moiety on insecticidal activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 21, n. 6, p. 993–998, 1973.

2. CARACTERIZAÇÃO DA SUSCETIBILIDADE A INSETICIDAS E DA RESISTÊNCIA A TEFLUBENZURON EM RAÇAS DE *Spodoptera frugiperda* (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE)

RESUMO

O conhecimento da suscetibilidade de insetos a inseticidas é de extrema importância para o estabelecimento de estratégias de manejo da resistência. *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) é um dos principais insetos-praga para diversas culturas de importância econômica. A existência de duas raças associadas a hospedeiros de *S. frugiperda* já foi descrita, sendo denominadas de raça arroz (R) e raça milho (C), assim como “híbridos” (RC) resultantes do cruzamento entre estas raças. Devido às diferenças fisiológicas e comportamentais já documentadas entre as raças de *S. frugiperda*, os objetivos do presente estudo foram (i) caracterizar a suscetibilidade de raças de *S. frugiperda* a inseticidas e (ii) selecionar e caracterizar a resistência a teflubenzuron em raças de *S. frugiperda*, a partir de uma população coletada na cultura do milho no Estado do Rio Grande do Sul. A identificação de raças de *S. frugiperda* foi feita com o uso de marcadores genéticos do DNA mitocondrial (*COI*) e nuclear (*Tpi*), sendo encontradas apenas indivíduos das raças milho (C) e híbrida (RC). As caracterizações da suscetibilidade das linhagens suscetíveis raças milho (C-Sus) e híbrida (RC-Sus) a 10 diferentes inseticidas (chlorantraniliprole, chlorfenapyr, chlorpyrifos, spinetoram, indoxacarb, lambda-cyhalothrin, methomyl, methoxyfenozide, teflubenzuron e thiodicarb), assim como das linhagens resistentes a teflubenzuron em raças milho (C-Res) e híbrida (RC-Res) foram feitas pelos métodos de bioensaio de aplicação tópica ou tratamento superficial da dieta artificial, de acordo com o modo de ação e formulação de cada inseticida. Para a maioria dos inseticidas testados, a CL_{50} da linhagem RC-Sus foi cerca de 1,5 a 2 vezes maior que da linhagem C-Sus, exceto para spinetoram e indoxacarb. Para teflubenzuron, a linhagem RC-Sus apresentou CL_{50} aproximadamente 8 vezes maior que a da linhagem C-Sus. A linhagem resistente RC-Res apresentou CL_{50} cerca de 5 vezes maior quando comparada a C-Res. As razões de resistência encontradas foram de 243,62 vezes para RC-Res e 365,08 vezes para C-Res. Em suma, a raça milho de *S. frugiperda* apresentou maior suscetibilidade para a maioria dos inseticidas testados. Esses resultados reforçam a relevância da identificação de raças de *S. frugiperda* nos estudos de caracterização da suscetibilidade a inseticidas.

Palavras-chave: Lagarta-do-cartucho; Raças associadas a hospedeiros; Manejo da resistência a inseticidas

ABSTRACT

The knowledge of the insect susceptibility to insecticides is greatly important for the implementation of resistance management strategies. *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) is one of the major insect pests in various crops of economic importance. Two host-associated strains were described for this specie, designated as corn (C) and rice (R) strains, as well as “hybrids” (RC) resulting from the interstrain matings. Due to morphological and physiological differences between these host-strains, the objective of this study was to (i)

characterize the susceptibility of *S. frugiperda* host-strains to different insecticides and (ii) select and characterize the teflubenzuron resistance in *S. frugiperda* host-strains, from a population collected in cornfields from the Rio Grande do Sul state. The identification of *S. frugiperda* host-strains was performed by the use of mitochondrial (*COI*) and nuclear (*Tpi*) DNA genetic markers, and only individuals from corn and hybrid strains were found in this population. The characterization of the susceptibility of susceptible strains from corn (C-Sus) and hybrid (RC-Sus) strains to 10 different insecticides (chlorantraniliprole, chlorfenapyr, chlorpyrifos, spinetoram, indoxacarb, lambda-cyhalothrin, methomyl, methoxyfenozide, teflubenzuron e thiodicarb), as well as the resistance of resistant strains from corn (C-Res) and hybrid (RC-Res) strains to teflubenzuron, were performed by the topical application or diet-overlay bioassays methods, according to the mode of action and formulation of each insecticide. The LC_{50} of the RC-Sus strain was 1.5 to 2 times higher when compared to the C-Sus strain for most of the insecticides tested, except for spinetoram and indoxacarb. For teflubenzuron, the RC-Sus presented LC_{50} approximately 8 times higher when compared to the C-Sus strain. The resistant strain RC-Res presented LC_{50} approximately 5 times higher when compared to the C-Res. The resistance ratios found were 243.62-fold for RC-Res and 365.08-fold for C-Res. In summary, the corn strain of *S. frugiperda* showed higher susceptibility to most of the insecticides tested. These results reinforce the relevance of the identification of host-strains of *S. frugiperda* to characterize the susceptibility of insecticides.

Key words: Fall armyworm; Host-associated strains; Insecticide resistance management

2.1. Introdução

A resistência de insetos a inseticidas é um dos principais desafios em programas de manejo de pragas, dada a relevância das perdas econômicas e dos impactos no sistema de produção agrícola. A evolução de resistência pode resultar na baixa eficácia do inseticida utilizado para controlar a praga, ocasionando na perda da tecnologia no campo e reduzindo as opções para rotação de inseticidas (SPARKS; NAUEN, 2015), desta forma, é de extrema importância preservar a vida útil dos inseticidas existentes.

Uma das pragas-chave no cenário agrícola mundial é *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) a qual tem demonstrado grande relevância devido às suas características bioecológicas, dentre elas alta capacidade adaptativa, a qual vem acarretando em diversos casos de resistência a inseticidas de diferentes grupos químicos (BOLZAN et al., 2019; CARVALHO et al., 2013; DIEZ-RODRÍGUEZ; OMOTO, 2001; MURARO et al., 2021; NASCIMENTO et al., 2016, 2021; OKUMA et al., 2017).

A existência de duas raças associadas a hospedeiros de *S. frugiperda* já foi descrita, sendo denominadas de raça arroz e raça milho (PASHLEY, 1986; PASHLEY; JOHNSON; SPARKS, 1985), assim como “híbridos” resultantes do cruzamento entre estas raças (PROWELL; MCMICHAEL; SILVAIN, 2004). Devido às semelhanças morfológicas

partilhadas entre raças, faz-se necessário o uso de marcadores genéticos do DNA mitocondrial (*COI*) e nuclear (*Tpi*) para a identificação da raça de forma precisa (NAGOSHI, 2019). Por outro lado, os indivíduos dessas raças, assim como os híbridos, diferem em diversos aspectos fisiológicos, comportamentais, genéticos e do desenvolvimento (GOUIN et al., 2017; GROOT et al., 2008; HAENNIGER et al., 2020; LIMA; MCNEIL, 2009; PASHLEY, 1988; PASHLEY; HARDY; HAMMOND, 1995; SCHÖFL; HECKEL; GROOT, 2009; SILVA-BRANDÃO et al., 2017, 2020; UNBEHEND et al., 2013; VEENSTRA; PASHLEY; OTTEA, 1995).

A variabilidade genética intraespecífica que deu origem às raças arroz e milho de *S. frugiperda* pode influenciar na suscetibilidade desses herbívoros às defesas das plantas e também às táticas empregadas para o controle da espécie. Estudos têm indicado que raças de *S. frugiperda* apresentam diferenciação no padrão de suscetibilidade a inseticidas, proteínas Bt e baculovírus (ADAMCZYK et al., 1997; BUSATO et al., 2006; INGBER et al., 2021; POPHAM; ROWLEY; HARRISON, 2021; RÍOS-DÍEZ; SALDAMANDO-BENJUMEA, 2011). Contudo, a identificação molecular nos estudos utilizando inseticidas foi conduzida utilizando apenas o marcador mitocondrial. Portanto, a presença de indivíduos híbridos de *S. frugiperda* não foi considerada.

O objetivo do presente trabalho foi o de verificar se a existência de raças de *S. frugiperda*, identificadas com o uso de marcadores genéticos do DNA mitocondrial (*COI*) e nuclear (*Tpi*), pode influenciar nos processos de evolução da resistência a inseticidas, com ênfase a teflubenzuron. Foram realizados estudos para (i) caracterizar a suscetibilidade de raças de *S. frugiperda* a diferentes inseticidas e (ii) selecionar e caracterizar a resistência a teflubenzuron em raças de *S. frugiperda*, a partir de uma população de *S. frugiperda* coletada na cultura do milho no Estado do Rio Grande do Sul.

2.2. Material e métodos

2.2.1. Insetos

As lagartas de *S. frugiperda* foram coletadas na cultura de milho não-Bt no município de Santo Antônio de Planalto (latitude 28°21'13,72" e longitude 52°43'1,52"), estado do Rio Grande do Sul, durante a primeira safra agrícola de 2017, e foram trazidas ao Laboratório de Resistência de Artrópodes, Departamento de Entomologia e Acarologia da ESALQ/USP. Desta população de campo foram utilizadas 100 pupas, as quais foram

individualizadas em copos plásticos (50 mL) e a umidade foi mantida com papel filtro umedecido em água destilada. Cada pupa, e a respectiva exúvia, foram identificadas com um código para posterior identificação da raça. Após a identificação molecular, as pupas foram separadas de acordo com a raça (Item 2.2.2). Os insetos foram mantidos em condições controladas durante todo o desenvolvimento, na temperatura de 25 ± 2 °C, umidade relativa de $70 \pm 10\%$ e fotofase de 14h. Esses indivíduos foram inicialmente triados por meio do marcador mitocondrial Citocromo Oxidase subunidade I - *COI* (LEVY et al., 2002) e do marcador nuclear Triose-fosfato Isomerase – *Tpi* (NAGOSHI, 2010; NAGOSHI et al., 2018) para identificação de raças.

A população inicial de campo foi separada em duas outras, com base na raça identificada pelos marcadores mitocondrial (*COI*) e nuclear (*Tpi*): RC (raça híbrida, identificados como raça arroz “Rice” pelo marcador *COI*, e raça milho “Corn” pelo marcador *Tpi*) e C (raça milho “Corn” pelos marcadores *COI* e *Tpi*). Cada raça (RC e C) foi separada em duas linhagens adicionais. A primeira linhagem de cada raça foi mantida na ausência de pressão de seleção a inseticidas e proteínas Bt por mais de 30 gerações, denominadas de RC-Sus (linhagem suscetível da raça híbrida “Rice/Corn”) e C-Sus (linhagem suscetível da raça milho “Corn”). A segunda linhagem de cada raça foi utilizada em bioensaios de seleção para o inseticida teflubenzuron (Nomolt®, 150 g i.a. L⁻¹, Basf S.A.), conforme descrito no item 2.2.3.

2.2.2. Identificação de raças por meio dos marcadores *COI* e *Tpi*

A extração de DNA das exúvias foi realizada de acordo com os procedimentos relatados por Nascimento e colaboradores (NASCIMENTO et al., 2021), a partir da modificação de um método já consolidado (DOYLE; DOYLE, 1990). Dois marcadores foram utilizados para a identificação da raça, sendo estes o mitocondrial Citocromo Oxidase subunidade I (*COI*) e o nuclear Triose fosfato isomerase (*Tpi*). As sequências dos oligonucleotídeos iniciadores foram obtidas em literatura prévia (Tabela 2.1) (LEVY; GARCIA-MARUNIAK; MARUNIAK, 2002; NAGOSHI et al., 2019). Primeiramente, a identificação se deu pelo marcador *COI* e então os insetos foram novamente identificados pelo marcador *Tpi*, para confirmação da identificação da raça.

As reações de PCR consistiram de 1X GoTaq® Colorless Master Mix (Promega), 0,2 µM de cada iniciador, 200 ng do template de DNA e água livre de nucleases no volume final

de 25 µL. As condições de ciclagem de PCR seguiram as especificações de cada conjunto de iniciador (Tabela 2.1). Ambas as reações de PCR e digestão de fragmentos foram conduzidas em termocicladora SimpliAmp (Life Technologies) em microtubos de 0,2 µL.

Alguns fragmentos de *Tpi* amplificados foram enviados para sequenciamento Sanger no Laboratório de Genômica e Biologia Molecular de Plantas, Departamento de Ciências Biológicas, ESALQ/USP. As seqüências obtidas foram alinhadas com outras do NCBI de ambas as raças, mediante o uso do software MEGA-X com o algoritmo MUSCLE (KUMAR et al., 2018) para identificar a mutação no nucleotídeo raça-específica e assim confirmar a identificação da raça (NAGOSHI, 2019). As seqüências de ambas as raças foram analisadas pela ferramenta online NEBcutter V2.0 de forma a encontrar uma enzima de restrição específica para identificação pelo método RFLP (Restriction fragment length polymorphism, Polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição), a qual revelou que a enzima de restrição *MspI* (HpaII) poderia ser utilizada como tem sido feito para o marcador *COI*.

A enzima *MspI* foi utilizada na digestão de ambas as reações de PCR, tanto para o marcador *COI* quanto para o *Tpi*. Para a reação de digestão, foi utilizado 5 µL do produto de PCR, 2 U da enzima *MspI* (ThermoFisher Scientific), 0,02X Buffer Tango (ThermoFisher Scientific), e água livre de nucleases no volume final de 15 µL. As amostras foram incubadas a 37 °C por 3h, de acordo com as instruções do fabricante. Como controle positivo, foram utilizadas fêmeas e machos homocigotos identificados previamente em sequenciamento Sanger como *COI-C/Tpi-C* (raça milho “Corn” por ambos marcadores) e *COI-R/Tpi-R* (raça arroz “Rice” por ambos os marcadores). As amostras digeridas foram utilizadas em corrida eletroforética em gel de agarose 2%. A identificação da raça, tanto pelo marcador *COI* quanto pelo *Tpi* foi conduzida de forma visual com o uso do gel de agarose após eletroforese em um transiluminador UV. De forma a estabelecer as linhagens em laboratório, as pupas de campo identificadas como híbridas (*COI-R/Tpi-C*) formaram a raça RC e as identificadas como milho (*COI-C/Tpi-C*) formaram a raça C.

Tabela 2.1. Oligonucleotídeos iniciadores e condições de PCR para identificação de raças de *S. frugiperda*.

Marcador	Sequência dos iniciadores	Condições de PCR
<i>COI</i>	JM-76: 5'-GAGCTGAATTAGG(G/A)ACTCCAGG-3'	94 °C (2 min); 35x 94 °C (1 min), 66 °C (45 s), 72 °C (2 min); extensão final 72 °C (10 min).
	JM-77: 5'-ATCACCTCC(A/T)CCTGCAGGATC-3'	
<i>Tpi</i>	412F: 5'-CCGGACTGAAGGTTATCGCTTG-3'	94 °C (1 min); 33x 92 °C (30 s), 56 °C (45 s), 72 °C (45 s); extensão final 72 °C (3 min).
	850R: 5'-AATTTTATTACCTGCTGTGG-3'	

2.2.3. Seleção de linhagens resistentes a teflubenzuron em raças de *S. frugiperda*

Para seleção de indivíduos resistentes a teflubenzuron das raças híbrida (RC) e milho (C) foi utilizada a CL₉₉ da linhagem suscetível de referência do laboratório como concentração inicial de seleção (10 µg de ingrediente ativo (teflubenzuron) mL⁻¹). Metade dos insetos das raças híbrida RC e milho C foram utilizados nesta seleção. A cada duas gerações a concentração utilizada para seleção foi aumentada em escala logarítmica (18, 32, 56 e 100 µg.ia.mL⁻¹), até 100 µg.ia.mL⁻¹, concentração a qual mostrou eliminar indivíduos suscetíveis e heterozigotos da linhagem, possibilitando o resgate apenas de insetos resistentes homozigotos, como descrito previamente em literatura (NASCIMENTO et al., 2021). Para a seleção, foi utilizado o método de bioensaio de contaminação superficial da dieta artificial em placas acrílicas, nas quais as lagartas de terceiro instar permaneceram se alimentando da dieta tratada com inseticida. Após cinco dias de exposição ao produto os insetos sobreviventes foram transferidos para recipientes contendo dieta artificial até conclusão da fase larval. Após coletada as pupas, foram montadas as gaiolas de criação para emergência dos adultos e reprodução. Os ovos foram coletados das folhas que revestiam as gaiolas para continuidade do ciclo. As linhagens resistentes foram denominadas de RC-Res (raça híbrida Rice/Corn resistente a teflubenzuron) e C-Res (raça Corn/milho resistente a teflubenzuron). Todas as linhagens foram mantidas em laboratório em condições de ambiente controladas à temperatura de 25 ± 2 °C, umidade relativa de 70 ± 10% e fotofase de 14h, por 30 gerações até o momento dos bioensaios. A dieta artificial utilizada na manutenção e nos bioensaios foi a mesma (KASTEN JR.; PRECETTI; PARRA, 1978).

2.2.4. Caracterização da suscetibilidade de raças de *S. frugiperda* a inseticidas de diferentes grupos químicos

A caracterização da suscetibilidade das linhagens RC-Sus e C-Sus para 10 diferentes inseticidas. Foram utilizadas as formulações técnicas dos inseticidas: chlorpyrifos (99% pureza, Dow AgroSciences Industrial Ltda.), methomyl (98,5% pureza, Ouro Fino Química Ltda.) e thiodicarb (95,2% pureza, Bayer Crop Science). Como formulações comerciais, foram utilizados os inseticidas: lambda-cyhalothrin (Karate Zeon®, 250 g i.a. L⁻¹, Syngenta Proteção de Cultivos Ltda.), indoxacarb (Avaunt®, 150 g i.a. L⁻¹, FMC Química do Brasil Ltda.), spinetoram (Exalt®, 120 g i.a. L⁻¹, Dow AgroSciences Industrial Ltda.), chlorantraniliprole (Premio®, 200 g i.a. L⁻¹, FMC Química do Brasil Ltda.), chlorfenapyr (Pirate®, 240 g i.a. L⁻¹, Basf S.A.), methoxyfenozide (Intrepid®, 240 g i.a. L⁻¹, Dow AgroSciences Industrial Ltda.) e teflubenzuron (Nomolt®, 150 g i.a. L⁻¹, Basf S.A.) (Tabela 2.2).

Para as formulações comerciais os bioensaios foram realizados pelo método de ingestão por contaminação superficial da dieta artificial com inseticida. Para isso, foram utilizadas placas de acrílico de 24 células (Costar®), contendo aproximadamente 1,25 mL de dieta artificial por célula. Após geleificação da dieta, as placas foram esterilizadas em câmara com luz ultravioleta por aproximadamente 15 minutos. Em seguida, foram aplicadas na superfície da dieta de cada célula 30 µL de diferentes concentrações dos inseticidas preparadas com água destilada como solvente e surfactante Triton™ X-100 (Vetec™) na proporção de 0,1% de diluição de volume. Como controle, foi utilizado apenas água destilada com o surfactante. Após secagem da superfície da dieta, foi transferida uma lagarta de terceiro ínstar de *S. frugiperda* para cada célula, na qual permaneceram se alimentando da dieta contaminada por um período específico que variou de 48h a 120h de acordo com o modo de ação dos inseticidas (48h para spinetoram, indoxacarb e lambda-cyhalothrin; 96h para chlorantraniliprole e chlorfenapyr; 120h para methoxyfenozide e teflubenzuron). Para os bioensaios de aplicação tópica, foram utilizadas lagartas de quarto instar, nas quais 1 µL de solução inseticida diluída em acetona P.A. foi aplicado no pronoto da lagarta por meio de um microaplicador automático. Como controle, foi utilizada apenas a acetona P.A. Após a aplicação, as lagartas foram transferidas para placas de acrílico de 24 células (Costar®) contendo dieta artificial, permanecendo por 24h até o momento da avaliação. As placas foram mantidas em câmaras climatizadas com temperatura de 25 ± 2 °C, 60 ± 10% de umidade

relativa do ar e fotofase de 14h. Para inseticidas com tempo de avaliação de 24h a 72h, foi utilizado como critério de mortalidade lagartas não responsivas ao toque de pinça e/ou com movimentos descoordenados, já para os de 120h as lagartas que não sofreram ecdise ou apresentaram retenção de tecido após ecdise (má-formação) do instar anterior foram consideradas como mortas.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado. Para caracterização da suscetibilidade foram testadas aproximadamente de 8-12 concentrações de cada inseticida, espaçadas em escala logarítmica, de modo que proporcionassem mortalidade entre 5 e 95%. Para cada concentração testada foram feitas 4 repetições, sendo cada repetição uma placa de bioensaio contendo 24 lagartas de terceiro instar (para ingestão) ou quarto instar (para aplicação tópica) de *S. frugiperda*. Lagartas encontradas fora da célula da placa de bioensaio foram excluídas da contagem de lagartas totais por repetição.

Tabela 2.2. Produtos utilizados nos ensaios de caracterização da suscetibilidade de *S. frugiperda* a inseticidas

Grupo químico (MoA IRAC)	Molécula	Concentrações ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	Tempo de avaliação (h)	Método de bioensaio
Carbamatos (1A)	methomyl	1,8 a 180	24	Aplicação tópica
	thiodicarb	10 a 3200	24	Aplicação tópica
Organofosforados (1B)	chlorpyrifos	10 a 1800	24	Aplicação tópica
Piretroides (3A)	lambda-cyhalothrin	1 a 32	48	Ingestão
Oxadiazinas (22A)	indoxacarb	0,56 a 18	48	Ingestão
Espinosinas (5)	spinetoram	0,1 a 10	48	Ingestão
Diamidas (28)	chlorantraniliprole	0,1 a 10	96	Ingestão
Clorfenapyr (13)	chlorfenapyr	1 a 56	96	Ingestão
Diacilhidrazinas (18)	methoxyfenozide	5,6 a 180	120	Ingestão
Benzoilureias (15)	teflubenzuron	0,18 a 100; 100 a 100000	120	Ingestão

2.2.5. Caracterização da resistência de raças de *S. frugiperda* a teflubenzuron

A caracterização da resistência a teflubenzuron foi conduzida utilizando as linhagens RC-Sus (híbrida suscetível), RC-Res (híbrida resistente), C-Sus (milho suscetível) e C-Res (milho resistente) a teflubenzuron. Foi utilizado o método de ingestão por contaminação superficial da dieta artificial com o inseticida comercial teflubenzuron (Nomolt®, 150 g i.a. L⁻¹, Basf S.A.), de acordo com a metodologia descrita no item 2.2.4. As placas foram mantidas em câmaras climatizadas com temperatura de 25 ± 2 °C, $60 \pm 10\%$ de umidade relativa do ar e fotofase de 14h. Após 120h da infestação foi avaliada a mortalidade, lagartas que não sofreram ecdise ou apresentaram retenção de tecido após ecdise (má-formação) do instar anterior foram consideradas como mortas.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado. Para caracterização da resistência foram testadas aproximadamente 8-12 concentrações de teflubenzuron, espaçadas em escala logarítmica, de modo que proporcionassem mortalidade entre 5 e 95% das linhagens testadas. Para cada concentração testada foram feitas 4 repetições, sendo cada repetição uma placa de bioensaio contendo 24 lagartas de terceiro instar de *S. frugiperda*. Lagartas encontradas fora da célula tratada foram excluídas da contagem de lagartas totais por repetição.

2.2.6. Análise estatística

Os dados de mortalidade obtidos nas curvas de concentração-resposta, tanto nos ensaios de caracterização da suscetibilidade quanto validação da resistência, foram analisados por GLM utilizando a distribuição binomial com função de ligação Probit. O ajuste ao modelo foi verificado por meio do pacote *hnp* (MORAL; HINDE; DEMÉTRIO, 2017). As CL_{S50} e os respectivos intervalos de confiança foram estimados usando a função *dose.p* do pacote *MASS* (VENABLES; RIPLEY, 2002). As CL_{S50} obtidas para cada inseticida foram comparadas entre raças utilizando a função *ratio test* do pacote *ecotox* (ROBERTSON et al., 2016; WHEELER; PARK; BAILER, 2006). As regressões provenientes da análise de Probit foram utilizadas para testar as hipóteses de igualdade e paralelismo ($p > 0,05$) (ROBERTSON et al., 2016). Os gráficos de concentração-resposta foram gerados por meio do pacote *ggplot2* (WICKHAM,

2016). Todas as análises estatísticas foram conduzidas utilizando o software R (R Core Team, 2020).

Nos ensaios de caracterização da resistência a teflubenzuron, foi também utilizada a comparação entre CL_{50} das linhagens suscetíveis e resistentes. A razão de resistência (RR) entre as linhagens avaliadas foi estimada mediante a divisão da CL_{50} da linhagem RC-Res pela CL_{50} da RC-Sus, e pela divisão da CL_{50} da linhagem C-Res pela CL_{50} da C-Sus.

2.3. Resultados

2.3.1. Identificação de raças por meio de marcadores *COI* e *Tpi*

A identificação da raça com marcador *COI* foi bem-sucedida (Figura 2.1). As raças puderam ser visualmente identificadas com precisão em gel de agarose após eletroforese dos fragmentos digeridos de PCR, como descrito previamente (LEVY; GARCIA-MARUNIAK; MARUNIAK, 2002). O método RFLP proposto para a identificação com o marcador *Tpi* também foi bem-sucedido. O conjunto de iniciadores 412F/850R produziu fragmentos de aproximadamente 200 pares de base (Figura 2.2). A enzima *MspI* promoveu a digestão dos fragmentos apenas no haplótipo *Tpi-C*, reação a qual produziu dois fragmentos menores (aproximadamente 170 e 30 pb), permitindo a identificação visual em gel de agarose (Figura 2.2). A identificação da raça das pupas de campo por meio destes marcadores indicou a presença de indivíduos pertencentes a raça híbrida *COI-R/Tpi-C* na proporção de 23% (n=23) e da raça milho pura *COI-C/Tpi-C* na proporção de 77% (n=77). Destes, 23 pupas identificadas como *COI-R/Tpi-C* foram utilizadas para constituir a raça híbrida RC, enquanto outras 23 pupas identificadas como *COI-C/Tpi-C* foram utilizadas para formar a raça milho pura C.

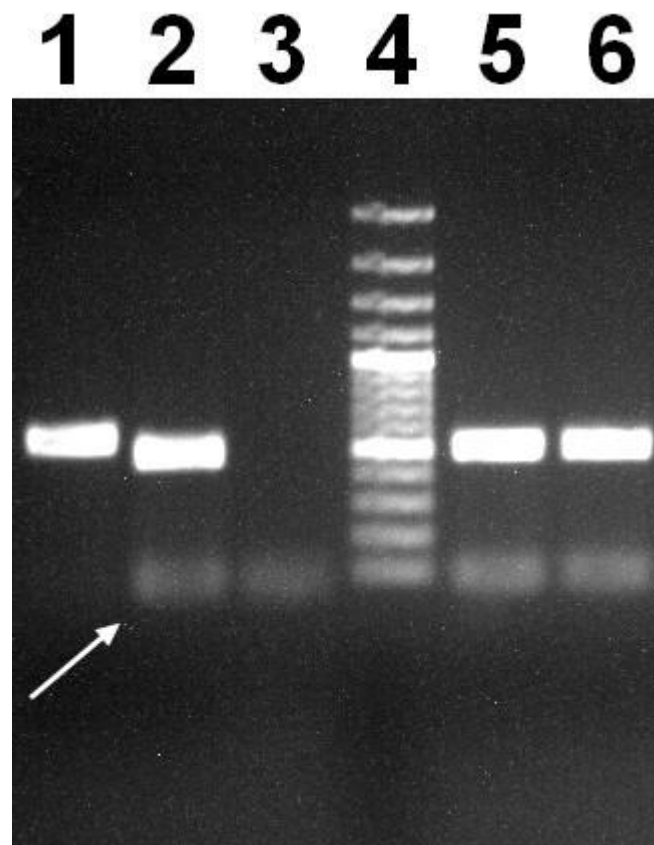


Figura 2.1. Gel de agarose (1,5%) mostrando o padrão de fragmentos após a digestão enzimática com *MspI* da amplificação do gene *COI*, o qual permite a diferenciação entre os haplótipos (1) *COI-R* de aproximadamente 569 pb e (2) *COI-C* (com dois fragmentos de aproximadamente 497 e 72 pb) comparando ao (4) Gene Ruler 100 pb plus DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific). (3) Controle negativo. A seta indica o menor fragmento (72 pb) do haplótipo *COI-C* produzido após digestão. (5-6) Insetos identificados como *COI-C* após identificação visual. O gel foi corado com brometo de etídio ($0,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e fotografado sob luz UV.

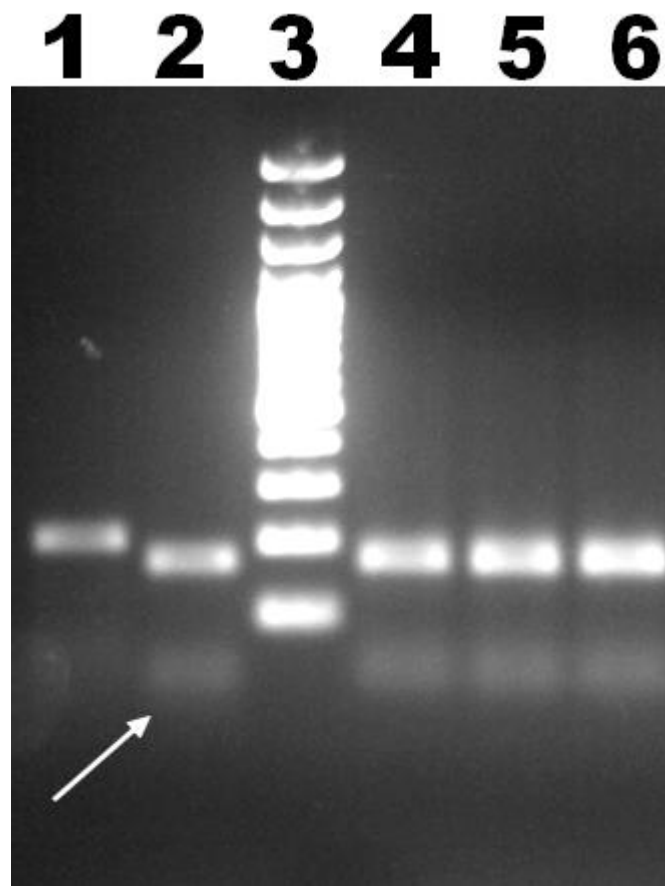


Figura 2.2. Gel de agarose (1,5%) mostrando o padrão de fragmentos após a digestão enzimática com *MspI* da amplificação do gene *Tpi*, o qual permite a diferenciação entre os haplótipos (1) *Tpi-R* (aproximadamente 203 pb) e (2) *Tpi-C* (com dois fragmentos de aproximadamente 170 e 30 pb) comparando ao (3) Gene Ruler 100 pb plus DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific). A seta indica o menor fragmento do haplótipo *Tpi-C* produzido após digestão. (4-6) Insetos identificados como *Tpi-C* após identificação visual. O gel foi corado com brometo de etídio ($0,5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) e fotografado sob luz UV.

2.3.2. Caracterização da suscetibilidade de raças de *S. frugiperda* a inseticidas de diferentes grupos químicos

A caracterização da suscetibilidade por meio de curvas de concentração-resposta das linhagens suscetíveis RC-Sus e C-Sus de *S. frugiperda* para os diferentes inseticidas testados indicou que as raças diferem na suscetibilidade para todos os inseticidas, com exceção de spinetoram, para o qual não houve diferença entre as CL_{50} . De modo geral, a CL_{50} da linhagem RC-Sus foi cerca de 1,5 a 2 vezes maior quando comparada à linhagem C-Sus, exceto para indoxacarbe, ao qual a linhagem C-Sus apresentou CL_{50} maior que RC-Sus (Tabela 2.3).

Para o inseticida methomyl, a raça híbrida RC-Sus apresentou valor de CL_{50} (IC 95%) maior que a milho C-Sus, sendo estes 17,50 (15,50 - 19,75) $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para RC-Sus e 8,13 (7,17 - 9,21) $\mu\text{g.mL}^{-1}$ C-Sus, com rejeição da hipótese de igualdade ($\chi^2 = 25,677$; $gl = 2$; $p < 0,05$) e aceitação de paralelismo ($\chi^2 = 0,068$; $gl = 1$; $p = 1$) entre os coeficientes angulares e interceptos entre as linhagens. Resultado semelhante foi observado para thiodicarb, onde os valores de CL_{50} foram 92,62 (78,83 - 108,81) $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para RC-Sus e 56,86 (48,05 - 67,28) $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para C-Sus, também havendo rejeição da hipótese de igualdade ($\chi^2 = 8,3$; $gl = 2$; $p < 0,05$) e aceitação de paralelismo ($\chi^2 = 0,051$; $gl = 1$; $p = 1$). Para o inseticida chlorpyrifos, a linhagem híbrida RC-Sus também apresentou maior valor de CL_{50} quando comparada à milho C-Sus, sendo estes 176,21 (158,49 - 195,91) $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e 90,19 (79,51 - 102,30) $\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente, com rejeição das hipóteses de igualdade ($\chi^2 = 42,324$; $gl = 2$; $p < 0,05$) e paralelismo ($\chi^2 = 8,67$; $gl = 1$; $p < 0,05$).

Para lambda-cyhalothrin, RC-Sus apresentou a maior CL_{50} de 6,02 (5,48 - 6,62) $\mu\text{g.mL}^{-1}$, enquanto que para C-Sus a concentração encontrada foi de 4,13 (3,66 - 4,65) $\mu\text{g.mL}^{-1}$, com rejeição da hipótese de igualdade ($\chi^2 = 9,219$; $gl = 2$; $p < 0,05$) e aceitação de paralelismo ($\chi^2 = 2,41$; $gl = 1$; $p = 0,106$). Para indoxacarb, C-Sus apresentou maior CL_{50} 3,43 (3,05 - 3,85) $\mu\text{g.mL}^{-1}$ comparada a RC-Sus 3,00 (2,72 - 3,31) $\mu\text{g.mL}^{-1}$, com aceitação das hipóteses de igualdade ($\chi^2 = 1,512$; $gl = 2$; $p = 0,265$) e de paralelismo ($\chi^2 = 0,522$; $gl = 1$; $p = 0,814$).

Para o inseticida spinetoram, os valores das CL_{50} obtidos não diferiram entre si, variando de 0,76 (0,67 - 0,88) $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para C-Sus e 1,01 (0,87 - 1,17) $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para RC-Sus, com rejeição da hipótese de igualdade ($\chi^2 = 3,36$; $gl = 2$; $p < 0,05$) e aceitação de paralelismo ($\chi^2 = 0,229$; $gl = 1$; $p = 0,986$). No caso do inseticida chlorantraniliprole, as linhagens RC-Sus e C-Sus apresentaram diferentes valores de CL_{50} , sendo estes 0,73 (0,64 - 0,83) $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e 0,49 (0,43 - 0,56) $\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente, onde a linhagem RC-Sus apresentou a maior, com rejeição da hipótese de igualdade ($\chi^2 = 6,715$; $gl = 2$; $p < 0,05$) e aceitação de paralelismo ($\chi^2 = 0,601$; $gl = 1$; $p = 0,796$). Para chlorfenapyr, a linhagem C-Sus também apresentou menor valor de CL_{50} 5,51 (4,87 - 6,22) $\mu\text{g.mL}^{-1}$ comparado a RC-Sus 9,13 (8,10 - 10,30) $\mu\text{g.mL}^{-1}$, havendo rejeição da hipótese de igualdade ($\chi^2 = 8,409$; $gl = 2$; $p < 0,05$) e aceitação de paralelismo ($\chi^2 = 0,159$; $gl = 1$; $p = 0,995$).

Por fim, para o inseticida methoxyfenozide, as linhagens RC-Sus e C-Sus apresentaram CL_{50} de 27,24 (24,78 - 29,94) e 19,44 (17,80 - 21,23) $\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente, sendo que RC-Sus apresentou CL_{50} significativamente maior, com rejeição da hipótese de igualdade ($\chi^2 = 12,362$; $gl = 2$; $p < 0,05$) e aceitação de paralelismo ($\chi^2 = 1,522$; $gl = 1$; $p =$

0,272). Para o inseticida teflubenzuron, foram encontradas as maiores diferenças, onde a linhagem RC-Sus apresentou CL_{50} aproximadamente 8 vezes maior que a da linhagem C-Sus (9,35 e 1,19 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente) (Tabela 2.3), com rejeição das hipóteses de igualdade ($\chi^2 = 195,085$; gl = 2; $p < 0,05$) e de paralelismo ($\chi^2 = 30,263$; gl = 1; $p < 0,05$).

Tabela 2.3. Suscetibilidade das raças híbrida (RC-Sus) e milho (C-Sus) de *S. frugiperda* a diferentes inseticidas.

MoA IRAC	Inseticida	Linhagem	n ¹	Coefficiente angular (\pm EPM ²)	CL ₅₀ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (IC 95%) ³	χ^2 (g.l.) ⁴
(1A)	Methomyl	RC-Sus	862	2,14 (\pm 0,13)	17,50 (15,50 - 19,75) a	6,96 (6)
		C-Sus	862	2,08 (\pm 0,13)	8,13 (7,17 - 9,21) b	7,48 (6)
(1B)	Thiodicarb	RC-Sus	1150	1,32 (\pm 0,07)	92,62 (78,83 - 108,81) a	8,53 (9)
		C-Sus	1052	1,35 (\pm 0,08)	56,86 (48,05 - 67,28) b	6,18 (8)
(3A)	Chlorpyrifos	RC-Sus	863	2,67 (\pm 0,16)	176,21 (158,49 - 195,91) a	3,43 (6)
		C-Sus	861	2,13 (\pm 0,13)	90,19 (79,51 - 102,30) b	4,40 (6)
(22A)	Lambda-cyhalothrin	RC-Sus	665	3,40 (\pm 0,23)	6,02 (5,48 - 6,62) a	7,36 (4)
		C-Sus	670	2,82 (\pm 0,21)	4,13 (3,66 - 4,65) b	3,58 (4)
(5)	Indoxacarb	RC-Sus	671	3,17 (\pm 0,22)	3,00 (2,72 - 3,31) b	3,79 (4)
		C-Sus	667	2,92 (\pm 0,20)	3,43 (3,05 - 3,85) a	4,66 (4)
(28)	Spinetoram	RC-Sus	758	2,08 (\pm 0,13)	1,01 (0,87 - 1,17) a	5,73 (5)
		C-Sus	756	1,97 (\pm 0,13)	0,76 (0,67 - 0,88) a	4,93 (5)
(13)	Chlorantraniliprole	RC-Sus	861	2,17 (\pm 0,13)	0,73 (0,64 - 0,83) a	5,93 (6)
		C-Sus	762	2,34 (\pm 0,15)	0,49 (0,43 - 0,56) b	6,96 (5)
(18)	Chlorfenapyr	RC-Sus	766	2,64 (\pm 0,16)	9,13 (8,10 - 10,30) a	8,60 (5)
		C-Sus	666	2,51 (\pm 0,18)	5,51 (4,87 - 6,22) b	6,08 (4)
(15)	Methoxyfenozide	RC-Sus	668	3,44 (\pm 0,25)	27,24 (24,78 - 29,94) a	4,24 (4)
		C-Sus	656	3,92 (\pm 0,28)	19,44 (17,80 - 21,23) b	4,44 (4)
(15)	Teflubenzuron	RC-Sus	766	3,21 (\pm 0,20)	9,35 (8,35 - 10,48) a	5,76 (5)
		C-Sus	859	1,98 (\pm 0,12)	1,19 (1,03 - 1,38) b	4,05 (6)

¹Número de insetos testados; ²Erro padrão da média; ³Concentração letal ($\mu\text{g i.a. mL}^{-1}$) do inseticida que causa a mortalidade de 50% das lagartas testadas; ⁴Valor do qui-quadrado (χ^2) calculado e grau de liberdade (g.l.). Valores de CL₅₀ seguidos de mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo *ratio test* ($p > 0,05$).

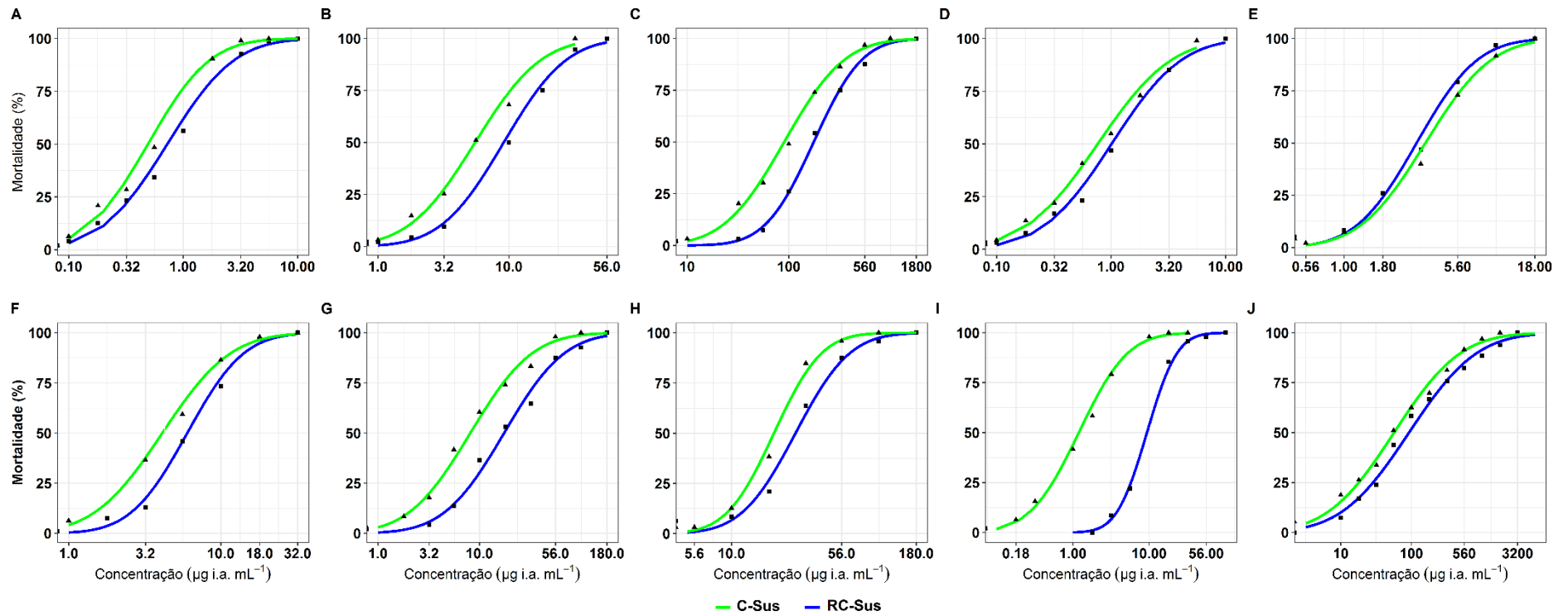


Figura 2.3. Curvas de concentração-mortalidade em escala logarítmica das linhagens suscetíveis das raças milho (C-Sus) e híbrida (RC-Sus) em 10 diferentes inseticidas: (A) Chlorantraniliprole, (B) Chlorfenapyr, (C) Chlorpyrifos, (D) Spinetoram, (E) Indoxacarb, (F) Lambda-cyhalothrin, (G) Methomyl, (H) Methoxyfenozide, (I) Teflubenzuron e (J) Thiodicarb.

2.3.3. Caracterização da resistência de raças de *S. frugiperda* a teflubenzuron

As variações nas curvas concentração-resposta das linhagens suscetíveis RC-Sus e C-Sus e resistentes RC-Res e C-Res de *S. frugiperda* ao inseticida teflubenzuron, podem ser observadas na Figura 2.3. A linhagem híbrida resistente RC-Res quando comparada a sua respectiva linhagem suscetível RC-Sus, apresentou CL_{50} significativamente maior e uma razão de resistência de 243,62 vezes, com rejeição das hipóteses de igualdade ($\chi^2 = 251,387$; gl = 2; $p < 0,05$) e também de paralelismo ($\chi^2 = 115,115$; gl = 1; $p < 0,05$) entre as linhagens. Por sua vez, a linhagem resistente milho C-Res também apresentou CL_{50} maior comparada a respectiva suscetível C-Sus, apresentou razão de resistência de 365,08 vezes (Tabela 2.4), com rejeição das hipóteses de igualdade ($\chi^2 = 236,95$; gl = 2; $p < 0,05$) e de paralelismo ($\chi^2 = 41,457$; gl = 1; $p < 0,05$). Enquanto que entre as linhagens resistentes, a linhagem híbrida RC-Res apresentou CL_{50} cerca de 5 vezes maior quando comparada a milho C-Res (2277,83 e 434,45 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente), com rejeição das hipóteses de igualdade ($\chi^2 = 25,255$; gl = 2; $p < 0,05$) e aceitação de paralelismo ($\chi^2 = 0,29$; gl = 1; $p = 0,987$).

Tabela 2.4. Concentração-mortalidade das linhagens suscetíveis (Sus) e resistentes (Res) das raças milho (C) e híbrida (RC) de *S. frugiperda* ao inseticida teflubenzuron.

Linhagem	n ¹	Coeficiente angular (\pm EPM ²)	CL_{50} (IC 95%) ³	χ^2 (g.l.) ⁴	RR ⁵
RC-Sus	766	3,21 (\pm 0,20)	9,35 (8,35 - 10,48) Ab	5,76 (5)	-
RC-Res	936	0,98 (\pm 0,07)	2277,83 (1799,13 – 2883,90) Aa	11,38 (7)	243,62
C-Sus	859	1,98 (\pm 0,12)	1,19 (1,03 - 1,38) Bb	4,05 (6)	-
C-Res	945	0,96 (\pm 0,06)	434,45 (331,48 – 569,41) Ba	12,62 (7)	365,08

¹Número de insetos testados; ²Erro padrão da média; ³Concentração letal ($\mu\text{g i.a.ml}^{-1}$) do inseticida que causa a mortalidade de 50% das lagartas testadas. Valores de CL_{50} seguidos de mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo *ratio test* ($p > 0,05$). Letras maiúsculas indicam comparação entre raças e letras minúsculas entre linhagens da mesma raça; ⁴Valor do qui-quadrado (χ^2) calculado e grau de liberdade (g.l.); ⁵Razão de resistência = CL_{50} linhagem resistente / CL_{50} linhagem suscetível.

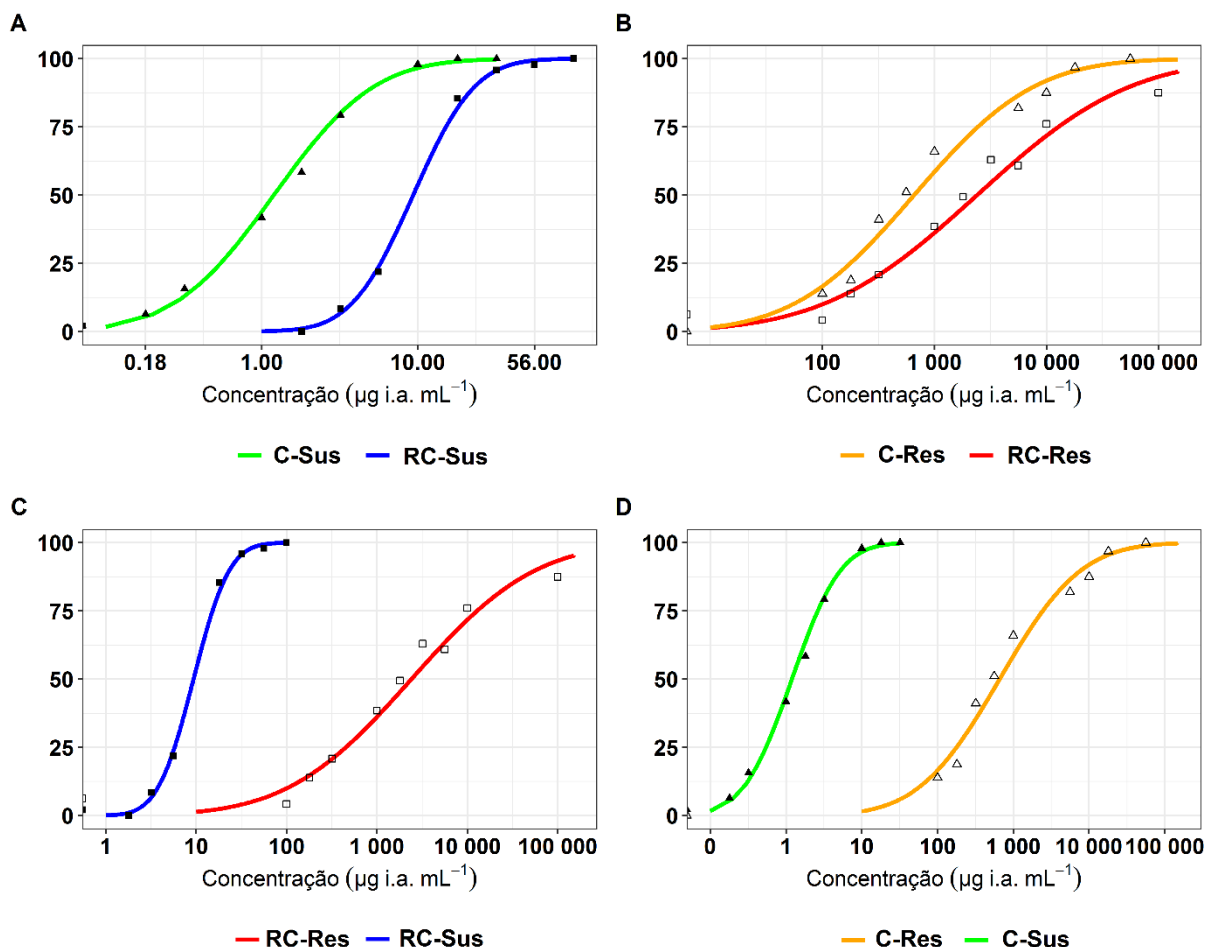


Figura 2.4. Curvas de concentração-resposta em escala logarítmica das raças milho (C) e híbrida (RC) suscetíveis (Sus) e resistentes (Res) ao inseticida teflubenzuron. Cada gráfico representa diferentes contrastes: (A) C-Sus e RC-Sus, (B) C-Res e RC-Res, (C) RC-Res e RC-Sus e (D) C-Res e C-Sus.

2.4. Discussão

Informações a respeito das possíveis implicações que as raças de *S. frugiperda* têm para o manejo da resistência ainda são incipientes. Neste estudo, foi conduzida a caracterização da suscetibilidade das raças milho e híbrida de *S. frugiperda* a diferentes inseticidas químicos, assim como a caracterização da resistência dessas mesmas raças ao inseticida teflubenzuron, demonstrando que elas respondem de forma distinta para a maioria dos inseticidas testados. Os resultados obtidos aqui indicam que as raças milho e híbrida apresentam diferenças nos padrões de suscetibilidade a inseticidas de diversos grupos químicos utilizados no manejo de *S. frugiperda*, sendo que a raça híbrida apresentou menor suscetibilidade para a maioria dos inseticidas testados. Os estudos disponíveis em literatura

tratando da caracterização de suscetibilidade e evolução da resistência a inseticidas nas raças de *S. frugiperda* são controversos e poucos explorados. Alguns estudos indicaram que lagartas da raça milho foram menos suscetíveis a cypermethrin, methyl parathion, methomyl, lambda-cyhalothrin, lufenuron e methoxyfenozide quando comparadas a lagartas da raça arroz (ADAMCZYK et al., 1997; BUSATO et al., 2006). Em outro caso, foi verificado que insetos coletados na cultura do arroz apresentaram evolução de resistência mais rápida à lambda-cyhalothrin e apresentam menor suscetibilidade a methomyl se comparados aos coletados em milho (RÍOS-DÍEZ; SALDAMANDO-BENJUMEA, 2011). Com relação a proteínas Bt, foi avaliado que as raças milho e híbrida foram mais tolerantes, especialmente a Cry1F, quando comparadas a raça arroz (INGBER et al., 2021; INGBER; MASON; FLEXNER, 2018). Em nosso estudo, a raça milho apresentou maior suscetibilidade aos inseticidas methomyl, lambda-cyhalothrin e methoxyfenozide.

Uma das principais diferenças entre os estudos relacionados a suscetibilidade de raças de *S. frugiperda* disponíveis na literatura e os resultados aqui apresentados recai sobre a variabilidade genética e fatores ambientais possivelmente associados aos insetos utilizados nos estudos. Nos trabalhos mencionados anteriormente utilizando inseticidas, a identificação da raça dos indivíduos foi feita apenas através do marcador mitocondrial, já que a descoberta de ocorrência de indivíduos “híbridos”, assim como a caracterização do marcador nuclear *Tpi* e a consolidação deste como ferramenta na identificação de raças foi mais recente (NAGOSHI, 2010; NAGOSHI et al., 2018). Desta forma, é desconhecida a identificação exata das raças utilizadas nesses estudos, a qual é obtida através da associação dos marcadores *COI* e *Tpi*, não sabendo então se os indivíduos das raças arroz e milho utilizados representavam “híbridos” ou uma linhagem “pura”. Além disso, as linhagens utilizadas nos estudos foram provenientes de diferentes hospedeiros e/ou localizações geográficas. No presente trabalho, as linhagens foram obtidas de uma mesma população, coletada no mesmo local e no mesmo hospedeiro, identificadas através da combinação dos marcadores *COI* e *Tpi* como raça híbrida e raça milho. Com isso, foi possível padronizar as pressões seletivas exercidas pelo ambiente, hospedeiro e táticas de controle empregadas, de forma a comparar a suscetibilidade apenas para o fator raça. Isso é importante pois planta hospedeira, condições ambientais e inseticidas, infligem pressões seletivas distintas e podem alterar a suscetibilidade do inseto a inseticidas (KARUPPAIAH; SRIVASTAVA; SUBRAMANIAN, 2016; OWUSU; CHITNIS; MÜLLER, 2017; XUE et al., 2010) e entomopatógenos (SHAURUB et al., 2016), por exemplo.

Todos os ingredientes ativos utilizados no presente estudo são indicados para o controle de *S. frugiperda*. Para teflubenzuron, a dose máxima recomendada em bula equivale a 9,5 µg.ia.mL, semelhante a CL₅₀ obtida para a linhagem RC-Sus (9,35 µg.ia.mL) e bem acima do valor da linhagem C-Sus (1,19 µg.ia.mL). Por outro lado, as CL₅₀ obtidas para as linhagens resistentes RC-Res e C-Res são muito superiores a dose de campo. Os experimentos conduzidos em laboratório otimizam o contato do inseticida com o inseto, dessa forma as doses não podem ser diretamente comparadas. A fim de se entender a aplicabilidade dos resultados aqui obtidos, deve-se futuramente investigar a suscetibilidade e resistência práticas em condições mais similares a do campo, utilizando pulverização foliar na planta.

A caracterização da resistência das linhagens resistentes a teflubenzuron, RC-Res e C-Res, também refletiu diferenças nos padrões toxicológicos. Estas apresentaram altos valores de CL₅₀, de aproximadamente 2300 µg i.a.ml⁻¹ para RC-Res e 430 µg i.a.ml⁻¹ para C-Res, resultando em razões de resistência de 244 e 365 vezes, respectivamente. Trabalhos prévios também relataram altos valores de CL₅₀ e razões de resistência a teflubenzuron em outra linhagem de *S. frugiperda* (NASCIMENTO et al., 2021) e *Chrysodeixis includens* (STACKE et al., 2020). As curvas de concentração-resposta representadas no gráfico da Figura 2.4, apresentaram um aspecto sigmoide para as linhagens suscetíveis RC-Sus e C-Sus, contudo, para as linhagens resistentes RC-Res e C-Res, as curvas apresentaram uma menor inclinação (coeficiente angular) devido a pequena diferença de mortalidade entre concentrações próximas. A baixa inclinação das curvas de concentração-resposta das linhagens resistentes reflete uma resposta heterogênea ao inseticida, enquanto que a inclinação das linhagens suscetíveis reflete uma resposta mais homogênea ao inseticida (ROBERTSON et al., 2016). De forma semelhante, a linhagem de *S. frugiperda* altamente resistente a teflubenzuron apresentou um baixo coeficiente angular na curva de concentração-mortalidade, indicando uma linhagem com resposta heterogênea ao mesmo inseticida em trabalho prévio (NASCIMENTO et al., 2021). Aqui, a linhagem híbrida (RC-Res) apresentou CL₅₀ cerca de 5 vezes maior que a linhagem milho (C-Res).

Os trabalhos recentes utilizando genômica e transcritômica em raças hospedeiras de *S. frugiperda* nos permitem associar modificações no padrão de suscetibilidade dessas raças a inseticidas. No genoma de indivíduos da raça milho, foi possível identificar um maior número de cópias de genes associados a quimiorrecepção, digestão e imunidade; enquanto que na raça arroz, genes associados a desintoxicação e digestão apresentavam maior número de cópias. Essas divergências existentes a nível molecular entre raças podem contribuir de forma

diferencial para a adaptação a xenobióticos naturais e sintéticos (GOUIN et al., 2017). Nesse cenário, o fato de as raças apresentarem diferentes números de genes ligados às vias de desintoxicação, poderia explicar a suscetibilidade diferencial aos inseticidas encontrada neste trabalho. Sendo assim, trabalhos posteriores a nível molecular deverão ser conduzidos para elucidar como a maquinaria celular em indivíduos de raças distintas atuam em processos adaptativos como evolução de resistência a inseticidas.

2.5. Conclusões

- A raça milho de *S. frugiperda* apresentou maior suscetibilidade que a raça híbrida para a maioria dos inseticidas testados;
- Houve resposta à pressão de seleção para resistência a teflubenzuron nas raças milho e híbrida de *S. frugiperda*, sendo que a linhagem resistente da raça híbrida apresentou CL_{50} cerca de 5 vezes maior que a da raça milho.

REFERÊNCIAS

- ADAMCZYK, J. J. et al. Susceptibility of fall armyworm collected from different plant hosts to selected insecticides and transgenic Bt cotton. **Journal of Cotton Science**, v. 1, n. 1, p. 21–28, 1997.
- BOLZAN, A. et al. Selection and characterization of the inheritance of resistance of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) to chlorantraniliprole and cross-resistance to other diamide insecticides. **Pest Management Science**, v. 75, n. 10, p. 2682–2689, 2019.
- BURTET, L. M. et al. Managing fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae), with Bt maize and insecticides in southern Brazil. **Pest Management Science**, v. 73, n. 12, p. 2569–2577, 2017.
- BUSATO, G. R. et al. Susceptibilidade de lagartas dos biótipos milho e arroz de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) a inseticidas com diferentes modos de ação. **Ciencia Rural**, v. 36, n. 1, p. 15–20, 2006.
- CARVALHO, R. A. et al. Investigating the Molecular Mechanisms of Organophosphate and Pyrethroid Resistance in the Fall Armyworm *Spodoptera frugiperda*. **PLoS ONE**, v. 8, n. 4, p. 1–11, 2013.

- 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, 2001.
- DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, v. 12, n. 1, p. 13–15, 1990.
- GOUIN, A. et al. Two genomes of highly polyphagous lepidopteran pests (*Spodoptera frugiperda*, Noctuidae) with different host-plant ranges. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1–12, 2017.
- GROOT, A. T. et al. Host strain specific sex pheromone variation in *Spodoptera frugiperda*. **Frontiers in Zoology**, v. 5, p. 1–13, 2008.
- HAENNIGER, S. et al. Sexual communication of *Spodoptera frugiperda* from West Africa: Adaptation of an invasive species and implications for pest management. **Scientific Reports**, p. 1–9, 2020.
- INGBER, D. A. et al. Oviposition preferences, Bt susceptibilities, and tissue feeding of fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) host strains. **Pest Management Science**, 2021.
- INGBER, D. A.; MASON, C. E.; FLEXNER, L. Cry1 Bt Susceptibilities of Fall Armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) Host Strains. **Journal of Economic Entomology**, v. 111, n. 1, p. 361–368, 2018.
- KARUPPAIAH, V.; SRIVASTAVA, C.; SUBRAMANIAN, S. Effect of Host Plants on Insecticide Susceptibility and Detoxification Enzymes Activity in *Spodoptera litura* Fabricius (Noctuidae: Lepidoptera). **Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences**, v. 86, n. 3, p. 715–721, 2016.
- KASTEN JR., P.; PRECETTI, A. A. C. M.; PARRA, J. R. P. Dados biológicos comparativos de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1979) em duas dietas artificiais e substrato natural. **Revista de Agricultura**, v. 53, p. 68–78, 1978.
- KUMAR, S. et al. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. **Molecular Biology and Evolution**, v. 35, n. 6, p. 1547–1549, 2018.
- LEVY, H. C.; GARCIA-MARUNIAK, A.; MARUNIAK, J. E. Strain Identification of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) Insects and Cell Line: PCR-RFLP of Cytochrome Oxidase C Subunit I Gene. **Florida Entomologist**, v. 85, n. 1, p. 186–190, 2002.

- LIMA, E. R.; MCNEIL, J. N. Female sex pheromones in the host races and hybrids of the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). **Chemoecology**, v. 19, n. 1, p. 29–36, 2009.
- MORAL, R. A.; HINDE, J.; DEMÉTRIO, C. G. B. Half-normal plots and overdispersed models in R: The hnp package. **Journal of Statistical Software**, v. 81, n. 10, 2017.
- MURARO, D. S. et al. Inheritance patterns, cross-resistance and synergism in *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) resistant to emamectin benzoate. **Pest Management Science**, v. Accepted A, 2021.
- NAGOSHI, R. N. The Fall Armyworm Triose Phosphate Isomerase (*Tpi*) Gene as a Marker of Strain Identity and Interstrain Mating. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 103, n. 2, p. 283–292, 2010.
- NAGOSHI, R. N. et al. Analysis of strain distribution, migratory potential, and invasion history of fall armyworm populations in northern Sub-Saharan Africa. **Scientific Reports**, v. 8, 2018.
- NAGOSHI, R. N. Evidence that a major subpopulation of fall armyworm found in the Western Hemisphere is rare or absent in Africa, which may limit the range of crops at risk of infestation. **PLoS ONE**, v. 14, n. 4, p. 1–18, 2019.
- NAGOSHI, R. N. et al. Genetic comparisons of fall armyworm populations from 11 countries spanning sub-Saharan Africa provide insights into strain composition and migratory behaviors. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1–11, 2019.
- NASCIMENTO, A. R. B. et al. There is more than chitin synthase in insect resistance to benzoylureas: Molecular markers associated with teflubenzuron resistance in *Spodoptera frugiperda*. **Journal of Pest Science**, 2021.
- 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, 2016.
- OKUMA, D. M. et al. Inheritance and fitness costs of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) resistance to spinosad in Brazil. **Pest Management Science**, 2017.
- OWUSU, H. F.; CHITNIS, N.; MÜLLER, P. Insecticide susceptibility of *Anopheles mosquitoes* changes in response to variations in the larval environment. **Scientific Reports**, n. May, p. 1–9, 2017.
- PASHLEY, D. P. Host-associated Genetic Differentiation in Fall Armyworm (Lepidoptera: Noctuidae): A Sibling Species Complex? **Annals of the Entomological Society of America**, v. 79, n. 3, p. 898–904, 1986.

- PASHLEY, D. P. Quantitative Genetics, Development and Physiological Adaptation in Host Strains of Fall Armyworm. **Evolution**, v. 42, n. 1, p. 93, 1988.
- PASHLEY, D. P.; HARDY, T. N.; HAMMOND, A. M. Host effects on development and reproductive traits in fall armyworm strains (Lepidoptera: Noctuidae). **Annals of the Entomological Society of America**, v. 88, n. 6, p. 748–755, 1995.
- PASHLEY, D. P.; JOHNSON, S. J.; SPARKS, A. N. Genetic Population Structure of Migratory Moths: The Fall Armyworm (Lepidoptera: Noctuidae). **Annals of the Entomological Society of America**, v. 78, n. 6, p. 756–762, 1985.
- POPHAM, H. J. R.; ROWLEY, D. L.; HARRISON, R. L. Differential insecticidal properties of *Spodoptera frugiperda* multiple nucleopolyhedrovirus isolates against corn-strain and rice-strain fall armyworm, and genomic analysis of three isolates. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 183, n. July 2020, p. 107561, 2021.
- PROWELL, D. P.; MCMICHAEL, M.; SILVAIN, J.-F. Multilocus Genetic Analysis of Host Use, Introgression, and Speciation in Host Strains of Fall Armyworm (Lepidoptera: Noctuidae). **Annals of the Entomological Society of America**, v. 97, n. 5, p. 1034–1044, 2004.
- RÍOS-DÍEZ, J. D.; SALDAMANDO-BENJUMEA, C. I. Susceptibility of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) Strains From Central Colombia to Two Insecticides, Methomyl and Lambda-Cyhalothrin: A Study of the Genetic Basis of Resistance. **Journal of Economic Entomology**, v. 104, n. 5, p. 1698–1705, 2011.
- ROBERTSON, J. L. et al. **Bioassays with Arthropods**. 3rd. ed. New York: CRC Press, 2016.
- SCHÖFL, G.; HECKEL, D. G.; GROOT, A. T. Time-shifted reproductive behaviours among fall armyworm (Noctuidae: *Spodoptera frugiperda*) host strains: Evidence for differing modes of inheritance. **Journal of Evolutionary Biology**, v. 22, n. 7, p. 1447–1459, 2009.
- SHAURUB, E. H. et al. Mortality and nematode production in *Spodoptera littoralis* larvae in relation to dual infection with *Steinernema riobrave*, *Heterorhabditis bacteriophora*, and *Beauveria bassiana*, and the host plant. **Biological Control**, v. 103, p. 86–94, 2016.
- SILVA-BRANDÃO, K. L. et al. Transcript expression plasticity as a response to alternative larval host plants in the speciation process of corn and rice strains of *Spodoptera frugiperda*. **BMC Genomics**, v. 18, n. 1, p. 1–15, 2017.
- SILVA-BRANDÃO, K. L. et al. Transcriptome differential co-expression reveals distinct molecular response of fall-armyworm strains to DIMBOA. **Pest Management Science**, 2020.

- SPARKS, T. C.; NAUEN, R. IRAC: Mode of action classification and insecticide resistance management. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 121, p. 122–128, 2015.
- STACKE, R. F. et al. Field-evolved resistance to chitin synthesis inhibitor insecticides by soybean looper, *Chrysodeixis includens* (Lepidoptera: Noctuidae), in Brazil. **Chemosphere**, v. 259, p. 1–8, 2020.
- SUN, R. et al. Benzoylurea Chitin Synthesis Inhibitors. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 63, n. 31, p. 6847–6865, 2015.
- UNBEHEND, M. et al. Pheromonal Divergence Between Two Strains of *Spodoptera frugiperda*. **Journal of Chemical Ecology**, v. 39, n. 3, p. 364–376, 2013.
- VEENSTRA, K. H.; PASHLEY, D. P.; OTTEA, J. A. Host-Plant Adaptation in Fall Armyworm Host Strains: Comparison of Food Consumption, Utilization, and Detoxication Enzyme Activities. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 88, n. 1, p. 80–91, 1995.
- VENABLES, W. N.; RIPLEY, B. D. **Modern Applied Statistics with S**. 4. ed. New York: Springer, 2002.
- WHEELER, M. W.; PARK, R. M.; BAILER, A. J. Comparing median lethal concentration values using confidence interval overlap or ratio tests. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 25, n. 5, p. 1441–1444, 2006.
- XUE, M. et al. Effects of four host plants on susceptibility of *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae) larvae to five insecticides and activities of detoxification esterases. **Pest Management Science**, v. 66, p. 1273–1279, 2010.

3. AVALIAÇÃO DO CUSTO ADAPTATIVO ASSOCIADO À RESISTÊNCIA A TEFLUBENZURON EM RAÇAS DE *Spodoptera frugiperda* (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE)

RESUMO

O custo adaptativo associado à resistência a inseticidas pode ser explorado para promover estratégias mais efetivas de manejo da resistência. Com a seleção e caracterização da resistência a teflubenzuron em raças milho e híbrida de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith), o objetivo do presente trabalho foi investigar o custo adaptativo associado à resistência, mediante avaliação de diferentes parâmetros biológicos e construção da tabela de vida de fertilidade com as larvas alimentando-se de folhas de milho. Para tanto, foram utilizadas as linhagens resistentes a teflubenzuron (Res), suscetíveis (Sus) e heterozigotas (H1: ♀Res♂Sus e H2: ♀Sus♂Res) das raças milho (C) e híbrida (RC). A viabilidade da fase de ovo foi menor para ambas as linhagens resistentes RC-Res e C-Res. A viabilidade da fase de larva foi reduzida somente para a linhagem C-Res. A fecundidade de fêmeas resistentes foi menor para ambas as raças. O custo adaptativo relativo encontrado foi semelhante para as linhagens resistentes de ambas as raças, sendo 0,78 para C-Res e 0,76 para RC-Res. Os heterozigotos de ambas as raças apresentaram custo adaptativo relativo semelhante às respectivas linhagens suscetíveis. Esses resultados demonstram que há custo adaptativo associado à resistência de *S. frugiperda* a teflubenzuron e o fator raça não influencia na magnitude do custo adaptativo. As informações aqui relatadas podem ser exploradas em programas de manejo da resistência de *S. frugiperda* a teflubenzuron.

Palavras-chave: Lagarta-do-cartucho; Raças; Benzoilureias; Custo adaptativo; Resistência de insetos

ABSTRACT

The fitness cost associated to insecticide resistance can be explored to promote effective resistance management strategies. With selection and characterization of the resistance to teflubenzuron in *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) corn and hybrid host-strains, the objective of the present work was to investigate the fitness cost associated with resistance, by evaluating different biological parameters and fertility life tables of larvae feeding on maize leaves. For that purpose, it was used resistant (Res), susceptible (Sus) and heterozygous strains (H1: ♀Res♂Sus and H2: ♀Sus♂Res) for the insecticide teflubenzuron, from both corn (C) and hybrid (RC) strains. The survival of the egg stage was lower for both resistant strains RC-Res and C-Res. The survival of the larval stage was reduced only for C-Res. The fecundity of resistant females was lower for both host-strains. The relative fitness cost found was similar to both resistant strains with values of 0.78 for C-Res and 0.76 for RC-Res. The heterozygotes from both host-strains presented relative fitness similar to the respective susceptible strain. These results showed that there is fitness cost associated to teflubenzuron resistance in *S. frugiperda* and the host-strain factor did not affect the magnitude of the fitness cost. The information reported here can be exploited in resistance management strategies of *S. frugiperda* to teflubenzuron.

Key words: Fall armyworm; Host- strains; Benzoylureas; Fitness cost; Insect resistance

3.1. Introdução

A resistência de insetos a táticas de controle é um grande problema na agricultura, e cada vez mais vem preocupando os agricultores, pesquisadores e as empresas detentoras de tecnologia (SPARKS et al., 2021). A resistência é uma característica adaptativa na qual uma gama de genes é favoravelmente selecionada, possibilitando assim a sobrevivência e reprodução do inseto após a exposição a inseticidas (TABASHNIK et al., 2014). O custo adaptativo existe quando a evolução da resistência a um inseticida vem acompanhada de uma desvantagem biológica significativa, a qual reduz a adaptação do inseto resistente comparado a sua respectiva linhagem suscetível na ausência da pressão de seleção (KLIOT; GHANIM, 2012). Desta forma, determinar se há custo associado à resistência pode auxiliar na compreensão da dinâmica da resistência ao longo do tempo, e assim planejar estratégias mais assertivas no contexto do manejo da resistência de insetos (MRI).

O controle de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) em campo tem sido feito principalmente mediante o uso de tecnologias Bt e/ou aplicações de inseticidas de diferentes modos de ação. Dentre os inseticidas utilizados para o controle desta praga, encontram-se os que agem sob o crescimento e desenvolvimento, como os inibidores da biossíntese de quitina, também denominados de benzoilureias. A resistência a benzoilureias já foi documentada em *S. frugiperda* (NASCIMENTO et al., 2021, 2016).

O custo adaptativo associado a resistência de *S. frugiperda* já foi relatado para diversos inseticidas (GARLET et al., 2021; OKUMA et al., 2017) e proteínas Bt (CHEN et al., 2019; HORIKOSHI et al., 2016; JAKKA; KNIGHT; JURAT-FUENTES, 2014). Além disso, trabalhos prévios já caracterizaram o custo adaptativo das raças de *S. frugiperda* quando mantidas em diferentes dietas e plantas hospedeiras (ORSUCCI et al., 2020; SILVA-BRANDÃO et al., 2017, 2020). Até o momento nenhum estudo foi conduzido para avaliar os possíveis custos adaptativos da resistência de *S. frugiperda* a benzoilureias.

O custo adaptativo pode ser quantificado de diversas formas, sendo as mais comuns mediante a avaliação da taxa de reversão da resistência na população ou pela observação de alterações em aspectos biológicos como reprodução, desenvolvimento e comportamento (KLIOT; GHANIM, 2012). Esses experimentos são comumente realizados mediante comparação de parâmetros de tabela de vida de fertilidade entre linhagens suscetível,

resistente e heterozigotas. Neste caso, é de grande importância que as linhagens a serem avaliadas apresentem componente genético o mais semelhante possível, de forma a se atribuir quaisquer diferenças biológicas a ausência ou presença dos alelos da resistência apenas, visto que o componente genético pode influenciar no custo adaptativo da resistência (RAYMOND; WRIGHT; BONSALL, 2011).

Com a seleção e caracterização da resistência a teflubenzuron em raças milho e híbrida de *S. frugiperda* a partir de uma mesma população (Capítulo 2), o presente trabalho objetivou investigar o custo adaptativo associado à resistência em raças milho e híbrida de *S. frugiperda*, mediante avaliação de diferentes parâmetros biológicos e construção da tabela de vida de fertilidade.

3.2. Material e métodos

3.2.1. Insetos

No presente estudo foram utilizadas as linhagens suscetíveis RC-Sus (raça híbrida suscetível) e C-Sus (raça milho suscetível), assim como as respectivas resistentes a teflubenzuron RC-Res (razão de resistência de 243,62 vezes) e C-Res (razão de resistência de 365,08 vezes) (Capítulo 2). Essas linhagens resistentes e suscetíveis, que vinham sendo criadas em dieta artificial há 36 gerações, foram transferidas para alimentação em folhas de milho não-Bt (híbrido 3700 RR2, Bayer, Uberlândia, MG, Brasil) por uma geração antes da condução dos experimentos, de forma a fornecer tempo de adaptação à mudança de dieta. As pupas destes insetos alimentados em folhas de milho, foram individualizadas em copos plásticos de 50 mL, em bandejas (de acordo com a linhagem) forradas com papel filtro umedecido com água destilada para manutenção da umidade. As bandejas foram mantidas em sala climatizada com temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$, umidade relativa de $70 \pm 10\%$ e fotofase de 14h. Após a emergência de cada adulto, foi feita a aferição do sexo e a montagem das linhagens de cada raça foi conduzida em gaiolas de tubos de PVC (23 cm de altura \times 10 cm diâmetro), revestidas internamente com papel jornal como substrato para a oviposição. Os adultos foram alimentados com uma solução de mel a 10% embebida em algodão. O revestimento de cada gaiola foi substituído diariamente para retirada das posturas. Neste experimento foram utilizadas as linhagens: RC-Sus (raça híbrida suscetível), C-Sus (raça milho suscetível), RC-Res (raça híbrida resistente a teflubenzuron), C-Res (raça milho

resistente a teflubenzuron), RC-H1 (raça híbrida heterozigota 1 do cruzamento ♀ RC-Res x ♂ RC-Sus), C-H1 (raça milho heterozigota 1 do cruzamento ♀ C-Res x ♂ C-Sus), RC-H2 (raça híbrida heterozigota 2 do cruzamento ♀ RC-Sus x ♂ RC-Res) e C-H2 (raça milho heterozigota 2 do cruzamento ♀ C-Sus x ♂ C-Res).

3.2.2. Biologia de linhagens suscetíveis, resistentes e heterozigotas de *S. frugiperda*

Os experimentos de custo adaptativo foram conduzidos em milho não-Bt (híbrido 3700 RR2, Bayer, Uberlândia, MG, Brasil), sendo utilizada para os experimentos folhas coletadas entre os estágios fenológicos V4 e V8. As plantas de milho foram cultivadas em vasos de 12L contendo duas partes de solo e uma de substrato, mantidas em casa de vegetação. Para os experimentos foram utilizadas placas de 16 células (Advento do Brasil, Diadema, SP, Brasil) contendo meio ágar-água 2,5%, papel filtro e pedaços de folhas de milho, sendo estas substituídas diariamente por folhas frescas recém-coletadas. Em cada célula foi alocada uma lagarta neonata (< 24h de idade), nas quais permaneceram até atingirem o quinto instar larval. Em seguida, as lagartas foram transferidas para novas placas, dessa vez contendo vermiculita expandida (1/4 de volume da célula), papel filtro e folhas de milho até o desenvolvimento da fase pupal. As pupas com 24h de idade foram então individualizadas em copos plásticos de 50 mL até a emergência do adulto, onde foi feita a aferição do sexo. Para cada linhagem foram utilizadas 20 placas (repetições), totalizando 320 indivíduos testados por linhagem. As placas foram mantidas em câmaras climatizadas com temperatura de 25 ± 2 °C, umidade relativa de $70 \pm 10\%$ e fotofase de 14h.

Foram avaliados diferentes parâmetros biológicos para a construção de tabela de vida de fertilidade, utilizando como parâmetros o tempo de desenvolvimento e viabilidade das fases de ovo, larva e pupa, peso da pupa com 24h de idade, razão sexual, longevidade de adultos, duração do período de oviposição (assim como pré- e pós-), fecundidade e fertilidade. A longevidade de adultos e duração do período de oviposição (pré- e pós-), fecundidade e fertilidade foram avaliadas a partir da formação de 20 casais (macho e fêmea virgens 24h pós-emergência) de cada linhagem por tratamento em gaiolas de tubos de PVC (23 cm de altura × 10 cm diâmetro), revestidas internamente com papel jornal como substrato para a oviposição. Os adultos foram alimentados com uma solução de mel a 10% embebida em algodão. A solução de mel e o revestimento de cada gaiola foram substituídos diariamente e o número de ovos de todas as posturas foi contabilizado. Da segunda postura de cada casal, foram

separados 100 ovos em copos plásticos de 100 mL com tampa, contendo um pedaço de um papel filtro umedecido para a determinação do período embrionário e a viabilidade dos ovos. O número de lagartas neonatas eclodidas foi aferido diariamente. Todos os parâmetros biológicos foram determinados a partir de observações diárias. Todo experimento foi conduzido em salas climatizadas com temperatura de 25 ± 2 °C, umidade relativa de $70 \pm 10\%$ e fotofase de 14h

3.2.3. Análise estatística

Os dados obtidos nos experimentos foram analisados utilizando GLM de acordo com a distribuição de cada dado. Os dados relativos à duração das fases biológicas, peso de pupa e longevidade de adultos foram adequados a distribuição Gaussiana; as taxas de viabilidade das fases biológicas foram adequadas a distribuição quase-binomial; os dados de razão sexual foram adequados a distribuição binomial; por fim, os de fecundidade e períodos de pré-, oviposição e pós- de fêmeas foram adequados a distribuição quase-Poisson. O ajuste ao modelo escolhido foi verificado utilizando o pacote *hnp* (MORAL et al., 2017). Foram confeccionadas tabelas de vida de fertilidade para estimar o tempo médio de uma geração (T), a taxa líquida de reprodução (R_0), a taxa intrínseca de crescimento (r_m) e a taxa finita de aumento (λ) através do procedimento *lifetable.r* (MAIA et al., 2014). Foi realizada análise de variância ANOVA 2-fatores, para verificar o efeito de cada fator (raça, linhagem) e sua interação para cada parâmetro avaliado, considerando a linhagem (Sus – suscetível, H1 – heterozigoto 1, H2 – heterozigoto 2 e Res – resistente) e a raça (RC – híbrida e C – milho) como variáveis independentes. As médias foram comparadas através do pacote *lsmeans*, e as diferenças estatísticas determinadas utilizando o ajuste de Tukey ($\alpha=0,05$). Os gráficos foram gerados com o uso do pacote *ggplot2*. Todas as análises estatísticas foram conduzidas no software R (R Core Team, 2020). O custo adaptativo relativo foi também calculado de acordo com o método proposto por (BIRD, 2020):

$$\text{Custo adaptativo relativo } (w) = r_m (\text{Res}, H1, H2) \div r_m (\text{Sus})$$

onde r_m representa o valor da taxa intrínseca de crescimento e as linhagens Res (resistente a teflubenzuron), H1 (heterozigota 1: cruzamento ♀ Res x ♂ Sus), H2 (heterozigota 2: cruzamento ♀ Sus x ♂ Res) e Sus (suscetível a teflubenzuron). Os valores de custo adaptativo

relativo (w) foram obtidos de forma separada para cada raça, sendo o valor de cada linhagem (Res, H1 ou H2) obtidos em relação a respectiva linhagem suscetível (Sus) da mesma raça. De forma padrão, para as linhagens suscetíveis (Sus), $w = 1$.

3.3. Resultados

3.3.1. Duração das fases biológicas

Os efeitos dos fatores raça, linhagem e interação não foram significativos no parâmetro duração da fase de ovo ($F = 0,28$; $gl = 1$; 154; $P = 0,59$ para raça, $F = 0,76$; $gl = 3$; 155; $P = 0,52$ para linhagem; $F = 0,61$; $gl = 3$; 151; $P = 0,61$ para interação). A média da duração da fase de ovo foi de 3,05 a 3,15 dias em todas as linhagens avaliadas (Figura 3.1).

A duração do estágio larval foi afetada pelos fatores raça, linhagem e interação ($F = 12,32$; $gl = 1$; 153; $P < 0,05$ para raça, $F = 19,71$; $gl = 3$; 154; $P < 0,001$ para linhagem e $F = 5,69$; $gl = 3$; 150; $P = 0,001$ para a interação). A maior duração deste período foi de 18,23 dias encontrada na linhagem RC-Res, aproximadamente 1,5 dia mais longa que as demais linhagens da raça híbrida. Por outro lado, as linhagens RC-Res e C-Res não diferiram entre si (18,23 e 18,09, respectivamente). A raça milho apresentou maior duração da fase larval para as linhagens C-Sus (18,23) e C-H2 (18,10), diferindo estatisticamente das linhagens RC-Sus (16,91) e RC-H2 (17,20) da raça híbrida (Figura 3.1).

O efeito da linhagem na duração do tempo de pupa não foi significativo ($F = 1,28$; $gl = 3$; 155; $P = 0,29$). De forma contrária, os efeitos da raça e da interação foram todos significativos ($F = 73,25$; $gl = 1$; 154; $P < 0,001$ para raça e $F = 3,53$; $gl = 3$; 151; $P = 0,017$ para a interação). Diferenças na duração do período pupal entre raças foi observada para todas as linhagens, sendo que a raça híbrida apresentou em média 1,5 dias a mais nesta fase (Figura 3.1).

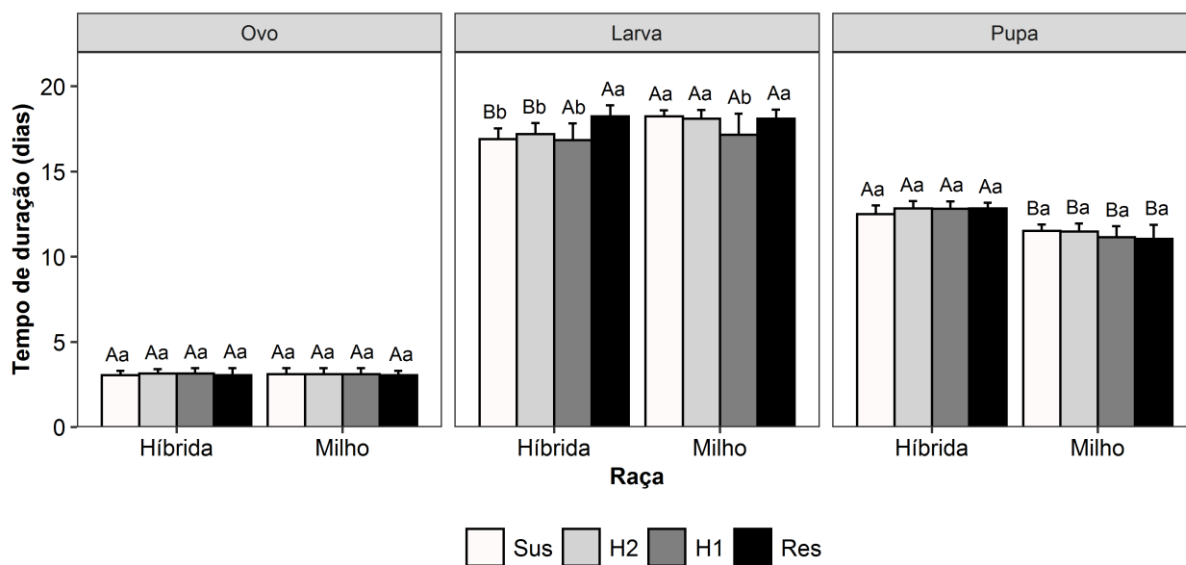


Figura 3.1. Tempo de duração das fases biológicas de ovo, larva e pupa das linhagens suscetível (Sus), heterozigotas (H1 e H2) e resistente (Res) a teflubenzuron das raças híbrida (RC) e milho (C) de *S. frugiperda*. Grupos de barras (\pm DP) seguidos de mesma letra não diferem significativamente entre si (Tukey; $p > 0,05$). Letras maiúsculas indicam comparação entre raças e letras minúsculas entre linhagens.

3.3.2. Sobrevivência das fases biológicas

O efeito da linhagem no parâmetro viabilidade da fase de ovo foi significativo ($F = 12,80$; $gl = 3$; 155 ; $P < 0,001$). Por outro lado, o efeito da raça e da interação não foram significativos neste mesmo parâmetro avaliado ($F = 0,31$; $gl = 1$; 154 ; $P = 0,58$ para linhagem e $F = 0,04$; $gl = 3$; 151 ; $P = 0,99$ para a interação).

As maiores viabilidades foram encontradas nas linhagens RC-H1 (95%), C-H1 (98%), RC-H2 (88%) e C-H2 (91%), enquanto as nas linhagens RC-Res e C-Res (38 e 45%, respectivamente), apresentaram as menores viabilidades (Figura 3.2).

O efeito da raça, linhagem e da interação foram todos significativos no parâmetro viabilidade da fase larval ($F = 9,10$; $gl = 3$; 155 ; $P < 0,001$ para linhagem, $F = 4,75$; $gl = 1$; 154 ; $P = 0,03$ para raça e $F = 37,18$; $gl = 3$; 151 ; $P < 0,001$ para a interação). A menor viabilidade nesta fase foi encontrada na linhagem C-Res (33%), diferindo das demais linhagens da mesma raça e também da RC-Res (69%). Para a raça híbrida, a menor viabilidade foi encontrada na linhagem RC-Sus (52%). Todas as quatro linhagens heterozigotas apresentaram viabilidade superior a 60% na fase larval (Figura 3.2).

Por fim, para o parâmetro viabilidade da fase de pupa, o fator linhagem não foi significativo ($F = 0,68$; $gl = 3$; 154 ; $P = 0,56$), enquanto que o fator raça e a interação foram

significativos ($F = 6,25$; $gl = 1$; 153 ; $P = 0,013$ para raça e $F = 8,11$; $gl = 3$; 150 ; $P < 0,001$ para a interação). Para a raça milho, a menor viabilidade foi encontrada em C-Res (73%) e a maior em C-Sus (91%), enquanto que na raça arroz a menor e maior viabilidades foram encontradas em RC-Sus (79%) e RC-H2 (92%), respectivamente. Todas as linhagens, de ambas as raças, apresentaram alta viabilidade (>73%) nesta fase (Figura 3.2).

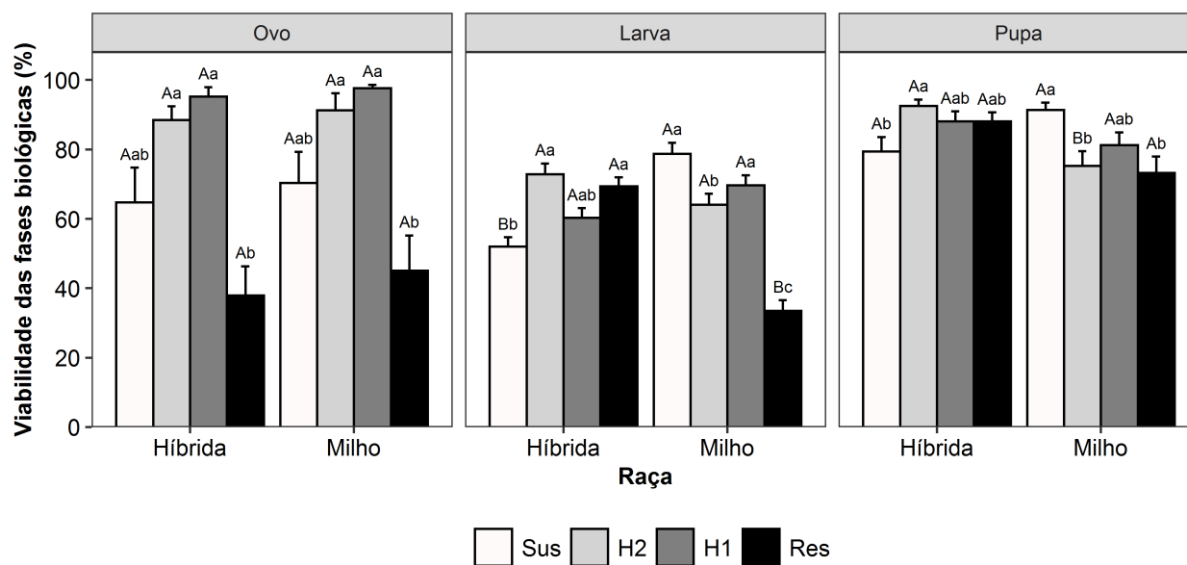


Figura 3.2. Viabilidade das fases biológicas de ovo, larva e pupa das linhagens suscetível (Sus), heterozigotas (H1 e H2) e resistente (Res) a teflubenzuron das raças híbrida (RC) e milho (C) de *S. frugiperda*. Grupos de barras (\pm EP) seguidos de mesma letra não diferem significativamente entre si (Tukey; $p > 0,05$). Letras maiúsculas indicam comparação entre raças e letras minúsculas entre linhagens.

3.3.3. Peso de pupa

No parâmetro peso de pupa de fêmeas com 24h, os efeitos dos fatores linhagem e raça foram significativos ($F = 16,36$; $gl = 3$; 148 ; $P < 0,001$ para linhagem; $F = 13,52$; $gl = 1$; 151 ; $P < 0,001$ para raça), sendo que a interação destes fatores não foi significativa ($F = 2,32$; $gl = 3$; 144 ; $P = 0,08$). Os menores pesos foram encontrados em C-Res (175,7 mg) e RC-Res (180,6 mg), não diferindo entre si e entre as respectivas suscetíveis, enquanto que os maiores valores foram encontrados nas linhagens heterozigotas de ambas as raças, as quais foram de 10 a 20 mg mais pesadas.

Com relação ao parâmetro peso de pupa de machos com 24h, o efeito do fator linhagem foi significativo ($F = 6,75$; $gl = 3$; 151 ; $P < 0,001$), porém, os efeitos da raça e da

interação não foram significativos ($F = 0,84$; $gl = 1$; 150 ; $P = 0,36$ para raça; $F = 0,71$; $gl = 3$; 147 ; $P = 0,55$ para a interação). Neste sexo, os menores pesos foram encontrados em C-Sus (190,2 mg) e RC-Sus (185,5 mg), as quais não diferiram entre si e entre as respectivas linhagens resistentes (Tabela 3.1).

3.3.4. Razão sexual

Os efeitos dos fatores linhagem, raça e a interação não foram significativos no parâmetro razão sexual ($F = 2,1049$; $gl = 3$; 154 ; $P = 0,09727$ para linhagem, $F = 0,8087$; $gl = 1$; 153 ; $P = 0,36851$ para raça e $F = 1,7517$; $gl = 3$; 150 ; $P = 0,15405$ para a interação). Todas as linhagens, de ambas as raças, apresentaram razão sexual próxima de 0,5 (Tabela 3.1).

Tabela 3.1. Peso de pupa com 24h e razão sexual das linhagens suscetível (Sus), heterozigotas (H1 e H2) e resistente (Res) a teflubenzuron das raças híbrida (RC) e milho (C) de *S. frugiperda*.

Raça-Linhagem	Peso de pupa (mg)		Razão sexual
	Fêmeas	Machos	
C-Res	175,7 ± 4,3 Ab	191,8 ± 5,4 Ab	0,56 ± 0,07 Aa
C-Sus	176,5 ± 2,3 Ab	190,2 ± 2,5 Ab	0,49 ± 0,03 Aa
C-H1	193,6 ± 2,9 Aa	198,7 ± 3,2 Aab	0,48 ± 0,04 Aa
C-H2	188,8 ± 2,5 Bab	208,3 ± 3,9 Aa	0,55 ± 0,05 Aa
RC-Res	180,6 ± 3,1 Ac	195,9 ± 3,1 Aab	0,45 ± 0,03 Aa
RC-Sus	187,7 ± 4,0 Abc	185,5 ± 2,8 Ab	0,52 ± 0,05 Aa
RC-H1	194,1 ± 3,5 Aab	194,4 ± 2,8 Aab	0,44 ± 0,04 Aa
RC-H2	204,7 ± 2,5 Aa	206,7 ± 2,9 Aa	0,55 ± 0,03 Aa

^aMédias de cada coluna (\pm EP) seguidas de mesma letra não diferem significativamente entre si (Tukey; $p > 0,05$). Letras maiúsculas indicam comparação entre raças e letras minúsculas entre linhagens.

3.3.5. Fecundidade

Os efeitos da linhagem, da raça e da interação foram todos significativos no parâmetro número de ovos por fêmea ($F = 20,26$; $gl = 3$; 116 ; $P < 0,001$ para linhagem, $F = 8,69$; $gl = 1$; 115 ; $P = 0,004$ para raça e $F = 3,68$; $gl = 3$; 112 ; $P = 0,014$ para a interação). As quatro linhagens heterozigotas apresentaram a maior média de total de ovos por fêmea,

variando de 1821 a 2302 ovos, não diferindo entre si. Entre as linhagens suscetíveis, a RC-Sus apresentou maior número de ovos comparada à C-Sus (2150 ovos e 1485 ovos, respectivamente). De forma geral, houve uma grande redução no número médio de ovos depositados por fêmeas das linhagens resistentes RC-Res (1101 ovos) e C-Res (1324 ovos) (Figura 3.3).

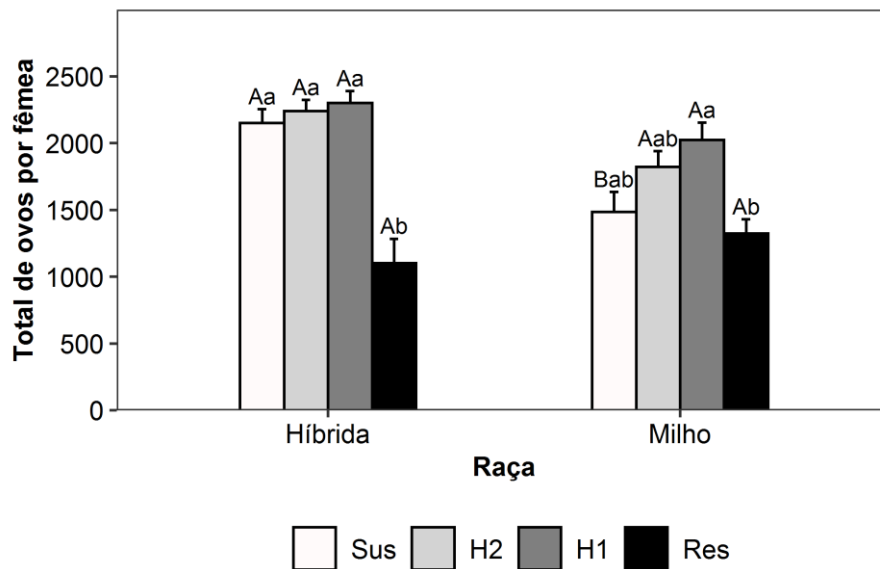


Figura 3.3. Fecundidade de fêmeas das linhagens suscetível (Sus), heterozigotas (H1 e H2) e resistente (Res) a teflubenzuron das raças híbrida (RC) e milho (C) de *S. frugiperda*. Grupos de barras (\pm EP) seguidos de mesma letra não diferem significativamente entre si (Tukey; $p > 0,05$). Letras maiúsculas indicam comparação entre raças e letras minúsculas entre linhagens.

3.3.6. Períodos de pré-oviposição, oviposição e pós-oviposição

Para o parâmetro período de pré-oviposição, os efeitos da linhagem não foram significativos ($F = 0,67$; $gl = 3$; 151 ; $P = 0,57$), por outro lado, a raça ($F = 60,26$; $gl = 1$; 150 ; $P < 0,001$) e interação ($F = 4,22$; $gl = 3$; 147 ; $P = 0,007$) foram significativos. De forma geral, as linhagens da raça híbrida apresentaram períodos de pré-oviposição mais extensos quando comparadas a raça milho (Tabela 3.2).

Os efeitos da linhagem, raça e da interação foram todos significativos para o período de oviposição ($F = 10,92$; $gl = 3$; 151 ; $P < 0,001$ para a linhagem, $F = 37,98$; $gl = 1$; 150 ; $P < 0,001$ para raça e $F = 7,40$; $gl = 3$; 147 ; $P < 0,001$ para a interação). O maior período de oviposição geral foi encontrado na linhagem RC-H2 (15,3 dias), enquanto que o menor na linhagem C-Sus (6,45 dias) (Tabela 3.2).

Para o parâmetro período de pós-oviposição o efeito da linhagem foi significativo ($F = 4,63$; $gl = 3$; 151 ; $P = 0,004$), enquanto que os demais não foram ($F = 0,78$; $gl = 1$; 150 ; $P = 0,38$ para raça e $F = 2,56$; $gl = 3$; 147 ; $P = 0,06$ para a interação entre linhagem e raça). A linhagem RC-Res apresentou o período de pós-oviposição mais longo (2,4 dias) e a linhagem C-H2 o mais curto (Tabela 3.2).

Tabela 3.2. Duração dos períodos de pré-oviposição, oviposição e pós-oviposição das linhagens suscetível (Sus), heterozigotas (H1 e H2) e resistente (Res) a teflubenzuron das raças híbrida (RC) e milho (C) de *S. frugiperda*.

Raça-Linhagem	Período (dias)		
	Pré-oviposição	Oviposição	Pós-oviposição
C-Res	3,40 ± 0,30 Ba	9,75 ± 0,93 Aa	1,80 ± 0,68 Aa
C-Sus	3,70 ± 0,19 Aa	6,45 ± 0,48 Bb	0,30 ± 0,10 Aa
C-H1	2,95 ± 0,22 Ba	10,95 ± 0,41 Aa	0,65 ± 0,18 Aa
C-H2	3,40 ± 0,27 Ba	9,60 ± 0,74 Ba	0,15 ± 0,11 Aa
RC-Res	6,93 ± 0,99 Aa	9,60 ± 1,02 Ab	2,40 ± 0,73 Aa
RC-Sus	4,45 ± 0,35 Aa	11,30 ± 0,72 Ab	0,85 ± 0,39 Aab
RC-H1	6,00 ± 0,64 Aa	12,55 ± 0,63 Aab	0,35 ± 0,13 Ab
RC-H2	4,80 ± 0,35 Aa	15,30 ± 0,55 Aa	1,20 ± 0,39 Aab

^aMédias de cada coluna (\pm EP) seguidas de mesma letra não diferem significativamente entre si (Tukey; $p > 0,05$). Letras maiúsculas indicam comparação entre raças e letras minúsculas entre linhagens.

3.3.7. Longevidade de adultos

Com relação ao parâmetro longevidade de adultos, o fator linhagem foi significativo para fêmeas ($F = 3,7437$; $gl = 3$; 150 ; $P = 0,0125$), contudo, não o foi para machos ($F = 1,4199$; $gl = 3$; 148 ; $P = 0,2394$). O fator raça foi significativo para ambos os sexos ($F = 8,073$; $gl = 1$; 149 ; $P = 0,0051$ para fêmeas e $F = 10,8507$; $gl = 1$; 147 ; $P = 0,0012$ para machos). Por fim, a interação foi significativa apenas para as fêmeas ($F = 2,6683$; $gl = 3$; 146 ; $P = 0,0499$ para fêmeas e $F = 0,1224$; $gl = 3$; 144 ; $P = 0,9467$ para machos). De forma geral, os adultos da raça híbrida foram mais longevos que os da raça milho (Figura 3.4).

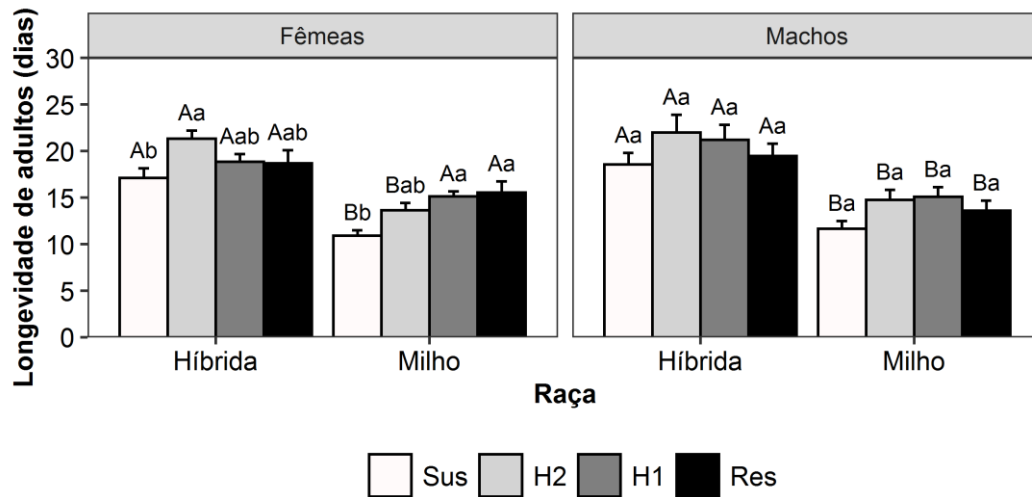


Figura 3.4. Longevidade de adultos das diferentes linhagens suscetível (Sus), heterozigotas (H1 e H2) e resistente (Res) a teflubenzuron das raças híbrida (RC) e milho (C) de *S. frugiperda*. Grupos de barras (\pm EP) seguidos de mesma letra não diferem significativamente entre si (Tukey; $p > 0,05$). Letras maiúsculas indicam comparação entre raças e letras minúsculas entre linhagens.

3.3.8. Parâmetros de crescimento populacional

O parâmetro taxa líquida de reprodução (R_0) foi afetado pela linhagem, raça e interação ($F = 12611$; $gl = 3$; 151 ; $P < 0,001$ para linhagem; $F = 585$; $gl = 1$; 150 ; $P < 0,001$ para raça e $F = 1707$; $gl = 3$; 147 ; $P < 0,001$ para a interação). Os valores de R_0 diferiram entre linhagens da mesma raça, sendo que as linhagens RC-Res e C-Res apresentaram os menores valores, contudo, não diferiram entre si. As linhagens heterozigotas apresentaram os maiores valores de R_0 (Tabela 3.3).

A duração média de uma geração (T) foi afetada pelos fatores linhagem, raça e sua interação ($F = 12993$; $gl = 3$; 151 ; $P < 0,001$ para linhagem; $F = 68475$; $gl = 1$; 150 ; $P < 0,001$ para raça e $F = 3947$; $gl = 3$; 147 ; $P < 0,001$ para a interação). As linhagens C-Res e RC-Res apresentaram maior duração de T , diferindo estatisticamente das demais linhagens da mesma raça e entre si. A linhagem que apresentou menor duração foi a C-H1 (32,3 dias) enquanto que a RC-Res apresentou a maior duração (40,04 dias). Em média, as linhagens da raça híbrida apresentaram duração de T cerca de 3 dias mais longa que as linhagens da raça milho (Tabela 3.3).

Os efeitos da linhagem, raça e da interação foram todos significativos tanto no parâmetro taxa intrínseca de crescimento (r_m) ($F = 14588$; $gl = 3$; 151 ; $P < 0,001$ para

linhagem; $F = 11305$; $gl = 1$; 150; $P < 0,001$ para raça e $F = 1226$; $gl = 3$; 147; $P < 0,001$ para a interação) quanto no parâmetro taxa finita de aumento (λ) ($F = 14618$; $gl = 3$; 151; $P < 0,001$ para linhagem; $F = 13784$; $gl = 1$; 150; $P < 0,001$ para raça e $F = 1519$; $gl = 3$; 147; $P < 0,001$ para a interação). Para a raça milho, a linhagem C-Res apresentou a menor taxa intrínseca de crescimento (0,14) e menor taxa finita de aumento (1,15) diferindo das linhagens suscetível e heterozigotas. Padrão semelhante pôde ser observado para a raça híbrida, onde a linhagem resistente RC-Res também apresentou o menor valores de r_m (0,13) e λ (1,13) (Tabela 3.3).

O custo adaptativo relativo (w), obtido através da divisão da taxa intrínseca de crescimento da linhagem resistente ou heterozigota pela mesma taxa da linhagem suscetível, é assumido como ($w = 1$) para as linhagens suscetíveis. Desta forma, o custo adaptativo relativo das linhagens C-Res, C-H1 e C-H2 são 0,78, 1,11 e 1, respectivamente. Para a raça híbrida, encontrou-se o custo adaptativo relativo de 0,76 e 1 nas linhagens RC-Res e RC-H1, respectivamente; por outro lado, a linhagem RC-H2 apresentou o maior valor de todas as linhagens desta raça (1,06). De acordo com esses resultados, as linhagens resistentes, de ambas as raças, apresentaram desvantagem biológica comparadas as suas respectivas linhagens suscetíveis e heterozigotas. Por outro lado, as linhagens heterozigotas não somente não apresentaram desvantagem, como mostraram-se com custo adaptativo relativo semelhante às linhagens suscetíveis. Este resultado é um indicativo de que o custo adaptativo da resistência a teflubenzuron em *S. frugiperda* é recessivo, independente da raça.

Tabela 3.3. Parâmetros de tabela de vida das linhagens suscetível (Sus), heterozigotas (H1 e H2) e resistente (Res) a teflubenzuron das raças híbrida e milho de *S. frugiperda*.

Parâmetros de tabela de vida ^{a,b}	Linhagem	Raça	
		Milho (C)	Híbrida (RC)
R_0	Res	158,92 ± 92 Ad	162,13 ± 7,44 Ad
	Sus	399,31 ± 7,80 Ac	398,91 ± 5,40 Ac
	H1	573,68 ± 11,46 Aa	506,60 ± 5,42 Bb
	H2	490,87 ± 8,90 Bb	689,32 ± 7,16 Aa
T	Res	35,93 ± 0,18 Ba	40,04 ± 0,24 Aa
	Sus	33,87 ± 0,15 Bb	35,91 ± 0,17 Ac
	H1	32,30 ± 0,09 Bc	37,30 ± 0,10 Ab
	H2	33,66 ± 0,17 Bb	37,00 ± 0,23 Ab
r_m	Res	0,14 ± 0,002 Ac	0,13 ± 0,004 Bc
	Sus	0,18 ± 0,002 Ab	0,17 ± 0,001 Bb
	H1	0,20 ± 0,002 Aa	0,17 ± 0,001 Bb
	H2	0,18 ± 0,002 Ab	0,18 ± 0,001 Aa
λ	Res	1,15 ± 0,003 Ac	1,13 ± 0,005 Bc
	Sus	1,19 ± 0,003 Ab	1,18 ± 0,002 Ab
	H1	1,21 ± 0,002 Aa	1,18 ± 0,001 Bb
	H2	1,19 ± 0,003 Ab	1,19 ± 0,001 Aa
w	Res	0,78	0,76
	Sus	1	1
	H1	1,11	1
	H2	1	1,06

^a R_0 : Taxa líquida de reprodução; T : Tempo médio de uma geração (dias); r_m : Taxa intrínseca de crescimento; λ : Taxa finita de aumento; w : Custo adaptativo relativo = r_m (Res, H1, H2) ÷ r_m (Sus). ^bMédias de cada coluna (\pm DP) seguidas de mesma letra não diferem significativamente entre si (Tukey; $p > 0,05$). Letras maiúsculas indicam comparação entre raças e letras minúsculas entre linhagens.

3.4. Discussão

Estudos que mensuram o custo adaptativo associado a resistência são geralmente realizados pela comparação de uma linhagem resistente proveniente de uma população de campo e uma suscetível de referência, a qual é mantida em laboratório por vários anos sem

pressão de seleção de inseticidas. Porém, para analisar somente o efeito dos alelos que conferem a resistência no custo adaptativo, deve-se optar por linhagens quase-isogênicas (FRENCH-CONSTANT; BASS, 2017), visto que o componente genético pode influenciar no custo adaptativo (RAYMOND; WRIGHT; BONSALL, 2011). Uma outra abordagem alternativa a esta, é através da utilização de uma população coletada em campo, a qual é separada em duas linhagens adicionais, sendo uma mantida na ausência e a outra na presença da pressão de seleção. Neste método, a resistência é selecionada a partir de alelos já presentes na população, ao qual no final do processo de seleção encontram-se em homozigose.

No presente estudo, as linhagens utilizadas foram provenientes de um mesmo local de coleta (geográfico e cultivo), partindo de uma população inicial da qual foi possível selecionar linhagens de *S. frugiperda* assumidas como suscetíveis (mantidas na ausência de pressão de seleção de inseticidas e proteínas Bt) e resistentes a teflubenzuron (a partir de pressão de seleção do inseticida a toda geração). Foi utilizada a abordagem alternativa à utilização de linhagens quase-isogênicas, visto que a linhagem suscetível de referência disponível no laboratório foi identificada como raça milho por ambos os marcadores genéticos (mitocondrial e nuclear). Isto permitiu a utilização de linhagens resistentes e suscetíveis originadas de uma mesma população inicial, padronizando as pressões seletivas sofridas pela população em campo até o momento da coleta, sendo possível a investigação da contribuição do fator raça, e não apenas da resistência, para o custo adaptativo.

Os resultados indicaram a presença de custo adaptativo nas linhagens resistentes de ambas as raças (RC-Res e C-Res). A conversão dos dados biológicos coletados em uma tabela de vida permitiu a visualização de um maior tempo médio de uma geração e menor taxa líquida de reprodução, o que resultou na redução das taxas intrínseca de crescimento e finita de aumento, e por fim, num menor custo adaptativo relativo. Por outro lado, das linhagens heterozigotas apresentaram custo adaptativo relativo semelhantes as respectivas linhagens suscetíveis, indicando ausência de custo adaptativo da resistência nas linhagens heterozigotas. Resultados semelhantes foram encontrados em estudos de custo adaptativo associado a resistência a benzilureias em outras espécies de insetos. Um estudo avaliou o custo adaptativo associado a resistência a diflubenzuron em *Cydia pomonella* (L.), e encontrou fecundidade, fertilidade, peso e longevidade reduzidos e maior tempo de desenvolvimento (BOIVIN et al., 2001). Em *Aedes aegypti* (L.) (BELINATO; VALLE, 2015), mosquitos resistentes a diflubenzuron apresentaram menores sucesso de alimentação, quantidade de sangue ingerido, número de ovos e eficiência de cópula, comparados a linhagem suscetível.

Em *Chrysodeixis includens* (Walker) resistente a teflubenzuron, os insetos apresentaram maior tempo de desenvolvimento, e menores número de ovos por fêmea e viabilidade desta fase (STACKE et al., 2020), resultando em maior tempo médio de uma geração, e menores taxas líquida de reprodução e intrínseca de crescimento.

Em *S. frugiperda*, o mecanismo de resistência a benzoilureias foi relatado como sendo majoritariamente via metabólica, através da regulação expressão de enzimas relacionadas a metabolização de xenobióticos, principalmente monooxigenases do complexo citocromo P450 (CYPs) (NASCIMENTO, 2018; NASCIMENTO et al., 2015). A superexpressão do complexo enzimático envolvido na resistência apresenta um alto gasto de energia ao inseto, e na ausência do inseticida os indivíduos resistentes poderiam apresentar uma desvantagem energética em comparação aos respectivos suscetíveis. Em uma linhagem de *Culex pipiens* (L.) resistente a inseticidas via superprodução de enzimas esterases, a medição de fontes de energia indicou que insetos resistentes carregam 30% a menos de reservas energéticas totais na forma de lipídios e açúcares, comparada a respectiva linhagem suscetível (RIVERO et al., 2011). Essas informações juntas poderiam explicar o custo adaptativo encontrado nas linhagens resistentes RC-Res e C-Res no presente trabalho.

Em condições de campo, dado que as linhagens resistentes apresentaram menor custo adaptativo relativo em milho, indivíduos suscetíveis e heterozigotos estariam em maior número em detrimento dos indivíduos resistentes, caso a pressão de seleção fosse cessada após uso contínuo do inseticida. É importante determinar o custo adaptativo de linhagens resistentes, contudo, as linhagens heterozigotas não podem ser ignoradas, já que a presença dos alelos da resistência em heterozigose não ocasionaram um custo nos parâmetros avaliados, estes poderiam permanecer presentes e amplamente distribuídos na população na ausência da pressão de seleção. Desta forma, com a retomada do uso de teflubenzuron, a resistência evoluiria mais rapidamente e conseqüentemente a falha de controle.

A extensão do custo adaptativo pode ser influenciada por diversos fatores ecológicos e ambientais, como por exemplo pelo componente genético, temperatura, qualidade da dieta, planta hospedeira, entre outros (CHEN et al., 2019; RAYMOND; WRIGHT; BONSALL, 2011; WILLIAMS et al., 2011; YANG et al., 2018). Por outro lado, ao avaliar a biologia em diferentes hospedeiros, o mesmo pode apresentar custo adaptativo, e a magnitude deste pode variar de acordo com a planta avaliada (CHEN et al., 2019; GARLET et al., 2021). Isso ocorre, pois, as plantas produzem diferentes compostos secundários que causam um estresse

fisiológico no inseto, podendo afetar a biologia, desenvolvimento e sobrevivência destes, como DIMBOA em milho por exemplo (SILVA-BRANDÃO et al., 2020). Em condições de campo, os insetos têm de lidar com diversos fatores adversos, bióticos e abióticos, que podem agir como agentes estressores e assim influenciar no custo adaptativo em diferentes graus. A rede de interações presentes neste cenário é bastante complexa, e idealmente, todos esses aspectos deveriam ser estudados.

A avaliação de custo da resistência é baseada, em grande maioria, na obtenção de parâmetros biológicos (como tempo de desenvolvimento, viabilidade das fases biológicas, razão sexual, longevidade, fecundidade e fertilidade) para construção de tabela de vida. Contudo, o custo pode estar presente em outros aspectos da biologia do inseto, ainda pouco investigados, como por exemplo na vulnerabilidade a predação ou parasitismo (JACKSON et al., 2020), tolerância térmica (ZHANG et al., 2015) e comportamento reprodutivo (DELISLE; VINCENT, 2002; EL-SAYED; FRASER; TRIMBLE, 2001; XU; CAO; DONG, 2010; ZHAO et al., 2009). A habilidade do inseto de evitar sua predação ou parasitismo, assim como de encontrar um parceiro para cópula, está diretamente ligada à sua capacidade de sobrevivência e sucesso reprodutivo, que são inerentes para a seleção de indivíduos resistentes na população e conseqüente evolução da resistência. Desta forma, a abordagem de outros aspectos biológicos poderia complementar estudos de custo adaptativo da resistência num cenário futuro.

Os resultados obtidos na presente pesquisa indicam que há custo adaptativo na resistência de *S. frugiperda* a teflubenzuron nos parâmetros biológicos avaliados, contudo, não foram encontradas diferenças significativas entre as raças híbrida e milho. Do ponto de vista prático, essa é uma informação interessante e que vale a pena ser explorada no MRI, visto que na ausência da pressão de seleção do inseticida, esses indivíduos seriam reduzidos de forma gradativa em campo. Por outro lado, as linhagens heterozigotas apresentam desempenho biológico semelhante as suscetíveis. Este dado associado a possível resistência cruzada com outras moléculas do mesmo grupo químico (NASCIMENTO et al., 2021), é preocupante, pois o aumento desses alelos no campo poderia afetar a durabilidade das benzoilureias como ferramenta no manejo da espécie.

3.5. Conclusões

- Há custo adaptativo associado à resistência a teflubenzuron nas raças milho e híbrida de *S. frugiperda*;
- Não há efeito da raça sobre a magnitude do custo adaptativo da resistência a teflubenzuron em *S. frugiperda*.

REFERÊNCIAS

- BELINATO, T. A.; VALLE, D. The Impact of Selection with Diflubenzuron, a Chitin Synthesis Inhibitor, on the Fitness of Two Brazilian *Aedes aegypti* Field Populations. **PLoS ONE**, v. 10, n. 6, p. 1–19, 2015.
- BIRD, L. J. Relative fitness and stability of resistance in a near-isogenic strain of indoxacarb resistant *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). **Pest Management Science**, v. 76, p. 4077–4085, 2020.
- BOIVIN, T. et al. Pleiotropy of insecticide resistance in the codling moth, *Cydia pomonella*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 99, p. 381–386, 2001.
- CHEN, X. et al. Fitness costs of Vip3A resistance in *Spodoptera frugiperda* on different hosts. **Pest Management Science**, v. 75, n. 4, p. 1074–1080, 2019.
- DELISLE, J.; VINCENT, C. Modified pheromone communication associated with insecticidal resistance in the obliquebanded leafroller, *Choristoneura rosaceana* (Lepidoptera: Tortricidae). **Chemoecology**, v. 12, p. 47–51, 2002.
- EL-SAYED, A. M.; FRASER, H. M.; TRIMBLE, R. M. Modification of the sex-pheromone communication system associated with organophosphorus-insecticide resistance in the obliquebanded leafroller (Lepidoptera: Tortricidae). **The Canadian Entomologist**, v. 133, p. 867–881, 2001.
- FFRENCH-CONSTANT, R. H.; BASS, C. Does resistance really carry a fitness cost? **Current Opinion in Insect Science**, v. 21, p. 39–46, 2017.
- GARLET, C. G. et al. Fitness Cost of Chlorpyrifos Resistance in *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) on Different Host Plants. **Environmental Entomology**, n. Xx, p. 1–11, 2021.
- HOLANDA, A. D. E. et al. Inference on Arthropod Demographic Parameters : Computational Advances Using R. **Journal of Economic Entomology**, v. 107, n. 1, p. 432–439, 2014.

- HORIKOSHI, R. J. et al. Near-isogenic Cry1F-resistant strain of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) to investigate fitness cost associated with resistance in Brazil. **Journal of Economic Entomology**, v. 109, n. 2, p. 854–859, 2016.
- JACKSON, G. E. et al. Grain aphids (*Sitobion avenae*) with knockdown resistance (kdr) to insecticide exhibit fitness trade-offs, including increased vulnerability to the natural enemy *Aphidius ervi*. **PLoS ONE**, v. 15, n. 11 November, p. 1–10, 2020.
- 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**, v. 107, n. 1, p. 342–351, 2014.
- KLIOT, A.; GHANIM, M. Fitness costs associated with insecticide resistance. **Pest Management Science**, v. 68, n. 11, p. 1431–1437, 2012.
- MORAL, R. A.; HINDE, J.; DEMÉTRIO, C. G. B. Half-normal plots and overdispersed models in R: The hnp package. **Journal of Statistical Software**, v. 81, n. 10, 2017.
- NASCIMENTO, A. R. B. Exploiting next generation sequencing techniques (NGS) to identify molecular markers for monitoring the resistance of *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) to insecticides and Bt proteins. University of São Paulo, 2018.
- NASCIMENTO, A. R. B. et al. There is more than chitin synthase in insect resistance to benzoylureas: Molecular markers associated with teflubenzuron resistance in *Spodoptera frugiperda*. **Journal of Pest Science**, 2021.
- NASCIMENTO, A. R. B. DO et al. Comparative transcriptome analysis of lufenuron-resistant and susceptible strains of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). **BMC Genomics**, v. 16, n. 1, p. 1–12, 2015.
- 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, 2016.
- OKUMA, D. M. et al. Inheritance and fitness costs of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) resistance to spinosad in Brazil. **Pest Management Science**, v. 74, n. 6, p. 1441–1448, 2017.
- ORSUCCI, M. et al. Transcriptional differences between the two host strains of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). **bioRxiv**, 2020.
- RAYMOND, B.; WRIGHT, D. J.; BONSALL, M. B. Effects of host plant and genetic background on the fitness costs of resistance to *Bacillus thuringiensis*. **Heredity**, v. 106, n. 2, p. 281–288, 2011.

- RIVERO, A. et al. Energetic Cost of Insecticide Resistance in *Culex pipiens* Mosquitoes. **Journal of Medical Entomology**, v. 48, n. 3, p. 694–700, 2011.
- SILVA-BRANDÃO, K. L. et al. Transcript expression plasticity as a response to alternative larval host plants in the speciation process of corn and rice strains of *Spodoptera frugiperda*. **BMC Genomics**, v. 18, n. 1, p. 1–15, 2017.
- SILVA-BRANDÃO, K. L. et al. Transcriptome differential co-expression reveals distinct molecular response of fall-armyworm strains to DIMBOA. **Pest Management Science**, v. 77, n. 1, p. 518–526, 2021.
- SPARKS, T. C. et al. Insecticide resistance management and industry: the origins and evolution of the Insecticide Resistance Action Committee (IRAC) and the mode of action classification scheme. **Pest Management Science**, v. 77, n. 6, p. 2609–2619, 2021.
- STACKE, R. F. et al. Field-evolved resistance to chitin synthesis inhibitor insecticides by soybean looper, *Chrysodeixis includens* (Lepidoptera: Noctuidae), in Brazil. **Chemosphere**, v. 259, p. 1–8, 2020.
- TABASHNIK, B. E. et al. Defining Terms for Proactive Management of Resistance to Bt Crops and Pesticides. **Journal of Economic Entomology**, v. 107, n. 2, p. 496–507, 2014.
- WILLIAMS, J. L. et al. Fitness cost of resistance to Bt cotton linked with increased gossypol content in pink bollworm larvae. **PLoS ONE**, v. 6, n. 6, 2011.
- XU, Z.; CAO, G.; DONG, S. Changes of Sex Pheromone Communication Systems Associated with Tebufenozide and Abamectin Resistance in Diamondback Moth, *Plutella xylostella* (L.). **Journal of Chemical Ecology**, v. 36, p. 526–534, 2010.
- YANG, B. J. et al. Effects of temperature on fitness costs in chlorpyrifos-resistant brown planthopper, *Nilaparvata lugens* (Hemiptera: Delphacidae). **Insect Science**, v. 25, n. 3, p. 409–417, 2018.
- ZHANG, L. J. et al. Trade-off between thermal tolerance and insecticide resistance in *Plutella xylostella*. **Ecology and Evolution**, v. 5, n. 2, p. 515–530, 2015.
- ZHAO, X. C. et al. Modified female calling behaviour in Cry1Ac-resistant *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). **Pest Management Science**, v. 65, p. 353–357, 2009.

4. ANÁLISE COMPARATIVA DA EXPRESSÃO GÊNICA ENVOLVIDA NA RESISTÊNCIA A TEFLUBENZURON EM RAÇAS DE *Spodoptera frugiperda* (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE)

RESUMO

A evolução da resistência de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) a inseticidas tem sido um dos grandes desafios em programas de manejo desta praga. Com a caracterização da resistência a teflubenzuron em diferentes raças de *S. frugiperda*, o objetivo deste estudo foi avaliar a expressão de diferentes genes em linhagens resistentes e suscetíveis ao inseticida teflubenzuron das raças milho e híbrida. Para tanto, a partir de um transcrito prévio de linhagens suscetível e resistente de *S. frugiperda* a teflubenzuron, foram selecionados transcritos diferencialmente expressos e ligados a processos de desintoxicação de xenobióticos, tegumento, regulação gênica e metabolismo energético. A avaliação da expressão gênica foi realizada por PCR quantitativo em tempo real (qPCR). As comparações estatísticas foram feitas a partir dos dados de Δct e expressão relativa, utilizando o método $2^{-\Delta\Delta ct}$. As análises demonstraram que dos 17 transcritos avaliados, 14 apresentaram expressão diferencial ($p < 0,05$) entre linhagens suscetível e resistente de alguma das raças, sendo que 9 deles foram diferencialmente expressos entre raças. Na raça híbrida, os transcritos mais expressos encontram-se no grupo de componentes cuticulares, com foco nas proteínas cuticulares RR-1 e RR-2. Já para a raça milho, os transcritos relacionados a desintoxicação foram mais expressos, com destaque para as enzimas do complexo citocromo P450 (CYPs). Os maiores contrastes na expressão gênica entre raças foram encontrados nos transcritos relacionados as enzimas CYPs e proteínas cuticulares RR-1 e RR-2. As raças híbrida e milho resistentes a teflubenzuron apresentaram superexpressão dos transcritos CYP6AB31, SULT1C4b, Cht7 e DNMT1. As raças de *S. frugiperda* apresentaram perfis de expressão gênica distintos para os transcritos avaliados. Esses resultados comprovam a importância de se identificar a raça de *S. frugiperda* em estudos de suscetibilidade a inseticidas.

Palavras-chave: Expressão gênica; Benzoilureias; Resistência de Insetos a Inseticidas; Lagarta-do-cartucho

ABSTRACT

The evolution of resistance of *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) to insecticides has been of the great threat to managing this pest. After characterizing resistance to teflubenzuron in different host-strains of *S. frugiperda*, the objective of this study was to evaluate the differential expression of genes in susceptible (Sus) and resistant (Res) strains to teflubenzuron in corn and hybrid strains of *S. frugiperda*. For this purpose, from a previous transcriptome of susceptible and resistant strains of *S. frugiperda* to teflubenzuron, it was selected transcripts differentially expressed between strains and related to detoxification of xenobiotics, integument, gene regulation and energy metabolism processes. The gene expression was evaluated by using real-time quantitative PCR (RT-qPCR). The statistical comparisons were conducted using Δct and relative expression, applying the $2^{-\Delta\Delta ct}$ method.

The analyses demonstrated that from the 17 transcripts evaluated, 14 showed differential expression ($p < 0.05$) between susceptible and resistant strains from at least one of the host-strains, while 9 of them were differentially expressed between host-strains. For the hybrid strain, the superexpressed transcripts belongs to the cuticular components group, focusing on cuticular proteins RR-1 and RR-2. For the corn strain, the transcripts related to detoxification processes were superexpressed, especially enzymes from the cytochrome P450 complex (CYPs). The greater contrasts in gene expression between host-strains were found for the CYPs enzymes and RR-1 and RR-2 cuticular proteins. The hybrid and corn strains resistant to teflubenzuron superexpressed the transcripts CYP6AB31, SULT1C4b, Cht7 and DNMT1. The host-strains of *S. frugiperda* showed distinct gene expression profiles for the transcripts evaluated. These results confirm the relevance of identifying host-strains of *S. frugiperda* to evaluate the susceptibility to insecticides.

Key words: Gene expression; Benzoylureas; Insecticide Resistance Management; Fall armyworm

4.1. Introdução

A presença de duas raças de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) associadas a plantas hospedeiras, sendo uma se alimentando preferencialmente em culturas de milho, sorgo e algodão (raça milho) e a outra usualmente encontrada se alimentando em arroz e outras gramíneas (raça arroz) já foi identificada e deve ser considerada em programas de manejo integrado de pragas (PASHLEY, 1986; PASHLEY; MARTIN, 1987). Dentre as diferenças entre estas raças de *S. frugiperda*, estudos têm indicado diferenciação no padrão de suscetibilidade a inseticidas, proteínas Bt e baculovírus (ADAMCZYK et al., 1997; BUSATO et al., 2006; INGBER et al., 2021; POPHAM; ROWLEY; HARRISON, 2021; RÍOS-DÍEZ; SALDAMANDO-BENJUMEA, 2011). Sem dúvida, uma melhor compreensão dos mecanismos moleculares envolvidos na diferenciação da suscetibilidade a inseticidas em raças de *S. frugiperda* poderá contribuir para o refinamento das estratégias de manejo desta praga.

A resistência de *S. frugiperda* a inseticidas benzoilureias já foi documentada na literatura (NASCIMENTO et al. 2015, 2021). As benzoilureias provavelmente atuam na quitina sintase I (*CHSI*) (DOURIS et al., 2016), enzima que catalisa a reação de incorporação de N-acetilglicosamina durante a síntese de quitina. Trabalhos prévios indicaram mutações no gene da quitina sintase I (*CHSI*) como responsável pela resistência de *Tetranychus urticae* (Koch) ao acaricida etoxazole (VAN LEEUWEN et al., 2012), de *Culex pipiens* (L.) ao inseticida diflubenzuron (FOTAKIS et al., 2020) e de *Plutella xylostella* (L.) e *Drosophila melanogaster* (Meig.) a etoxazole e diflubenzuron (DOURIS et al., 2016). Em *S. frugiperda*,

não foram encontradas mutações pontuais e/ou mudanças na expressão da *CHSI*, desta forma, alterações nesta enzima não configuram o mecanismo exclusivo de resistência a esse grupo (NASCIMENTO et al., 2021).

Por outro lado, o provável mecanismo de resistência a benzoilureias foi relatado pela expressão elevada de enzimas relacionadas a desintoxicação de xenobióticos, como glutathione S-transferases (GSTs), UDP glicosil transferases (UGTs) e citocromo P450s (CYPs) (NASCIMENTO, 2018; NASCIMENTO et al., 2015). Aparentemente, a resistência ocorre em um cenário muito complexo em *S. frugiperda*, sendo mais provável que a expressão elevada de enzimas de desintoxicação, aliadas a outros processos metabólicos, desempenhem um importante papel na resistência a benzoilureias. As raças associadas a hospedeiros nesta espécie apresentam variações nas sequências e número de cópias de genes envolvidos em processos de desintoxicação, principalmente da família CYP, assim como expressão diferencial de vários deles (GOUIN et al., 2017; ORSUCCI et al., 2020).

Com a caracterização da resistência a teflubenzuron em raças milho e híbrida de *S. frugiperda*, além da verificação de que a raça milho apresenta maior suscetibilidade que a raça híbrida para a maioria dos inseticidas testados, incluindo teflubenzuron (Capítulo 2), o objetivo do presente trabalho foi entender os mecanismos moleculares da resistência de *S. frugiperda* a teflubenzuron e as possíveis diferenças na expressão de genes potencialmente envolvidos na resistência (NASCIMENTO, 2018), utilizando linhagens resistentes e suscetíveis a teflubenzuron das raças milho e híbrida de *S. frugiperda*.

4.2. Material e métodos

4.2.1. Insetos

As linhagens de *S. frugiperda* utilizadas neste estudo foram obtidas como descrito previamente no Capítulo 2. Foram utilizadas duas linhagens da raça híbrida (RC) e duas linhagens da raça milho (C). Cada uma das quatro linhagens, foi mantida por 30 gerações na ausência (RC-Sus e C-Sus) ou na presença da pressão de seleção de teflubenzuron (RC-Res e C-Res). Todas as linhagens foram mantidas em condições controladas de laboratório (25 ± 1 °C, UR $70 \pm 10\%$ e fotofase de 14h) sob dieta artificial (KASTEN JR.; PRECETTI; PARRA, 1978).

4.2.2. Extração de RNA e síntese de cDNA

Para a extração de RNA total, foram utilizadas lagartas inteiras das linhagens RC-Sus, C-Sus, RC-Res e C-Res nas primeiras horas do quarto instar larval. Para tal, as lagartas foram individualizadas em recipientes contendo dieta artificial com 24h de antecedência da extração, enquanto ainda estavam no final do terceiro instar. Para a extração, foram separadas cinco lagartas de início do quarto instar por linhagem, sendo cada linhagem amostrada em triplicatas biológicas. As extrações foram feitas utilizando TRI Reagent® (Sigma-Aldrich), seguindo-se o protocolo do fabricante para extração de RNA de tecidos. As amostras foram maceradas com pistilos de plástico em 1 mL da solução e homogeneizadas em vórtex. O lisado foi centrifugado a 12.000g e 4 °C por 5 minutos, e o sobrenadante coletado e transferido para um novo tubo, permanecendo incubado por 5 minutos para completa dissociação do complexo nucleoproteico. Em seguida, foi adicionado 0,2 mL de clorofórmio em cada tubo, permanecendo por mais 3 minutos. As amostras seguiram para centrífuga a 12.000g e 4 °C por 15 minutos, resultando numa fase inferior avermelhada formada por fenol-clorofórmio (contendo DNA e proteínas), uma interfase esbranquiçada, e uma fase superior incolor (contendo RNA). A fase superior incolor foi recuperada e transferida para um novo tubo, no qual 0,5 mL de isopropanol puro gelado foi adicionado. As amostras permaneceram incubadas por 10 minutos e foram centrifugadas pelo mesmo tempo a 12.000g a 4 °C, para precipitação do RNA. O sobrenadante foi descartado e o pellet formado no fundo do tubo foi lavado com etanol 75% gelado por três vezes, os precipitados foram parcialmente secos ao ar livre e depois ressuspensos em 50 µL de água livre de nucleases. O rendimento e a qualidade da extração de RNA foram determinados por meio da leitura de absorbância utilizando o equipamento Epoc™, ajustado para leitura de amostras de RNA. Amostras com razão A_{260}/A_{280} entre 1,8 e 2,0 e concentração entre 2,0 e 2,5 µg.µL⁻¹ apresentaram qualidade e concentração ótimas para utilização no experimento.

As amostras de RNA total extraídas foram submetidas a reação de transcrição reversa com o uso do kit ImProm-II™ Reverse Transcription System (Promega), segundo instruções do fabricante. As reações foram divididas em dois passos. No primeiro passo ocorreu a combinação do RNA-alvo com o iniciador. As reações consistiram em 2 µg de RNA, 0,5 µg de random primers (Invitrogen™) e água livre de nucleases até completar o volume final de 5 µL. As amostras foram encubadas a 70 °C por 5 min e em seguida a 4 °C por mais 5 minutos. No segundo passo foi adicionado ao produto do passo anterior: 4 µL ImProm-II™ Reaction Buffer, 2,4 µL MgCl₂, 1 µL dNTP Mix, 1 µL ImProm-II™ Reverse

Transcriptase e 6,6 μL de água livre de nucleases, num volume final de 20 μL . No termociclador, as amostras permaneceram a 25 °C (5 min), 55 °C (60 min) e 70 °C (15 min) para síntese do cDNA. As amostras obtidas foram armazenadas a -20 °C até o momento do uso.

4.2.3. Análise de expressão gênica por PCR em tempo real

Os genes e grupos funcionais foram escolhidos com base na lista de transcritos diferencialmente expressos entre linhagens de *S. frugiperda* suscetível e resistente a teflubenzuron (Tef-R) pertencentes ao banco de dados interno do laboratório (NASCIMENTO, 2018). A obtenção de genes candidatos para análise de expressão gênica foi baseada em transcritos diferencialmente expressos entre as linhagens considerando p-valor ajustado $\leq 0,01$ e \log_2 fold change ≤ 5 (supressos em Tef-R) ou ≥ 5 (superexpressos em Tef-R). A partir destes, foram escolhidos transcritos pertencentes a grupos funcionais já previamente relatados como envolvidos no mecanismo de resposta a intoxicação ou de resistência a inseticidas, com foco em benzoilureias. Desta forma, foram selecionados transcritos relativos a enzimas de desintoxicação, tegumento, regulação gênica e diversos outros relacionados ao metabolismo energético.

A sequência relativa a cada transcrito foi recuperada e utilizada para desenhar iniciadores específicos. Estes iniciadores foram construídos e analisados utilizando as ferramentas online PrimerQuest Tool (Integrated DNA Technologies) e OligoAnalyzer (Integrated DNA Technologies). Os iniciadores foram ressuspendidos em água livre de nucleases para a concentração estoque de 200 pmol/ μL , e então submetidos a reação de PCR convencional utilizando o cDNA como molde para verificação inicial da especificidade destes (formação de uma única banda nítida após corrida eletroforética em gel de agarose). Em seguida, foram realizadas curvas de eficiência a partir de reações de qPCR utilizando um gradiente de concentrações de cDNA de todas as amostras. Inicialmente, foi feita a diluição seriada das amostras de cDNA (contendo uma mistura em partes iguais das quatro linhagens), de forma a se obter os gradientes de concentração de cDNA:água de 1:5 (~500 ng), 1:25 (~100 ng), 1:125 (~20 ng), 1:625 (~4 ng) e 1:3125 (~0,8 ng), sendo cada uma dessas concentrações amostrada em triplicata para as reações de qPCR. Os valores de inclinação obtidos foram submetidos a seguinte fórmula para o cálculo da eficiência de cada par de iniciadores:

$$\text{Eficiência (\%)} = 10^{\frac{-1}{\text{inclinação}}} - 1$$

Iniciadores que apresentaram intervalo de eficiência entre 90-110% e um único pico no gráfico de curva de dissociação (revelando um produto específico), foram considerados adequados para prosseguimento nas análises de expressão. As reações de amplificação foram feitas na plataforma ViiA™ 7 Real Time PCR System (Applied Biosystems, Life Technologies), que consistiram em 100 ng cDNA, 5 µL de SYBR Green/ROX qPCR MasterMix 2X (Thermo Scientific), 0,3 µM de cada um dos iniciadores (Tabela 4.1) e 5 µL de água ultrapura, totalizando um volume final de 10 µL. As condições de ciclagem constituíram de 50 °C (2 min), um passo inicial de desnaturação de 95 °C (10 min), seguido por 35 ciclos de 95 °C (15 s), 60 °C (30 s) e 72 °C (30 s). Um controle negativo (sem molde de cDNA) foi utilizado para verificar ausência de contaminação nas reações. A normalização foi realizada mediante uso do gene de referência GAPDH (gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase) (NASCIMENTO et al., 2015).

4.2.4. Análise estatística

O delineamento experimental escolhido foi o inteiramente casualizado, composto por quatro tratamentos (linhagens RC-Sus, C-Sus, RC-Res e C-Res), sendo cada repetição amostrada em triplicatas biológicas contendo 5 lagartas cada e analisada em triplicata técnica nas reações de qPCR. Os dados foram analisados de duas formas: uma análise estatística foi realizada com as repetições obtidas de Δct . Neste caso, as normalizações do ct do gene de interesse pelo gene referência, para os quatro tratamentos, foram analisadas por GLM (General Linear Model) na distribuição Gaussiana, e a verificação do ajuste ao modelo escolhido foi feita mediante uso do gráfico meio-normal de probabilidades com envelope de simulação do pacote *hnp* (MORAL; HINDE; DEMÉTRIO, 2017). Foi realizada análise de variância ANOVA 2-fatores, para verificar o efeito de cada fator (raça, linhagem) e sua interação para cada parâmetro avaliado, considerando a linhagem (Sus – suscetível e Res – resistente) e a raça (RC – híbrida e C – milho) como variáveis independentes. As médias foram comparadas através do pacote *lsmeans*, e as diferenças estatísticas determinadas utilizando o ajuste de Tukey ($\alpha=0,05$).

Uma segunda análise foi conduzida através da obtenção da expressão relativa de acordo com o método $2^{-\Delta\Delta ct}$ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001). Os dados provenientes da

expressão relativa foram analisados por GLM, também na distribuição Gaussiana, o ajuste ao modelo escolhido foi feito por meio do gráfico meio-normal de probabilidades com envelope de simulação do pacote *hnp* (MORAL; HINDE; DEMÉTRIO, 2017). Foi realizada análise de variância ANOVA 1-fator de forma separada para cada raça, considerando a linhagem (Res – resistente e Sus – suscetível) como variável independente. As médias foram comparadas utilizando o pacote *lsmeans*, e as diferenças estatísticas determinadas utilizando o ajuste de Tukey ($\alpha=0,05$). Os gráficos foram gerados através do pacote *ggplot2*. Todas as análises estatísticas foram conduzidas no software R v. 4.0.0. (R Core Team, 2020).

Tabela 4.1. Lista de iniciadores construídos com base nos transcritos diferencialmente expressos para validação por qPCR.

Transcrito	Expressão (Tef-R) ¹	Oligos iniciadores	Sequência	Descrição
GAPDH		GAPDH_F	CGTGGGAGCAGGTTTCGT	gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
		GAPDH_R	ACGGCCGCTTTAGTGTTGTC	
CYP6AB31	+	DN28793_c2_g1_i5_F	GAAGTTCCTCGTTCCGTAGAAG	citocromo P450 CYP6AB31
		DN28793_c2_g1_i5_R	GTCTCAGCTGCCAAGATGAT	
CYP9E2	+	DN23917_c2_g2_i8_F	CAGGGCATAGAAGGTGTTGT	citocromo P450 CYP9E2
		DN23917_c2_g2_i8_R	AGATACGCCAACGATGTGATAG	
CYP6AE44	+	DN29048_c3_g1_i1_F	GAACCGACCCTCATCATAAAG	citocromo P450 CYP6AE44
		DN29048_c3_g1_i1_R	TTTCACAGTACGCAGAGACTTC	
CYP321A8	+	DN28106_c2_g1_i3_F	CAAGACCCGTGATGGTAACT	citocromo P450 CYP321A8
		DN28106_c2_g1_i3_R	TCTGATCCAATGCCGAAGATAG	
AKR	+	DN24831_c0_g1_i13_F	ACTGTCGCCCAAGTTCTTATT	aldo-ceto redutase
		DN24831_c0_g1_i13_R	TCGAAGTTGCTCGCGATAC	
SULT1C4a	+	DN23725_c0_g1_i3_F	GATGTCTTCGTCACCAGCTAC	sulfotransferase 1C4
		DN23725_c0_g1_i3_R	CAGTGAGAGGTATGGCATTAGAC	
SULT1C4b	+	DN22563_c1_g1_i2_F	GCTTGCTGCGTCATTTCTTC	sulfotransferase 1C4 isoforma X3
		DN22563_c1_g1_i2_R	GCGGGAGTTCGGTATGATG	
RR-1a	+	DN18725_c0_g1_i1_F	CGGTGTATGAGATGCTGTAGTC	RR-1 cuticular motif 15
		DN18725_c0_g1_i1_R	TCGAAACCTCAAACGGTATCC	

RR-1b	-	DN22768_c0_g2_i4_F	GCCTCATCCTGCTCATTCTT	RR-1 cuticular motif 16 isoforma X1
		DN22768_c0_g2_i4_R	CACCTACACCGTCACTTACAC	
RR-2a	+	DN20520_c0_g1_i1_F	TGGACTTACCAGCCAAGTATTC	RR-2 cuticular motif 127
		DN20520_c0_g1_i1_R	CAAACACAGACAACGACACATATT	
RR-2b	+	DN22624_c0_g1_i3_F	TTTCCACTCGTTGACTGATACC	RR-2 cuticular motif 59
		DN22624_c0_g1_i3_R	AGTTCAACTGGTAATCGTAGCC	
Cht7	+	DN11042_c0_g1_i1_F	CATCTCTGCGTCCTTCTCATC	quitinase 7
		DN11042_c0_g1_i1_R	CGTCTGCTGGTCGTTTCTTA	
DNMT1	+	DN26694_c0_g1_i4_F	TCCGTTGTGACCTCATTGATAC	DNA metil- transferase 1
		DN26694_c0_g1_i4_R	GGGCTGTGGAAACTGTTACT	
2-OGDH	+	DN28523_c0_g2_i3_F	CGTTCGGGTACTTCTCAATCTC	2-oxoglutarato desidrogenase
		DN28523_c0_g2_i3_R	GTCTACTACGACCTGCTCAAAC	
Cit_c1	-	DN16890_c1_g1_i2_F	CCTTCCGAAACCTCGTCAAT	citocromo c1
		DN16890_c1_g1_i2_R	TCTCGAAGTAGTTACCCTCCTC	
ILP2a	-	DN19271_c1_g3_i1_F	TCGTCAGATGTCCCTTCCA	peptídeo tipo insulina 2
		DN19271_c1_g3_i1_R	CTTCAACCTTCAGCACCTACA	
ILP2b	+	DN15892_c0_g1_i1_F	CTGTGGACGTCGACTTGTTA	peptídeo tipo insulina 2
		DN15892_c0_g1_i1_R	CGCCTGTTCTTTGTTGAAG	

¹Transcritos (+) superexpressos e (-) supressos na linhagem resistente a teflubenzuron (Tef-R) (NASCIMENTO, 2018).

4.3. Resultados

4.3.1. Análise de expressão gênica por PCR em tempo real

O método $2^{-\Delta\Delta ct}$, o qual se baseia na expressão relativa dos genes na linhagem resistente em relação a respectiva suscetível de cada raça, demonstrou que as linhagens resistentes apresentam expressão relativa distinta para a maioria dos genes testados (Figura 4.1, Tabela 4.2).

Para a linhagem resistente da raça híbrida (RC-Res), os transcritos mais expressos encontram-se no grupo de componentes cuticulares, sendo RR-1b (55 vezes), RR-2b (7,5 vezes) e Cht7 (3,5 vezes) mais expressos em RC-Res comparado a RC-Sus. Outros transcritos diferencialmente expressos referem-se aos de desintoxicação, com destaque a CYP6AB31 (4 vezes) e SULT1C4b (5 vezes) mais expressos em RC-Res. Além destes, encontra-se DNMT1 (3,5 vezes) e Cit_c1 (3,2 vezes) mais expressos em RC-Res. Os demais transcritos não diferiram em expressão entre as linhagens RC-Res e RC-Sus.

Por outro lado, na linhagem resistente da raça milho (C-Res), os transcritos relacionados a desintoxicação de xenobióticos se destacam, principalmente as enzimas do citocromo P450 (CYP). Em C-Res, os transcritos CYP6AE44 e CYP321A8 foram 25 e 85 vezes mais expressos em C-Res, respectivamente. Outros transcritos relacionados a desintoxicação foram mais expressos, como CYP6AB31 (8 vezes), AKR (2,5 vezes), SULT1C4a (2,5 vezes) e SULT1C4b (2 vezes). Além destes, os componentes cuticulares RR-1a e Cht7 foram 8,5 vezes e 4 vezes mais expressos, respectivamente. DNMT1 foi 3,5 vezes mais expresso. Dos demais transcritos, que se referem a processos do metabolismo energético, foram mais expressos 2-OGDH (2 vezes) e ILP2b (12,5 vezes) em C-Res.

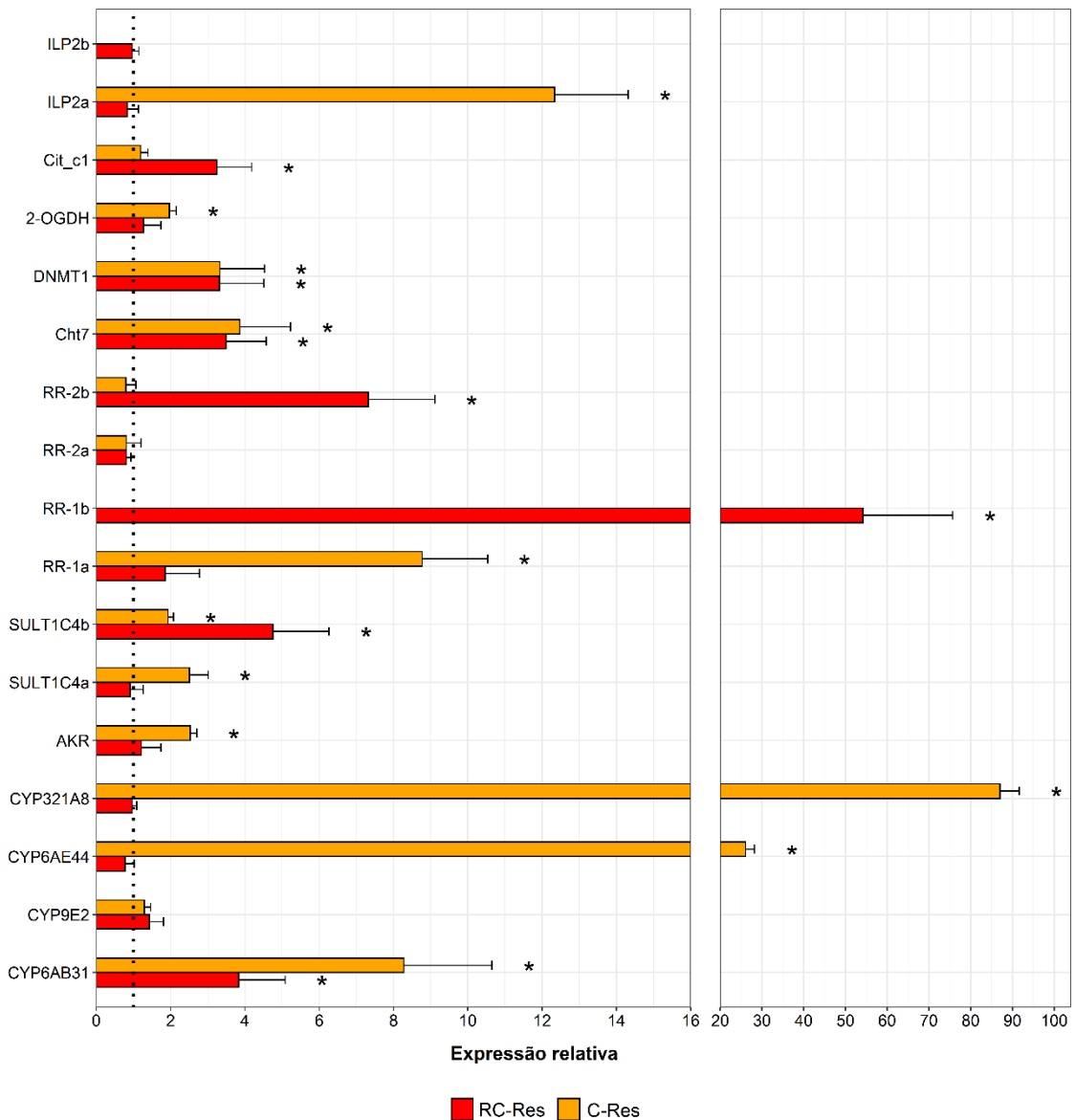


Figura 4.1. Expressão relativa das linhagens resistentes ao inseticida teflubenzuron das raças híbrida (RC-Res) e milho (C-Res) de *S. frugiperda* obtida pela análise de qPCR. Os valores de expressão relativa foram obtidos através do método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ utilizando a respectiva linhagem suscetível de cada raça como referência. Barras horizontais representam a média \pm EP (n=3). Nível de significância (*): $p < 0,05$. Genes com expressão relativa > 1 com “*” foram mais expressos em relação a linhagem suscetível de referência. Na linhagem C-Res não foi possível obter expressão relativa dos transcritos ILP2b e RR-1b, visto que não houve amplificação em reação de qPCR.

Tabela 4.2. Estatística proveniente da análise ANOVA 1-fator da expressão relativa das linhagens resistentes raça híbrida (RC-Res) e milho (C-Res) de *S. frugiperda*, em relação as suas respectivas suscetíveis.

Transcrito	Média ± EP (n=3) e estatística referente a cada raça			
	RC-Res		C-Res	
CYP6AB31	3,83 ± 1,24	$F = 13,06; gl = 1, 4; P = 0,036$	8,28 ± 2,37	$F = 52,89; gl = 1, 4; P = 0,005$
CYP9E2	1,43 ± 0,38	$F = 0,80; gl = 1, 4; P = 0,422$	1,29 ± 0,17	$F = 2,83; gl = 1, 4; P = 0,168$
CYP6AE44	0,77 ± 0,25	$F = 0,96; gl = 1, 4; P = 0,383$	26,03 ± 2,20	$F = 118,36; gl = 1, 4; P < 0,001$
CYP321A8	0,96 ± 0,12	$F = 0,05; gl = 1, 4; P = 0,832$	87,01 ± 4,59	$F = 4185,10; gl = 1, 4; P < 0,001$
AKR	1,21 ± 0,53	$F = 0,16; gl = 1, 4; P = 0,705$	2,52 ± 0,18	$F = 69,00; gl = 1, 4; P = 0,001$
SULT1C4a	0,91 ± 0,35	$F = 0,15; gl = 1, 4; P = 0,716$	2,50 ± 0,51	$F = 7,98; gl = 1, 4; P = 0,048$
SULT1C4b	4,75 ± 1,52	$F = 19,92; gl = 1, 4; P = 0,021$	1,93 ± 0,15	$F = 50,04; gl = 1, 4; P = 0,002$
RR-1a	1,85 ± 0,93	$F = 0,16; gl = 1, 4; P = 0,708$	8,77 ± 1,76	$F = 107,9; gl = 1, 4; P = 0,002$
RR-1b	54,15 ± 21,53	$F = 87,08; gl = 1, 4; P = 0,003$	-	-
RR-2a	0,81 ± 0,12	$F = 6,01; gl = 1, 4; P = 0,070$	0,80 ± 0,4	$F = 0,40; gl = 1, 4; P = 0,563$
RR-2b	7,32 ± 1,79	$F = 41,94; gl = 1, 4; P = 0,007$	0,79 ± 0,27	$F = 1,07; gl = 1, 4; P = 0,359$
Cht7	3,49 ± 1,08	$F = 14,49; gl = 1, 4; P = 0,032$	3,86 ± 1,37	$F = 13,45; gl = 1, 4; P = 0,021$
DNMT1	3,32 ± 1,19	$F = 9,94; gl = 1, 4; P = 0,034$	3,32 ± 1,19	$F = 45,84; gl = 1, 4; P = 0,002$
2-OGDH	1,27 ± 0,47	$F = 0,04; gl = 1, 4; P = 0,846$	1,96 ± 0,19	$F = 31,56; gl = 1, 4; P = 0,005$
Cit_c1	3,24 ± 0,94	$F = 12,31; gl = 1, 4; P = 0,025$	1,19 ± 0,2	$F = 21,98; gl = 1, 4; P = 0,009$
ILP2a	0,83 ± 0,30	$F = 0,68; gl = 1, 4; P = 0,456$	12,33 ± 1,98	$F = 32,69; gl = 1, 4; P = 0,005$
ILP2b	0,96 ± 0,18	$F = 0,01; gl = 1, 4; P = 0,933$	-	-

Os valores de expressão relativa foram obtidos através do método $2^{-\Delta\Delta ct}$ utilizando a respectiva linhagem suscetível de cada raça como referência. *F*: teste F; *gl*: graus de liberdade; nível de significância ($P < 0,05$). Na raça milho não foi realizada estatística dos transcritos ILP2b e RR-1b, pois não houve amplificação em reação de qPCR para a linhagem C-Res.

A análise estatística utilizando os valores de Δct dos tratamentos possibilitou a comparação dos níveis de expressão entre linhagens suscetíveis e resistentes a teflubenzuron de ambas as raças. Os valores médios, desvio padrão e respectivas comparações estatísticas encontram-se abaixo (Tabela 4.3). Para os transcritos relacionados a enzimas do complexo citocromo P450 (CYPs), foi avaliada a expressão gênica dos transcritos CYP6AB31, CYP9E2, CYP6AE44 e CYP321A8. O transcrito identificado como CYP321A8 foi mais expresso na linhagem RC-Sus que C-Sus, por outro lado, foi altamente expresso em C-Res em comparação a sua respectiva suscetível (C-Sus) e com a resistente da raça híbrida (RC-Res). O transcrito CYP6AB31 foi mais expresso nas linhagens resistentes RC-Res e C-Res que nas respectivas suscetíveis. Para CYP9E2 não houve diferença na expressão entre as quatro linhagens. O transcrito CYP6AE44 foi altamente expresso em C-Res, diferindo das demais três linhagens.

Para os transcritos relacionados as enzimas sulfotransferases, foram escolhidos os transcritos SULT1C4a e SULT1C4b. O transcrito SULT1C4a foi mais expresso em C-Res comparado a C-Sus, contudo, a expressão foi a mesma em C-Res, RC-Sus e RC-Res. Enquanto que SULT1C4b foi mais expresso em ambas linhagens resistentes comparadas às respectivas suscetíveis, sendo mais expresso em C-Sus que RC-Sus.

Para os transcritos relacionados ao tegumento, temos RR-1a e RR-1b, que se referem às proteínas cuticulares RR-1; RR-2a e RR-2b, que se referem às proteínas cuticulares RR-2; e Cht7, que se refere a uma quitinase 7 (Tabela 4.3). O transcrito RR-1a foi mais expresso em C-Res que C-Sus, contudo, foi mais expresso nas linhagens RC-Sus e RC-Res da raça híbrida. O RR-1b, o qual não houve amplificação do transcrito na linhagem C-Res, foi mais expresso em C-Sus que RC-Sus, e diferencialmente mais expresso em RC-Res comparado a sua respectiva linhagem suscetível. Para o transcrito RR-2a, mais expresso na raça milho comparada à híbrida, não houve diferença entre linhagens suscetível e resistente de mesma raça. O transcrito RR-2b foi mais expresso em C-Sus que RC-Sus, e superexpresso em RC-Res. Por fim, Cht7 foi superexpresso em ambas as linhagens resistentes comparado às respectivas suscetíveis.

Com relação ao processo biológico de regulação gênica, tem-se o transcrito DNMT1, que se refere a uma DNA metil-transferase 1, o qual foi mais expresso nas linhagens resistentes RC-Res e C-Res comparada às suscetíveis RC-Sus e C-Sus, contudo, não houve diferença na expressão deste transcrito entre raças (Tabela 4.3).

Para transcritos relacionados ao metabolismo energético, tem-se os transcritos 2-OGDH, AKR e Cit_c1. O transcrito 2-OGDH, foi mais expresso em C-Res comparado a C-Sus, contudo, não diferiu das linhagens RC-Res e RC-Sus. Para AKR foi observada superexpressão em C-Res comparado as demais três linhagens (Tabela 4.3).

Para transcritos relacionados a peptídeos tipo-insulina 2, temos o ILP2a e o ILP2b. Com relação a ILP2a, foi observada superexpressão em C-Res comparado as demais três linhagens. Por fim, para o transcrito ILP2b, para o qual não houve amplificação na linhagem C-Res, não houve diferença entre as demais três linhagens (Tabela 4.3).

Tabela 4.3. Valores médios de Δct obtidos em reação de qPCR utilizando as linhagens suscetível (Sus) e resistente (Res) a teflubenzuron das raças híbrida (RC) e milho (C) de *S. frugiperda*.

Transcrito	Valores médios de Δct^1				Valor da estatística dos fatores (linhagem; raça; interação) ²
	RC-Res	RC-Sus	C-Res	C-Sus	
CYP6AB31	4,19 ± 0,86 Ab	6,00 ± 0,83 Aa	2,95 ± 0,75 Ab	5,90 ± 0,34 Aa	(<i>F</i> = 28,09; <i>gl</i> = 1, 10; <i>P</i> = 0,002; <i>F</i> = 1,60; <i>gl</i> = 1, 9; <i>P</i> = 0,253; <i>F</i> = 1,60; <i>gl</i> = 1, 8; <i>P</i> = 0,252)
CYP9E2	3,01 ± 0,57 Aa	3,40 ± 0,21 Aa	3,17 ± 0,32 Aa	3,52 ± 0,29 Aa	(<i>F</i> = 2,97; <i>gl</i> = 1, 10; <i>P</i> = 0,123; <i>F</i> = 0,41; <i>gl</i> = 1, 9; <i>P</i> = 0,537; <i>F</i> = 0,01; <i>gl</i> = 1, 8; <i>P</i> = 0,915)
CYP6AE44	4,04 ± 0,77 Aa	3,53 ± 0,38 Aa	-0,79 ± 0,21 Bb	3,85 ± 0,36 Aa	(<i>F</i> = 55,65; <i>gl</i> = 1, 10; <i>P</i> < 0,001; <i>F</i> = 66,56; <i>gl</i> = 1, 9; <i>P</i> < 0,001; <i>F</i> = 86,85; <i>gl</i> = 1, 8; <i>P</i> < 0,001)
CYP321A8	6,05 ± 0,30 Aa	5,97 ± 1,00 Ba	1,99 ± 0,13 Bb	8,43 ± 0,92 Aa	(<i>F</i> = 38,69; <i>gl</i> = 1, 10; <i>P</i> < 0,001; <i>F</i> = 0,94; <i>gl</i> = 1, 9; <i>P</i> = 0,365; <i>F</i> = 50,99; <i>gl</i> = 1, 8; <i>P</i> < 0,001)
SULT1C4a	4,78 ± 0,70 Aa	4,45 ± 0,67 Aa	4,36 ± 0,39 Ab	5,63 ± 0,41 Aa	(<i>F</i> = 2,09; <i>gl</i> = 1, 10; <i>P</i> = 0,186; <i>F</i> = 1,38; <i>gl</i> = 1, 9; <i>P</i> = 0,274; <i>F</i> = 5,99; <i>gl</i> = 1, 8; <i>P</i> = 0,040)
SULT1C4b	3,51 ± 0,84 Ab	5,63 ± 0,69 Aa	3,31 ± 0,19 Aa	4,24 ± 0,32 Ba	(<i>F</i> = 20,98; <i>gl</i> = 1, 10; <i>P</i> = 0,002; <i>F</i> = 7,24; <i>gl</i> = 1, 9; <i>P</i> = 0,031; <i>F</i> = 3,40; <i>gl</i> = 1, 8; <i>P</i> = 0,108)
AKR	3,98 ± 0,43 Aa	4,01 ± 0,18 Aa	2,46 ± 0,17 Bb	3,79 ± 0,12 Aa	(<i>F</i> = 29,54; <i>gl</i> = 1, 10; <i>P</i> < 0,001; <i>F</i> = 42,41; <i>gl</i> = 1, 9; <i>P</i> < 0,001; <i>F</i> = 26,30; <i>gl</i> = 1, 8; <i>P</i> < 0,001)

RR-1a	2,34 ± 0,37 Aa	2,82 ± 0,08 Ba	0,66 ± 0,29 Bb	3,34 ± 0,16 Aa	(<i>F</i> = 95,45; <i>gl</i> = 1, 10; <i>P</i> < 0,001; <i>F</i> = 9,10; <i>gl</i> = 1, 9; <i>P</i> = 0,019; <i>F</i> = 53,67; <i>gl</i> = 1, 8; <i>P</i> < 0,001)
RR-1b	6,24 ± 1,09 b	11,80 ± 1,01 Aa	-	9,17 ± 0,24 B	(<i>F</i> = 55,50; <i>gl</i> = 1, 7; <i>P</i> < 0,001; <i>F</i> = 15,59; <i>gl</i> = 1, 6; <i>P</i> = 0,011; -)
RR-2a	11,32 ± 0,22 Aa	11,45 ± 0,14 Aa	9,57 ± 0,37 Ba	9,07 ± 0,33 Ba	(<i>F</i> = 1,61; <i>gl</i> = 1, 10; <i>P</i> = 0,240; <i>F</i> = 146,03; <i>gl</i> = 1, 9; <i>P</i> < 0,001; <i>F</i> = 3,84; <i>gl</i> = 1, 8; <i>P</i> = 0,086)
RR-2b	8,91 ± 0,93 Bb	11,58 ± 0,44 Aa	10,11 ± 0,21 Aa	9,43 ± 0,22 Ba	(<i>F</i> = 7,32; <i>gl</i> = 1, 10; <i>P</i> = 0,030; <i>F</i> = 3,73; <i>gl</i> = 1, 9; <i>P</i> = 0,095; <i>F</i> = 32,60; <i>gl</i> = 1, 8; <i>P</i> < 0,001)
Cht7	5,21 ± 0,17 Aa	6,32 ± 0,30 Ab	4,84 ± 0,47 Aa	6,62 ± 0,37 Ab	(<i>F</i> = 51,94; <i>gl</i> = 1, 10; <i>P</i> < 0,001; <i>F</i> = 0,03; <i>gl</i> = 1, 9; <i>P</i> = 0,858; <i>F</i> = 2,86; <i>gl</i> = 1, 8; <i>P</i> = 0,129)
DNMT1	3,51 ± 0,84 Ab	5,63 ± 0,69 Aa	3,31 ± 0,19 Ab	4,24 ± 0,32 Aa	(<i>F</i> = 23,88; <i>gl</i> = 1, 10; <i>P</i> = 0,001; <i>F</i> = 10,27; <i>gl</i> = 1, 9; <i>P</i> = 0,012; <i>F</i> = 0,0007; <i>gl</i> = 1, 8; <i>P</i> = 0,979)
2-OGDH	3,47 ± 0,20 Aa	3,55 ± 0,15 Ba	3,41 ± 0,05 Ab	4,42 ± 0,17 Aa	(<i>F</i> = 38,91; <i>gl</i> = 1, 10; <i>P</i> < 0,001; <i>F</i> = 21,71; <i>gl</i> = 1, 9; <i>P</i> = 0,002; <i>F</i> = 28,12; <i>gl</i> = 1, 8; <i>P</i> < 0,001)
Cit_c1	2,98 ± 0,70 Ab	4,42 ± 0,44 Aa	3,42 ± 0,04 Aa	3,67 ± 0,15 Aa	(<i>F</i> = 9,31; <i>gl</i> = 1, 10; <i>P</i> = 0,016; <i>F</i> = 0,025; <i>gl</i> = 1, 9; <i>P</i> = 0,878; <i>F</i> = 4,73; <i>gl</i> = 1, 8; <i>P</i> = 0,061)
ILP2a	11,09 ± 1,12 Aa	10,56 ± 1,04 Aa	7,59 ± 0,38 Bb	11,18 ± 0,38 Aa	(<i>F</i> = 10,74; <i>gl</i> = 1, 10; <i>P</i> = 0,011; <i>F</i> = 9,47; <i>gl</i> = 1, 9; <i>P</i> = 0,015; <i>F</i> = 19,36; <i>gl</i> = 1, 8; <i>P</i> = 0,002)

ILP2b	11,48 ± 0,45 a	11,38 ± 0,63 Aa	-	11,22 ± 0,71 A	(<i>F</i> = 0,044; <i>gl</i> = 1, 7; <i>P</i> = 0,840; <i>F</i> = 0,11; <i>gl</i> = 1, 6; <i>P</i> = 0,751; -)
-------	----------------	-----------------	---	----------------	---

¹Os valores de Δct foram obtidos através da normalização $\Delta ct = ct_{\text{geneinteresse}} - ct_{\text{GAPDH}}$. Médias de cada coluna ($\pm DP$) seguidas de mesma letra não diferem significativamente entre si (Tukey; $p > 0,05$). Letras maiúsculas indicam comparação entre raças e letras minúsculas entre linhagens da mesma raça. ²*F*: teste F; *gl*: graus de liberdade. Na linhagem C-Res não foi realizada estatística dos transcritos ILP2b e RR-1b, pois não houve amplificação em reação de qPCR.

4.4. Discussão

Neste trabalho, foram utilizadas linhagens resistentes ao inseticida teflubenzuron, um dos inseticidas do grupo das benzoilureias, para entender a expressão de genes potencialmente relacionados a resistência, nas raças de *S. frugiperda*. A partir de um transcrito prévio, foram escolhidos transcritos diferencialmente expressos entre uma linhagem suscetível e outra resistente a teflubenzuron, relacionados a enzimas de desintoxicação (P450 e sulfotransferases), tegumento (quitinase, proteínas RR-1 e RR-2), regulação gênica (DNA metil transferase) e diversos outros relacionados ao metabolismo energético. No presente trabalho, foram utilizadas linhagens resistentes e suscetíveis da raça milho “pura” (C-Res e C-Sus) e raça “híbrida” (RC-Res e RC-Sus) de *S. frugiperda*, sendo esta última identificada como raça arroz pelo DNA mitocondrial e raça milho pelo DNA nuclear. A análise de expressão gênica relativa demonstrou que o perfil da linhagem C-Res é mais semelhante ao de Tef-rr, linhagem do transcrito de referência utilizado a qual foi identificada como raça milho por ambos os marcadores (NASCIMENTO, 2018).

Nos insetos, os inseticidas comumente induzem um aumento da atividade metabólica de enzimas que participam de processos de desintoxicação de xenobióticos. Na fase I (primária) deste processo, encontram-se as enzimas do complexo citocromo P450 (CYPs). As CYPs fazem parte de uma superfamília enzimática muito importante, e estão envolvidas no metabolismo de xenobióticos naturais e sintéticos. Existem 4 grandes clados de genes P450 em insetos, CYPM (mitocondrial), CYP2, CYP3 e CYP4, sendo os dois últimos os maiores e principais responsáveis pelo metabolismo de xenobióticos e resistência a inseticidas (FEYEREISEN, 2006). Dada a relevância do clado CYP3 neste contexto de resistência, no presente trabalho foram escolhidos transcritos pertencentes a ele. O metabolismo de xenobióticos através da desintoxicação foi declarado como sendo de suma importância e um processo-chave para a resistência a teflubenzuron (NASCIMENTO et al., 2021) e lufenuron (NASCIMENTO et al., 2015). Relacionados a desintoxicação, foram avaliadas a expressão de 4 transcritos relativos a enzimas do citocromo P450 (CYP), 1 aldol redutase e 2 sulfotransferases, sendo todos super expressos em Tef-rr (resistente a teflubenzuron) no transcrito de referência (NASCIMENTO, 2018).

No presente trabalho, o transcrito CYP6AB31 foi superexpresso em RC-Res e C-Res. Em *Spodoptera litura*, a alta expressão do gene CYP6AB31 no intestino médio e corpo gorduroso é correlacionada com a resistência a piretroides (LI et al., 2019). Já os transcritos CYP6AE44 e CYP321A8 foram superexpressos apenas em C-Res. O silenciamento do cluster

CYP6AE em uma linhagem de *Helicoverpa armigera* aumentou a suscetibilidade a algumas toxinas de plantas e inseticidas sintéticos (WANG et al., 2018), indicando a importância deste cluster para a desintoxicação de xenobióticos. Em *S. frugiperda* o gene CYP321A8 desempenha um papel crítico na desintoxicação em uma linhagem resistente a chlorantraniliprole (BAI-ZHONG et al., 2020), enquanto que outro transcrito da subfamília CYP321A foi altamente expresso em uma linhagem resistente ao inseticida lufenuron (NASCIMENTO et al., 2015). Em *Spodoptera*, transcritos da subfamília CYP321A são altamente expressos no intestino médio e/ou corpo gorduroso (BAI-ZHONG et al., 2020; WANG et al., 2017). Aparentemente a alta expressão destes transcritos são um indicativo de resistência a benzoilureias, ao menos para linhagens da raça milho.

Além das CYPs, os insetos também apresentam enzimas redutases que catalisam a redução de xenobióticos na fase I, embora sejam menos comuns que as oxidases. Dentre as reações de redução, existe a redução de aldeídos e cetonas, catalisadas pelas enzimas aldeído redutases ou aldo-ceto redutases (AKRs). Referente a essas enzimas, foi avaliada a expressão do transcrito AKR, o qual foi mais expresso na linhagem C-Res comparada às demais. As AKRs estão envolvidas na resposta a estresses e desintoxicação de xenobióticos, e foram associadas na resistência a piretroides (BARSKI; TIPPARAJU; BHATNAGAR, 2008; MOYES et al., 2017; PENNING, 2015).

Os produtos provenientes da fase I da desintoxicação podem passar por reações de conjugação com moléculas endógenas, as quais ocorrem durante a fase II. Os produtos após conjugação são mais polares, menos tóxicos e mais rapidamente excretados. Uma família de enzimas que atuam na fase II são as sulfotransferases (SULTs). As SULTs catalisam a última fase da reação de transferência de um grupo sulfato ao grupo hidroxil do aceptor (YU, 2008). No presente trabalho, o transcrito SULT1C4b foi significativamente mais expresso em ambas as linhagens resistentes comparado as respectivas suscetíveis, enquanto que SULT1C4a foi apenas em C-Res. As enzimas SULTs já foram relatadas como sendo um dos mecanismos associados a resistência a inseticidas (BONIZZONI et al., 2015), e a alta expressão delas está relacionada a resposta metabólica do inseto após contaminação por diflubenzuron (MERZENDORFER et al., 2012).

Após a contaminação por diflubenzuron, a expressão de genes relacionados a proteínas estruturais da cutícula também pode ser afetada, dentre elas as proteínas “RR” (MERZENDORFER et al., 2012). A família de proteínas cuticulares mais abundantes em insetos contém uma sequência conhecida como Rebers-Riddiford (RR), a qual pode ocorrer

em três formas: RR-1, RR-2 e RR-3, sendo as duas primeiras as formas mais comuns. As proteínas que contêm a forma RR-1 são comumente encontradas na cutícula flexível, a RR-2 encontrada na cutícula endurecida, e a RR-3 na cutícula pós-ecdisial (ANDERSEN, 2000; VANNINI; WILLIS, 2017). Foram encontradas diferenças na expressão dessas proteínas cuticulares entre raças. O transcrito RR-1a relativo à proteína RR-1 foi superexpresso na linhagem C-Res, enquanto que RR-1b foi superexpresso apenas em RC-Res, em relação as demais linhagens. Relacionado a proteínas RR-2, apenas o transcrito RR-2b foi superexpresso, também na linhagem RC-Res. Aparentemente, as linhagens resistentes apresentam alta expressão dessas proteínas cuticulares como uma forma compensatória para lidar com as alterações estruturais decorrentes da ação do inseticida, fenômeno este já conhecido (EL-BROLOS; STAINIER, 2017), podendo proporcionar um endurecimento, espessamento ou reorganização estrutural do tecido. Em teoria, esse reforço do tecido cuticular necessitaria de uma maior quantidade de enzimas para degradar o mesmo. A degradação da quitina é catalisada por diversas enzimas hidrolíticas, dentre elas as quitinases (DOUCET; RETNAKARAN, 2012). Em insetos, as quitinases estão envolvidas em processos de digestão e muda, no dobramento da cutícula e da membrana peritrófica. No presente trabalho, foi encontrada uma superexpressão do transcrito Cht7 nas linhagens resistentes RC-Res e C-Res, que se refere a uma quitinase 7. A alta expressão desta enzima nas linhagens resistentes pode estar relacionada com a necessidade de degradar a cutícula reforçada com proteínas cuticulares, e desta forma explicar os resultados obtidos.

A 2-oxoglutarato mitocondrial desidrogenase (2-OGDH), também denominada de α -cetoglutarato desidrogenase, é uma das três enzimas do complexo oxoglutarato desidrogenase, complexo este importante no ciclo de Krebs pela catalise da reação de conversão de 2-oxoglutarato, coenzima A e NAD^+ a succinil-Coenzima A, NADH e CO_2 (TRETTER; ADAM-VIZI, 2005). A enzima 2-OGDH é responsável pela descarboxilação do cetoácido 2-oxoglutarato no início do ciclo, e é dependente da disponibilidade de seu substrato, devido a isto, o 2-oxoglutarato tem um papel crucial no metabolismo de energia celular (WU et al., 2016). Também tem ação antioxidante (LONG; HALLIWELL, 2011) e promove aumento de longevidade (CHIN et al., 2014), o que poderia explicar a maior longevidade de adultos das linhagens resistentes encontradas na avaliação de parâmetros biológicos do Capítulo 3. A expressão elevada de 2-OGDH e de outros componentes, poderia indicar atividade aumentada deste complexo enzimático e conseqüentemente da respiração celular. No presente trabalho, C-Res apresentou superexpressão do transcrito 2-OGDH comparado a C-Sus, contudo, não

diferiu de RC-Res e RC-Sus. Este complexo enzimático representa o principal modulador do fluxo do ciclo de Krebs, e conseqüentemente da atividade cadeia transportadora de elétrons e da produção de ATP (HANSFORD, 1980; TRETTER; ADAM-VIZI, 2005). O Citocromo C1 (CytC1) é uma proteína importante para a transferência de elétrons durante a fosforilação oxidativa. Essa proteína aceita um elétron do Citocromo b e o transfere para Citocromo C (CytC), a qual segue para a última etapa da cadeia transportadora de elétrons (Complexo IV). Neste trabalho, o transcrito Cit_c1 foi mais expresso em RC-Res comparado a RC-Sus, todavia, não diferiu de C-Res e C-Sus. Considerando as diferenças encontradas na expressão destes transcritos, é possível que a modulação da respiração celular possa ser um fator contribuinte para a resistência.

Nos insetos, os peptídeos tipo insulina (ILPs) desempenham importantes funções na regulação do desenvolvimento, metabolismo, reprodução, imunidade, comportamento, resistência a estresses e envelhecimento (KANNAN; FRIDELL, 2013). Os peptídeos tipo insulina 2 (ILP2) podem atuar promovendo o consumo de reservas de carboidrato durante a fase larval, embora a regulação do metabolismo seja particularmente complexa (KANNAN; FRIDELL, 2013; SATAKE et al., 1997). O transcrito ILP2a, relativo a um ILP2, foi superexpresso em C-Res comparado as demais três linhagens. Essa alta expressão indica um consumo elevado de reservas de energia, o qual seria necessário para fornecer insumos para outras vias metabólicas altamente expressas, como as de desintoxicação por exemplo. Em uma linhagem de *Culex pipiens*, resistente a inseticidas pela superexpressão de enzimas esterases, os insetos resistentes apresentaram 30% a menos de reservas energéticas comparados aos respectivos suscetíveis (RIVERO et al., 2011), demonstrando o custo energético da resistência.

Em *S. frugiperda*, a resistência as benzoilureias foi relatada como sendo poligênica, através da regulação da expressão gênica em muitas vias de desintoxicação (NASCIMENTO, 2018; NASCIMENTO et al., 2016). A análise da expressão gênica demonstra que diferentes vias metabólicas podem estar contribuindo para a resistência, de forma distinta entre as raças. Quando a resistência é poligênica, ou seja, resultando da soma dos efeitos aditivos causados por respostas de diferentes genes (BOHANNAN et al., 1999; RAYMOND; HECKEL; SCOTT, 1989), essa característica pode contribuir com os resultados relacionados a custo adaptativo observados no Capítulo 3.

Relacionado a regulação da expressão gênica, no presente trabalho, foi avaliada a expressão de uma DNA metil transferase 1 (DNMT1). As DNMTs constituem um grupo enzimático que está envolvido na regulação da expressão gênica através da adição de grupos metil, podendo inibir a transcrição gênica bloqueando a acessibilidade a ativadores de transcrição quando em regiões promotoras ou aumentar a expressão quando presente no corpo dos genes (LYKO, 2018). As DNMTs podem atuar regulando o processo de splicing alternativo e assim enriquecer o repertório do transcrito, contribuindo para a diversidade transcritômica e proteômica (CHAUDHARY et al., 2019; MAOR; YEARIM; AST, 2015). O processo de splicing alternativo foi relatado como mecanismo gerador de heterogeneidade transcritômica (RANSON; COLLINS; HEMINGWAY, 1998), fenômeno este associado a casos de resistência em diferentes espécies de insetos (BAXTER et al., 2010; BERGER et al., 2016; DE MANDAL et al., 2019; FABRICK et al., 2014). O transcrito DNMT1 aqui avaliado foi super expresso nas linhagens C-Res e RC-Res, contudo, não houveram diferenças entre raças. A superexpressão de DNMT1 indica uma maior taxa de metilação de DNA em ambas as linhagens resistentes, o que pode estar contribuindo para o fenótipo resistente. A metilação do DNA já foi relatada como sendo responsável pela amplificação de esterases e consequente resistência metabólica em *Myzus persicae*, podendo haver demetilação e assim silenciamento na ausência do inseticida, de forma a reduzir o excesso da produção enzimática e assim o custo adaptativo (BASS et al., 2014; FFRENCH-CONSTANT, 2013; FIELD; DEVONSHIRE, 1998). O conhecimento neste respeito ainda é incipiente, portanto mais estudos são necessários para entender a contribuição da metilação na resistência de insetos a inseticidas (OPPOLD; MULLER, 2017).

Estudos recentes indicaram que a falta de um agrupamento consistente no genoma nuclear com base na raça e a baixa correlação entre raça mitocondrial e nuclear sugere que está ocorrendo hibridização e que os marcadores disponíveis podem não ser suficientes para definir a raça, já que são insuficientes para determinar a extensão do componente genético de cada raça ocupado no genoma do híbrido (SCHLUM et al., 2020). Os resultados aqui obtidos indicam que a raça híbrida difere da raça milho na expressão da maioria dos genes testados, o que pode ser reflexo da combinação do material genético das duas raças. Desta forma, reforçam a hipótese de que os híbridos diferem das linhagens parentais em diferentes aspectos, e que, portanto, devem ser considerados em estudos futuros.

4.5. Conclusões

- As raças milho e híbrida de *S. frugiperda* apresentam padrão de expressão gênica distinto para a maioria dos transcritos avaliados;
- As proteínas cuticulares RR-1 e RR-2 foram superexpressas na raça híbrida resistente a teflubenzuron em comparação com a raça híbrida suscetível e raça milho resistente a teflubenzuron;
- As enzimas CYPs foram superexpressas na raça milho resistente a teflubenzuron em comparação com a raça milho suscetível e raça híbrida resistente a teflubenzuron.

REFERÊNCIAS

- ADAMCZYK, J. J. et al. Susceptibility of fall armyworm collected from different plant hosts to selected insecticides and transgenic Bt cotton. **Journal of Cotton Science**, v. 1, n. 1, p. 21–28, 1997.
- ANDERSEN, S. O. Studies on proteins in post-ecdysial nymphal cuticle of locust, *Locusta migratoria*, and cockroach, *Blaberus craniifer*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 30, n. 7, p. 569–577, 2000.
- BAI-ZHONG, Z. et al. Silencing of Cytochrome P450 in *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) by RNA Interference Enhances Susceptibility to Chlorantraniliprole. **Journal of Insect Science**, v. 20, n. 3, p. 1–7, 2020.
- BARSKI, O. A.; TIPPARAJU, S. M.; BHATNAGAR, R. The Aldo-Keto Reductase Superfamily and its Role in Drug Metabolism and Detoxification. **Drug Metabolism Reviews**, v. 40, n. 4, p. 553–624, 2008.
- BASS, C. et al. The evolution of insecticide resistant in the peach potato aphid, *Myzus persicae*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 51, n. October, p. 41–51, 2014.
- BAXTER, S. W. et al. Mis-spliced transcripts of nicotinic acetylcholine receptor $\alpha 6$ are associated with field evolved spinosad resistance in *Plutella xylostella* (L.). **PLoS Genetics**, v. 6, n. 1, 2010.
- BERGER, M. et al. Insecticide resistance mediated by an exon skipping event. **Molecular Ecology**, v. 25, n. 22, p. 5692–5704, 2016.
- BOHANNAN, B. J. M.; TRAVISANO, M.; LENSKI, R. E. Epistatic Interactions Can Lower the Cost of Resistance to Multiple Consumers. **Evolution**, v. 53, n. 1, p. 292–295, 1999.

- BONIZZONI, M. et al. RNA-seq analyses of changes in the *Anopheles gambiae* transcriptome associated with resistance to pyrethroids in Kenya: identification of candidate-resistance genes and candidate-resistance SNPs. **Parasites & Vectors**, p. 1–13, 2015.
- BUSATO, G. R. et al. Susceptibilidade de lagartas dos biótipos milho e arroz de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) a inseticidas com diferentes modos de ação. **Ciencia Rural**, v. 36, n. 1, p. 15–20, 2006.
- CHAUDHARY, S. et al. Alternative splicing and protein diversity: Plants versus animals. **Frontiers in Plant Science**, v. 10, n. June, p. 1–14, 2019.
- CHIN, R. M. et al. The metabolite α -ketoglutarate extends lifespan by inhibiting ATP synthase and TOR. **Nature**, v. 510, p. 397–401, 2014.
- DE MANDAL, S. et al. Alternative splicing and insect ryanodine receptor. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, v. 102, n. 3, 2019.
- DOUCET, D.; RETNAKARAN, A. Insect Chitin: Metabolism, Genomics and Pest Management. In: **Advances in Insect Physiology**. 1. ed. [s.l.] Elsevier Ltd., 2012. p. 437–511.
- DOURIS, V. et al. Resistance mutation conserved between insects and mites unravels the benzoylurea insecticide mode of action on chitin biosynthesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 113, n. 51, p. 14692–14697, 2016.
- EL-BROLOSY, M. A.; STAINIER, D. Y. R. Genetic compensation: A phenomenon in search of mechanisms. **PLoS Genetics**, v. 13, n. 7, p. 1–17, 2017.
- FABRICK, J. A. et al. Alternative splicing and highly variable cadherin transcripts associated with field-evolved resistance of pink bollworm to Bt cotton in India. **PLoS ONE**, v. 9, n. 5, p. 1–13, 2014.
- FEYEREISEN, R. Evolution of insect P450. **Biochemical Society Transactions**, v. 34, n. 6, p. 1252–1255, 2006.
- FFRENCH-CONSTANT, R. H. The molecular genetics of insecticide resistance. **Genetics**, v. 194, n. 4, p. 807–815, 2013.
- 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**, v. 330, p. 169–173, 1998.

- FOTAKIS, E. A. et al. Identification and detection of a novel point mutation in the Chitin Synthase gene of *Culex pipiens* associated with diflubenzuron resistance. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 14(5):e000, p. 1–10, 2020.
- GOUIN, A. et al. Two genomes of highly polyphagous lepidopteran pests (*Spodoptera frugiperda*, Noctuidae) with different host-plant ranges. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1–12, 2017.
- HANSFORD, R. G. Control of Mitochondrial Substrate Oxidation. In: **Current Topics in Bioenergetics**. [s.l.] ACADEMIC PRESS, INC., 1980. v. 10p. 217–278.
- INGBER, D. A. et al. Oviposition preferences, Bt susceptibilities, and tissue feeding of fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) host strains. **Pest Management Science**, 2021.
- KANNAN, K.; FRIDELL, Y. C. Functional implications of *Drosophila* insulin-like peptides in metabolism, aging, and dietary restriction. **Frontiers in Physiology**, v. 4, n. October, p. 1–8, 2013.
- KASTEN JR., P.; PRECETTI, A. A. C. M.; PARRA, J. R. P. Dados biológicos comparativos de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1979) em duas dietas artificiais e substrato natural. **Revista de Agricultura**, v. 53, p. 68–78, 1978.
- LI, D. et al. Transcriptome analysis of molecular mechanism to pyrethroids resistance in *Spodoptera litura*. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 169, p. 1–31, 2020.
- LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402–408, 2001.
- LONG, L. H.; HALLIWELL, B. Biochemical and Biophysical Research Communications Artefacts in cell culture : a-Ketoglutarate can scavenge hydrogen peroxide generated by ascorbate and epigallocatechin gallate in cell culture media. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 406, n. 1, p. 20–24, 2011.
- LYKO, F. The DNA methyltransferase family: A versatile toolkit for epigenetic regulation. **Nature Reviews Genetics**, v. 19, n. 2, p. 81–92, 2018.
- MAOR, G. L.; YEARIM, A.; AST, G. The alternative role of DNA methylation in splicing regulation. **Trends in Genetics**, v. 31, n. 5, p. 1–7, 2015.
- MERZENDORFER, H. et al. Genomic and proteomic studies on the effects of the insect growth regulator diflubenzuron in the model beetle species *Tribolium castaneum*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 42, n. 4, p. 264–276, 2012.
- MORAL, R. A.; HINDE, J.; DEMÉTRIO, C. G. B. Half-normal plots and overdispersed models in R: The hnp package. **Journal of Statistical Software**, v. 81, n. 10, 2017.

- MOYES, C. L. et al. Contemporary status of insecticide resistance in the major *Aedes* vectors of arboviruses infecting humans. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 7, p. 1–20, 2017.
- NASCIMENTO, A. R. B. Exploiting next generation sequencing techniques (NGS) to identify molecular markers for monitoring the resistance of *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) to insecticides and Bt proteins. University of São Paulo, 2018.
- NASCIMENTO, A. R. B. et al. There is more than chitin synthase in insect resistance to benzoylureas: Molecular markers associated with teflubenzuron resistance in *Spodoptera frugiperda*. **Journal of Pest Science**, 2021.
- NASCIMENTO, A. R. B. DO et al. Comparative transcriptome analysis of lufenuron-resistant and susceptible strains of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). **BMC Genomics**, v. 16, n. 1, p. 1–12, 2015.
- 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, 2016.
- OPPOLD, A.-M.; MULLER, R. Epigenetics: A Hidden Target of Insecticides. In: **Advances in Insect Physiology**. [s.l: s.n.]. v. 53p. 313–324.
- ORSUCCI, M. et al. Transcriptional differences between the two host strains of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). **bioRxiv**, 2020.
- PASHLEY, D. P. Host-associated Genetic Differentiation in Fall Armyworm (Lepidoptera: Noctuidae): A Sibling Species Complex? **Annals of the Entomological Society of America**, v. 79, n. 3, p. 898–904, 1986.
- PASHLEY, D. P.; MARTIN, J. A. Reproductive Incompatibility Between Host Strains of the Fall Armyworm (Lepidoptera: Noctuidae). **Annals of the Entomological Society of America**, v. 80, n. 6, p. 731–733, 1987.
- PENNING, T. M. Chemico-Biological Interactions The aldo-keto reductases (AKRs): Overview. **Chemico-Biological Interactions**, v. 234, n. August 2014, p. 236–246, 2015.
- POPHAM, H. J. R.; ROWLEY, D. L.; HARRISON, R. L. Differential insecticidal properties of *Spodoptera frugiperda* multiple nucleopolyhedrovirus isolates against corn-strain and rice-strain fall armyworm , and genomic analysis of three isolates. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 183, n. July 2020, p. 107561, 2021.

- RANSON, H.; COLLINS, F.; HEMINGWAY, J. The role of alternative mRNA splicing in generating heterogeneity within the *Anopheles gambiae* class I glutathione S-transferase family. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 95, n. 24, p. 14284–14289, 1998.
- RAYMOND, M.; HECKEL, D. G.; SCOTT, J. G. Interactions Between Pesticide Genes: Model and Experiment. **Genetics**, v. 123, p. 543–551, 1989.
- RÍOS-DÍEZ, J. D.; SALDAMANDO-BENJUMEA, C. I. Susceptibility of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) Strains From Central Colombia to Two Insecticides, Methomyl and Lambda-Cyhalothrin: A Study of the Genetic Basis of Resistance. **Journal of Economic Entomology**, v. 104, n. 5, p. 1698–1705, 2011.
- RIVERO, A. et al. Energetic Cost of Insecticide Resistance in *Culex pipiens* Mosquitoes. **Journal of Medical Entomology**, v. 48, n. 3, p. 694–700, 2011.
- SATAKE, S. I. et al. Bombyxin, an Insulin-Related Peptide of Insects, Reduces the Major Storage Carbohydrates in the Silkworm *Bombyx mori*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, v. 118, n. 2, p. 349–357, 1997.
- SCHLUM, K. A. et al. Whole genome comparisons reveal panmixia among fall armyworm (*Spodoptera frugiperda*) from diverse locations. **bioRxiv**, p. 2020.09.25.314005, 2020.
- TRETTER, L.; ADAM-VIZI, V. Alpha-ketoglutarate dehydrogenase: A target and generator of oxidative stress. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 360, n. 1464, p. 2335–2345, 2005.
- VAN LEEUWEN, T. et al. Population bulk segregant mapping uncovers resistance mutations and the mode of action of a chitin synthesis inhibitor in arthropods. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 109, n. 12, p. 4407–4412, 2012.
- VANNINI, L.; WILLIS, J. H. Localization of RR-1 and RR-2 cuticular proteins within the cuticle of *Anopheles gambiae*. **Arthropod Structure and Development**, v. 46, n. 1, p. 13–29, 2017.
- WANG, H. et al. CYP6AE gene cluster knockout in *Helicoverpa armigera* reveals role in detoxification of phytochemicals and insecticides. **Nature Communications**, v. 9, n. 1, 2018.
- WANG, R. L. et al. Identification of two cytochrome monooxygenase P450 genes, CYP321A7 and CYP321A9, from the tobacco cutworm moth (*Spodoptera litura*) and

their expression in response to plant allelochemicals. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 11, p. 1–12, 2017.

WU, N. et al. Alpha-Ketoglutarate: Physiological Functions and Applications. **Biomolecules & Therapeutics**, v. 24, n. 1, p. 1–8, 2016.

YU, S. J. Detoxification Mechanisms in Insects. In: **Encyclopedia of Entomology**. [s.l.] Springer, 2008. p. 1187–1201.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O conhecimento da variabilidade intraespecífica em populações de insetos-praga é de fundamental importância para a implementação de programas efetivos de manejo integrado. Esta dissertação buscou compreender o impacto da diferenciação de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) em duas raças associadas a hospedeiros denominadas de raças “arroz” e “milho”, assim como “híbridos” resultantes do cruzamento entre estas raças em programas de manejo da resistência a inseticidas. A partir de uma população de *S. frugiperda* coletada na cultura do milho no Estado do Rio Grande do Sul, foi possível isolar as raças milho (C) e híbrida (RC). De cada raça, foi possível também a seleção de uma linhagem suscetível (Sus) e resistente (Res) a teflubenzuron. Portanto, as comparações de todos os parâmetros neste trabalho foram realizadas com linhagens apresentando o mesmo componente genético.

A raça milho (C) apresentou maior suscetibilidade para a maioria dos inseticidas testados, em comparação com a raça híbrida. De forma similar, na caracterização da resistência a teflubenzuron, a raça híbrida resistente (RC-Res) apresentou maior CL_{50} que a raça milho resistente (C-Res) e a razão de resistência a teflubenzuron foi mais alta para a raça milho. As linhagens resistentes a teflubenzuron das raças C e RC apresentaram custo adaptativo, com redução de fecundidade e fertilidade. Contudo, o fator raça não influenciou na magnitude do custo adaptativo. A partir de estudos de expressão diferencial de alguns genes candidatos relacionados à resistência de *S. frugiperda* a teflubenzuron, os transcritos relacionados a enzimas do complexo citocromo P450 foram superexpressos na linhagem resistente da raça milho (C-Res), por outro lado, os transcritos referentes a proteínas cuticulares RR-1 e RR-2 se destacaram na linhagem resistente da raça híbrida (RC-Res), demonstrando que a regulação da expressão gênica ocorre de forma diferencial para as linhagens resistentes a teflubenzuron das raças milho e híbrida.

Portanto, o conhecimento da paisagem agrícola de uma determinada região poderá interferir na distribuição relativa de raças de *S. frugiperda* e consequente impacto na suscetibilidade a inseticidas. Desta forma, determinar a frequência de ocorrência dessas raças no campo é essencial para implementar estratégias efetivas de manejo da resistência. Trabalhos semelhantes precisam ser conduzidos utilizando populações de *S. frugiperda* coletadas em outras localidades com sistema de produção de cultivos distintos. Além disso, a presença de custo adaptativo associado à resistência a teflubenzuron nas raças milho e híbrida é um resultado que pode ser explorado no MRI, pelo uso rotacionado de inseticidas com modo de ação distinto, assim como outras táticas de controle, de forma a reduzir os indivíduos

resistentes no campo e assim prolongar a vida útil das benzoilureias como ferramenta no manejo de *S. frugiperda*.