Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"

Monitoramento e caracterização da resistência de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) a inseticidas diamidas no Brasil

Anderson Bolzan

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor em Ciências. Área de concentração: Entomologia

Piracicaba
2019

Anderson Bolzan
Engenheiro Agrônomo

Monitoramento e caracterização da resistência de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) a inseticidas diamidas no Brasil

versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

Orientador:
Professor. Dr. **CELSO OMOTO**

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor em Ciências: área de concentração: Entomologia

Piracicaba
2019

Dados internacionais de Catalogação na Publicacao

DIVISAO DE BIBLIOTECA – DIBD/ESALQ/USP

Bolzan, Anderson

Monitoramento e caracterização da resistência de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) a inseticidas diamidas no Brasil / Anderson Bolzan. - - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2019.

101 p.

Tese (Doutorado) - - USP / Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”.

1. Chlorantraniliprole 2. Cyantraniliprole 3. Flubendiamide 4. Lagarta-do-cartucho do milho 5. Manejo da resistência de insetos a inseticidas I. Título

A Deus, pela saúde para completar mais este desafio em minha vida.

Agradeço

Aos meus pais Airton Fernando Bolzan e Eloá Maria Druzian Bolzan, meu irmão Diego Bolzan e minha noiva Jamile Fernanda Mainardi pelo amor, dedicação, carinho e incentivo à realização deste sonho.

Dedico e agradeço

AGRADECIMENTOS

À Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.

Ao Programa de Pós-graduação em Entomologia USP/ESALQ, pela oportunidade de realizar o curso de doutorado.

Ao meu orientador, Dr. Celso Omoto, pelo carinho, dedicação, ensinamentos e paciência durante a realização do curso. Muito obrigado!

A todos os professores do Departamento de Entomologia e Acarologia USP/ESALQ, pelos ensinamentos, convívio e experiências. Os senhores foram essenciais para minha formação, sempre serei grato.

Ao Dr. Ralf Nauen, pelo aprendizado, suporte e oportunidade de realizar parte dos trabalhos no Laboratório de Toxicologia e Resistência de Insetos da Bayer AG, CropScience Division, Monheim am Rhein, Alemanha.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudo (Processo: 141371/2015-3), e ao Comitê de Ação à Resistência a Inseticidas (IRAC-BR), pelo suporte à realização do trabalho.

Aos membros Comissão Coordenadora do Programa em Entomologia USP/ESALQ, 2018, pelo convívio e experiências. Em especial ao coordenador Dr. Fernando L. Cônsoli.

Aos funcionários do Departamento de Entomologia e Acarologia USP/ESALQ. Em especial à Andrea Varella Sintoni, Maria Marta Colletti e Francisco Carlos Prata “Chico”, pela disponibilidade e amizade nestes 4 anos.

Aos colegas do Programa de Pós-graduação em Entomologia USP/ESALQ, pelo convívio e companheirismo durante o curso.

À Dra. Eloisa Salmeron, pesquisadora assistente do Laboratório de Resistência de Artrópodes USP/ESALQ, pela ajuda e amizade desde o início do curso de doutorado.

Aos atuais colegas e amigos de Pós-graduação do Laboratório de Resistência de Artrópodes USP/ESALQ, Aline Sartori Guidolin, Daniela M. Okuma, Douglas Amado, Dyrson Abbade Neto, Erick Cordeiro, Ewerton C. Lira, Fernando E. O. Padovez, Fernando S. A. Amaral, Ingrid S. Kaiser, Juliana Rodrigues, Renato Horikoshi, Rubens H. Kanno e Sandy Spineli, pela ajuda, amizade e descontração. Foi muito bom dividir esses momentos com vocês, sempre recordarei!

Aos colegas e amigos de Pós-graduação que já deixaram o Laboratório de Resistência de Artrópodes USP/ESALQ, Antonio R. B. Nascimento, Felipe Antônio Domingues, José P. F. Bentivenha, Mariana R. Durigan, Natália Alves Leite, Oderlei Bernardi, Osmar Arias e

Rogério M. Pereira. Muito obrigado pela amizade e auxílio sempre que precisei, foi muito bom ter convivido e aprendido com vocês.

Aos colegas e amigos que fiz na Alemanha, Débora Boaventura, Sonja Mehlhorn, Julie Ulrich, Luise Rüβmann e Azim Qureshi.

Aos funcionários e estagiários do Laboratório de Resistência de Artrópodes USP/ESALQ, pela disponibilidade e amizade durante este período. Especialmente para Janice Soares.

Ao amigo Fernando E. O. Padovez "D-tona", pelo auxílio nos experimentos e disponibilidade independente do dia e da hora.

A todos que fizeram parte da equipe F_2 Spodoptera, principalmente para Aline Sartori Guidolin, Ewerton C. Lira, Fernando S. A. Amaral, Fernando E. O. Padovez, Ingrid S. Kaiser, Rubens H. Kanno.

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

Aos meus pais, Airton Fernando Bolzan e Eloá Maria Druzian Bolzan, meu irmão Diego Bolzan e minha noiva Jamile Fernanda Mainardi pelo carinho, suporte e incentivo para a realização de meus sonhos.

Para todos aqueles que direta ou indiretamente me auxiliaram na realização deste trabalho.

SUMÁRIO

RESUMO 8
ABSTRACT 9
LISTA DE FIGURAS 10
LISTA DE TABELAS 12
1. INTRODUÇÃO 13
REFERÊNCIAS 17
2. MONITORAMENTO DA RESISTÊNCIA DE *Spodoptera frugiperda* (J. E. SMITH) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE) A INSETICIDIDAS DIAMIDAS NO BRASIL 25
2.1. INTRODUÇÃO 26
2.2. MATERIAL E MÉTODOS 27
2.2.1. Coleta das populações de *S. frugiperda* 27
2.2.2. Monitoramento genotípico da resistência de *S. frugiperda* ao inseticida chlorantraniliprole 28
2.2.3. Monitoramento fenotípico da resistência de *S. frugiperda* a chlorantraniliprole e flubendiamide 31
2.2.4. Análise estatística 36
2.3. RESULTADOS 37
2.3.1. Monitoramento genotípico da resistência de *S. frugiperda* ao inseticida chlorantraniliprole 37
2.3.2. Monitoramento fenotípico da resistência de *S. frugiperda* a chlorantraniliprole e flubendiamide 38
2.4. DISCUSSÃO 48
2.5. CONCLUSÕES 51
REFERÊNCIAS 51
3. SELEÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA HERANÇA DA RESISTÊNCIA DE *Spodoptera frugiperda* (J. E. SMITH) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE) A CHLORANTRANILIPROLE E RESISTÊNCIA CRUZADA A INSETICIDAS DIAMIDAS 57
3.1. INTRODUÇÃO 58
3.2. MATERIAL E MÉTODOS 60
3.2.1. Obtenção e criação das linhagens 60
3.2.2. Seleção da linhagem de *S. frugiperda* resistente a chlorantraniliprole 60
3.2.3. Caracterização da resistência de *S. frugiperda* a chlorantraniliprole 61
3.2.4. Herança da resistência 62
3.2.4.1. Dominância da resistência 62
3.2.4.2. Número de genes associados a resistência 62
3.2.5. Sobrevivência em plantas de milho 63
3.2.6. Resistência cruzada de *S. frugiperda* a inseticidas diamidas 64
3.3. RESULTADOS 65
3.3.1. Caracterização da resistência de *S. frugiperda* a chlorantraniliprole 65
3.3.2. Herança da resistência 65
3.3.2.1. Dominância da resistência 66

3.3.2.2. Número de genes associados a resistência 66
3.3.2.3. Sobrevivência em plantas de milho 67
3.3.3. Resistência cruzada de *S. frugiperda* a inseticidas diamidas 68
3.4. DISCUSSÃO 69
3.5. CONCLUSÕES 72
REFERÊNCIAS 72
4. INVESTIGAÇÃO DOS MECANISMOS ASSOCIADOS À RESISTÊNCIA DE *Spodoptera frugiperda* A INSETICIDAS DIAMIDAS 81
4.1. INTRODUÇÃO 82
4.2. MATERIAL E MÉTODOS 84
4.2.1. Linhagens e populações de campo 84
4.2.2. Inseticidas e sinergistas 85
4.2.3. Bioensaios com sinergistas 86
4.2.4. Sequenciamento parcial dos receptors de rianodina 87
4.2.5. Pirosequenciamento para genotipagem de mutações no sítio de ação das diamidas 88
4.3. RESULTADOS 89
4.3.1. Bioensaios com sinergistas 89
4.3.2. Sequenciamento parcial do receptor de rianodina 89
4.3.3. Genotipagem por pirosequenciamento 91
4.4. DISCUSSÃO 92
4.5. CONCLUSÕES 95
REFERÊNCIAS 95
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS 101

RESUMO

Monitoramento e caracterização da resistência de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) a inseticidas diamidas no Brasil

O controle de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) tem sido realizado principalmente pelo uso de inseticidas químicos e plantas geneticamente modificadas que expressam toxinas de *Bacillus thuringiensis* Berliner (Bt) no Brasil. Casos de evolução da resistência no campo a estes agentes de controle têm sido uma das grandes ameaças para programas de MIP. Inseticidas diamidas ainda representam uma importante opção para o manejo de *S. frugiperda*; sendo assim, estudos que fomentem a implementação de estratégias pró-ativas de manejo da resistência são fundamentais para a manutenção da eficácia deste grupo químico no controle de *S. frugiperda*. Os objetivos da presente tese foram: (i) Monitorar a resistência de *S. frugiperda* a inseticidas diamidas no Brasil, utilizando métodos genotípico e fenotípico; (ii) Selecionar em laboratório uma linhagem de *S. frugiperda* resistente a inseticidas diamidas e caracterizar as bases genéticas da resistência; e (iii) Investigar os mecanismos associados à resistência de *S. frugiperda* a inseticidas diamidas. O método de F_2 "screen" foi utilizada para o monitoramento genotípico da resistência de *S. frugiperda* ao inseticida chlorantraniliprole, sendo testadas 817 isolinhas provenientes de 14 populações brasileiras de *S. frugiperda* entre os anos agrícolas 2016 e 2017. Dentre as populações testadas, foi verificada uma variação de 0,0030 a 0,0781 na frequência de alelos que conferem resistência a chlorantraniliprole, com média geral de 0,0217. No monitoramento fenotípico, foram testadas ≈ 70 populações de *S. frugiperda* coletadas das principais regiões produtoras de milho durante os anos agrícolas 2016, 2017 e 2018. A sobrevivência larval para o inseticida chlorantraniliprole variou de 0,00 a 32,08% na concentração diagnóstica de 0,505 µg de chlorantraniliprole cm^{-2}. Para o inseticida flubendiamide, as sobrevivências variaram de 0,00 a 46,25% na concentração diagnóstica de 2,842 µg de flubendiamide cm^{-2}. Populações de *S. frugiperda* da Bahia, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul e Goiás apresentaram as menores suscetibilidades a chlorantraniliprole e flubendiamide. Os valores de CL_{50} das linhagens suscetível (Sus) e resistente a chlorantraniliprole (Chlorant-R) foram 0,011 e 2,610 µg i.a.cm^{-2}, respectivamente, com razão de resistência (RR) de ≈ 240 vezes. A herança da resistência de *S. frugiperda* a chlrontraniliprole foi caracterizada como autossômica, incompletamente recessiva e monogênica. A linhagem resistente a chlorantraniliprole apresentou moderada resistência cruzada para cyantraniliprole (RR ≈ 27 vezes) e muito alta para flubendiamide (RR > 42000 vezes). A pré-exposição a diferentes sinergistas inibidores de enzimas de detoxificação não aumentou significativamente a suscetibilidade larval, sugerindo que a resistência metabólica não está envolvida na resistência de *S. frugiperda* a diamidas. Mediante sequenciamento da região C-terminal dos receptores de rianodina (RyR) nos domínios II a IV, foi detectada a mutação I4734M que foi recentemente descrita como um dos mecanismos de resistência devido à alteração no alvo de ação de inseticidas diamidas em outras pragas de Lepidoptera. Os resultados obtidos no presente trabalho servirão para a implementação de estratégias efetivas de manejo da resistência para preservar a vida útil de diamidas para o manejo de *S. frugiperda* no Brasil.

Palavras-chave: Chlorantraniliprole; Cyantraniliprole; Flubendiamide; Lagarta-do-cartucho do milho; Manejo da resistência de insetos a inseticidas

ABSTRACT

Monitoring and characterization of *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) resistance to diamide insecticides in Brazil

The control of *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) has been performed mainly by the use of insecticides and genetically modified plants expressing *Bacillus thuringiensis* Berliner (Bt) toxins in Brazil. Field-evolved resistance to these control agents represents a major threat in IPM programs. Diamide insecticides represent an important tool for managing *S. fugiperda*; therefore, studies that promote proactive resistance management strategies are important to prolong the lifetime of this chemical group to control *S. frugiperda*. The goals of this dissertation were: (i) To monitor *S. frugiperda* resistance to diamide insecticides in Brazil, using genotypic and phenotypic methods; (ii) To select a resistant strain of *S. frugiperda* to diamide insecticides under laboratory conditions and to characterize the genetic basis of resistance; and (iii) to investigate the resistance mechanisms of *S. frugiperda* to diamides insecticides. The F_2 screen method was used to genotypic monitoring of *S. frugiperda* resistance to chlorantraniliprole resistance by testing 817 isofamilies from 14 Brazilian populations of *S. frugiperda* collected in 2016 and 2017 crop seasons. Among the populations tested, resistance allelic frequency to chlorantraniliprole ranged from 0.0030 to 0.0781, with overall average of 0.0217. In the phenotypic monitoring, we monitored ≈ 70 populations of *S. frugiperda* collected from major maize-growing regions during the crop seasons 2016, 2017 and 2018. The larval survival for chlorantraniliprole insecticide ranged from 0.00 to 32.08% at diagnostic concetration of 0.505 µg chlorantraniliprole cm^{-2} and 0.00 to 46.25% for flubendiamide at diagnostic concentration of 2.842 µg flubendiamide cm^{-2}. Populations of *S. frugiperda* from Bahia, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul and Goiás showed the lowest susceptibilities to chlorantraniliprole and flubendiamide. The LC_{50} values of the susceptible (Sus) and chlorantraniliprole-resistant (Chlorant-R) strains were 0.011 and 2.610 µg i.a. cm^{-2}, respectively, with a resistance ratio (RR) of ≈ 240-fold. The inheritance of chlorantraniliprole resistance in *S. frugiperda* was characterized as autosomal, incompletely recessive and monogenic. The chlorantraniliprole-resistant strain showed moderate cross-resistance to cyantraniliprole (RR ≈ 27-fold) and high cross-resistance to flubendiamide (RR > 42,000-fold). Pre-exposure to different synergists known to inhibit detoxification enzymes did not result in significantly increased larval toxicity, suggesting a minor role of metabolic resistance. Sequencing of the FAW ryanodine receptor (RyR) C-terminal domains II to VI revealed a SNP, resulting in a I4734M mutation recently described to confer target-site resistance to diamides in lepidopteran pests. The results obtained herein will help for the implementation of effective resistance management strategies to preserve the lifetime of diamides to manage *S. frugiperda* in Brazil.

Keywords: Chlorantraniliprole; Cyantraniliprole; Flubendiamide; Fall armyworm; Insecticide resistance management

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1. Locais de coleta das populações de *Spodoptera frugiperda* usadas no monitoramento genotípico da resistência ao inseticida chlorantraniliprole. 30

Figura 2.2. Locais de coleta das populações de *Spodoptera frugiperda* usadas no monitoramento fenotípico da resistência aos inseticidas chlorantraniliprole e flubendiamide (1ª e 2ª safra 2016; entressafra 2016-2017; 1ª e 2ª safra 2017). Populações marcadas com triângulo foram monitoradas apenas para o inseticida chlorantraniliprole. 35

Figura 2.3. Locais de coleta das populações de *Spodoptera frugiperda* usadas no monitoramento fenotípico da resistência aos inseticidas chlorantraniliprole e flubendiamide (entressafra 2017-2018; 1ª e 2º safra 2018). 36

Figura 2.4. Monitoramento fenotípico da resistência a chlorantraniliprole em populações brasileiras de *Spodoptera frugiperda*. A-1ª safra 2016; B-2ª safra 2016; C-Entressafra 2016-2017; D-1ª safra 2017; E-2ª safra 2017; F-Entressafra 2017-2018; G-1ª safra 2018; H-2ª safra 2018.* Houve diferença estatística entre as sobrevivências da população de campo e a população suscetível de referência pela não sobreposição dos intervalos de confiança 95 %. 42

Figura 2.5. Avaliação temporal da suscetibilidade de populações *Spodoptera frugiperda* expostas a concentração diagnóstica de chlorantraniliprole (0,505 μg i.a. cm^{-2}). Baseado na média de sobrevivência (%) das populações de campo agrupadas de acordo com a safra de coleta. Houve diferença estatística quando não ocorreu sobreposição dos intervalos de confiança (95 %). 43

Figura 2.6. Monitoramento fenotípico da resistência a flubendiamide em populações brasileiras de *Spodoptera frugiperda*. A-1ª safra 2016; B-2ª safra 2016; C-Entressafra 2016-2017; D-1ª safra 2017; E-2ª safra 2017; F-Entressafra 2017-2018; G-1ª safra 2018; H-2ª safra 2018. *Houve diferença estatística entre a sobrevivência larval da população de campo e a população suscetível de referência pela não sobreposição dos intervalos de confiança 95 %. 47

Figura 2.7. Avaliação temporal da suscetibilidade de *Spodoptera frugiperda* expostas a concentração diagnóstica de flubendiamide (2,842 μg i.a. cm^{-2}). Baseado na média de sobrevivência (%) de lagartas de populações de campo agrupadas de acordo com a safra de coleta. Houve diferença estatística quando não ocorreu sobreposição dos intervalos de confiança (95 %). 48

Figura 3.1. Grau de dominância da resistência de *Spodoptera frugiperda* em função da concentração de chlorantraniliprole. 66

Figura 3.2. Sobrevivência larval das linhagens suscetível (Sus), heterozigoto (H1 = ♀ Chlorant-R × ♂ Sus) e resistente (Chlorant-R) em plantas de milho não tratadas e tratadas com chlorantraniliprole. 68

Figura 4.1. Locais de coleta das populações de *Spodoptera frugiperda* usadas para genotipagem de mutações no sítio de ação dos inseticidas diamidas (receptores de rianodina). 85

Figura 4.2. Alinhamento múltiplo do receptor de rianodina abrangendo os domínios transmembranais (TM) de II a VI em *Spodoptera exigua* (GenBank: AFC36359) e linhagens suscetível (Sf_Sus) e resistente a inseticidas diamidas (Sf_Chlorant-R). 90

Figura 4.3. Alinhamento da sequência de aminoácidos do receptor de rianodina de diferentes lepidópteros-praga, cobrindo os locais onde as mutações G4946E e I4790M ocorrem. As características estruturais e a numeração foram baseadas no receptor de rianodina de *Plutella xylostella* (GenBank: AET09964). Números de acesso do GenBank para as sequências alinhadas: *P. xylostella* (GenBank: AET09964), *Tuta absoluta* (GenBank: APC65631), *Chilo suppressalis* (GenBank: AFN70719), *Spodoptera exigua* (GenBank: AFC36359) e *Spodoptera frugiperda* "Sus" (GenBank: MK226188). 91

Figura 4.4. Resultados do pirosequenciamento para as posições 4946 (A-B) e 4790 (C-D) (numeração de *Plutella xylostella*) do receptor de rianodina de *Spodoptera frugiperda*. Homozigoto GGC (A - Sus; B - Chlorant-R). Homozigoto TAT (C - Sus) e homozigoto CAT (D - Chlorant-R). A-B foram sequenciados no sentido 5'-3' e C-D no sentido 3'-5'.....92

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1. Local e data de coleta das populações de *Spodoptera frugiperda* usadas no monitoramento genotípico da resistência ao inseticida chlorantraniliprole. 29

Tabela 2.2. Local e data de coleta das populações de *Spodoptera frugiperda* usadas no monitoramento fenotípico da resistência aos inseticidas chlorantraniliprole e flubendiamide. ..... .32

Tabela 2.3. Frequência estimada do alelo que confere resistência a chlorantraniliprole em populações de *Spodoptera frugiperda* do Brasil. 38

Tabela 2.4. Sobrevivência larval (%) de populações brasileiras de *Spodoptera frugiperda* expostas a concentração diagnóstica de chlorantraniliprole. 39

Tabela 2.5. Sobrevivência larval (%) de populações brasileiras de *Spodoptera frugiperda* expostas a concentração diagnóstica de flubendiamide. 44

Tabela 3.1. Concentração-resposta das linhagens suscetível (Sus), resistente (Chlorant-R) e progênies F_1 dos cruzamentos recíprocos de *Spodoptera frugiperda* ao inseticida chlorantraniliprole. 65

Tabela 3.2. Análise do qui-quadrado (χ^2) da mortalidade dos retrocruzamentos entre a linhagem da Chlorant-R e a progênie F_1 dos cruzamentos recíprocos (H1 = ♀ Chlorant-R × ♂ Sus e H2 = ♀ Sus × ♂ Chlorant-R) expostas a diferentes concentrações de chlorantraniliprole. 67

Tabela 3.3. Concentração-resposta das linhagens suscetível (Sus) e resistente (Chlorant-R) de *Spodoptera frugiperda* aos inseticidas cyantraniliprole e flubendiamide. 69

Tabela 4.1. Local e data de coleta das linhagens e populações de *Spodoptera frugiperda* testadas. 85

Tabela 4.2. Lista de primers usados no sequenciamento de Sanger e pirosequenciamento. .. 88

Tabela 4.3. Concentração-resposta das linhagens suscetível (Sus) e resistente (Chlorant-R) de *Spodoptera frugiperda* para os inseticidas chlorantraniliprole (Chlor) e flubendiamide (Flub) usando lagartas previamente tratadas com piperonyl butoxide (PBO), diethyl maleate (DEM) and S,S,S-tributyl phosphorotrithioate (DEF). 90

Tabela 4.4. Genotipagem por pirosequenciamento das mutações no receptor de rianodina das linhagens suscetível (Sus) e resistente (Chlorant-R) de *Spodoptera frugiperda* a inseticidas diamidas, nas posições G4946 e I4790 (numeração de *Plutella xylostella*). 92

1. INTRODUÇÃO

Apesar dos avanços na adoção do manejo integrado para o controle de insetos-praga na agricultura, o uso de inseticidas químicos ainda é principal método utilizado no controle de pragas em diversas culturas. Já foram reportados casos de resistência em aproximadamente 600 espécies de ácaros e insetos, e o problema da resistência tem afetado a produção agrícola a nível mundial (Sparks; Nauen, 2015; Nauen et al., 2019). A redução da eficácia dos inseticidas em razão da evolução da resistência no campo desafia tanto os produtores rurais quanto as companhias que desenvolvem estes produtos, uma vez que devido ao aumento dos custos e exigências regulatórias rigorosas, o registro de novas moléculas para o controle de pragas está cada vez mais escasso (Sparks, 2013; Sparks; Lorsbach et al., 2017). Portanto, estudos que fomentem estratégias de manejo da resistência são fundamentais para a manutenção da eficácia das moléculas inseticidas já disponibilizadas para o controle de pragas.

Dentre os inseticidas que apresentam características desejáveis para serem utilizados dentro de um programa de manejo integrado de pragas, os inseticidas do grupo das diamidas se destacam por apresentarem baixa toxicidade a mamíferos e alta seletividade a inimigos naturais, além da ausência de resistência cruzada com inseticidas de outros grupos químicos (Tohnishi et al., 2005; Lahm et al., 2005; Ebbinghaus-Kintscher et al., 2006; Lahm et al., 2009; Larson et al., 2012). O desenvolvimento deste grupo de inseticidas teve como base estudos realizados na década de 1940, quando foi verificada a ação inseticida de uma série de moléculas extraídas a partir de extratos da casca de *Ryania speciosa* Vahl (Flacoutiaceae), uma planta nativa da América do Sul e Central. Estes estudos detectaram que as moléculas causavam uma ação paralisante nos insetos, levando-os a morte (Edwards et al., 1948; Jefferies et al., 1997). A estas moléculas foi dado o nome de rianoides, porém uma em especial, denominada rianodina, teve maior atenção devido a sua afinidade a determinados receptores localizados canais de cálcio (receptores de rianodina – RyRs) presentes no retículo sarcoplasmático das células musculares (Fill; Copello, 2002). No entanto, a rianodina se mostrou não seletiva, com alta afinidade de ligação para os RyRs de diferentes ordens de insetos e também de mamíferos (Lehmberg; Casida, 1994), sendo uma desvantagem do uso desta molécula como inseticida (Lümmen, 2013).

O primeiro inseticida do grupo das diamidas foi o flubendiamide (diamida do ácido ftálico), desenvolvido pela empresa Nihon Nohyaku CO,. LTD, a partir do derivado do benzenedicarboxamide (Tohnishi et al., 2005), posteriormente foram desenvolvidas as

diamidas antranílicas chlorantraniliprole e cyantraniliprole, pela empresa DuPont® (Lahm et al., 2005, 2007, 2009). Este novo grupo de inseticidas se ligam em um local diferente da rianodina nos RyRs, porém da mesma forma promovem a saída descontrolada de Cálcio (Ca^{+2}), do estoque interno da célula, provocando paralisia muscular e a morte do inseto (Cordova et al., 2006). Flubendiamide possui elevada atividade contra insetos da ordem Lepidoptera, chlorantraniliprole além de afetar lepidópteros, também é ativo contra insetos da ordem Coleoptera, já cyantraniliprole por possuir propriedades sistêmicas, atua também sobre insetos ordem Hemiptera, Thysanoptera e Diptera (Foster et al., 2012; Nauen; Steinbach, 2016). Os inseticidas diamidas representam aproximadamente 10 % das vendas globais de inseticidas e este valor tende a aumentar à medida que novas moléculas do grupo se tornem disponíveis para comercialização (Nauen et al., 2019).

Apesar de ser um dos mais recentes grupos de inseticidas, diversos relatos de baixa suscetibilidade e resistência de insetos já foram reportados. Como por exemplo, *Spodoptera exigua* (Hubner) (Lepidoptera: Noctuidae) na China (Lai et al., 2011); *Plutella xylostella* L. (Lepidoptera: Plutellidae) no Brasil (Silva et al., 2012; Ribeiro et al., 2014), China (Wang et al., 2012; Wang et al., 2013), Tailândia e Filipinas (Troczka et al., 2012), Índia, Japão, Taiwan, Coreia do Sul, USA e Vietnã (Steinbach et al., 2015); *Chilo suppressalis* (Walker) (Lepidoptera: Crambidae) na China (Wu et al., 2014); *Adoxophyes honmai* (Yasuda) (Lepidoptera: Tortricidae) no Japão (Uchiyma; Ozawa, 2014); e *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) na Itália, Grécia (Roditakis et al., 2015), Brasil e Espanha (Silva et al., 2016; Roditakis et al., 2017). Para *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera Noctuidae), recentemente foi relatado um caso de evolução da resistência no campo para flubendiamide e chlorantraniliprole em Porto Rico, com razões de resistência de 500 e 160 vezes, respectivamente (Gutiérrez-Moreno et al., 2018). Dentre os mecanismos associados à resistência de insetos a inseticidas diamidas, pode-se destacar as mutações encontradas na região C-terminal do gene que codifica os RyRs (Troczka et al., 2012; Guo et al., 2014a,b; Roditakis et al., 2017), além de casos de resistência associados a detoxificação metabólica (Wang et al., 2013; Muthusamy et al., 2014).

Apesar dos casos de resistência já reportados, os inseticidas diamidas ainda representam uma importante ferramenta no manejo de diversas pragas, principalmente lepidópteros. Dentre as pragas-alvo destes inseticidas, uma das mais relevantes é a lagarta-do-cartucho do milho, *S. frugiperda*. Esta é uma espécie com alta capacidade de reprodução e dispersão, além do hábito polífago (Pogue, 2002; Casmuz et al., 2010), tendo mais de 180 espécies de plantas hospedeiras, distribuídas em 42 famílias diferentes (Casmuz et al., 2010).

Plantas da família Poaceae estão entre as maiores hospedeiras desta praga, com destaque para o milho (*Zea mayz* L.), trigo (*Triticum* spp.), sorgo (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) e arroz (*Oryza sativa* L.) (Cruz, 1995; Casmuz et al., 2010). Porém, em razão da oferta de hospedeiros ao longo do ano, frequentemente culturas como soja (*Glycine max* L.), algodão (*Gossypium hirsutum* L) e solanáceas sofrem injúrias devido a ataques desta praga (Capinera, 2002). Apesar do grande número de plantas hospedeiras, é na cultura do milho que esta praga denota maior importância, sendo considerada uma das principais pragas da cultura nas Américas, principalmente na América do Sul, América Central e México (Cruz et al., 1982). Recentemente, *S. frugiperda* ganhou maior notoriedade no cenário agrícola mundial por ter sido reportada como espécie invasiva no continente africano e asiático (Goergen et al., 2016; FAO, 2018; ICAR-NBAR, 2018), e pelo potencial de causar severas perdas na produção de milho nestes continentes, caso métodos adequados de controle não forem estabelecidos (Abrahams et al., 2017; ITTA, 2018).

No Brasil, o sistema de cultivo intensivo favorece que *S. frugiperda* se mantenha em níveis populacionais elevados durante maior parte do ano, uma vez que as principais culturas produzidas no país são hospedeiras desta praga. A utilização de inseticidas químicos para o controle de *S. frugiperda* ainda é um dos principais métodos utilizados em diversas culturas. Em razão do uso indiscriminado destes compostos, casos de falhas no controle em razão da evolução da resistência no campo já foram reportados para grupos químicos mais antigos como piretroides (lambda-cyhalothrin) e organofosforados (chlorpyrifos) (Carvalho et al., 2013), além de resistência selecionada em laboratório para benzoilureias (lufenuron) e espinosinas (spinosad) (Nascimento et al., 2016; Okuma et al., 2018). Em culturas como milho, algodão e soja, onde o cultivo de plantas geneticamente modificadas que expressam proteínas inseticidas de *Bacillus thurigiensis* Berliner (Plantas Bt) foi liberado e amplamente adotado no país (CÉLERES, 2017), houve uma significante redução no uso de inseticidas químicos para o controle de lepidópteros ao compararmos com o período anterior a adoção desta biotecnologia (Brookes; Barfoot, 2018). Entretanto, em razão da alta pressão de seleção exercida sobre *S. frugiperda*, casos de evolução da resistência no campo já foram reportados para as proteínas Cry1F e Cry1Ab (Farias et al., 2014; Omoto et al; 2016), e também resistência selecionada em laboratório para as proteínas Cry1A105 e Vip3Aa20 (Bernardi et al., 2015; Bernardi et al., 2016), e em razão destes casos de resistência, muitas vezes se faz necessário um aumento no número de aplicações de inseticidas.

Inseticidas diamidas podem ser usados para o manejo da resistência de *S. frugiperda* a outros grupos químicos ou proteínas Bt, em razão da ausência de resistência cruzada entre

diamidas e outros grupos de inseticidas. Para a preservação da vida útil de inseticidas, o monitoramento da resistência é fundamental para a detecção de genótipos resistentes em baixas frequências, auxiliando no estabelecimento de estratégias de manejo da resistência. Para detectar indivíduos resistentes em uma população, existem técnicas que podem ser realizadas *in vivo*, cujo indivíduos intactos são expostos diretamente aos inseticidas, e testes *in vitro*, no qual são utilizadas técnicas bioquímicas que determinam a atividade enzimática ou alterações em genes específicos relacionados à resistência (ffrench-Constant; Roush, 1990).

Dentre as técnicas *in vivo*, o monitoramento da resistência pode ser caracterizado como fenotípico ou genotípico. O monitoramento fenotípico pode ser realizado mediante a comparação entre estimativas de doses letais de populações de campo com as de populações suscetíveis de referência, ou utilizando concentrações diagnósticas diretamente sobre uma população do campo (ffrench-Constant; Roush, 1990). Já o monitoramento genotípico pode ser realizado por técnicas como F_1 "screen" e F_2 "screen", entretanto para o F_1 "screen" existe a necessidade de se posuir em laboratório uma população resistente para acasalar com indivíduos do campo, realizando o bioensaio discriminatório na geração F_1 (Gould et al., 1997). Enquanto que para o F_2 "screen", a partir de fêmeas fecundas coletadas no campo, são feitos cruzamentos endogâmicos na geração F_1 e os bioensaios discriminatórios são realizados na geração F_2 (Andow; Alstad, 1998). Ambos os métodos permitem a detecção e o monitoramento da frequência de alelos que conferem resistência, mesmo quando a frequência destes ainda se encontra baixa no campo. Os métodos fenotípicos são mais eficientes quando os alelos relacionados a resistência têm efeito aditivo ou dominante, enquanto os métodos genotípicos são mais eficientes quando os alelos ligados a resistência têm efeito recessivo (Andow, 2008). Dentre as técnicas *in vitro*, destaca-se a detecção e monitoramento da resistência por técnicas moleculares para a detecção de genes ou mutações envolvidas na resistência. Dentre as técnicas moleculares, destaca-se a genotipagem de mutações conhecidas pela amplificação do DNA (PCR-RFLP/CAPS, PIRA/PCR/dCAPS, PCR alelo-específico), genotipagem de mutações por sequenciamento (PCR + sequenciamento de Sanger, PCR + pirosequenciamento, sequenciamento pela plataforma Illumina), quantificação de genes e transcritos (qPCR, RT-qPCR), além das técnicas mais recentes como o sequenciamento completo de transcritoma (RNA-Seq) e o sequenciamento de terceira geração (PacBio, Nanopore, SMRT®) (Network, 2016).

Além da detecção e monitoramento, é de fundamental importância conhecer a herdabilidade dos caracteres que conferem a resistência a inseticidas, pois o padrão de herança genética da resistência tem grande influência na sua evolução, sendo um fator

determinante para a taxa de aumento da frequência de alelos que conferem resistência (Georghiou; Taylor, 1977). O grau de dominância (recessivo ou dominante) e o número de genes envolvidos permite entender a dinâmica da resistência, influenciando na velocidade que a evolução da resistência é verificada no campo em condições de pressões seletivas (Georghiou; Taylor, 1977). A ocorrência de resistência cruzada também influencia a evolução da resistência devido à pressão de seleção por outros inseticidas (Georghiou; Taylor, 1977). Sendo assim, estudos de caracterização da resistência e resistência cruzada são essenciais para o entendimento das bases genéticas associadas à resistência e para a adoção de estratégias pró-ativas de manejo da resistência (Roush; Mckenzie, 1987).

Diante do exposto, com a finalidade de subsidiar estratégias de manejo da resistência e preservar a eficácia dos inseticidas diamidas para o manejo de *S. frugiperda*, nossos objetivos foram:

- Monitorar a resistência de *S. frugiperda* a inseticidas diamidas no Brasil, utilizando métodos de monitoramento genotípico e fenotípico;
- Selecionar em laboratório uma linhagem de *S. frugiperda* resistente a inseticidas diamidas para caracterizar as bases genéticas da resistência e estudar as relações de resistência cruzada entre diamidas;
- Investigar os mecanismos associados à resistência de *S. frugiperda* a inseticidas diamidas.

Referências

Abrahams P, Bateman M, Beale T, Clottey V, Cock M, Colmenarez Y, Corniani N, Day R, Early R, Godwin J, Gomez J, Moreno PG, Murphy ST, Oppong-Mensah B, Phiri N, Pratt C, Richards G, Silvestri S, Witt A, Fall Armyworm: Impacts and Implications for Africa. CABI – UK Aid. Evidence Note (2), September 2017. https://www.invasive-species.org/Uploads/InvasiveSpecies/Fall%20Armyworm%20Evidence%20Note%20September%202017.pdf [acesso 18 de setembro de 2018].

Andow DA, Alstad DN, F_2 screen for rare resistance alleles. *J Econ Entomol* **91**:572-578 (1998).

Andow DA, The risk of resistance evolution in insects to transgenic insecticidal crops. *Collect Biosaf Rev* **4**:142-199 (2008).

Bernardi D, Salmeron E, Horikoshi RJ, Bernardi O, Dourado PM, Carvalho RA, Martinelli S, Head GP, Omoto C. Cross-resistance between Cry 1 proteins in fall armyworm (*Spodoptera frugiperda*) may affect the durability of current pyramided Bt mayze hybrids in Brazil. *Plos ONE* **10** (2015). https://doi.org/10.1371/journal.pone.0140130

Bernardi O, Bernardi D, Horikoshi RJ, Okuma DM, Miraldo LL, Faroretto J, Medeiros FCL, Burdy T, Omoto C, Selection and characterization of resistance to the Vip3Aa20 protein from *Bacillus thuringiensis* in *Spodoptera frugiperda*. *Pest Manag Sci* **72**:1794-1802 (2016).

Brookes G, Barfoot P, Environmental impacts of genetically modified (GM) crop use 1996-2016: Impacts on pesticide use and carbon emissions. *GM Crops Food* **9**:109-139 (2018).

Capinera JL, *Handbook of vegetable pests*. Academic Press, San Diego, CA, p. 887 (2002).

Carvalho RA, Omoto C, Field LM, Williansom MS, Bass C, Investigating the molecular mechanism of organophosphate and pyrethroid resistance in the fall armyworm *Spodoptera frugiperda*. *PloS ONE* **8**:1-11 (2013).

Casmuz A, Juárez ML, Socías MG, Murúa MG, Prieto S, Medina S, Willink E, Gastaminza G, Revisión de los hospederos del gusano cogollero del maíz, *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *Rev Soc Entomol Argent* **69**:209-231 (2010).

CÉLERES, 3º levantamento de adoção da biotecnologia agrícola no Brasil, safra 2016/17. http://www.celeres.com.br/3o-levantamento-de-adocao-da-biotecnologia-agricola-no-brasil-safra-201617/ [acesso 7 de janeiro de 2019].

Cordova D, Benner EA, Sacher MD, Rauh JJ, Sopa JS, Lahm GP, Selby TP, Stevenson TM, Flexner L, Gutteridge S, Rhoades DF, Wu L, Smith RM, Tao Y, Anthranilic diamides: A new class of insecticides with a novel mode of action, ryanodine receptor activation. *Pestic Biochem Physiol* **84:**196-214 (2006).

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

Cruz I, Santos JP, Waquil JM, Principais pragas da cultura de milho. In. *Recomendações técnicas para a cultura do milho*, (Circular técnica, 6). EMBRAPA CNPMS, Sete Lagoas, MG, pp. 45-60 (1982).

Ebbinghaus-Kintscher U, Lümmen P, Lobitz N, Schulte T, Funke C, Fischer R, Phthalic acid diamides activate ryanodine sensitive Ca^{2+} release channels in insects. *Cell Calcium* **39**:21-33 (2006).

Edwards GA, Weiant EA, Slocombe AG, The action of ryanodine on contractile process in striated muscle. *Science* **108**:330-332 (1948).

FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations, Briefing Note on FAO actions on Fall Armyworm in Africa (latest updates: 16 February 2018). http://www.fao.org/3/a-bt415e.pdf [acesso 16 de setembro 2018].

Farias JR, Andow DA, Horikoshi RJ, Sorgatto RJ, Fresia P, Santos AC, Omoto C, Field-evolved resistance to Cry1F maize by *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in Brazil. *Crop Prot* **64**:150-158 (2014).

ffrench-Constant RH, Roush RT, Resistance detection and documentation: the relative roles of pesticidal and biochemical assays, in *Pesticide resistance in arthropods*, ed. Roush RT, Tabashnik B, Chapman and Hall, Inc, New York, NY, pp. 4-38 (1990).

Fill M, Copello JA, Ryanodine receptor calcium release channels. *Physiol Rev* **82**:893-922 (2002).

Foster SP, Denholm I, Rison J, Portillo HE, Margaritopoulis J, Slater R, Susceptibility of standard clones and European field populations of the green peach aphid, *Myzus persicae*, and the cotton aphid, *Aphis gossypii* (Hemiptera: Aphididae), to the novel anthranilic diamide insecticide cyantraniliprole. *Pest Manag Sci* **68**:629-633 (2012).

Georghiou GP, Taylor CE, Genetic and biological influences in the evolution of insecticide resistance. *J Econ Entomol* **70**:319-323 (1977).

Goergen G, Kumar PL, Sankung SB, Togola A, Tamò M, Fisrt report of outbreaks of the fall armyworm *Spodoptera frugiperda* (J E Smith) (Lepidoptera, Noctuidae), a new alien invasive pest in west and central Africa. *PLoS ONE* **11**:1-9 (2016).

Gould F, Anderson A, Jones A, Sumerford D, Heckel DG, Lopez J, Micinski S, Leonard R, Laster M, Initial frequency of alleles for resistance to *Bacillus thurigiensis* toxins in field populations of *Heliothis virescens*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**:3519-3523 (1997).

Guo L, Liang P, Zhou X, Gao X, Novel mutations and mutation combinations of ryanodine receptor in a chlorantraniliprole resistant population of *Plutella xylostella* (L.). *Sci Rep* **4**:1-7 (2014)a.

Guo L, Wang Y, Zhou X, Li Z, Liu S, Pei L, Gao X, Functional analysis of a point mutation in the ryanodine receptor of *Plutella xylostella* (L.) associate with resistance to chlorantraniliprole. *Pest Manag Sci* **70**:1083-1089 (2014)b.

Gutiérrez-Moreno R, Mota-Sanchez D, Blanco CA, Whalon ME, Terán-Santofimio H, Rodriguez Maciel JC, DiFonzo C, Field-Evolved resistance of the Fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) to synthetic insecticides in Puerto Rico and Mexico. *J Econ Entomol* (2018). doi: 10.1093/jee/toy372

ICAR-NBAR, Indian Council of Agricultural Research - National Bureau of Agricultural Insect Resources, PEST ALERT: 30th July, 2018 *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Insecta: Lepidoptera). http://www.cib.res.in/recent_events/Pest%20Alert%2030th%20July%202018-new1.pdf [acesso 16 de setembro de 2018].

IITA, International Institute of Tropical Agriculture, Fall armyworm has reached the Indian subcontinent. http://www.iita.org/news-item/fall-armyworm-has-reached-the-indian-subcontinent/ [acesso 16 de setembro de 2018].

Jefferies PR, Yu P, Casida JE, Structural modifications increase the insecticidal activity of ryanodine. *Pest Manag Sci* **51**:33-38 (1997).

Lahm GP, Cordova D, Barry JD, New and selective ryanodine receptor activators for insect control. *Bioorg Med Chem* **17**:4127-4133 (2009).

Lahm GP, Selby TP, Freudenberger JH, Stevenson TM, Myers BJ, Seburyamo G, Smith BK, Flexner L, Clark CE, Cordova D, Insecticidal anthranilic diamides: a new class of potent ryanodine receptor activators. *Bioorg Med Chem Lett* **15**:4898-906 (2005).

Lahm GP, Stevenson TM, Selby TP, Freudenberger JH, Cordova D, Flexner L, Bellin CA, Dubas CM, Smith BK, Hughes KA, Hollingshaus JG, Clark CE, Benner EA, Ryanaxypyr^{tm}: A new insecticidal anthranilic diamide that acts as a potent and selective ryanodine receptor activator. *Bioorg Med Chem Lett* **17**:6274-6279 (2007).

Lai T, Li J, Su j, Monitoring of beet armyworm *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae) resistance to chlorantraniliprole in China. *Pestic Biochem Physiol* **101**:195-205 (2011).

Larson JL, Redmont CT, Potter DA, Comparative impact of an anthranilic diamide and other insecticidal chemistries on beneficial invertebrates and ecosystem services in turfgrass. *Pest Manag Sci* **68**:740-748 (2012).

Lehmberg E, Casida JE, Similarity of insect and mammalian ryanodine binding sites. *Pestic Biochem Physiol* **48**:145-152 (1994).

Lümmen P, Calcium channels as molecular target sites of novel insecticides, in *Advances in Insect Physiology*, vol. 44, ed. Cohen E, Academic Press, London, UK, pp. 287-347 (2013).

Muthusamy R, Vishnupriya M, Shivakumar MS, Biochemical mechanism of chlorantraniliprole resistance in *Spodoptera litura* (Fab) (Lepidoptera: Noctuidae). *J Asia Pac Entomol* **17**:865-869 (2014).

Nascimento RB, Farias JR, Bernardi D, Horikoshi RJ, Omoto C, Genetic basis of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) resistance to the chitin synthesis inhibitor lufenuron. *Pest Manag* Sci **72**:810-815 (2016).

Nauen R, Slater R, Sparks TC, Elbert A, Mccaffery A, IRAC: Insecticide resistance and mode-of-action classification of insecticides, in *Modern Crop Protection Compounds*, ed. Jeschke P, Witschel M, Krämer W, Schirmer U. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Alemanha, pp. 995-1012 (2019).

Nauen R, Steinbach D, Resistance to diamides insecticides in Lepidopteran pests, in *Advances in insect control and resistance management*, ed. Horowitz R, Ishaaya I. Springer International Publishing, Suiça, pp. 219-240 (2016).

Network R, Trends and challenges in pesticide resistance detection. *Trends Plant Sci* **21**:834-853 (2016).

Okuma DM, Bernardi D, Horikoshi RJ, Bernardi O, Silva AP, Omoto C, Inheritance and fitness cost of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) resistance to spinosad in Brasil. *Pest Manag Sci* **74**:1441-1448 (2018).

Omoto C, Bernardi O, Salmeron E, Sorgatto RJ, Dourado PM, Crivellari A, Carvalho RA, Willse A, Martinelli S, Head GP, Field-evolved resistance to Cry1Ab maize by *Spodoptera frugiperda* in Brazil. *Pest Manag Sci* **72:**1727-1736 (2016).

Pogue GM, A world revision of the genus *Spodoptera* Guenée (Lepidoptera: Noctuidae). *Mem Am Entomol Soc* **43**:1-202 (2002).

Ribeiro LMS, Wanderley-Teixeira V, Ferreira HN, Teixeira ÁAC, Siqueira HAA, Fitness costs associated with field-evolved resistance to chlorantraniliprole in *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae). *Bull Entomol Res* **104**:88-96 (2014).

Roditakis E, Steinbach D, Moritz G, Vasakis E, Stavrakaki M, Ilias A, García-Vidal L, Martínez-Aguirre MR, Bielza P, Morou E, Silva JE, Silva WM, Siqueira HAA, Iqbal S, Troczka BJ, Williamson MS, Bass C, Tsagkarakou A, Vontas J, Nauen R, Ryanodine receptor point mutations confer diamide insecticide resistance in tomato leafminer, *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae). *Insect Biochem Mol Biol* **80**:11-20 (2017).

Roditakis E, Vasakis E, Grispou M, Stavrakaki M, Nauen R, Gravouil M, Bassi A, First report of *Tuta absoluta* resistance to diamide insecticides. *J Pest Sci* **88**:9-16 (2015).

Roush RT, Mckenzie JA, Ecological genetics of insecticide and acaricide resistance. *Ann Rev Entomol* **32**:361-380 (1987).

Silva JE, Assis CPO, Ribeiro LMS, Siqueira HAA, Field-evolved resistance and cross-resistance of Brazilian *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae) populations to diamide insecticides. *J Econ Entomol* **109**:2190-2195 (2016).

Silva JE, Siqueira HAA, Silva TBM, Campos MR, Barros R, Baseline susceptibility to chlorantraniliprole of Brazilian populations of *Plutella xylostella*. *Crop Prot* **35**:97-101 (2012).

Sparks TC, Lorsbach BA, Pespectives on the agrochemical industry and agrochemical discovery. *Pest Manag Sci* **73**:672-677 (2017)

Sparks TC, Nauen R, IRAC: Mode of action classification and insecticide resistance management. *Pestic Biochem Physiol* **121**:122-128 (2015).

Sparks TC, Insecticide discovery: an evaluation and analysis. *Pestic Biochem Physiol* **107**:8-17 (2013).

Steinbach D, Gutbrod O, Lümmen P, Matthiesen S, Schorn C, Nauen R, Geographic spread, genetics and functional characteristics of ryanodine receptor based target-site resistance to diamide insecticides in diamondback moth, *Plutella xylostella*. *Insect Biochem Mol Biol* **63**:14-22 (2015).

Tohnishi M, Nakao H, Furuya T, Seo A, Kodama H, Tsubata K, Fujioka S, Kodama H, Hirooka T, Nishimatsu T, Flubendiamide, a novel insecticide highly active against lepidopterous insect 735 pests. *J Pestic Sci* **30**:354-360 (2005).

Troczka B, Zimmer CT, Elias J, Schorn C, Bass C, Davies TG, Field LM, Williamson MS, Slates R, Nauen R, Resistence to diamide inseticides in diamondback moth, *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae) is associated with a mutation in the membrane-spanning domain of the ryanodine receptor. *Insect Biochem Mol Biol* **42**:873-880 (2012).

Uchiyama T, Ozawa A, Rapid development of resistance to diamide insecticides in the smaller tea tortrix, *Adoxophyes honmai* (Lepidoptera: Tortricidae), in tea fields of Shizuoka Prefecture, Japan. *Appl Entomol Zool* **49**:529-534 (2014).

Wang X, Khakame SK, Ye C, Yang Y, Wu Y, Characterisation of field-evolved resistence to chlorantraniliprole in the diamond back moth, *Plutella xylostella*, from China. *Pest Manag Sci* **69**:661-665 (2013).

Wang XL, Wu YD, High levels of resistance to chlorantraniliprole evolved in field populations of *Plutella xylostella*. *J Econ Entomol* **105**:1019-1023 (2012).

Wu M, Zhang S, Yao R, Wu S, Su J, Gao C, Susceptibility of the rice stem borer, *Chilo suppressalis* (Lepidoptera: Crambidae), to flubendiamide in China. *J Econ Entomol* **107**:1250-1255 (2014).

2. MONITORAMENTO DA RESISTÊNCIA DE *Spodoptera frugiperda* (J. E. SMITH) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE) A INSETICIDIDAS DIAMIDAS NO BRASIL

Resumo

O monitoramento da resistência a inseticidas é fundamental para que as estratégias de manejo da resistência sejam adotadas de maneira preventiva, retardando a evolução da resistência e prolongando a efetividade dos inseticidas no controle de pragas. Neste trabalho objetivou-se monitorar a resistência de populações de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) a inseticidas diamidas no Brasil, utilizando métodos de monitoramento genotípico e fenotípico. No monitoramento genotípico, a técnica do F_2 "screen" foi utilizada para estimar a frequência do alelo de resistência de *S. frugiperda* ao inseticida chlorantraniliprole em populações de *S. frugiperda* coletadas nas principais regiões produtoras de milho no Brasil durante os anos agrícolas 2016 e 2017. Já no monitoramento fenotípico, foram utilizadas concentrações diagnósticas de chlorantraniliprole e flubendiamide em ≈ 70 populações de *S. frugiperda* coletadas entre os anos agrícolas 2016 e 2018. No monitoramento genotípico foram testadas 817 isolinhas provenientes de 14 populações de *S. frugiperda* coletadas nas principais regiões produtoras de milho no Brasil. Dentre as populações testadas, foi verificada uma variação de 0,0030 a 0,0781 na frequência estimada de alelos que conferem resistência a chlorantraniliprole, com uma média geral de 0,0217. No monitoramento fenotípico, foi observado uma variação na sobrevivência larval de 0,00 a 32,08 % quando expostas a concentração diagnóstica de 0,505 µg de chlorantraniliprole cm^{-2} e de 0,00 a 46,25% na concentração diagnóstica de 2,842 µg de flubendiamide cm^{-2}. As populações de *S. frugiperda* provenientes de Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul e Bahia apresentaram as maiores sobrevivências nas concentrações diagnósticas testadas. Os resultados obtidos no presente trabalho evidenciam o elevado risco de evolução da resistência de *S. frugiperda* a inseticidas diamidas, necessitando a implementação de estratégias efetivas de manejo da resistência para preservar a vida útil de diamidas para o manejo desta praga.

Palavras-chave: Chlorantraniliprole; Flubendiamide; F_2 "screen"; Lagarta-do-cartucho do milho; Manejo da resistência a inseticidas

Abstract

Monitoring insecticide resistance is essential for proactive resistance management strategies to delay the evolution of resistance and extend the effectiveness of insecticides to pest control. In this study, we monitor the diamide resistance in Brazilian populations of *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith), using genotypic and phenotypic monitoring methods. In genotypic monitoring, the F_2 screen method was used to estimate the chlorantraniliprole resistance allele frequency in field populations of *S. frugiperda* collected from major maize-productions regions in Brazil during crop seasons of 2016 and 2017. In the phenotypic monitoring, diagnostic concentrations of chlorantraniliprole and flubendiamide were used in ≈ 70 populations of *S. frugiperda* collected during crop seasons of 2016 to 2018. In the genotypic monitoring, we tested 817 isofamilies from 14 populations of *S. frugiperda* and the chlorantraniliprole resistant allele frequency ranged from 0.0030 to 0.0781, with an average of 0.0217. In the phenotypic monitoring, the survival of *S. frugiperda* populations ranged from 0.00 to 32.08% at the diagnostic concentration of 0.505 µg chlorantraniliprole cm^{-2} and from 0.00 to 46.25% at diagnostic concentration of 2.842 µg flubendiamide cm^{-2}. Populations of *S.*

frugiperda from Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul and Bahia states showed the highest survival rates. The results obtained herein showed a high risk of *S. frugiperda* resistance to diamide insecticides, requiring the implementation of effective resistance management strategies to preserve the lifetime of diamides to manage this pest.

Keywords: Chlorantraniliprole; Flubendiamide; F_2 screen; Fall armyworm; Insecticide resistance management

2.1. Introdução

Para que estratégias de manejo da resistência de insetos a inseticidas sejam efetivas, estas devem ser implementadas enquanto a frequência de resistência no campo ainda é baixa (Tabashinik; Croft, 1982). O uso de técnicas de monitoramento da resistência fornece subsídios para implementação destas estratégias, permitindo identificar precocemente decréscimos na suscetibilidade de uma população a determinado inseticida, além de verificar a variação geográfica e temporal da resposta de uma população à pressão de seleção e avaliar se um programa de manejo da resistência já implementado está sendo efetivo (Roush; Miller, 1986; Kranthi, 2005). O monitoramento pode ser realizado por métodos fenotípicos ou genotípicos, sendo os métodos fenotípicos mais eficientes quando os alelos ligados a resistência têm efeito aditivo ou dominante, enquanto que os métodos genotípicos são mais eficientes quando os alelos que conferem resistência têm efeito recessivo (Andow, 2008). Ambos os métodos fornecem informações que possibilitam a adoção de táticas de manejo de maneira preventiva para retardar a evolução da resistência e prolongar a vida útil dos inseticidas.

Os inseticidas diamidas se tornaram uma alternativa efetiva para o controle de pragas, principalmente da ordem Lepidoptera (Tohnish et al., 2005; Cordova et al., 2006). Este grupo de inseticidas possui um modo de ação único, atuando como moduladores dos receptores de rianodina (RyRs), permitindo a liberação desordenada Ca^{+2} das reservas intracelulares para o citosol pela ativação do canal, causando a morte do inseto devido à paralisia na contração muscular (Sattelle et al., 2008; Lümmen, 2013). Devido a fatores como alta eficácia sobre insetos-alvo, baixa toxicidade à mamíferos e seletividade a inimigos naturais, atualmente os inseticidas diamidas são utilizados em larga escala, representando o terceiro maior grupo químico de inseticidas em vendas globais, e este número tende a aumentar a medida que novas moléculas são disponibilizadas para comercialização (Lahm et al., 2009; Brugger et al., 2010; Stecca et al., 2017; Nauen et al., 2019). Chlorantraniliprole (diamida antranílica) e flubendiamide (diamida do ácido ftálico) foram os primeiros inseticidas do grupo das

diamidas (Lahm et al., 2009). No Brasil, os primeiros produtos comerciais com estes ingredientes ativos foram registrados em 2009 (MAPA, 2018), desde então estes inseticidas são usados no controle de diversos insetos-praga, incluindo *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae).

Spodoptera frugiperda é uma espécie altamente polífaga, sendo considerada praga-chave de diversas culturas de importância econômica (Cruz, 1995; Casmuz et al. 2010). Apesar da polifagia, este inseto tem como principal hospedeiro o milho (*Zea mays* L.), sendo considerada uma das principais pragas da cultura na América do Sul, América Central e México (Cruz et al., 1982). Recentemente *S. frugiperda* foi reportada como espécie invasiva no continente Africano e Asiático, com potencial de causar severas perdas na produção agrícola destes continentes (Goergen et al., 2016; Sharanabasappa et al., 2018). No Brasil, onde *S. frugiperda* representa uma importante praga do cénario agrícola, o controle é feito principalmente por plantas que expressam proteínas Bt (*Bacillus thurigiensis* Berliner) e inseticidas químicos, porém devido a alta pressão de seleção exercida sobre esta praga, já há relatos de evolução da resistência no campo para proteínas Bt (Cry1F e Cry1Ab) e grupos químicos inseticidas como piretroides (lambda-cyhalotrhin) e organofosforados (chlorpirifós) (Carvalho et al., 2013; Farias et al., 2014; Omoto et al; 2016). Além disso, também já foram reportados casos de resistência selecionada em laboratório para benzoiulreias (lufenuron) e espinosinas (spinosad) (Nascimento et al., 2016; Okuma et al., 2018).

Os casos de resistência já reportados no Brasil tornam o manejo de *S. frugiperda* ainda mais desafiador, a medida que se tornam mais restritas as opções para seu controle. Diante desse contexto, é necessásio o estabelecimento de estratégias de manejo da resistência de *S. frugiperda* a inseticidas diamidas, com o intuito de preservar a vida útil deste grupo que ainda representa uma efetiva opção para o manejo desta praga. Para dar suporte à implementação destas estratégias, neste trabalho objetivou-se monitorar a resistência de *S. frugiperda* a inseticidas diamidas no Brasil, utilizando métodos de monitoramento genotípico e fenotípico.

2.2. Material e métodos

2.2.1. Coleta das populações de *S. frugiperda*

Para a realização dos bioensaios de monitoramento, populações de campo de *S. frugiperda* foram coletadas em diferentes regiões produtoras de milho no Brasil, nos anos agrícolas 2016, 2017 e 2018, além das entressafras 2016-2017 e 2017-2018. Aproximadamente 1000 lagartas por população foram coletadas em áreas comerciais de milho

não-Bt e acondicionadas em copos plásticos (100 mL) contendo dieta artificial proposta por Kasten Jr et al. (1978). Posteriormente as lagartas foram encaminhadas ao Laboratório de Resistência de Artrópodes - USP/ESALQ, onde permaneceram até atingirem o estágio de pupa. As pupas obtidas foram retiradas, desinfetadas com solução de sulfato de cobre a 6,5 % e posteriormente acondicionadas em bandejas plásticas (48 x 33 cm) forradas com papel filtro umedecido, cada pupa foi individualizada com um copo plástico (50 mL) invertido, onde permanceram até a emergência dos adultos. Os insetos foram mantidos em sala climatizada (25 ± 1°C, 70 ± 10 % umidade relativa e 14:10 h (L:E) fotoperíodo) desde a chegada das lagartas no laboratório até a emergência dos adultos.

2.2.2. Monitoramento genotípico da resistência de *S. frugiperda* ao inseticida chlorantraniliprole

A frequência alélica de resistência de *S. frugiperda* ao inseticida chlorantraniliprole foi estimada e monitorada pela técnica do F_2 "screen" (Andow; Alstad, 1998). Foram testadas populações de campo coletadas nos estados do Paraná, São Paulo, Mato Grosso do Sul, Mato Grosso, Goiás e Bahia no ano agrícola 2016, entressafra 2016-2017 e ano agrícola 2017 (Tabela 2.1 e Figura 2.1). Após a emergência dos adultos provenientes do campo (parentais P_0), foram formados casais (isolinhas) com indivíduos de até 24 h após a emergência. Cada isolinha foi alocada em copos plásticos (500 mL) invertidos sobre prato de acrílico forrado com papel filtro, para a alimentação dos adultos foi ofertado algodão embebido em solução de mel e água 1:10, substituído a cada dois dias. Os copos que continham posturas foram retirados, fechados e mantidos até a eclosão das lagartas (neonatas). As lagartas provenientes de cada isolinha (geração F_1) foram inoculadas em três placas de 32 compartimentos (Advento do Brasil, São Paulo, Brasil) contendo dieta artificial (1 lagarta por compartimento), totalizando 96 lagartas inoculadas por isolinha. As pupas obtidas de cada isolinha foram desinfetadas e acondicionadas em gaiolas de PVC (policloreto de vinila, 10 cm de diâmetro x 20 cm de altura) revestidas internamente com papel jornal (substrato de oviposição), para fechar as extremidades superior e inferior da gaiola foram usados pratos de acrílico, sobre o prato inferior foi colocado papel filtro umedecido para a manutenção da umidade. Após a emergência dos adultos, novamente foi ofertado algodão embebido em solução de mel e água 1:10, a cada dois dias a alimentação foi substituída e as posturas retiradas. As posturas contidas no papel jornal foram recortadas e mantidas em copos plásticos (100 mL) contendo um pedaço de papel filtro umedecido para a manutenção da umidade. As lagartas recém

eclodidas (geração F_2) foram transferidas para copos plásticos transparentes (100 mL) contendo dieta artificial, onde permaneceram até atingirem o 3° ínstar, estágio no qual as lagartas foram utilizadas nos bioensaios.

Tabela 2.1. Local e data de coleta das populações de *Spodoptera frugiperda* usadas no monitoramento genotípico da resistência ao inseticida chlorantraniliprole.

Código População	**Cidade, UF**	**Local de coleta**		**Data de Coleta**
		Latitude	**Longitude**	
Ano agrícola 2016				
PR-65	Peabiru, PR	23°51'58"S	52°23'43"O	15.04.2016
SP-22	Casa Branca, SP	21°50'19"S	47°11'03"O	20.04.2016
MS-22	Rio Brilhante, MS	21°44'26"S	54°29'17"O	23.03.2016
LRV	Lucas do Rio Verde, MT	12°58'10"S	55°46'31"O	18.05.2016
BAR	Barreiras, BA	11°45'42"S	45°46'31"O	09.05.2016
Entressafra 2016-2017				
SP-23	São João da Boa Vista, SP	22°00'58"S	46°50'26"O	01.08.2016
MT-38	Lucas do Rio Verde, MT	13°00'05"S	55°58'14"O	27.09.2016
GO-39	Rio Verde, GO	17°24'26"S	50°49'50"O	27.07.2016
BA-45	São Desidério, BA	12°08'25"S	45°26'58"O	27.06.2016
Ano agrícola 2017				
PR-70	Cascavel, PR	25°00'06"S	53°30'24"O	16.11.2016
SP-24	Casa Branca, SP	21°34'50"S	47°05'21"O	30.12.2016
MT-40	Lucas do Rio Verde, MT	12°33'41"S	56°09'42"O	07.03.2017
GO-41	Rio Verde, GO	17°42'58"S	51°10'46"O	12.12.2016
BA-47	Luis Eduardo Magalhães, BA	11°57'35"S	46°05'54"O	23.12.2016

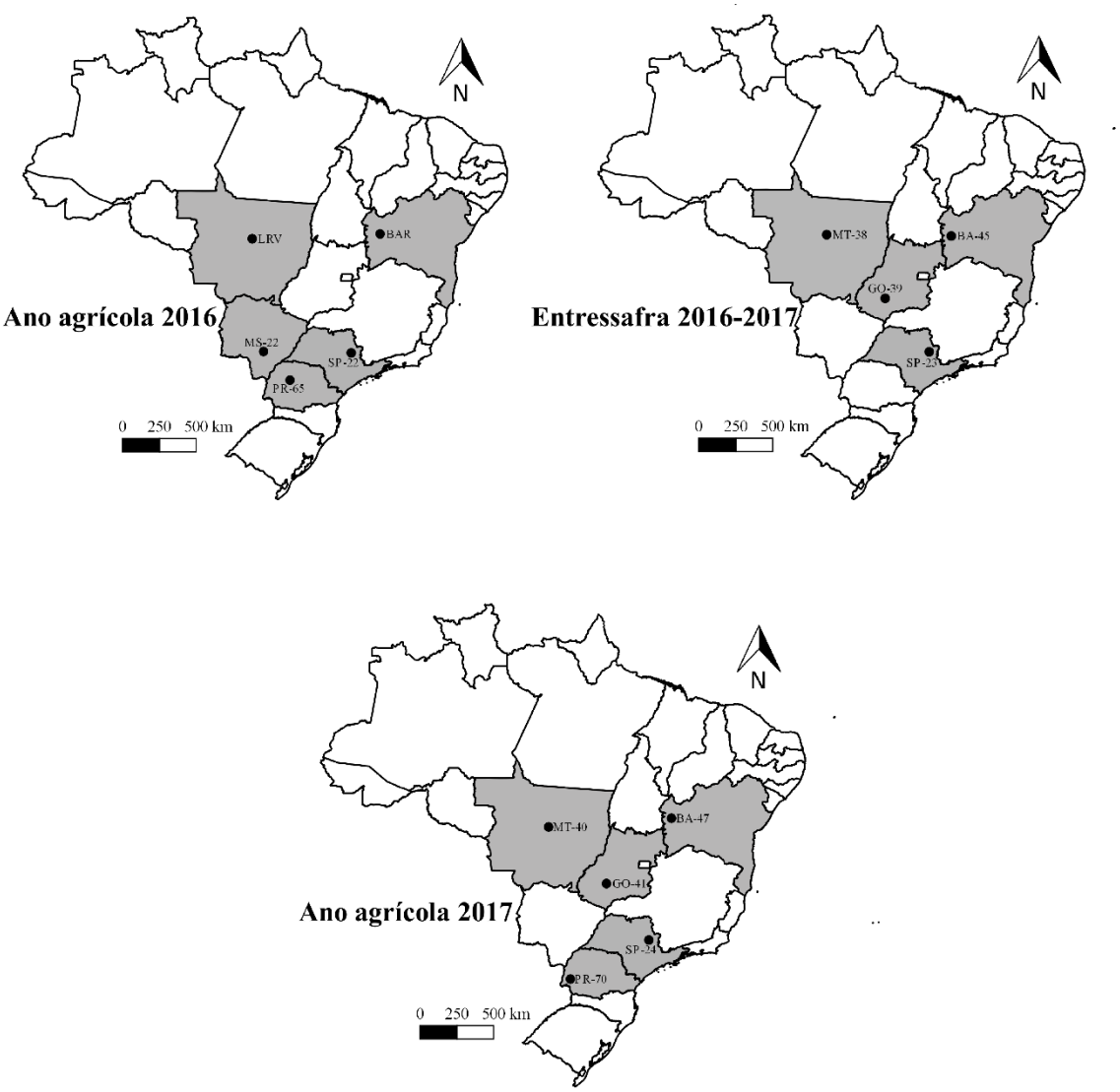

Figura 2.1. Locais de coleta das populações de *Spodoptera frugiperda* usadas no monitoramento genotípico da resistência ao inseticida chlorantraniliprole.

O método de bioensaio utilizado foi o de ingestão, mediante a contaminação superficial da dieta com inseticida. Os bioensaios foram realizadas em placas de acrílico de 24 células (Costar® Corning Incorporated, Corning, NY, USA), contendo 1,25 mL de dieta artificial por célula. Em cada célula foram aplicados 30 µL de solução de inseticida e surfactante (Triton® X-100, Labsynth, Diadema, SP, Brazil) na concentração de 0,1 %. A concentração diagnóstica utilizada foi de 0,505 µg de chlorantraniliprole cm^{-2} (Premio® SC 200 g i.a. L^{-1}, DuPont do Brasil S.A., Barueri, SP, Brasil), proposta por Ribeiro (2014).

Após a secagem da solução inseticida, 120 lagartas por isolinha foram expostas ao inseticida chlorantraniliprole (1 lagarta por célula). As lagartas foram mantidas em câmara

climatizada (25 ± 1 °C, 70 ± 10 % umidade relativa e 14:10 h (L:E) fotoperíodo) e após 96 h a mortalidade foi avaliada. Os insetos que não apresentavam movimentos coordenados após o toque de um pincel foram considerados mortos, os sobreviventes foram retirados das placas e transferidos para copos plásticos (50 mL) contendo dieta artificial, onde permaneceram até completar seu ciclo biológico.

Levando em consideração que entre os parentais existe apenas uma cópia do alelo de resistência e 3 cópias do alelo que confere suscetibilidade, se os descendentes dos parentais (geração F_1) acasalarem entre si para originar a progênie F_2, espera-se que 1/16 das lagartas da geração F_2 sejam homozigotas para o alelo da resistência (Andow; Alstad, 1998). Sendo assim, ao testarmos 120 lagartas por isolinha, foram consideradas positivas aquelas isolinhas em que 7 ou mais (≈ 6 %) lagartas da progênie F_2 sobreviveram à exposição ao inseticida e atingiram a fase adulta.

2.2.3. Monitoramento fenotípico da resistência de *S. frugiperda* a chlorantraniliprole e flubendiamide

Para monitoramento fenotípico da resistência de *S. frugiperda* a chlorantraniliprole e flubendiamide no Brasil, foram utilizadas cerca de 70 populações de campo coletadas nas principais regiões produtoras de milho do país entre os anos agrícolas 2016 e 2018 (1ª e 2ª safra 2016; entressafra 2016-2017; 1ª e 2ª safra 2017; entressafra 2017-2018; 1ª e 2º safra 2018) (Tabela 2.2 e Figuras 2.2 e 2.3). Além disso, uma linhagem suscetível de referência (Sus) foi usada como padrão de comparação com as populações de campo, esta linhagem foi obtida junto a Embrapa Milho e Sorgo (Sete Lagoas, MG, Brasil) no ano de 1996, sendo mantida sem pressão de seleção por inseticidas ou proteínas Bt. Após a emergência, os adultos de cada população foram agrupados em aproximadamente 100 casais em gaiolas de PVC (15 cm de diâmetro × 20 cm de altura) revestidas com papel jornal. A alimentação dos adultos, retirada das posturas, inoculação das lagartas da geração F_1 e o método de bioensaio seguiram os mesmos procedimentos anteriormente mencionados no item 2.2.2.

Tabela 2.2. Local e data de coleta das populações de *Spodoptera frugiperda* usadas no monitoramento fenotípico da resistência aos inseticidas chlorantraniliprole e flubendiamide.

Código População	Cidade, UF	Latitude	Longitude	Data de coleta
1ª safra 2016				
RS-20	Não me Toque, RS	28º25'44"S	52º45'52"O	03.11.2015
RS-21	Sto Ângelo, RS	28º24'09"S	52º14'32"O	05.11.2015
SC-5	Seara, SC	27º08'07"S	52º16'43"O	06.11.2015
PR-62	Ponta Grossa, PR	25º20'04"S	50º03'10"O	24.11.2015
PR-63	Cascavel, PR	24º56'52"S	53º30'57"O	24.11.2015
SP-21	Casa Branca, SP	21º50'33"S	46º59'51"O	23.10.2015
MG-23	Araguari, MG	18º46'52"S	47º58'21"O	24.11.2015
GO-36	Planaltina, GO	15º22'11"S	47º37'52"O	10.12.2015
GO-37	Rio Verde, GO	17º38'19"S	51º08'59"O	18.12.2015
BA-43	Correntina, BA	13º39'05"S	45º40'50"O	14.12.2015
BA-44	Roda Velha, BA	12°44'21"S	45°59'55"O	23.02.2016
2ª safra 2016				
PR-64	Cornelho Procópio, PR	23º12'42"S	50º42'19"O	12.03.2016
PR-65	Peabiru, PR	23º51'58"S	52º23'43"O	15.04.2016
PR-66	Palotina, PR	24º09'50"S	53º32'15"O	18.04.2016
SP-22	Casa Branca, SP	21º50'19"S	47º11'03"O	20.04.2016
MS-22	Rio Brilhante, MS	21º44'26"S	54º29'17"O	23.03.2016
MS-23	Chapadão do Sul, MS	18º45'43"S	52º36'41"O	29.03.2016
MT-35	Sapezal, MT	13º25'36"S	58º38'18"O	23.03.2016
MT-36	Lucas do Rio Verde, MT	12º46'01"S	56º07'18"O	30.03.2016
MT-37	Campo Verde, MT	15º33'04"S	55º12'71"O	12.03.2016
LRV	Lucas do Rio Verde, MT*	12º58'10"S	55º46'31"O	18.05.2016
GO-38	Rio Verde, GO	17º35'24"S	50º56'45"O	14.03.2016
BAR	Barreiras, BA*	11º45'42"S	45º46'31"O	09.05.2016
Entressafra 2016-2017				
SP-23	São João da Boa Vista, SP	22º00'58"S	46º50'26"O	01.08.2016
MT-38	Lucas do Rio Verde, MT	13º00'05"S	55º58'14"O	27.09.2016
GO-39	Rio Verde, GO	17º24'26"S	50º49'50"O	27.07.2016
BA-45	São Desidério, BA	12º08'25"S	45º26'58"O	27.06.2016
1ª safra 2017				
RS-22	Sto Antônio do Planalto, RS	28º21'14"S	52º43'02"O	21.11.2016
SC-6	Guatambu, SC	27º07'53"S	52º45'33"O	28.11.2016
PR-69	Tibagi, PR	24º27'01"S	50º11'22"O	16.11.2016
PR-70	Cascavel, PR	25º00'06"S	53º30'24"O	16.11.2016
SP-24	Casa Branca, SP	21º34'50"S	47º05'21"O	30.12.2016
MG-25	Tupaciguara, MG	18º37'49"S	48º42'12"O	28.11.2016
GO-41	Rio Verde, GO	17º42'58"S	51º10'46"O	12.12.2016
GO-42	Cristalina, GO	16º55'27"S	47º38'14"O	23.12.2016
BA-47	Luis Eduardo Magalhães, BA	11º57'35"S	46º05'54"O	23.12.2016
2ª safra 2017				
PR-71	Toledo, PR	24º40'14"S	53º48'49"O	10.03.2017
PR-72	Luiziana, PR	24º15'50"S	52º21'19"O	30.03.2017
PR-73	Sertanópolis, PR*	23º01'17"S	50º59'21"O	30.03.2017

(continuação tabela 2.2)

Código População	Cidade, UF	Latitude	Longitude	Data de coleta
Continuação 2ª safra 2017				
SP-25	Pirassununga, SP	21º53'09"S	47º20'58"O	07.04.2017
MS-24	Chapadão do Sul, MS	18º46'42"S	52º38'50"O	02.03.2017
MS-25	Laguna Carapã, MS	22º42'34"S	55º02'55"O	10.03.2017
MT-40	Lucas do Rio Verde, MT	12º33'41"S	56º09'42"O	07.03.2017
MT-41	Sapezal, MT	13º30'09"S	58º45'33"O	07.03.2017
MT-42	Campo Verde, MT	15º29'28"S	55º20'52"O	07.03.2017
GO-43	Montividiu, GO	17º29'59"S	51º07'23"O	02.03.2017
Entressafra 2017-2018				
SP-26	Casa Branca, SP	21º40'11"S	47º03'20"O	03.08.2017
MS-26	Chapadão do Sul, MS	18º46'48"S	52º38'50"O	12.07.2017
MT-44	Sorriso, MT	12º59'13"S	55º51'35"O	12.07.2017
GO-44	Rio Verde, GO	17º47'45"S	50º58'20"O	28.07.2017
BA-48	São Desidério, BA	12º51'12"S	45º28'13"O	28.07.2017
1ª safra 2018				
RS-24	Sto Ângelo, RS	28º12'00"S	54º16'15"O	18.10.2017
RS-26	Não-me-Toque, RS	28º15'36"S	52º51'24"O	16.11.2017
SC-7	Chapecó, SC	27º05'04"S	52º38'06"O	23.11.2017
PR-75	Castro, PR	24º46'13"S	49º53'50"O	23.11.2017
PR-76	Toledo, PR	24º51'10"S	53º50'44"O	14.12.2017
SP-27	Casa Branca, SP	21º50'15"S	47º00'26"O	09.11.2017
MG-26	Araguari, MG	18º32'06"S	48º23'35"O	26.12.2017
GO-45	Cristalina, GO	16º19'08"S	47º35'36"O	06.12.2017
GO-46	Rio Verde, GO	17º44'39"S	50º51'14"O	26.12.2017
BA-49	São Desidério, BA	13º15'52"S	46º08'46"O	06.12.2017
2ª safra 2018				
PR-77	Campo Mourão, PR	24º31'51"S	51º52'54"O	29.03.2018
PR-78	Cascavel, PR	24º45'36"S	53º40'10"O	27.03.2018
PR-79	Sertanópolis, PR*	23°00'26"S	51°00'13"O	23.04.2018
SP-28	Casa Branca, SP	22º05'57"S	47º01'40"O	06.04.2018
MS-27	Chapadão do Sul, MS	18º46'17"S	52º36'33"O	29.03.2018
MS-28	Dourados, MS	22º42'27"S	55º02'34"O	06.04.2018
MT-45	Lucas do Rio Verde, MT	13º09'49"S	56º00'25"O	20.03.2018
MT-46	Sapezal, MT	13º30'08"S	58º48'05"O	27.03.2018
MT-47	Campo Verde, MT	15°37'54"S	55°08'37"O	18.04.2018
GO-47	Rio Verde, MT	17º52'05"S	50º55'48"O	09.04.2018

*Populações monitoradas apenas para o inseticida chlorantraniliprole.

As concentrações diagnósticas utilizadas foram propostas por Ribeiro (2014), 0,505 µg de chlorantraniliprole cm^{-2} (Premio® SC 200 g i.a. L^{-1}, DuPont do Brasil S.A., Barueri, SP, Brasil) e 2,842 µg de flubendiamide cm^{-2} (Belt® SC 480 g i.a. L^{-1}, Bayer S.A., São Paulo, SP Brasil). Após a secagem da solução inseticida sobre a dieta artificial, em torno de 480 lagartas de 3° ínstar da geração F_1 foram inoculadas individualmente (1 lagarta por célula). Após a

inoculação, as lagartas foram mantidas em câmara climatizada (25 ± 1 °C, 70 ± 10 % umidade relativa e 14:10 h (L:E) fotoperíodo) e após 96 h, a mortalidade foi avaliada.

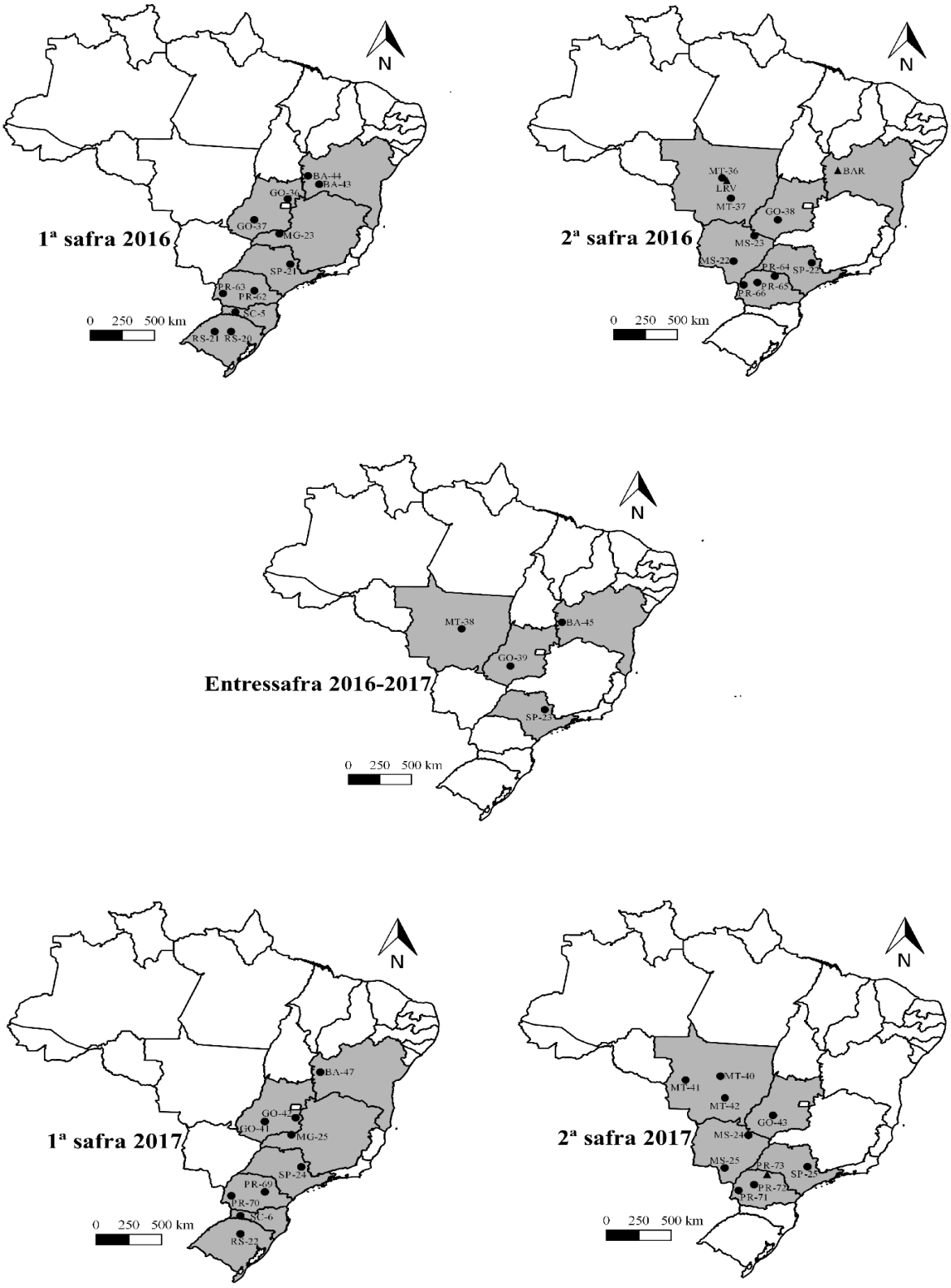

Figura 2.2. Locais de coleta das populações de *Spodoptera frugiperda* usadas no monitoramento fenotípico da resistência aos inseticidas chlorantraniliprole e flubendiamide (1ª e 2ª safra 2016; entressafra 2016-2017; 1ª e 2ª safra 2017). Populações marcadas com triângulo foram monitoradas apenas para o inseticida chlorantraniliprole.

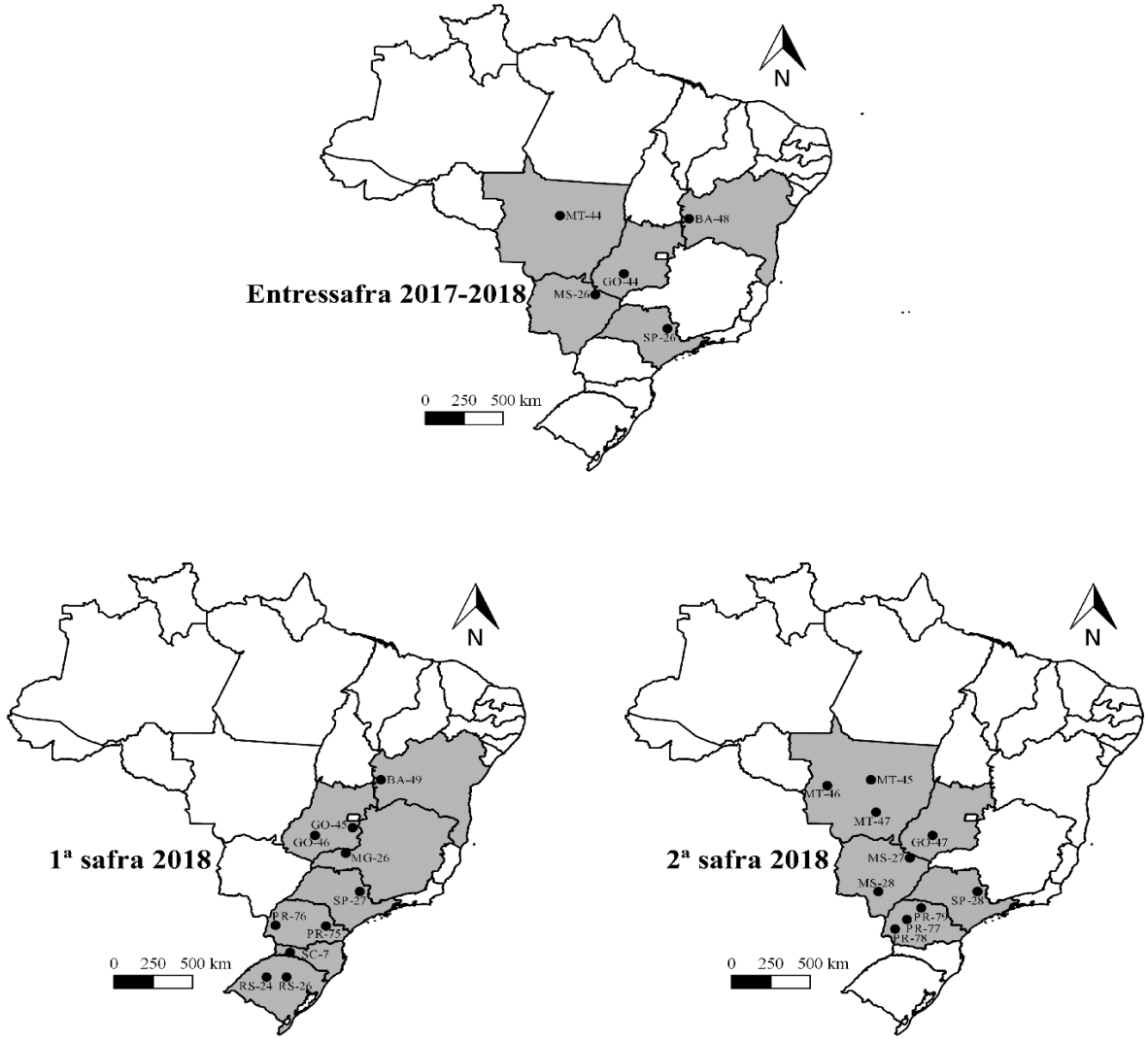

Figura 2.3. Locais de coleta das populações de *Spodoptera frugiperda* usadas no monitoramento fenotípico da resistência aos inseticidas chlorantraniliprole e flubendiamide (entressafra 2017-2018; 1ª e 2º safra 2018).

2.2.4. Análise estatística

Para o monitoramento genotípico, após a obtenção do número de isolinhas positivas e negativas, a frequência esperada do alelo de resistência foi calculada usando o algoritmo descrito na equação 1, proposta por Andow; Alstad (1998). Já os intervalos de confiança (IC 95 %) foram estimados utilizando a função *binom.bayes* do pacote *binom* no programa R 3.4.1 (R Development Core Team, 2017).

Com os dados obtidos no monitoramento fenotípico, foram estimados a probabilidade de sobrevivência e os intervalos de confiança 95 % para cada população testada, para isso foi utilizado a função *binom.probit* do pacote binom do programa R 3.4.1 (R Develpment Core Team, 2017). A sobrevivência de cada população de campo foi comparada com a

sobrevivência da linhagem suscetível de laboratório (Sus), pela análise da sobreposição dos intervalos de confiança.

Para comparar as sobrevivências de acordo com a safra monitorada, as populações de campo foram agrupadas de acordo com a safra de coleta e novamente foram estimados a probabilidade de sobrevivência e os intervalos de confiança 95 %. Para esta análise também foi a utilizada a função *binom.probit* do pacote binom do R 3.4.1. As médias sobrevivências de *S. frugiperda* entre as safras foram comparadas entre si pela sobreposição dos intervalos de confiança 95 %.

2.3. Resultados

2.3.1. Monitoramento genotípico da resistência de *S. frugiperda* ao inseticida chlorantraniliprole

Foram testadas 817 isolinhas provenientes de 14 populações brasileiras de *S. frugiperda* durante os anos agrícolas 2016 e 2017. Dentre as populações testadas, foi verificada uma variação de 0,0030 (0-0,0113 IC 95 %) (Casa Branca, SP - 2017) a 0,0781 (0,0486-0,1139 IC 95 %) (Luis Eduardo Magalhães, BA - 2017) na frequência estimada de alelos que conferem resistência a chlorantraniliprole (Tabela 2.3). Em geral, a frequência do alelo que confere resistência a chlorantraniliprole em populações brasileiras de *S. frugiperda* foi de 0,0217 (0,0170-0,0269 IC 95 %) (Tabela 2.3). Populações coletadas na Bahia apresentaram as maiores frequências do alelo de resistência, dentro de cada safra, estas populações representaram pelo menos 50 % das isolinhas positivas encontradas. Apenas em cinco populações não foram encontradas isolinhas positivas, são elas Peabiru, PR e Casa Branca, SP (2016), São João da Boa Vista, SP (entressafra 2016-2017), Cascavel, PR e Casa Branca, SP (2017) (Tabela 2.3). Quando agrupadas dentro da safra de coleta, as frequências estimadas foram 0,0148 (0,0088-0,0222 IC 95 %), 0,0323 (0,0214-0,0453 IC 95 %) e 0,0227 (0,0151-0,0317 IC 95 %) no ano agrícola 2016, entressafra 2016-2017 e ano agrícola 2017, respectivamente.

Tabela 2.3. Frequência estimada do alelo que confere resistência a chlorantraniliprole em populações de *Spodoptera frugiperda* do Brasil.

Cód. Pop.	Cidade, UF	N° de Isolinhas P_0	N° de Isolinhas F_1	N° Isolinhas F_2 Testadas	N° Isolinhas F_2 Positivas	Frequência do alelo R[a] (IC 95 %)
Ano agrícola 2016						
PR-65	Peabiru, PR	144	103	74	0	0,0033 (0-0,0127)
SP-22	Casa Branca, SP	125	95	58	1	0,0083 (0,0010-0,0232)
MS-22	Rio Brilhante, MS	120	80	59	0	0,0041 (0-0,0152)
LRV	Lucas do Rio Verde, MT	143	95	51	3	0,0189 (0,0052-0,0411)
BAR	Barreiras, BA	136	86	61	13	0,0556 (0,0309-0,0870)
Subtotal		668	459	303	17	0,0148 (0,0088-0,0222)
Entressafra 2016-2017						
SP-23	São João da Boa Vista, SP	94	62	46	0	0,0052 (0-0,0192)
MT-38	Lucas do Rio Verde, MT	150	97	47	6	0,0357 (0,0146-0,0658)
GO-39	Rio Verde, GO	127	94	66	7	0,0294 (0,0129-0,0525)
BA-45	São Desidério, BA	150	98	48	13	0,0700 (0,0390-0,1092)
Subtotal		521	351	207	26	0,0323 (0,0214-0,0453)
Ano agrícola 2017						
PR-70	Cascavel, PR	113	72	43	0	0,0056 (0-0,0205)
SP-24	Casa Branca, SP	150	114	80	0	0,0030 (0-0,0113)
MT-40	Lucas do Rio Verde, MT	152	122	90	7	0,0217 (0,0095-0,0389)
GO-41	Rio Verde, GO	88	54	32	1	0,0147 (0,0018-0,0407)
BA-47	Luis Eduardo Magalhães, BA	151	101	62	19	0,0781 (0,0486-0,1139)
Subtotal		654	463	307	27	0,0227 (0,0151-0,0317)
Total		1843	1273	817	70	0,0217 (0,0170-0,0269)

[a] Frequência de alelos de resistência baseado em um modelo de resistência monogênica.

2.3.2. Monitoramento fenotípico da resistência de *S. frugiperda* a chlorantraniliprole e flubendiamide

Quando expostas à concentração diagnóstica de chlorantraniliprole, foi observado uma variação na sobrevivência larval das populações de *S. frugiperda*, variando de 0,00 (0,00-0,64 % IC 95 %) a 32,08 % (28,03-36,36 % IC 95 %) (Tabela 2.4 e Figura 2.4). No ano agrícola 2016, as populações de *S. frugiperda* coletadas nos estados da Bahia, Goiás, Mato Grosso do Sul e Mato Grosso apresentaram uma maior sobrevivência, diferindo da população suscetível de referência (Sus). Com destaque para as populações de Correntina, BA (1ª safra 2016) e Sapezal, MT (2ª safra 2016) com sobrevivências de 32,08 % (28,03-36,36 % IC 95 %) e 16,27 % (13,25-19,70 % IC 95 %), respectivamente. Na entressafra 2016-2017, ainda foi observado uma maior sobrevivência nas populações coletadas na Bahia e Mato Grosso, porém para populações provindas de outros estados, a suscetibilidade de *S. frugiperda* se manteve alta.

Tabela 2.4. Sobrevivência larval (%) de populações brasileiras de *Spodoptera frugiperda* expostas a concentração diagnóstica de chlorantraniliprole.

Código Pop.	Cidade, UF	Número de lagartas		Sobrevivência (%)
		Testadas	Sobreviventes	0,505 µg i.a. cm^{-2} (IC 95 %)
Sus	Suscetível de referência	480	0	0,00 (0,00-0,77)
1ª safra 2016				
RS-20	Não me Toque, RS	480	0	0,00 (0,00-0,77)
RS-21	Sto Ângelo, RS	480	0	0,00 (0,00-0,77)
SC-5	Seara, SC	480	0	0,00 (0,00-0,77)
PR-62	Ponta Grossa, PR	480	2	0,42 (0,09-1,50)
PR-63	Cascavel, PR	480	3	0,63 (0,19-1,80)
SP-21	Casa Branca, SP	480	1	0,21 (0,02-1,24)
MG-23	Araguari, MG	480	4	0,83 (0,23-2,12)
GO-36	Planaltina, GO	504	27	5,36 (3,67-7,63)*
GO-37	Rio Verde, GO	480	22	4,58 (3,00-6,78)*
BA-43	Correntina, BA	480	154	32,08 (28,03-36,36)*
BA-44	Roda Velha, BA	528	11	2,08 (1,13-3,64)*
Total populações de campo		5352	224	4,19 (3,68-4,75)
2ª safra 2016				
PR-64	Cornelho Procópio, PR	480	4	0,83 (0,30-2,09)
PR-65	Peabiru, PR	480	2	0,42 (0,09-1,50)
PR-66	Palotina, PR	480	3	0,63 (0,19-1,80)
SP-22	Casa Branca, SP	456	2	0,44 (0,10-1,58)
MS-22	Rio Brilhante, MS	480	16	3.33 (2.02-5.29)*
MS-23	Chapadão do Sul, MS	576	17	2,95 (1,81-4,62)*
MT-35	Sapezal, MT	504	82	16,27 (13,25-19,70)*
MT-36	Lucas do Rio Verde, MT	432	27	6,25 (4,27-8,87)*
MT-37	Campo Verde, MT	480	41	8,85 (6,31-11,32)*
LRV	Lucas do Rio Verde, MT	480	17	3,54 (2,18-5,54)*
GO-38	Rio Verde, GO	480	22	4,58 (3,00-6,78)*
BAR	Barreiras, BA	480	19	3,96 (2,50-6,04)*
Total populações de campo		5808	252	4,34 (3,84-4,89)
Entressafra 2016-2017				
SP-23	São João da Boa Vista, SP	480	4	0,83 (0,30-2,09)
MT-38	Lucas do Rio Verde, MT	504	24	4,76 (2,17-6,93)*
GO-39	Rio Verde, GO	480	0	0,00 (0,00-0,77)
BA-45	São Desidério, BA	480	32	6,67 (4,71-9,20)*
Total populações de campo		1944	60	3,09 (2,39-3,94)
1ª safra 2017				
RS-22	Sto Antônio do Planalto, RS	504	0	0,00 (0,00-0,73)
SC-6	Guatambu, SC	480	0	0,00 (0,00-0,77)
PR-69	Tibagi, PR	480	0	0,00 (0,00-0,77)
PR-70	Cascavel, PR	504	1	0,20 (0,02-1,18)
SP-24	Casa Branca, SP	432	3	0,69 (0,21-1,99)
MG-25	Tupaciguara, MG	480	2	0,42 (0,09-1,50)
GO-41	Rio Verde, GO	480	18	3,75 (2,34-5,79)*
GO-42	Cristalina, GO	480	46	9,58 (7,21-12,49)*
BA-47	Luis Eduardo Magalhães, BA	480	46	9,58 (7,21-12,49)*
Total populações de campo		4320	116	2,69 (2,24-3,20)

(continuação tabela 2.4)

Código Pop.	Cidade, UF	Número de lagartas		Sobrevivência (%)
		Testadas	Sobreviventes	0,505 µg i.a. cm^{-2} (IC 95 %)
2ª safra 2017				
PR-71	Toledo, PR	576	0	0,00 (0,00-0,64)
PR-72	Luiziana, PR	576	3	0,52 (0,16-1,50)
PR-73	Sertanópolis, PR	480	0	0,00 (0,00-0,77)
SP-25	Pirassununga, SC	480	0	0,00 (0,00-0,77)
MS-24	Chapadão do Sul, MS	504	2	0,40 (0,09-1,43)
MS-25	Laguna Carapã, MS	456	7	1,54 (0,71-3,08)
MT-40	Lucas do Rio Verde, MT	480	0	0,00 (0,00-0,77)
MT-41	Sapezal, MT	480	2	0,42 (0,09-1,50)
MT-42	Campo Verde, MT	504	3	0,60 (0,18-1,71)
GO-43	Montividiu, GO	504	1	0,20 (0,02-1,18)
Total populações de campo		5040	18	0,36 (0,22-0,56)
Entressafra 2017-2018				
SP-26	Casa Branca, SP	504	0	0,00 (0,00-0,73)
MS-26	Chapadão do Sul, MS	504	2	0,40 (0,09-1,43)
MT-44	Sorriso, MT	504	2	0,40 (0,09-1,43)
GO-44	Rio Verde, GO	480	1	0,21 (0,02-1,24)
BA-48	Roda Velha, BA	480	12	2,50 (1,39-4,26)*
Total populações de campo		2472	17	0,69 (0,42-1,09)
1ª safra 2018				
RS-24	Sto Ângelo, RS	480	3	0,40 (0,09-1,43)
RS-26	Não-me-Toque, RS	480	2	0,42 (0,09-1,50)
SC-7	Chapecó, SC	480	3	0,63 (0,19-1,18)
PR-75	Castro, PR	480	6	1,25 (0,54-2,65)
PR-76	Toledo, PR	480	2	0,42 (0,09-1,50)
SP-27	Casa Branca, SP	504	7	1,39 (0,64-2,79)
MG-26	Araguari, MG	528	1	0,19 (0,02-1,23)
GO-45	Cristalina, GO	480	41	8,54 (6,31-11,32)*
GO-46	Rio Verde, GO	504	15	2,98 (1,76-4,80)*
BA-49	São Desidério, BA	480	72	15,00 (12,03-18,42)*
Total populações de campo		4896	152	3,10 (2,65-3,62)
2ª safra 2018				
PR-77	Campo Mourão	480	0	0,00 (0,00-0,77)
PR-78	Cascavel	480	5	1,04 (0,41-2,37)
PR-79	Sertanópolis	576	0	0,00 (0,00-0,64)
SP-28	Casa Branca	480	0	0,00 (0,00-0,77)
MS-27	Chapadão do Sul	480	11	2,29 (1,24-4,00)*
MS-28	Dourados	552	0	0,00 (0,00-0,67)
MT-45	Lucas do Rio Verde	480	14	2,91 (1,70-4,78)*
MT-46	Sapezal	480	21	4,38 (2,83-6,54)*
MT-47	Campo Verde	480	2	0,42 (0,09-1,50)
GO-47	Rio Verde	480	0	0,00 (0,00-0,77)
Total populações de campo		4968	53	1,07 (0,81-1,39)

* Houve diferença estatística entre as sobrevivências da população de campo e a população suscetível de referência pela não sobreposição dos intervalos de confiança 95%.

No ano agrícola 2017, a maioria das populações testadas apresentaram alta suscetibilidade a chlorantraniliprole, com exceção de populações coletadas na Bahia e Goiás em 1ª safra. Na entressafra 2017-2018 foi observada uma alta suscetibilidade das populações testadas, somente a população de Roda Velha, BA diferiu da população Sus com sobrevivência 2,50 % (1,39-4,26 IC 95 %). No ano agrícola 2018, novamente as populações da Bahia, Goiás, Mato Grosso do Sul e Mato Grosso diferiram da suscetível, com destaque principalmente para as populações de Cristalina, GO e São Desidério, BA, com sobrevivências de 8,54 % (6,31-11,32 % IC 95 %) e 15,00 % (12,03-18,42 % IC 95 %), respectivamente (Tabela 2.4 e Figura 2.4).

Ao agruparmos as populações de acordo com a safra de coleta e verificarmos as médias de sobrevivência, é possível observar que, de modo geral a suscetibilidade de *S. frugiperda* a chlorantraniliprole vem aumentando desde o ano agrícola 2016, quando as maiores sobrevivências de *S. frugiperda* foram observadas (Figura 2.5).

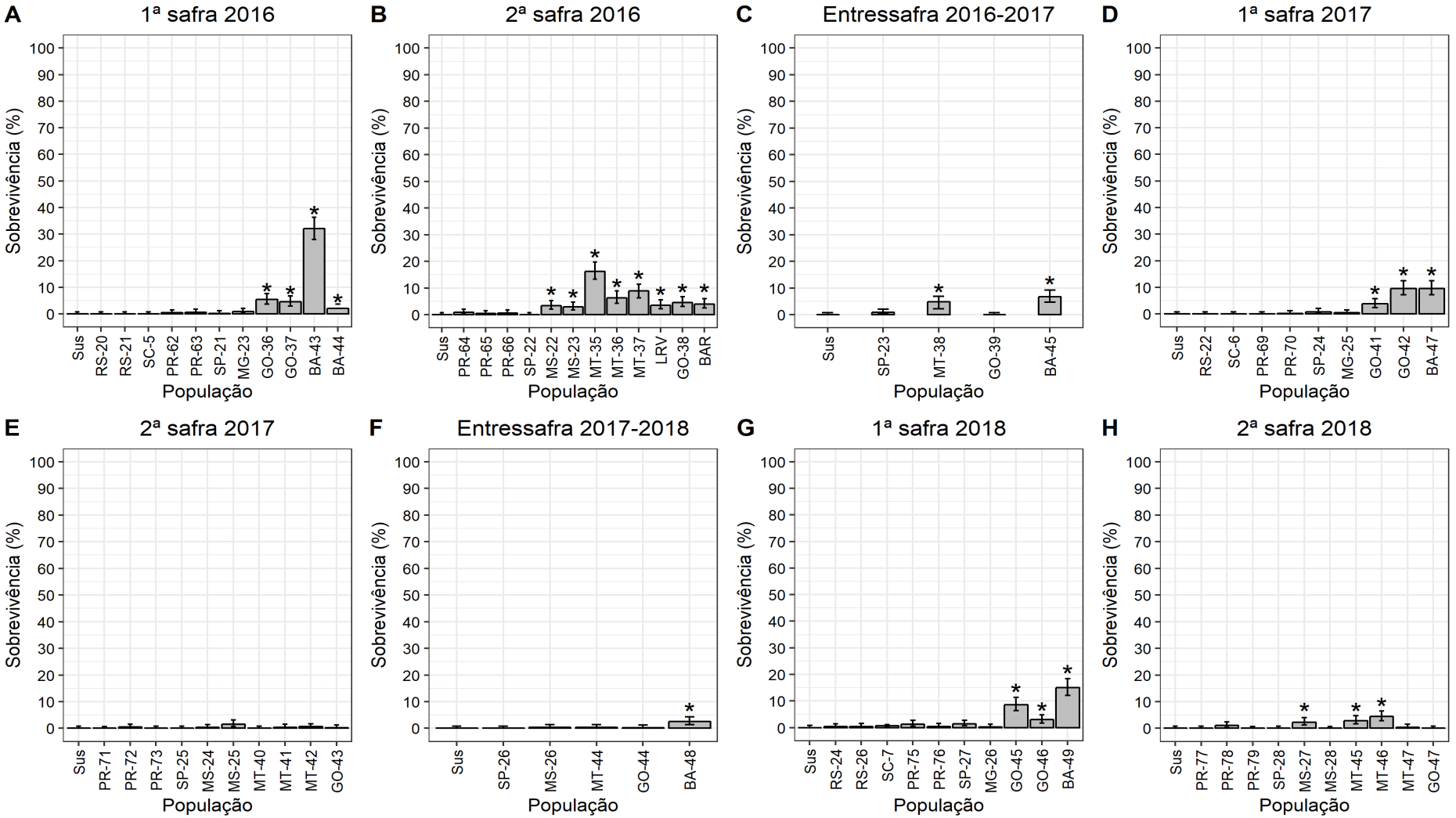

Figura 2.4. Monitoramento fenotípico da resistência a chlorantraniliprole em populações brasileiras de *Spodoptera frugiperda*. A-1ª safra 2016; B-2ª safra 2016; C-Entressafra 2016-2017; D-1ª safra 2017; E-2ª safra 2017; F-Entressafra 2017-2018; G-1ª safra 2018; H-2ª safra 2018.* Houve diferença estatística entre as sobrevivências da população de campo e a população suscetível de referência pela não sobreposição dos intervalos de confiança 95%.

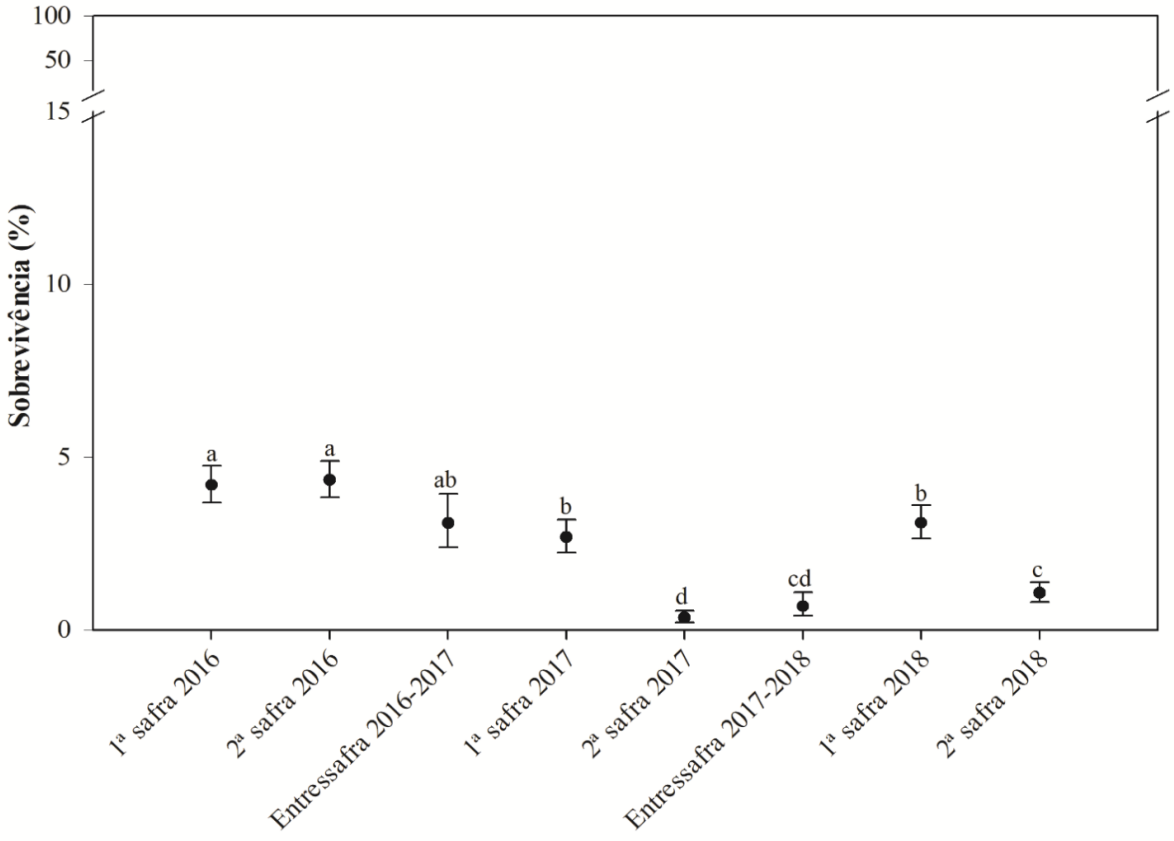

Figura 2.5. Avaliação temporal da suscetibilidade de populações *Spodoptera frugiperda* expostas à concentração diagnóstica de chlorantraniliprole (0,505 µg i.a. cm^{-2}). Baseado na média de sobrevivência (%) das populações de campo agrupadas de acordo com a safra de coleta. Houve diferença estatística quando não ocorreu sobreposição dos intervalos de confiança (95 %).

Para o inseticida flubendiamide (Tabela 2.5 e Figura 2.6), no ano agrícola 2016 foi verificada uma sobrevivência significativa em praticamente todas as populações testadas, com exceção de populações provindas do estado do Paraná, todas as demais diferiram da Sus. Dentre as populações que apresentaram maiores sobrevivência estão Planaltina, GO (1ª safra) e Chapadão do Sul, MS (2ª safra), com sobrevivências de 18,54 % (15,27-22,22 % IC 95 %) e 15,42 % (12,41-18,87 % IC 95 %), respectivamente. Na 2ª safra 2016, todas as populações coletadas no Mato Grosso apresentaram mais de 20 % de sobrevivência. Na entressafra 2016-2017, ocorreu um aumento na suscetibilidade de *S. frugiperda* a flubendiamide nas populações de Goiás e Mato Grosso, ao contrário do ocorrido na Bahia, onde foi verificado um decréscimo na suscetibilidade quando comparada as safras anteriores (Tabela 2.5 e Figura 2.6).

Tabela 2.5. Sobrevivência larval (%) de populações brasileiras de *Spodoptera frugiperda* expostas à concentração diagnóstica de flubendiamide.

Código Pop.	Cidade, UF	Número de lagartas		Sobrevivência (%)
		Testadas	Sobreviventes	2,842 µg i.a. cm^{-2} (IC 95 %)
Sus	Suscetível de referência	480	0	0,00 (0,00-0,77)
1ª safra 2016				
RS-20	Não me Toque, RS	480	21	4,38 (2,83-6,54)*
RS-21	Sto Ângelo, RS	456	20	4,36 (2,81-6,61)*
SC-5	Seara, SC	480	15	3,13 (1,86-5,03)*
PR-62	Ponta Grossa, PR	480	8	1,67 (0,81-3,20)*
PR-63	Cascavel, PR	456	0	0,00 (0,00-0,81)
SP-21	Casa Branca, SP	504	29	5,75 (3,99-8,08)*
MG-23	Araguari, MG	504	26	5,16 (3,50-7,39)*
GO-36	Planaltina, GO	480	89	18,54 (15,27-22,22)*
GO-37	Rio Verde, GO	480	58	12,08 (9,41-15,15)*
BA-43	Correntina, BA	456	42	9,21 (6,83-12,16)*
BA-44	Roda Velha, BA	480	23	4,79 (3,17-7,02)*
Total populações de campo		5256	331	6,30 (5,67-6,98)
2ª safra 2016				
PR-64	Cornelho Procópio, PR	480	12	2,50 (1,39-4,26)*
PR-65	Peabiru, PR	504	0	0,00 (0,00-0,73)
PR-66	Palotina, PR	528	3	0,57 (0,17-1,64)
SP-22	Casa Branca, SP	480	17	3,54 (2,18-5,53)*
MS-22	Rio Brilhante, MS	480	52	10,83 (8,30-13,88)*
MS-23	Chapadão do Sul, MS	480	74	15,42 (12,41-18,87)*
MT-35	Sapezal, MT	480	222	46,25 (41,82-50,72)*
MT-36	Lucas do Rio Verde, MT	480	97	20,21 (16,80-23,30)*
MT-37	Campo Verde, MT	480	140	29,17 (25,24-33,36)*
GO-38	Rio Verde, GO	480	39	8,12 (5,95-10,86)*
Total populações de campo		4872	656	13,46 (12,53-14,45)
Entressafra 2016-2017				
SP-23	São João da Boa Vista, SP	480	6	1,25 (0,54-2,65)
MT-38	Lucas do Rio Verde, MT	480	28	5,83 (4,02-8,24)*
GO-39	Rio Verde, GO	480	17	3,54 (2,18-5,54)*
BA-45	São Desidério, BA	480	68	14,17 (11,28-17,52)*
Total populações de campo		1920	119	6,20 (5,19-7,35)
1ª safra 2017				
RS-22	Sto Antônio do Planalto, RS	480	8	1,67 (0,81-3,20)*
SC-6	Guatambu, SC	480	3	0,63 (0,19-1,80)
PR-69	Tibagi, PR	480	6	1,25 (0,54-2,64)
PR-70	Cascavel, PR	456	6	1,32 (0,57-2,79)
SP-24	Casa Branca, SP	528	0	0,00 (0,00-0,70)
MG-25	Tupaciguara, MG	480	32	6,67 (4,71-9,20)*
GO-41	Rio Verde, GO	480	9	1,88 (0,95-3,47)*
GO-42	Cristalina, GO	480	48	10,00 (7,57-12,95)*
BA-47	Luis Eduardo Magalhães, BA	600	95	15,83 (13,09-18,93)*
Total populações de campo		4464	207	4,64 (4,05-5,29)

(continuação tabela 2.5)

Código Pop.	Cidade, UF	Número de lagartas		Sobrevivência (%)
		Testadas	Sobreviventes	2,842 µg i.a. cm^{-2} (IC 95 %)
2ª safra 2017				
PR-71	Toledo, PR	480	12	2,50 (1,39-4,26)*
PR-72	Luiziana, PR	480	0	0,00 (0,00-0,77)
SP-25	Pirassununga, SP	480	9	1,87 (0,95-3,47)
MS-24	Chapadão do Sul, MS	456	11	0,63 (0,19-1,80)
MS-25	Laguna Carapã, MS	504	14	2,78 (1,62-4,55)*
MT-40	Lucas do Rio Verde, MT	504	20	3,96 (2,54-5,99)*
MT-41	Sapezal, MT	480	42	8,75 (6,49-11,56)*
MT-42	Campo Verde, MT	480	28	5,83 (4,02-8,24)*
GO-43	Montividiu, GO	480	3	0,63 (0,19-1,80)
Total populações de campo		4344	139	3,20 (2,71-3,76)
Entressafra 2017-2018				
SP-26	Casa Branca, SP	504	5	0,99 (0,40-2,26)
MS-26	Chapadão do Sul, MS	504	5	0,99 (0,40-2,26)
MT-44	Sorriso, MT	504	0	0,00 (0,00-0,73)
GO-44	Rio Verde, GO	360	8	2,22 (1,08-4,25)*
BA-48	Roda Velha, BA	600	101	16,83 (14,01-20,00)*
Total populações de campo		2472	119	4,81 (4,03-5,72)
1ª safra 2018				
RS-24	Sto Ângelo, RS	480	3	0,63 (0,19-1,80)
RS-26	Não-me-Toque, RS	480	11	2,29 (1,24-4,00)*
SC-7	Chapecó, SC	480	11	2,29 (1,24-4,00)*
PR-75	Castro, PR	480	13	2,71-1,55-4,52)*
PR-76	Toledo, PR	480	18	3,75 (2,34-5,79)*
SP-27	Casa Branca, SP	480	23	4,79 (3,17- 7,03)*
MG-26	Araguari, MG	432	2	0,46 (0,10-1,67)
GO-45	Cristalina, GO	528	36	6,82 (4,92-9,24)*
GO-46	Rio Verde, GO	528	21	4,00 (2,57-5,95)*
BA-49	São Desidério, BA	480	61	12,71 (9,97-15,93)*
Total populações de campo		4848	199	4,10 (3,58-4,69)
2ª safra 2018				
PR-77	Campo Mourão	480	12	2,50 (1,39-4,26)*
PR-78	Cascavel	456	8	1,75 (0,85-3,37)*
PR-79	Sertanópolis	552	2	0,36 (0,08-1,31)
SP-28	Casa Branca	480	2	0,42 (0,09-1,50)
MS-27	Chapadão do Sul	504	45	8,92 (6,69-11,68)*
MS-28	Dourados	504	34	6,67 (4,82-9,22)*
MT-45	Lucas do Rio Verde	672	50	7,44 (5,65-9,63)*
MT-46	Sapezal	480	104	21,67 (18,17-25,53)*
MT-47	Campo Verde	480	22	4,58 (3,00-6,78)*
GO-47	Rio Verde	480	12	2,50 (1,39-4,26)*
Total populações de campo		5088	291	5,72 (5,11-6,39)

* Houve diferença estatística entre as sobrevivências da população de campo e a população suscetível de referência pela não sobreposição dos intervalos de confiança 95%.

No ano agrícola 2017, foi possível verificar que a suscetibilidade da população coletada em Luis Eduardo Magalhães, BA (1ª safra 2017) foi similar a observada na entressafra 2016-2017. Já nas populações coletadas em Goiás na 1ª safra 2017, houve uma significativa diferença de sobrevivência entre elas, onde foi observado que a população coletada em Rio Verde manteve os padrões de sobrevivência encontrados na entressafra 2016-2017, já a população de Cristalina apresentou uma maior sobrevivência, 10 % (7,57-12,95 % IC 95 %). Na 2ª safra de 2017, as populações coletadas em Mato Grosso e Mato grosso do Sul apresentaram um aumento significativo na suscetibilidade a flubendiamide, embora ainda diferindo da população Sus (Tabela 2.5 e Figura 2.6).

Na entressafra 2017-2018, novamente a população coletada na Bahia apresentou elevada sobrevivência, 16,83 % (14,01-20,00 % IC 95 %) e a população coletada em Rio Verde se manteve com aproximadamente 2 % de sobrevivência, as demais populações testadas se mostraram suscetíveis a flubendiamide. No ano agrícola 2018, a maioria das populações testadas diferiram da suscetível de referência, dentre elas as que apresentaram menor suscetibilidade a flubendiamide foram coletadas em São Desidério, BA (1ª safra 2018) e Sapezal, MT (2ª safra 2018), com sobrevivências de 12,71 % (9,97-15,93 % IC 95 %) e 21,67 (18,17-25,53 % IC 95 %) (Tabela 2.5 e Figura 2.6).

De modo geral, ao longo das safras avaliadas foi possível observar que a média de sobrevivência larval de *S. frugiperda* expostas a concentração diagnóstica de flubendiamide se manteve próxima aos 5 %, com exceção da 2ª safra 2016, quando foi verificado uma menor suscetibilidade a flubendiamide em praticamente todas as populações testadas (Figura 2.7).

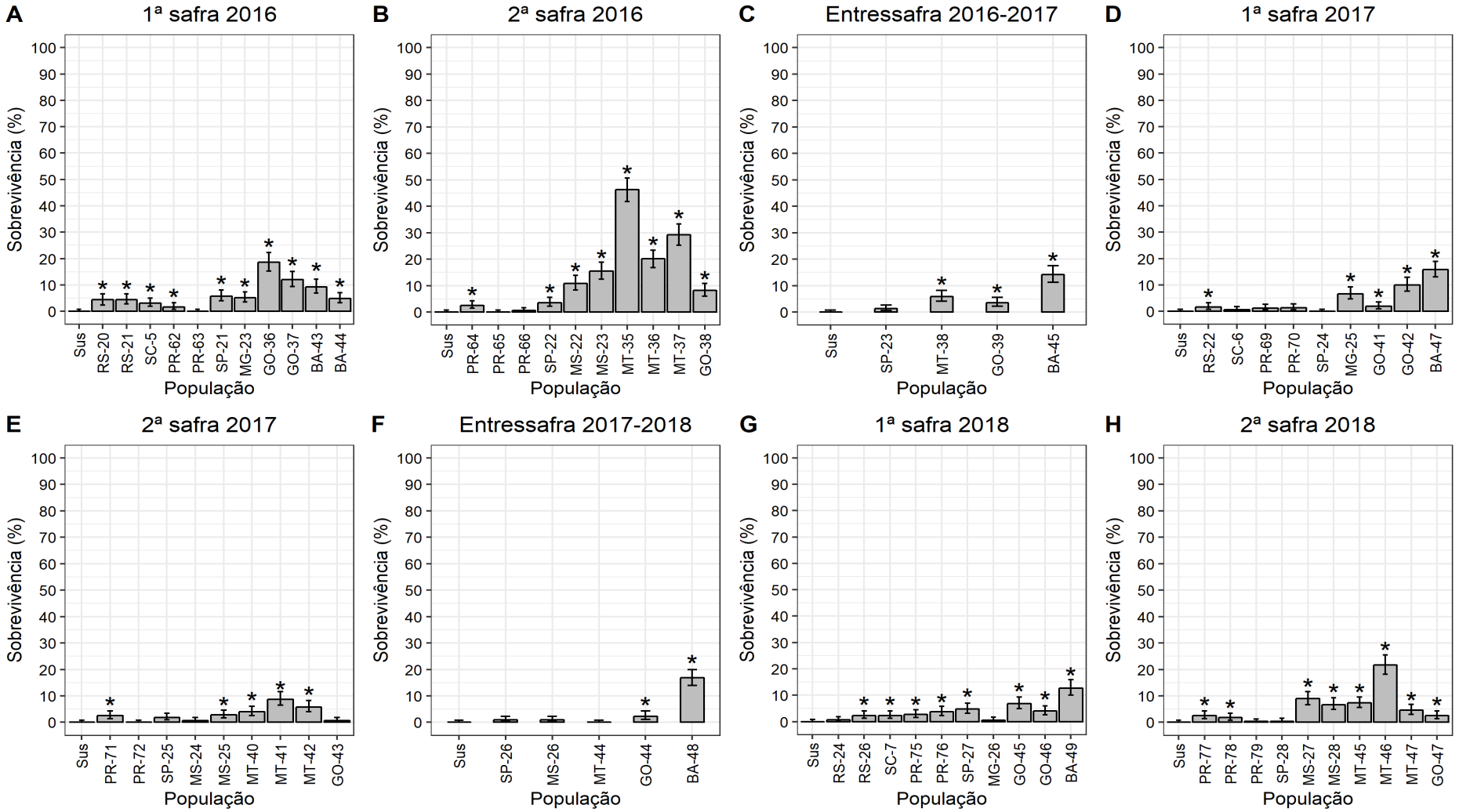

Figura 2.6. Monitoramento fenotípico da resistência a flubendiamide em populações brasileiras de *Spodoptera frugiperda*. A-1ª safra 2016; B-2ª safra 2016; C-Entressafra 2016-2017; D-1ª safra 2017; E-2ª safra 2017; F-Entressafra 2017-2018; G-1ª safra 2018; H-2ª safra 2018. *Houve diferença estatística entre a sobrevivência larval da população de campo e a população suscetível de referência pela não sobreposição dos intervalos de confiança 95%.

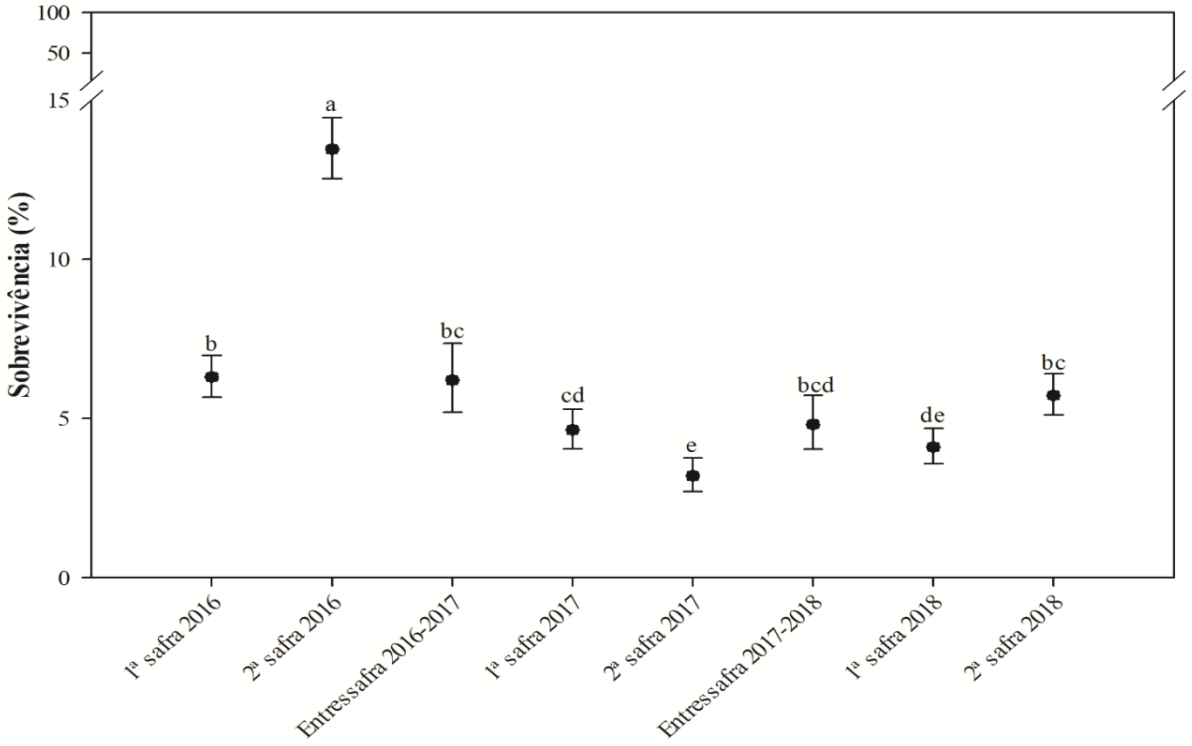

Figura 2.7. Avaliação temporal da suscetibilidade de *Spodoptera frugiperda* expostas a concentração diagnóstica de flubendiamide (2,842 µg i.a. cm^{-2}). Baseado na média de sobrevivência (%) de lagartas das populações de campo agrupadas de acordo com a safra de coleta. Houve diferença estatística quando não ocorreu sobreposição dos intervalos de confiança (95 %).

2.4. Discussão

No presente estudo, foi realizado o monitoramento da resistência a inseticidas diamidas em populações de *S. frugiperda* coletadas nas principais regiões produtoras de milho do Brasil. Utilizando a técnica do F_2 "screen", proposta por Andow; Alstad (1998), foi possível estimar que a frequência média do alelo que confere resistência a chlorantraniliprole entre os anos agrícolas 2016 e 2017 foi de 0,0217 (0,0170-0,0269 IC 95 %) (Tabela 2.3). Utilizando método de bioensaio semelhante, Ribeiro (2014) avaliou a frequência alélica de resistência a chlorantraniliprole em populações brasileiras de *S. frugiperda* nos anos agrícolas 2012, 2013 e 2014, encontrando as frequências de 0,0033 (0-0,0062 IC 95 %), 0,0134 (0,0082-0,0198 IC 95 %) e 0,0176 (0,0084-0,0277 IC 95 %), respectivamente. Embora no presente estudo tenham sido detectadas isolinhas positivas na maioria das populações avaliadas, foi possível verificar que a frequência de resistência a chlorantraniliprole foi maior nas populações coletadas no estado da Bahia, representando em todas as safras 50 % ou mais das isolinhas positivas (Tabela 2.3). Ribeiro (2014) também verificou uma maior frequência do alelo de resistência de *S. frugiperda* a chlorantraniliprole no estado da Bahia, porém além

deste estado somente foram encontradas isolinhas positivas no estado do Mato Grosso. O aumento da frequência de resistência ao longo das safras pode evidenciar a pressão de seleção exercida por este inseticida sobre *S. frugiperda*, principalmente no estado da Bahia.

A utilização de concentrações diagnósticas permite distinguir fenótipos resistentes de suscetíveis (Kranti, 2005). Ao realizar o monitoramento fenotípico, através do uso de concentrações diagnósticas previamente determinadas, foi possível observar uma menor suscetibilidade de *S. frugiperda* a flubendiamide quando comparado a chlorantraniliprole em todas as safras avaliadas. Entretanto o padrão de suscetibilidade a ambos os inseticidas se portou de maneira semelhante ao longo das safras. Como exemplo, na 1ª e 2ª safra de 2016 e entressafra 2016-2017, foram observadas as maiores sobrevivências de *S. frugiperda* para ambos os inseticidas, com destaque para a 2ª safra de 2016. Da mesma forma, na 2ª safra de 2017 foram observadas as menores sobrevivências de *S. frugiperda*. Este fator pode estar relacionado a resistência cruzada entre os inseticidas diamidas, no qual já foram reportadas em insetos como *Plutella xylostella* L. (Lepidoptera: Plutellidae) *e Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) (Wang et al., 2013; Roditakis et al., 2015; Silva et al., 2016). Neste caso, a suscetibilidade de *S. frugiperda* a chlorantraniliprole ou flubendiamide está diretamente relacionada à pressão de seleção exercida por ambos inseticidas.

No Brasil, após a liberação de cultivo de plantas de milho que expressam proteínas Bt, houve uma drástica redução no uso de inseticidas para o controle de lepidópteros na cultura, incluindo *S. frugiperda* (Brookes; Barfoot, 2018), porém em razão da alta adoção desta tecnologia, associada a um manejo inaquado, foram reportadas falhas no controle desta praga devido a evolução da resistência no campo para protéinas Bt (Cry1F e Cry1Ab) (Farias et al., 2014; Omoto et al., 2016), tornando novamente necessário um aumento no número aplicações de inseticidas para o controle desta praga (Burlet et al., 2017). Entretanto as opções para o manejo se tornam reduzidas a medida que já foram reportadas falhas de controle devido a evolução da resistência no campo para inseticidas piretroides e organofosforados (Carvalho et al., 2013). Os inseticidas diamidas compõe uma importante ferramenta para o manejo de *S. frugiperda* e também podem ser usados no manejo da resistência desta praga a outros grupos químicos. Porém o uso deste grupo deve ser efetuado de maneira apropriada, em associação com outras táticas de controle, pois embora comercializados a pouco tempo no Brasil, já existem casos de evolução da resistência à diamidas no campo para *P. xyllostella* e *T. absoluta* (Ribeiro et al., 2014; Silva et al., 2016), também há um caso de resistência de *H. armigera* selecionada em laboratório (Pereira, 2017).

Outro fator que pode ter afetado a suscetibilidade de *S. frugiperda* a inseticidas diamidas no Brasil foi a detecção e ampla disseminação da praga exótica *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae), causando um uso excessivo de inseticidas para seu controle (Pomari-Fernandes et al., 2015), por ocuparem o mesmo nicho ecológico e compartilharem plantas hospedeiras, este excesso de aplicações pode ter exposto *S. frugiperda* a inúmeras pressões de seleção. Essas condições podem estar associadas a menor suscetibilidade de *S. frugiperda* a inseticidas diamidas no ano agrícola 2016. Entretando, no cenário atual, com o aumento da utilização de proteínas inseticidas com alta eficácia contra *H. armigera* em soja (Dourado et al., 2016), e *S. frugiperda* em milho (Bernardi et al., 2015), existe uma tendência de redução dos níveis populacionais destas espécies nestas culturas, o que pode causar uma redução no número de aplicações de inseticidas e consequentemente interferir na suscetibilidade de *S. frugiperda* a diamidas.

Os resultados observados no monitoramento genotípico e fenotípico refletem as variações geográficas e temporais na suscetibilidade de *S. frugiperda* a inseticidas diamidas no Brasil. Ambos os métodos utilizados demonstram que em algumas regiões a necessidade de implementação de táticas para retardar a evolução da resistência são urgentes, principalmente nos estados de Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul e Bahia, sendo neste último onde foram verificadas as maiores frequências de resistência e também as maiores sobrevivências de *S. frugiperda*. Em comum entre estes locais estão as elevadas temperaturas ao longo do ano, com temperatura média anual em torno de 25 ºC e a possiblidade de cultivo de duas ou até três safras em um ano, de acordo com a disponibilidade de água para irrigação (CONAB, 2018, INMET, 2018, ANA, 2017).

O sistema de cultivo intensivo, com sobreposição geográfica e temporal de culturas hospedeiras proporciona a intensa exposição de *S. frugiperda* aos principais métodos de controle (inseticidas e plantas Bt), uma vez que estes métodos não são empregados exclusivamente para o seu controle, mas sim para todo um complexo de pragas. A intensa pressão de seleção, associada a fatores como frequência inicial do alelo de resistência, dominância dos fenótipos resistentes, custo adaptativo dos genótipos resistentes e o fluxo gênico entre as populações estão entre os principais fatores que afetam as taxas de evolução da resistência (Roush; Mckenzie, 1987). Sendo assim, em regiões onde os fatores abióticos favorecem o cultivo de maneira intensiva e as estratégias de manejo de resistência não são adequadas, não existe um período propício para o restabelecimento da suscetibilidade pela ausência de pressão de seleção, migração de indivíduos suscetíveis ou pelo custo adaptativo associado à resistência.

Diante dos resultados encontrados no monitoramento genotípico e fenotípico da resistência de *S. frugiperda* a inseticidas diamidas, é possível verificar que em algumas regiões do país as estratégias de manejo da resistência não estão sendo adequadas, refletindo em uma diminuição da suscetibilidade de *S. frugiperda* a chlorantraniliprole e flubendiamide. A adoção de estratégias efetivas de manejo da resistência é necessária com mais urgência nestas regiões, visto que falhas no controle podem ocorrer em breve em razão da evolução da resistência no campo. Além disso, a continuidade do monitoramento da resistência é fundamental para dar suporte e avaliar o impacto das estratégias de manejo adotadas.

2.5. Conclusões

- A frequência alélica de resistência a chlorantraniliprole varia de acordo com a região de coleta das populações de *S. frugiperda.*
- Populações de *S. frugiperda* coletadas na Bahia apresentam a maior frequência de alelos que conferem resistência a chlorantraniliprole.
- Populações de *S. frugiperda* coletadas nos estados de Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul e Bahia apresentam as maiores sobrevivências larvais quando expostas às concentrações diagnósticas de chlorantraniliprole e flubendiamide.

Referências

ANA, AgênciaNacional de Águas, Atlas irrigação: uso da água na agricultura irrigada (2017). http://arquivos.ana.gov.br/imprensa/publicacoes/AtlasIrrigacao-UsodaAguanaAgriculturaIrrigada.pdf [Acesso 9 de novembro de 2018].

Andow DA, The risk of resistance evolution in insects to transgenic insecticidal crops. *Collection of Biosafety Reviews* **4**:142-199 (2008).

Andow DA, Alstad DN, F_2 screen for rare resistance alleles. *J Econ Entomol* 91:572-578 (1998).

Bernardi O, Bernardi D, Ribeiro RS, Okuma DM, Salmeron E, Fatoretto J, Medeiros FCL, Burd T, Omoto C, Frequency of resistance to Vip3Aa20 toxin from *Bacillus thuringiensis* in *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) populations in Brazil. *Crop Prot* **76**:7-14 (2015).

Brookes G, Barfoot P, Environmental impacts of genetically modified (GM) crop use 1996-2016: Impacts on pesticide use and carbon emissions. *GM Crops Food* **9**:109-139 (2018).

Brugger KB, Cole PG, Newman IC, Parker N, Scholz B, Suvagia P, Walker G, Hammond TG, Selectivity of chlorantraniliprole to parasitoid wasps. *Pest Manag Sci* **66**:1075-1081 (2010).

Burlet LM, Bernardi O, Melo AA, Pes MP, Strahl TT, Guedes JV, Managing fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae), with Bt maize and insecticides in southern Brazil. *Pest Manag Sci* **73**:2567-2577 (2017).

Carvalho RA, Omoto C, Field LM, Williansom MS, Bass C, Investigating the molecular mechanism of organophosphate and pyrethroid resistance in the fall armyworm *Spodoptera frugiperda*. *PloS ONE* **8**:1-11 (2013).

Casmuz A, Juárez ML, Socías MG, Murúa MG, Prieto S, Medina S, Willink E, Gastaminza G, Revisión de los hospederos del gusano cogollero del maíz, *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *Rev Soc Entomol Argent* **69**:209-231 (2010).

CONAB, Companhia Nacional de Abastecimento, Acompanhamento da safra brasileira: Grãos, safra 2018/2019, **6**:1-142, novembro 2018.

Cordova D, Benner EA, Sacher MD, Rauh JJ, Sopa JS, Lahm GP, Selby TP, Stevenson TM, Flexner L, Gutteridge S, Rhoades DF, Wu L, Smith RM, Tao Y, Anthranilic diamides: A new class of insecticides with a novel mode of action, ryanodine receptor activation. *Pestic Biochem Physiol* **84:**196-214 (2006).

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

Cruz I, Santos JP, Waquil JM, Principais pragas da cultura de milho. In. *Recomendações técnicas para a cultura do milho*, (Circular técnica, 6). EMBRAPA CNPMS, Sete Lagoas, MG, pp. 45-60 (1982).

Dourado PM, Bacalhau FB, Amado D, Carvalho RA, Martinelli S, Head GP, Omoto C, High susceptibility to Cry1Ac na low resistance allele frequency reduce the risk of resistance of *Helicoverpa armigera* to Bt soybean in Brazil. *PLoS ONE* **11**:e0161388 (2016).

Farias JR, Andow DA, Horikoshi RJ, Sorgatto RJ, Fresia P, Santos AC, Omoto C, Field-evolved resistance to Cry1F maize by *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in Brazil. *Crop Prot* **64**:150-158 (2014).

Goergen G, Kumar PL, Sankung SB, Togola A, Tamò M, Fisrt report of outbreaks of the fall armyworm *Spodoptera frugiperda* (J E Smith) (Lepidoptera, Noctuidae), a new alien invasive pest in west and central Africa. *PLoS ONE* **11**:1-9 (2016).

INMET, Instituto Nacional de Meteorologia, Normal Climatológica do Brasil 1981-2010, temperatura média compensada. http://www.inmet.gov.br/portal/index.php?r=clima/normaisClimatologicas [acesso 9 de novembro de 2018].

Kasten Jr. P, Precetti AACM, Parra JRP, Dados biológicos comparativos de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) em duas dietas artificiais e substrato natural. *Rev Agric* **53**:69-78 (1978).

Kranthi KR, Insecticide Resistance – Monitoring, Mechanisms and Management Manual Central. Institute for Cotton Research. CICR, Nagpur, India, ICAC, Washington, p. 155 (2005).

Lahm GP, Cordova D, Barry JD, New and selective ryanodine receptor activators for insect control. *Bioorg Med Chem* **17**:4127-4133 (2009).

Lümmen P, Calcium channels as molecular target sites of novel insecticides, in *Advances in Insect Physiology*, vol. 44, ed. Cohen E, Academic Press, London, UK, pp. 287-347 (2013).

MAPA, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Registros concedidos entre 2005-2018. Disponível para download em: http://www.agricultura.gov.br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-agricolas/agrotoxicos/informacoes-tecnicas [acesso 16 de setembro 2018].

Nascimento RB, Farias JR, Bernardi D, Horikoshi RJ, Omoto C, Genetic basis of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) resistance to the chitin synthesis inhibitor lufenuron. *Pest Manag Sci* **72**:810-815 (2016).

Nauen R, Slater R, Sparks TC, Elbert A, Mccaffery A, IRAC: Insecticide resistance and mode-of-action classification of insecticides, in *Modern Crop Protection Compounds*, ed. Jeschke P, Witschel M, Krämer W, Schirmer U. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Alemanha, pp. 995-1012 (2019).

Okuma DM, Bernardi D, Horikoshi RJ, Bernardi O, Silva AP, Omoto C, Inheritance and fitness cost of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) resistance to spinosad in Brasil. *Pest Manag Sci* **74**:1441-1448 (2018).

Omoto C, Bernardi O, Salmeron E, Sorgatto RJ, Dourado PM, Crivellari A, Carvalho RA, Willse A, Martinelli S, Head GP, Field-evolved resistance to Cry1Ab maize by *Spodoptera frugiperda* in Brazil. *Pest Manag Sci* **72:**1727-1736 (2016).

Pereira RM, *Caracterização da suscetibilidade a inseticidas diamidas e espinosinas em populações de* Helicoverpa armigera *(Lepidoptera: Noctuidae) do Brasil.* Tese de doutorado, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil (2017).

Pomari-Fernandes A, Bueno AF, Sosa-Gómez DR, *Helicoverpa armigera*: current status and future perspectives in Brazil. *Curr. Agric Sci Tech* **21**:1-7 (2015).

R Development Core Team, *R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing.* Vienna, Austria, (2017).

Ribeiro LMS, Wanderley-Teixeira V, Ferreira HN, Teixeira ÁAC, Siqueira HAA, Fitness costs associated with field-evolved resistance to chlorantraniliprole in *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae). *Bull Entomol Res* **104**:88-96 (2014).

Ribeiro RS. *Monitoramento da sucetibilidade de populações de* Spodoptera frugiperda *(J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) a inseticidas diamidas no Brasil*. Dissertação de mestrado, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil (2014). http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/11/11146/tde-11112014-153823/pt-br.php [acesso 07 de outubro de 2018].

Roditakis E, Vasakis E, Grispou M, Stavrakaki M, Nauen R, Gravouil M, Bassi A, First report of *Tuta absoluta* resistance to diamide insecticides. *J Pest Sci* **88**:9-16 (2015).

Roush RT, Miller GL, Considerations for design of insecticide resistance monitoring programs. *J Econ Entomol* **79**:293-298 (1986).

Roush RT, McKenzie JA, Ecological genetics of insecticide and acaricide resistance. *Ann Rev Entomol* **32**:361-380 (1987).

Sattelle D, Cordova D, Cheerk TR, Insect ryanodine receptors: molecular targets for novel pest control chemicals. *Invertebr Neurosci* **8**:107-119 (2008).

Sharanabasappa C, Kalleshwaraswamy CM, Asokan R, Mahadeva Swamv HM, Marutid MS, Pavithra HB, Kavita H, Navi S, Prabhu ST, Goergen G, First report of the Fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (J E Smith) (Lepidoptera: Noctuidae), an alien invasive pest on maize in India. *Pest Manage Hortic Ecosyst* **24**:23-29 (2018).

Silva JE, Assis CPO, Ribeiro LMS, Siqueira HAA, Field-evolved resistance and cross-resistance of Brazilian *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae) populations to diamide insecticides. *J Econ Entomol* **109**:2190-2195 (2016).

Stecca CS, Silva DB, Bueno AF, Pasini A, Denez MD, Andrade K, Selectivity of insecticides used in soybean crop to the predator *Podisus nigrispinus* (Hemiptera: Pentatomidae). *Semina: Ciênc Agrár* **38**:3469-3480 (2017).

Tabashinik BE, Croft BA, Managing pesticide resistance in crop-arthropod complexes: Interactions between biological and operational factors. *Environ Entomol* **11**:1197-1144 (1982).

Tohnishi M, Nakao H, Furuya T, Seo A, Kodama H, Tsubata K, Fujioka S, Kodama H, Hirooka T, Nishimatsu T, Flubendiamide, a novel insecticide highly active against lepidopterous insect 735 pests. *J Pestic Sci* **30**:354-360 (2005).

Wang X, Khakame SK, Ye C, Yang Y, Wu Y, Characterisation of field-evolved resistance to chlorantraniliprole in the diamondback moth, *Plutella xylostella*, from China. *Pest Manag Sci* **69**:661-665 (2013).

3. SELEÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA HERANÇA DA RESISTÊNCIA DE *Spodoptera frugiperda* (J. E. SMITH) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE) A CHLORANTRANILIPROLE E RESISTÊNCIA CRUZADA A INSETICIDAS DIAMIDAS

Resumo

O entendimento das bases genéticas associadas à resistência pode auxiliar na implementação de estratégias de manejo da resistência a inseticidas (MRI). Neste estudo nós selecionamos e caracterizamos a herança da resistência de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) ao inseticida chlorantraniliprole, e a resistência cruzada com os demais inseticidas diamidas. Os valores de CL_{50} das linhagens suscetível (Sus) e resistente a chlorantraniliprole (Chlorant-R) foram 0,011 e 2,610 µg i.a.cm^{-2}, respectivamente, resultando em uma razão de resistência de 237,4 vezes. Os valores de CL_{50} dos cruzamentos recíprocos foram de 0,155 µg i.a. cm^{-2} e 0,164 µg i.a. cm^{-2} indicando que a resistência é autossômica. A herança da resistência foi incompletamente recessiva em concentrações próximas a concentrações recomendadas de chlorantraniliprole. Em plantas tratadas com a concentração de campo de chlorantraniliprole ocorreu 60% de sobrevivência de lagartas da linhagem Chlorant-R e 15% de sobrevivência de lagartas da linhagem heterozigota. A linhagem resistente a chlorantraniliprole apresentou moderada resistência cruzada para cyantraniliprole (RR ≈ 27 vezes) e muito alta para flubendiamide (RR > 42000 vezes). O padrão de herança da resistência de *S. frugiperda* a chlrontraniliprole foi caracterizada como autossômica, incompletamente recessiva e monogênica. Foi verificada a ocorrência de resistência cruzada entre inseticidas diamidas. Estes resultados fornecem informações essenciais para a implementação de programas de manejo de resistência paara preservar a vida útil de inseticidas diamidas para o controle de *S. frugiperda* no Brasil.

Palavras-chave: Cyantraniliprole; Flubendiamide; Herança da resistência; Lagarta-do-cartucho do milho; Manejo da resistência a inseticidas

Abstract

Understanding the genetic basis of insect resistance to insecticides can help to implement Insecticide Resistance Management (IRM) strategies. In this study, the resistance of *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) to chlorantraniliprole was selected and characterized, and the occurrence of cross-resistance between the remaining diamide insecticides was evaluated. The estimated LC_{50} values were 0.011 and 2.610 µg a.i. cm^{-2} for the susceptible (Sus) and chlorantraniliprole resistant (Chlorant-R) strains, respectively, resulting in a resistance ratio (RR) of 237-fold. The LC_{50} values of the reciprocal crosses were 0.155 µg a.i. cm^{-2} and 0.164 µg a.i. cm^{-2}, indicating that the resistance assumes autosomal inheritance. Resistance was characterized as incompletely recessive and monogenic at concentrations close to the recommended field rate of chlorantraniliprole. Survival of the resistant-strain and heterozygous larvae in maize plants treated at the field rate was 60 and 15% respectively. The Chlorant-R strain showed moderate cross-resistance to cyantraniliprole (RR ≈ 27-fold) and very high cross-resistance to flubendiamide (RR > 42,000-fold). The inheritance of chlorantraniliprole resistance was characterized as autosomal, incompletely recessive and monogenic. *S. frugiperda* showed cross-resistance to other diamide insecticides. These results

provide essential information for the implementation of IRM programs to preserve the useful life of diamide insecticides for controlling *S. frugiperda* in Brazil.

Keywords: Cyantraniliprole; Fall armyworm; Flubendiamide; Resistance inheritance; Resistance management

*Este capítulo foi publicado na revista Pest Management Science. Referência: **Bolzan A,** Padovez FEO, Nascimento ARN, Kaiser IS, Lira EC, Amaral FSA, Kanno RH, Malaquias JB, Omoto C. Selection and characterization of the inheritance of resistance of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) to chlorantraniliprole and cross-resistance to other diamide insecticides. *Pest Manag Sci.* DOI: 10.1002/ps.5376

3.1. Introdução

Inseticidas do grupo das diamidas foram lançados no mercado a pouco mais de uma década, demostrando grande eficiência no controle de diversos insetos-praga. Estes inseticidas possuem modo de ação inovador, atuando como moduladores dos receptores de rianodina (RyR) localizados na membrana do retículo sarcoplasmático de tecido musculares. Estes canais tem a função de liberar rapidamente o Ca^{2+} dos estoques intracelulares, processo necessário para a contração muscular. Os inseticidas diamidas atuam induzindo a liberação de Ca^{2+}, independente da concentração deste íon no citosol. Esta liberação desordenada resulta em paralisia irreversível em razão da contração muscular e consequentemente cessação de alimentação, levando o inseto à morte (Nauen, 2006; Cordova et al., 2006; Cordova et al 2007; Sattelle et al 2008; IRAC, 2017).

Existem três inseticidas diamidas comercializados, a diamida do ácido ftálico (flubendiamide) e as diamidas antranílicas (chlorantraniliprole e cyantraniliprole) (Tohnishi et al., 2005; Lahm et al., 2007; Lahm et al., 2009). Devido a fatores como, grande eficiência contra pragas-alvo, baixa toxicidade a mamíferos e insetos benéficos e a ausência de resistência cruzada com inseticidas de outros grupos químicos, os inseticidas diamidas foram adotados por inúmeros produtores, representando atualmente aproximadamente 10% das vendas globais de inseticidas (Tohnishi et al., 2005; Lahm et al., 2005; Ebbinghaus-Kintscher et al., 2006; Lahm et al., 2009; Larson et al., 2012; Nauen et al., 2019). Embora este seja um novo grupo de inseticidas, já existem relatos de evolução da resistência no campo ou resistência selecionada em laboratório em 12 espécies de insetos (APRD, 2019).

Spodoptera frugiperda (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae), conhecida como lagarta-do-cartucho do milho, é nativa do continente americano, tendo sua presença relatada desde o norte da Argentina até o sul do Canadá (Sparks, 1979). Recentemente *S. frugiperda* foi reconhecida como espécie invasiva em países do oeste e centro do continente africano (Goergen et al., 2016), com potencial de colonizar maior parte da África tropical devido sua capacidade reprodutiva e migratória, ausência de diapausa e ampla gama de hospedeiros (Johnson, 1987; Pogue, 2002; Capinera, 2002; Goergen et al., 2016). Apesar de ser uma espécie polífaga, *S. frugiperda* tem como principal hospedeiro o milho (*Zea mays* L.), sendo considerada uma das principais pragas que atacam a cultura, podendo comprometer a produção em até 54 % (Figueiredo et al., 2006).

O controle químico tem sido uma das principais estratégias de manejo de *S. frugiperda* contribuindo para a evolução da resistência aos principais grupos químicos, incluindo piretroides (lambda-cyhalothrin), carbamatos (carbaryl), organofosforados (clorpyriphos), benzoilureias (lufenuron) e espinosinas (spinosad) (Brattsten et al., 1986; Yu, 1991, 1992: Yu; Nguyen, 1994; Diez-Rodriguez; Omoto, 2001; Morillo; Notz, 2001; Yu et al., 2003; Carvalho et al., 2013; Nascimento et al., 2016; Okuma et al., 2017). Além destes, devido à alta adoção de plantas transgênicas que expressam proteínas de *Bacillus thuringiensis* Berliner, já existem casos de resistência de *S. frugiperda* a tecnologias Bt no Brasil (Farias et al., 2014; Omoto et al; 2016; CÉLERES, 2017). Neste cenário, os inseticidas diamidas são utilizados com frequência para conter falhas no controle *S. frugiperda* em cultivos de milho Bt no Brasil, sendo um importante componente em programas de manejo desta praga.

Os fatores genéticos têm grande influência na evolução da resistência, uma vez que a herança da resistência é um fator determinante na taxa de aumento da frequência de resistência nas próximas gerações. Dentre os principais fatores genéticos estão a frequência inicial do alelo, o número de genes envolvidos e o grau de dominância da resistência. A resistência cruzada também influencia a evolução da resistência devido à pressão de seleção já exercida por outros inseticidas (Georghiou; Taylor, 1977). Estudos de caracterização e determinação das bases genéticas associadas a resistência a inseticidas são fundamentais para a compreensão da evolução da resistência no campo e o para o estabelecimento de estratégias pró ativas de manejo da resistência de insetos (MRI) (Roush; Mckenzie, 1987). Desta forma, o objetivo deste estudo foi selecionar em laboratório uma linhagem de *S. frugiperda* resistente a inseticidas diamidas, além de demonstrar as bases genéticas da resistência de *S. frugiperda* a chlorantraniliprole e as relações de resistência cruzada entre inseticidas diamidas.

3.2. Material e métodos

3.2.1. Obtenção e criação das linhagens

A linhagem resistente a chlorantraniliprole (Chlorant-R) foi selecionada a partir de insetos coletados em milho no município de Correntina, BA, Brasil (13º39’05” S e 45º40’50” W), no ano agrícola 2016. A linhagem suscetível de referência (Sus) foi obtida junto a Embrapa Milho e Sorgo (Sete Lagoas, MG, Brasil) no ano de 1996, e mantida em laboratório sem pressão de seleção por inseticidas ou proteínas Bt.

As lagartas foram criadas em dieta artificial a base de germe de trigo, levedura de cerveja, proteína de soja e caseína (Kasten Jr et al., 1978). Ao atingirem a fase de pupa, estas foram desinfetadas com solução de sulfato de cobre 6,5 % e posteriormente acondicionadas em bandejas plásticas (48 × 33 cm) forradas com papel filtro umedecido, cada pupa foi individualizada com um copo plástico (50 mL) invertido. Após a emergência dos adultos, estes foram transferidos para gaiolas de PVC (10 cm de diâmetro x 20 cm de altura) revestidas com folha de papel utilizado como substrato de oviposição. Os adultos foram alimentados com solução de mel e água 1:10. As posturas foram retiradas a cada dois dias e acondicionadas em copos plásticos (100 mL) até a eclosão das lagartas. Os insetos foram mantidos em sala climatizada (25 ± 1 °C, 70 ± 10 % umidade relativa e 14:10 h (L:E) fotoperíodo) em todas as fases de desenvolvimento.

3.2.2. Seleção da linhagem de *S. frugiperda* resistente a chlorantraniliprole

Para a seleção da linhagem resistente a chlorantraniliprole (Chlorant-R) foi utilizada a técnica do F_2 “screen” (Andow; Alstad, 1998). Para isso, pupas da população coletada no município de Correntina, BA, Brasil foram individualizadas em copos plásticos (50 mL) colocados sobre papel filtro umedecido para a manutenção da umidade. Após a emergência dos adultos, foram formados 50 casais (isolinhas). As lagartas provenientes de cada isolinha (geração F_1) foram mantidas em três placas de 32 compartimentos (Advento do Brasil, São Paulo, Brasil) contendo dieta artificial, totalizando 96 lagartas por isolinha. Ao emergirem, os adultos provindos de cada isolinha foram alocados em gaiolas de PVC (10 cm de diâmetro x 20 cm de altura) revestidas com folha de papel. As progênies oriundas dos acasalamentos na linhagem F_1 foram transferidas para copos plásticos de 100 mL contendo dieta artificial.

O método de bioensaio utilizado foi o de ingestão com contaminação superficial da dieta com inseticida. Foram utilizadas placas de acrílico de 24 células (Costar® Corning

Incorporated, Corning, NY, USA), contendo 1,25 mL de dieta artificial por célula. Foram aplicados 30 µL de solução de inseticida com uma concentração de 0,505 µg de chlorantraniliprole cm^{-2} (Premio® SC 200 g i.a. L^{-1}, DuPont do Brasil S.A., Barueri, SP, Brasil) proposta por Ribeiro (2014) diluída em água destilada e surfactante (Triton® X-100, Labsynth, Diadema, SP, Brazil) na concentração de 0,1 %, após a secagem da superfície da dieta, foram infestadas uma lagarta por célula. Foram testadas 120 lagartas por isolinha, e após a inoculação, estas foram mantidas em câmera climatizada (25 ± 1°C, 70 ± 10 % umidade relativa e 14:10 h (L:E) fotoperíodo). A mortalidade foi avaliada 96 h após a infestação, e as lagartas que não apresentavam movimentos coordenados ao toque de um pincel foram consideradas mortas.

As lagartas sobreviventes constituíram a linhagem resistente a chlorantraniliprole Chlorant-R, sendo mantida em laboratório sob constante pressão de seleção (1,579 µg de chlorantraniliprole cm^{-2}), os bioensaios de caracterização iniciaram após mais duas gerações sob pressão de seleção.

3.2.3. Caracterização da resistência de *S. frugiperda* a chlorantraniliprole

Para a caracterização da resistência, lagartas de 3º ínstar das linhagens Sus e Chlorant-R foram submetidas a bioensaios de concentração-resposta, utilizado o método de bioensaio de ingestão, especificado detalhadamente no item 3.2.2. As lagartas da linhagem Sus foram expostas a 7 concentrações de chlorantraniliprole (entre 0,002-0,051 µg i.a. cm^{-2}) e as lagartas da linhagem Chlrorant-R foram expostas a 6 concentrações (entre 0,505-8,842 µg i.a. cm^{-2}), no tratamento controle para ambas as linhagens foram aplicados apenas água e surfactante. Foram testadas de 3 a 4 repetições de aproximadamente 24 lagartas por concentração.

Os dados de mortalidade foram submetidos à análise Probit (Finney, 1971), utilizando o programa Polo-Plus (LeOra Software, 2002). Foram estimadas a concentração que mata 50 % (CL_{50}), seus respectivos intervalos de confiança (IC 95 %) e valores de coeficiente angular para ambas as linhagens. Também foram realizados testes de paralelismo e igualdade ($P < 0,05$) para comparar os coeficientes angular e linear obtidos para as retas de regressão estabelecidas para cada linhagem (Robertson et al., 2007).

3.2.4. Herança da resistência

3.2.4.1. Dominância da resistência

Para estimar o grau de dominância da resistência de *S. frugiperda* a chrorantranilpole, foram realizados cruzamentos recíprocos entre adultos das linhagens Sus e Chlorant-R (H1 = ♀ Chlorant-R × ♂ Sus e H2 = ♀ Sus × ♂ Chlorant-R). Foram transferidos 20 casais de cada cruzamento recíproco para uma gaiola de PVC (10 cm de diâmetro x 20 cm de altura), onde ocorreu o acasalamento e oviposição. Ao alcançarem o 3º ínstar, as lagartas progênies destes cruzamentos (linhagens heterozigotas) foram submetidas a bioensaios concentração-resposta. O método de bioensaio utilizado foi o mesmo mencionado no item 3.2.2 e para a determinação da CL_{50} de cada linhagem heterozigota, os dados de mortalidade foram submetidos à análise Probit (Finney, 1971). A dominância da resistência (D) foi estimada para cada concentração testada através do método de Bourguet et al. (2000) [equação 1].

$$D_{ML} = \frac{M_{RS} - M_{SS}}{M_{RR} - M_{SS}} \qquad [1]$$

Sendo M_{RR}, M_{SS} e M_{RS} as mortalidades das linhagens resistente, suscetível e heterozigoto nas diferentes concentrações testadas, respectivamente. Valores de D = 0 representam herança completamente recessiva, valores D = 1 representam herança completamente dominante, valores intermediários representam herança incompleta.

O grau de dominância também foi analisado pelo método de Stone (1968) [equação 2].

$$D = \frac{2X_F - X_R - X_S}{X_R - X_S} \quad [2]$$

Onde X_F, X_R e X_S representam log10 CL_{50} dos heterozigotos F_1, Chlorant-R e Sus, respectivamente. $D = 1$ herança completamente dominante, $0 < D < 1$ herança incompletamente dominante, $-1 < D < 0$ herança incompletamente recessiva, e $D = -1$ herança completamente recessiva.

3.2.4.2. Número de genes associados a resistência

Para estimar o número de genes associados a resistência de *S. frugiperda* a chlorantraniliprole foram utilizadas metodologias descritas por Tsukamoto (1983) e Roush; Daly (1990). Para isto foram individualizadas pupas das linhagens heterozigotas provenientes dos cruzamentos recíprocos e pupas da linhagem Chlorant-R. Após a emergência dos adultos, foram realizados os retrocruzamentos entre as linhagens heterozigotas e a linhagem resistente Chlorant-R (20 casais por retrocruzamento), formando ao total 4 retrocruzamentos (♀

Chlorant-R × ♂ H1; ♂ Chlorant-R × ♀ H1; ♀ Chlorant-R × ♂ H2; ♂ Chlorant-R × ♀ H2) que foram mantidos em gaiolas de PVC (10 cm de diâmetro x 20 cm de altura) para o acasalamento e oviposição. Ao alcançarem o 3º ínstar, as lagartas progênies destes retrocruzamentos foram submetidas a bioensaios concentração-resposta, utilizando o mesmo método de bioensaio e as mesmas concentrações de chlorantraniliprole que as linhagens heterozigotas foram expostas. Com os dados de mortalidade obtidos, foi possível avaliar a hipótese de herança monogênica a partir do teste qui-quadrado [equação 3] (Sokal; Rohlf, 1995).

$$\chi^2 = \frac{(Ni - \hat{p}ni)^2}{\hat{p}\hat{q}ni} \qquad [3]$$

A variável Ni representa a mortalidade observada da progênie do retrocruzamento na concentração i, $\hat{p}$ representa a proporção esperada de mortalidade calculada a partir do modelo mendeliano [equação 4] (Georghiou, 1969), ni número de indivíduos testados da progênie do retrocruzamento na concentração i e $\hat{q}$ representa a proporção esperada de sobrevivência ou $\hat{q} = 1 - \hat{p}$.

$$p = \frac{a+b}{2} \qquad [4]$$

Onde a representa a mortalidade da linhagem parental usada e b representa a mortalidade da linhagem heterozigota, ambas em uma determinada concentração. A hipótese de herança monogênica foi rejeitada quando o $\chi^2_{\text{calculado}} \geq \chi^2_{\text{tabelado}}$ a 1 grau de liberdade ($P < 0,05$). Também foi estimado o número de loci associado a resistência pelo método de Lande (1981) [equação 5].

$$n_E = \frac{(X_{RR} - X_{SS})^2}{8\sigma_s^2} \qquad [5]$$

Onde que, X_{RR} e X_{SS} correspondem ao $\log_{10}$ das CL_{50} das linhagens Chlorant-R e Suscetível respectivamente, $\sigma_s^2 = \sigma_{B1}^2 + \sigma_{B2}^2 - [\sigma_{F1}^2 + 0,5\sigma_{RR}^2 + 0,5\sigma_{SS}^2]$, σ_{B1}^2 e σ_{B2}^2 correspondem as variações fenotípicas dos retrocruzamentos 1 e 2, e σ_{F1}^2, σ_{RR}^2 e σ_{SS}^2 correspondem as variações fenotípicas das linhagens heterozigota F_1, resistente e suscetível, estimadas pelo inverso do coeficiente angular ao quadrado.

3.2.5. Sobrevivência em plantas de milho

Para este estudo, milho convencional (DKB 390®) foi semeado em vasos plásticos de 3 litros mantidos em casa de vegetação. Ao atingirem o estádio fenológio V_3, as plantas foram

pulverizadas com a concentração de campo recomendada para a cultura do milho de 0,250 µg de chlorantraniliprole cm^{-2}. No tratamento controle as plantas foram pulverizadas com água destilada. Após a secagem as plantas foram infestadas com lagartas provenientes de das linhagens Sus, heterozigotos H1 e Chlorant-R na densidade de uma lagarta por planta. As plantas foram acondicionadas no interior de tubos plásticos transparentes (14 cm de diâmetro x 33 cm de altura), tendo a parte superior vedada por um tecido *"voil"*. Foram utilizadas 200 lagartas por linhagem (100 em plantas tratadas e 100 em plantas não tratadas), cada lagarta representando uma repetição. A sobrevivência foi avaliada após 96 h do momento da infestação.

Para a análise dos dados, um modelo linear generalizado com distribuição binomial foi ajustado aos dados de sobrevivência larval. Para verificar o ajuste do modelo aos dados foi utilizado o gráfico de probabilidade meio-normal com envelope simulado (Demétrio et al., 2014). Para avaliar se ocorreu significância de interação entre os fatores (plantas tratadas ou não tratadas x linhagens de *S. frugiperda*) foi realizada uma análise de desvio (P = 0,05). Todas as análises acima descritas foram realizadas utilizando o programa R 3.4.1 (R Development Core Team, 2017). As médias foram comparadas pela sobreposição dos intervalos de confiança (95 %), que foram obtidos utilizando o procedimento PROC GENMOD (link function = logit) no SAS 9.2 (SAS Institute, 2010).

3.2.6. Resistência cruzada de *S. frugiperda* a inseticidas diamidas

Para avaliar a resistência cruzada da linhagem resistente (Chloran-R), utilizou-se o mesmo método de bioensaio exemplificado no item 3.2.3. Lagartas de 3º ínstar provenientes da linhagem Sus e Chlorant-R foram utilizadas em bioensaios concentração-resposta para os inseticidas cyantraniliprole (Benevia® OD 100 g i.a. L^{-1}, DuPont do Brasil S.A., Barueri, SP, Brasil) e flubendiamide (Belt® SC 480 g i.a. L^{-1}, Bayer S.A., São Paulo, SP Brasil). A linhagem Sus foi exposta a 6 concentrações de Cyantraniliprole (entre 0,016-5,053 µg i.a. cm^{-2}), mesmo número de concentrações que a linhagem Chlorant-R (entre 0,505-8,842 µg i.a. cm^{-2}). Para flubendiamide, a linhagem Sus foi exposta a 7 concentrações (entre 0,005-0,158 µg i.a. cm^{-2}), já a linhagem Chlrorant-R foi submetida a 10 concentrações (entre 15,789-2842,105 µg i.a. cm^{-2}). Foram testadas de 4 a 6 repetições de aproximadamente 24 lagartas por concentração.

Os dados de mortalidade foram submetidos à análise Probit (Finney, 1971), no qual se estimou a concentração que mata 50 % (CL_{50}) dos indivíduos, seus respectivos intervalos de

confiança (IC 95%) e valores de coeficiente angular para ambas as linhagens. Também foram realizados testes de paralelismo e igualdade ($P < 0,05$) para comparar os coeficientes angular e linear obtidos para cada linhagem (Robertson et al., 2007).

3.3. Resultados

3.3.1. Caracterização da resistência de *S. frugiperda* a chlorantraniliprole

Foram testadas 36 isolinhas utilizando da técnica do F_2 "screen", e as lagartas sobreviventes que compuseram inicialmente a linhagem resistente foram oriundas de 19 isolinhas. Ao comparar os valores de CL_{50} das linhagens Sus e Chlorant-R, foi possível verificar que a linhagem selecionada apresentou razão de resistência de aproximadamente 240 vezes para chlorantraniliprole, diferindo da linhagem Sus pelo teste de igualdade ($\chi^2 = 594$; gl = 2; $P < 0,001$), e não diferindo pelo teste de paralelismo ($\chi^2 = 1,74$; gl = 1; $P = 0,187$) (Tabela 3.1).

Tabela 3.1. Concentração-resposta das linhagens suscetível (Sus), resistente (Chlorant-R) e progênies F_1 dos cruzamentos recíprocos de *Spodoptera frugiperda* ao inseticida clorantraniliprole.

Linhagem	n	Coef. Ang. (± EP)	CL_{50} (IC 95%) (µg i.a. cm^{-2})	χ^2	gl[a]	RR[b]
Sus	696	3,07 (± 0,21)	0,011 (0,009-0,013)	6,05	5	-
Chlorant-R	667	2,66 (±0,23)	2,610 (2,318-2,978)	1,93	3	237,3
♀Chlorant-R × ♂Sus	617	2,92 (±0,22)	0,155 (0,121-0,199)	9,42	4	14,1
♀Sus × ♂Chlorant-R	667	2,78 (±0,19)	0,164 (0,134-0,199)	6,47	4	14,9

[a] Graus de liberdade (gl).
[b] Razão de resistência (RR) = CL_{50} da linhagem testada/CL_{50} da linhagem suscetível.

3.3.2. Herança da resistência

Ao realizar bioensaios concentração-resposta com as progênies (F_1) dos cruzamentos recíprocos H1 e H2, foi possível observar valores de CL_{50} semelhantes entre as linhagens heterozigotas, havendo sobreposição dos intervalos de confiança (tabela 3.1). Da mesma forma, as linhagens com genótipo heterozigoto não diferiram entre si pelo teste de igualdade ($\chi^2 = 0,75$; gl = 2; $P = 0,686$) e paralelismo ($\chi^2 = 0,22$; gl = 1; $P = 0,638$). Sendo assim, estes resultados indicam que os genes relacionados a resistência de *S. frugiperda* estão localizados em cromossomos autossômicos, não possuindo origem mitocondrial ou sexual.

3.3.2.1. Dominância da resistência

Ao analisar o grau de dominância pelo método de Bourguet et al. (2000), que determina o grau de dominância em relação a concentração testada, é possível observar que os valores da dominância diminuíram a medida em que as concentrações de chlorantraniliprole se elevaram. Apesar de apresentar um grau de dominância maior em concentrações menores, nas concentrações próximas a concentração de campo recomendada para a cultura do milho (0,250 µg de chlorantraniliprole cm^{-2} / 125 mL ha^{-1} Premio® SC 200 g i.a. L^{-1}) o grau de dominância foi menor que 0,5, o que indica uma herança incompletamente recessiva (Figura 3.1). Os graus de dominância estimados pelo método de Stone (1968) foram -0,033 e -0,012 para os cruzamentos ♀ Chlorant-R × ♂ Sus e ♀ Sus × ♂ Chlorant-R, respectivamente, indicando que a resistência a chlorantraniliprole apresentou traço incompletamente recessivo.

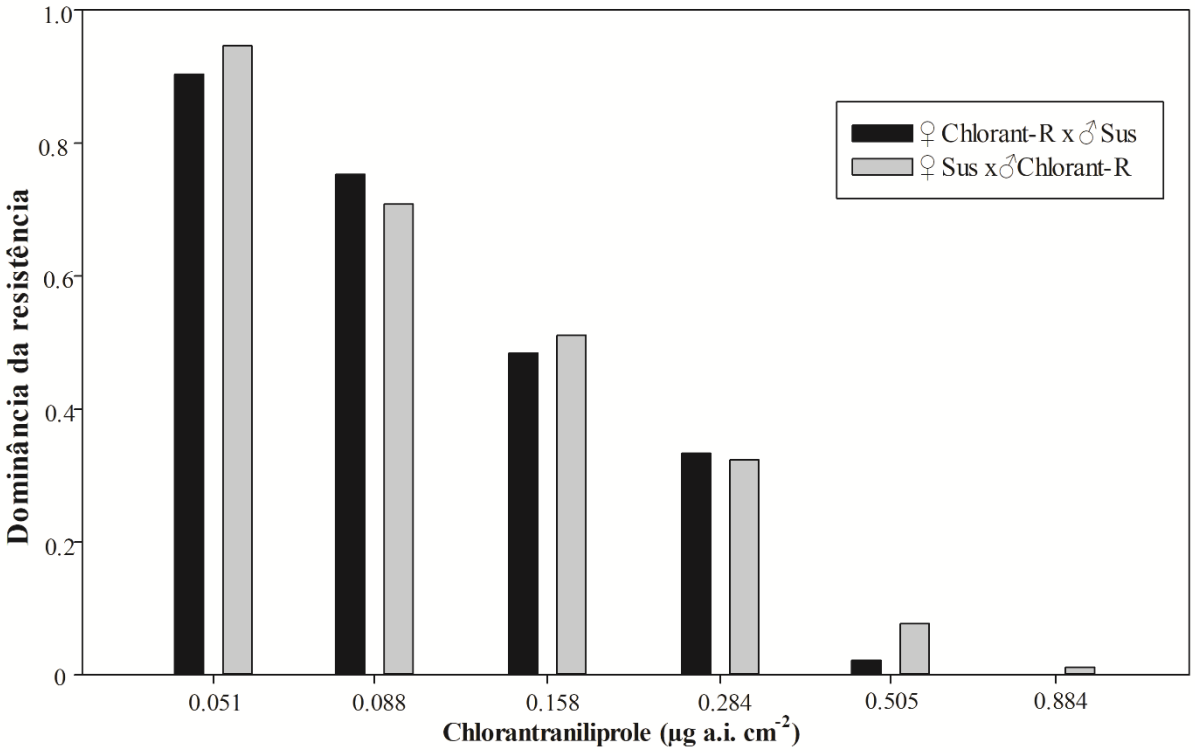

Figura 3.1. Grau de dominância da resistência de *Spodoptera frugiperda* em função da concentração de chlorantraniliprole.

3.3.2.2. Número de genes associados a resistência

Utilizando o teste do qui-quadrado (χ^2) ($P < 0,05$), foi possível comparar a mortalidade observada e esperada dos indivíduos provenientes dos retrocruzamentos entre as linhagens heterozigotas com o parental fenotipicamente mais distinto (Chlorant-R). Foi possível verificar uma variação nas mortalidades observadas e esperadas. Nas duas concentrações mais

altas, próximas a concentração discriminatória, a hipótese da herança monogênica não foi rejeitada em todos os retrocruzamentos testados (Tabela 3.2), relacionando a sobrevivência de *S. frugiperda* em concentrações elevadas de chlorantraniliprole a um efeito monogênico. Se considerarmos as concentrações mais baixas testadas, a mortalidade observada de alguns retrocruzamentos diferiu da esperada (Tabela 3.2), demonstrando que a sobrevivência de *S. frugiperda* nestas concentrações pode também estar relacionada a um efeito poligênico associado a poucos loci (≈ 2,5).

Tabela 3.2. Análise do qui-quadrado (χ^2) da mortalidade dos retrocruzamentos entre a linhagem da Chlorant-R e a progênie F_1 dos cruzamentos recíprocos (H1 = ♀ Chlorant-R × ♂ Sus e H2 = ♀ Sus × ♂ Chlorant-R) expostas a diferentes concentrações de chlorantraniliprole.

Conc.	♀ Chlorant-R × ♂ H1			♂ Chlorant-R × ♀ H1			♀ Chlorant-R × ♂ H2			♂ Chlorant-R × ♀ H2		
µg cm^{-2}	Obs[a]	Esp[b]	χ^2	Obs[a]	Esp[b]	χ^2	Obs[a]	Esp[b]	χ^2	Obs[a]	Esp[b]	χ^2
0,051	0,00	4,69	4,67*	0,00	4,69	4,72*	1,04	2,60	0,92	1,04	2,60	0,92
0,088	2,08	12,37	9,37*	3,19	12,37	7,30*	11,46	14,58	0,75	5,21	14,58	6,77*
0,158	12,63	25,79	8,59*	18,75	25,79	2,49	9,57	24,47	11,28*	24,73	24,47	0,01
0,284	18,09	32,86	9,30*	24,47	32,86	3,00	17,71	33,85	11,18*	36,84	33,85	0,38
0,505	42,71	50,18	2,14	45,16	50,18	0,94	49,47	47,84	0,10	50,53	47,84	0,27
0,884	57,89	54,17	0,53	52,08	54,17	0,17	53,13	53,64	0,01	58,33	53,64	0,85

[a] Mortalidade observada.
[b] Mortalidade esperada baseada em herança mendeliana.
* Diferença significativa ($P < 0,05$, graus de liberdade = 1) entre a mortalidade observada e a esperada.

3.3.2.3. Sobrevivência em plantas de milho

Ocorreu interação significativa entre as plantas tratadas/não tratadas e linhagens de *S. frugiperda* (gl = 2; desvio = 34,58; $P < 0,001$). Também ocorreu diferença significativa entre as linhagens testadas (gl = 2; desvio = 82,17; $P < 0,001$) e entre as plantas tratadas e não tratadas (gl = 1; desvio = 159,20; $P < 0,001$).

Foi observada diferença significativa entre as mesmas linhagens de *S. frugiperda* expostas em plantas tratadas e não tratadas (Figura 3.2). Porém a linhagem Chlorant-R apresentou elevada sobrevivência mesmo em plantas tratadas com chlorantraniliprole (60 %). Da mesma forma, foi possível constatar que na concentração de campo ainda ocorre sobrevivência de indivíduos heterozigotos (15 %). Em plantas não tratadas, não foi possível observar diferença significativa entre as linhagens testadas (Figura 3.2).

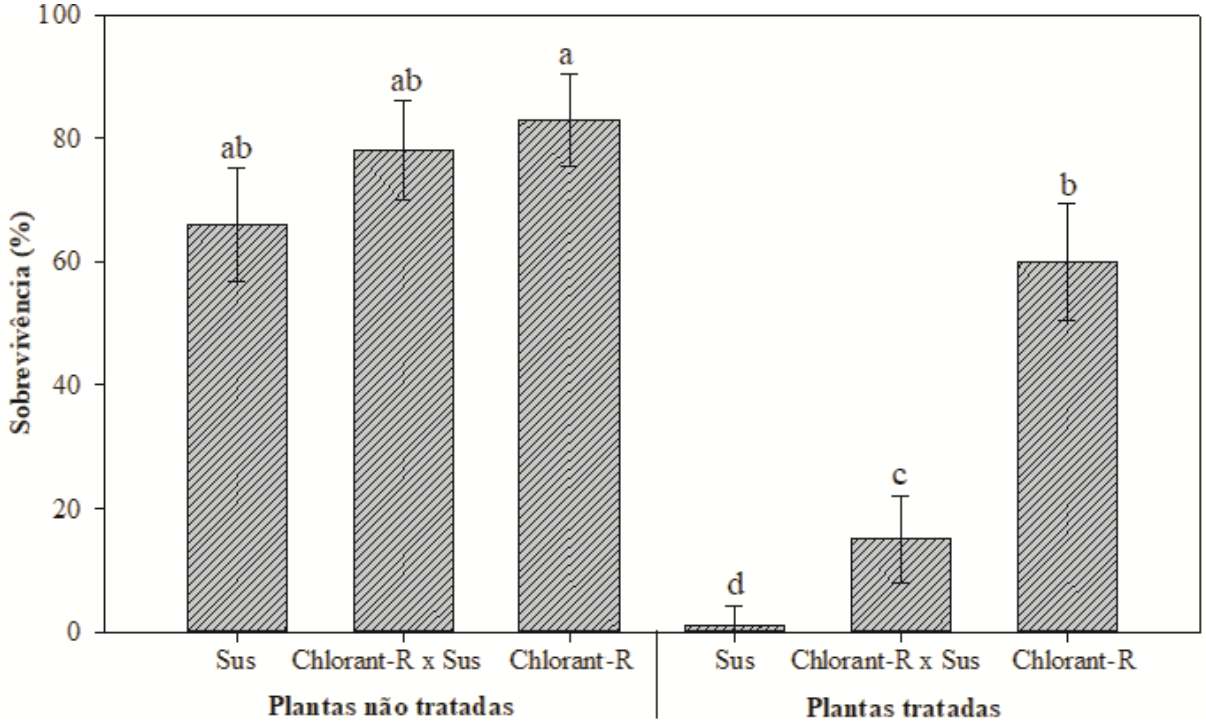

Figura 3.2. Sobrevivência larval das linhagens suscetível (Sus), heterozigoto (H1 = ♀ Chlorant-R × ♂ Sus) e resistente (Chlorant-R) em plantas de milho não tratadas e tratadas com chlorantraniliprole.

3.3.3. Resistência cruzada de *S. frugiperda* a inseticidas diamidas

A linhagem Chlorant-R apresentou resistência cruzada entre os inseticidas diamidas testados (cyantraniliprole e flubendiamide) (Tabela 3.3). A linhagem Chlorant-R apresentou menor razão de resistência para cyantraniliprole (≈ 27 vezes), quando comparado a outra diamida antranílica (chlorantraniliprole, ≈ 240 vezes), porém ainda assim a linhagem resistente diferiu da linhagem Sus pelos testes de igualdade (χ^2 = 500; gl =2; P < 0,001) e paralelismo (χ^2 = 18,46; gl = 1; P < 0,001). Apesar de ser selecionada inicialmente por chlorantraniliprole, a linhagem Chlorant-R apresentou maior razão de resistência a flubendiamide (> 42000 vezes), quando comparada aos outros inseticidas testados. A linhagem Chlorant-R não apresentou resposta de mortalidade com o acréscimo da concentração. A mortalidade foi de aproximadamente 35 % na máxima concentração utilizada (2842,105 µg i.a. cm^{-2}), assim não foi possível estimar com precisão valores de CL_{50} para a linhagem Chlorant-R, devido ao não ajuste dos dados ao modelo de Probit (Tabela 3.3).

Tabela 3.3. Concentração-resposta das linhagens suscetível (Sus) e resistente (Chlorant-R) de *Spodoptera frugiperda* aos inseticidas cyantraniliprole e flubendiamide.

Inseticida	Linhagem	n	Coef. Ang. (± EP)	CL_{50} (IC 95%) (µg i.a. cm^{-2})	χ^2	gl[a]	RR[b]
Cyantraniliprole	Sus	651	1,57 (±0,11)	0,122 (0,099-0,149)	3,34	4	-
	Chlorant-R	734	2,78 (±0,44)	3,237 (2,057-5,154)	5,89	3	26,53
Flubendiamide	Sus	849	2,93 (±0,33)	0,067 (0,053-0,081)	7,66	5	-
	Chlorant-R	1265		> 2842,105			> 42419

[a] Graus de Liberdade (gl).
[b] Razão de resistência = CL_{50} da linhagem resistênte/CL_{50} da linhagem suscetível.

3.4. Discussão

A elevada pressão de seleção causada por aplicações indiscriminadas de inseticidas tem proporcionado a rápida evolução da resistência de *S. frugiperda* a inseticidas. Em nosso trabalho, nós selecionamos e caracterizamos a resistência de *S. frugiperda* ao inseticida chlorantraniliprole. Foi obtida linhagem resistente de *S. frugiperda* a chlorantraniliprole com razão de resistência de ≈ 240 vezes, selecionada a partir do método do F_2 "screen". Esta metodologia tem sido usada frequentemente para detectar, monitorar e estimar a frequência de alelos que conferem resistência, sendo este método eficiente quando a resistência assume caráter recessivo e a frequência dos alelos de resistência ainda está baixa no campo. Quando estes pressupostos são atendidos, esta técnica é mais eficiente que o monitoramento fenotípico realizado em uma população coletada no campo ou em sua progênie (Andow; Alstad, 1998; Andow; Ives, 2002). Apesar desta técnica ser usada frequentemente para estimar a frequência de alelos de resistência de pragas em cultivos Bt, neste trabalho a técnica do F_2 "screen" foi utilizada apenas para fins de seleção da linhagem resistente.

Inseticidas diamidas são usados com frequência no controle de lepidópteros-pragas em diversas culturas no Brasil, em razão desta intensa pressão seletiva, já existem relatos de falhas no controle de *P. xylostella* e *T. absoluta* devido a evolução da resistência destas pragas a diamidas no campo (Ribeiro et al., 2014; Silva et al., 2016). A seleção de uma linhagem resistente a diamidas a partir de uma população de campo pode evidenciar o uso intenso deste grupo de inseticidas no controle de *S. frugiperda* no Brasil.

Por ser uma espécie que possui uma ampla gama de plantas hospedeiras (Pogue, 2002; Capinera, 2002), no Brasil o controle de *S. frugiperda* se torna ainda mais difícil a medida que há elevada oferta de hospedeiros ao longo do ano em razão da sobreposição espacial e temporal de culturas. A ocorrência de *S. frugiperda* em níveis populacionais elevados expõe

as populações de campo a inúmeras aplicações de inseticidas ao longo ano, o que pode causar a seleção de alelos e a rápida evolução da resistência caso não haja um adequado manejo. Para uma espécie de mesmo gênero, *Spodoptera exigua* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae), Lai*;* Su (2011) avaliaram em laboratório o risco de evolução da resistência a chlorantraniliprole e após 22 gerações expostas a seleção, houve um acréscimo de aproximadamente 12 vezes na CL_{50}. Em nosso trabalho foi possível selecionar uma linhagem resistente de *S. frugiperda* a inseticidas diamidas, o que indica que a frequência de resistência no campo pode estar aumentando ao longo das safras. Estratégias proativas de MRI devem ser estabelecidas para que a frequência não atinja um nível crítico, no qual é possível evidenciar possíveis falhas no controle de pragas.

Ao serem expostas a chlorantraniliprole, as linhagens heterozigotas provenientes dos cruzamentos recíprocos não diferiram entre si pelo teste de igualdade, indicando que os *loci* relacionandos a resistência de *S. frugiperda* a este inseticida estão localizados em cromossomos autossômicos, não possuindo origem em genes mitocondriais ou cromossomos sexuais. A maioria dos casos de resistência de insetos a inseticidas relatam o caráter autossômico, como nos estudos de herança da resistência de *S. frugiperda* a lambda-cyhalothrin (Diez-Rodriguez; Omoto, 2001), carbaryl (Yu, 1991), lufenuron e spinosad (Nascimento et al., 2016; Okuma et al., 2017). Linhagens de *P. xylostella* e *T. absoluta* resistentes a diamidas também apresentaram herança autossômica, além de um grau de dominância incompletamente recessivo (Steinbach et al., 2015; Roditakis et al., 2017).

A dominância da resistência em condições de campo depende de diversos aspectos, como a concentração aplicada, o estágio de desenvolvimento do inseto e até mesmo os fatores ambientais (Roush; Daly, 1990; Bourguet et al., 1996). Através do método de Bourguet et al. (2000) foi possível observar que a linhagem Chlorant-R apresentou dominância incompletamente recessiva em concentrações de chlorantraniliprole semelhantes a recomendada para o controle de *S. frugiperda* na cultura milho, ou seja, na concentração recomendada não ocorre 100 % de mortalidade de insetos heterozigotos. Este comportamento foi verificado através do experimento com plantas de milho tratadas com a concentração recomendada de chlorantraniliprole, na qual foi observada 15 % de indivíduos com o genótipo heterozigoto.

Quando a frequência dos alelos de resistência ainda é baixa em uma população, estes são encontrados em maior proporção em indivíduos heterozigotos (Roush; Daly, 1990), portanto, o conhecimento da expressão fenotípica destes insetos no campo gera implicações no manejo da resistência (Roush; Mckenzie, 1987). Garantir a mortalidade dos indivíduos de

genótipo heterozigotos é fundamental no manejo da resistência de insetos e a conjuntura de que a concentração de campo não é suficiente para matar todos indivíduos heterozigotos evidencia o elevado risco de rápida evolução da resistência *S. frugiperda* a chlorantraniliprole no campo.

A resistência de *S. frugiperda* a chlorantraniliprole demonstrou estar relacionada a uma variação em um pequeno número de possíveis genes associados a essa característica, de modo geral se comportando como uma característica fenotípica associada a uma herança monogênica, principalmente nas concentrações mais elevadas, ou associada a pequeno número de genes que segregam em blocos, promovendo baixa variância encontrada no teste de segregação. Os inseticidas diamidas atuam nos RyRs dos insetos, e estes são codificados por um único gene que foi primeiramente descrito em *Drosophila melanogaster* Meigen (Diptera: Drosophilidae) (Takeshima et al., 1994). Os RyRs possuem seis hélices transmembranais no seu domínio intramembranar (região C-terminal), no qual o canal de cálcio está contido, além deste, também há um grande domínio citoplasmático (região N-terminal) (Lümmen, 2013). Mutações neste gene, já foram apontadas como responsáveis pela resistência de insetos a inseticidas diamidas (Troczka et al., 2012; Guo et al., 2014a,b; Roditakis et al., 2017), porém este não é o único mecanismo de resistência já relatado, a detoxificação metabólica também foi associada a resistência de insetos a diamidas (Wang et al., 2013; Muthusamy et al., 2014). Portanto ainda são necessários estudos relacionados aos mecanismos associados a resistência de *S. frugiperda* a chlorantraniliprole.

Neste estudo, *S. frugiperda* apresentou resistência cruzada entre diamidas antranílicas e diamidas do ácido ftálico. Isto pode estar ligado a correlação entre a estrutura dos sítios de ligação destas moléculas nos RyRs. Porém, a razão de resistência foi maior para flubendiamide comparado às diamidas antranílicas, isto pode indicar que o mecanismo que está conferindo resistência esteja atuando diretamente no sítio de ligação de flubendiamide, e de maneira concomitante afetando a afinidade dos RyRs para chlorantraniliprole e cyantraniliprole. Estudos de ligação de inseticidas diamidas sobre tecidos musculares de diferentes espécies indicam que há variação no sítio de ligação dos inseticidas diamidas de acordo com a espécie estudada (Qi; Casida, 2013), como em *Musca domestica* L. (Diptera*:* Muscidae), na qual não foram observados sítios de ligação com elevada afinidade para flubendiamide. Contudo, insetos da ordem Lepidoptera, como *Chloridea virescens* (=*Heliothis virescens*) (Fabricius) (Lepidoptera: Noctuidae), apresentaram similar sítio de ligação similar com estrutura e atividades correlacionadas, indicando um sítio de ligação em comum para diamidas antranílicas e do ácido ftálico (Qi et al., 2014). Esta similaridade pode

estar relacionada a resistência cruzada a inseticidas diamidas, na qual já foi relatada em lepidópteros, como por exemplo, *T. absoluta* na Itália e no Brasil (Roditakis et al., 2015; Silva et al., 2016), *P. xylostella* na Tailândia, Filipinas, China e Brasil (Troczka et al., 2012; Wang; Wu, 2012; Liu et al., 2015; Ribeiro et al., 2017), *Spodoptera litura* (Fabricius) (Lepidoptera: Noctuidae) e *Chilo suppressalis* (Walker) (Lepidoptera: Pyralidae) na China (Sang et al., 2016; Zhao et al., 2017). A resistência cruzada é um problema que pode restringir o tempo de utilização de um novo inseticida (Wen; Scott, 1997), sendo assim a ocorrência de resistência cruzada de *S. frugiperda* a diamidas pode comprometer a utilização deste grupo no seu controle.

O Brasil é um país de agricultura tropical, produzindo diversas culturas ao longo do ano, muitas destas culturas são hospedeiras de *S. frugiperda*, portanto esta praga se encontra presente no campo durante todo o ano em níveis populacionais elevados. Inseticidas diamidas são constantemente usados em tratamento de sementes e aplicação foliar no controle de diversas pragas, principalmente lepidópteros. Este estudo caracterizou as bases genéticas da resistência de *S. frugiperda* a chlorantraniliprole e verificou a ocorrência de resistência cruzada entre os inseticidas diamidas, demonstrando o risco de rápida evolução da resistência no campo. Sendo assim, é necessário utilizar técnicas eficientes de monitoramento e estratégias proativas de manejo para manter baixa a frequência de resistência e diminuir a pressão de seleção sobre *S. frugiperda*, prolongando a vida útil dos inseticidas diamidas, que até então tem se mostrado eficientes no controle de diversas pragas.

3.5. Conclusões

- O padrão de herança da resistência de *S. frugiperda* a chlorantraniliprole é caracterizado como autossômico, incompletamente recessivo e monogênico nas concentrações mais elevadas.
- A linhagem de *S. frugiperda* resistente a chlorantraniliprole apresenta moderada resistência cruzada para cyantraniliprole e muito alta para flubendiamide.

Referências

Andow DA, Alstad DN, F_2 screen for rare resistance alleles. *J Econ Entomol* **91**:572-578 (1998).

Andow DA, Ives AR, Monitoring and adaptive resistance management. *Ecol Appl* **12**:1378-1390 (2002).

APRD - Arthropod Pesticide Resistance Database (2019), Michigan State University. http://www.pesticideresistance.org/ [accesso 30 de janeiro de 2019].

Bourguet D, Genissel A, Raymond M, Insecticide resistance and dominance levels. *J Econ Entomol* **93**:1588-1595 (2000).

Bourguet D, Prout M, Raymond M, Dominance of insecticide resistance presents a plastic response. *Genetics* **143:**407-416 (1996).

Brattsten LB, Holyoke CW Jr, Leeper JR, Raffa KF Insecticide resistance: challenge to pest management and basic research. *Science* **231**:1255-1260 (1986).

Capinera JL, *Handbook of vegetable pests*. Academic Press, San Diego, CA, p. 887 (2002).

Carvalho RA, Omoto C, Field LM, Williansom MS, Bass C, Investigating the molecular mechanism of organophosphate and pyrethroid resistance in the fall armyworm *Spodoptera frugiperda*. *PloS ONE* **8**:1-11 (2013).

CÉLERES, 3º levantamento de adoção da biotecnologia agrícola no Brasil, safra 2016/17. http://www.celeres.com.br/3o-levantamento-de-adocao-da-biotecnologia-agricola-no-brasil-safra-201617/ [acesso 7 de janeiro de 2018].

Cordova D, Benner EA, Sacher MD, Rauh JJ, Sopa JS, Lahm GP, Selby TP, Stevenson TM, Flexner L, Gutteridge S, Rhoades DF, Wu L, Smith RM, Tao Y, Anthranilic diamides: A new class of insecticides with a novel mode of action, ryanodine receptor activation. *Pestic Biochem Physiol* **84:**196-214 (2006).

Cordova D, Benner EA, Sacher MD, Rauh JJ, Sopa JS, Lahm GP, Selby TP, Stevenson TM, Flexner L, Gutteridge S, Rhoades DF, Wu L, Smith RM, Tao Y, The Novel Mode of Action of Anthranilic Diamide Insecticides: Ryanodine Receptor Activation, in *Synthesis and Chemistry of Agrochemicals VII*, ed. Lyga JW, Theodoridis G, American Chemical Society, Washington, DC, pp. 223-224 (2007).

Demétrio CG, Hinde J, Moral RA, Models for overdispersed data in entomology, in *Ecological Modelling Applied to Entomology*, ed. Ferreira CP, Godoy WA. Springer, New York, NY, pp. 219-259 (2014).

Diez-Rodriguez GI, Omoto C, Herança da resistência de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) a lambda-cialotrina. *Neotrop Entomol* **30**:311-316 (2001).

Ebbinghaus-Kintscher U, Lümmen P, Lobitz N, Schulte T, Funke C, Fischer R, Phthalic acid diamides activate ryanodine sensitive Ca^{2+} release channels in insects. *Cell Calcium* **39**:21-33 (2006).

Farias JR, Andow DA, Horikoshi RJ, Sorgatto RJ, Fresia P, Santos AC, Omoto C, Field-evolved resistance to Cry1F maize by *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in Brazil. *Crop Prot* **64**:150-158 (2014).

Figueiredo MLC, Martins-Dias AMP, Cruz I, Relação entre a lagarta-do-cartucho e seus agentes de controle biológico natural na produção de milho. *Pesq Agropec Bras* **41**:1693-1698 (2006).

Finney DJ, *Probit Analysis*. Cambridge University Press, Cambridge, UK. p. 333 (1971).

Georghiou GP, Genetics of resistance to insecticides in houseflies and mosquitoes. *Exp Parasitol* **26**:224-255 (1969).

Georghiou GP, Taylor CE, Genetic and biological influences in the evolution of insecticide resistance. *J Econ Entomol* **70**:319-323 (1977).

Goergen G, Kumar PL, Sankung SB, Togola A, Tamò M, Fisrt report of outbreaks of the fall armyworm *Spodoptera frugiperda* (J E Smith) (Lepidoptera, Noctuidae), a new alien invasive pest in west and central Africa. *PLoS ONE* **11**:1-9 (2016).

Guo L, Liang P, Zhou X, Gao X, Novel mutations and mutation combinations of ryanodine receptor in a chlorantraniliprole resistant population of *Plutella xylostella* (L.). *Sci Rep* **4**:1-7 (2014)a.

Guo L, Wang Y, Zhou X, Li Z, Liu S, Pei L, Gao X, Functional analysis of a point mutation in the ryanodine receptor of *Plutella xylostella* (L.) associate with resistance to chlorantraniliprole. *Pest Manag Sci* **70**:1083-1089 (2014)b.

IRAC - Inseticide Resistance Action Committee, IRAC MoA Classification Scheme (2017). http://www.irac-online.org/documents/moa-classification/?ext=pdf [Acesso 6 de janeiro de 2018].

Johnson SJ, Migration and the life history strategy of the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* in the Western Hemisphere. *Insect Sci Appl* **8**:543-549 (1987).

Kasten Jr. P, Precetti AACM, Parra JRP, Dados biológicos comparativos de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) em duas dietas artificiais e substrato natural. *Rev Agric* **53**:69-78 (1978).

Lahm GP, Cordova D, Barry JD, New and selective ryanodine receptor activators for insect control. *Bioorg Med Chem* **17**:4127-4133 (2009).

Lahm GP, Selby TP, Freudenberger JH, Stevenson TM, Myers BJ, Seburyamo G, Smith BK, Flexner L, Clark CE, Cordova D, Insecticidal anthranilic diamides: a new class of potent ryanodine receptor activators. *Bioorg Med Chem Lett* **15**:4898-906 (2005).

Lahm GP, Stevenson TM, Selby TP, Freudenberger JH, Cordova D, Flexner L, Bellin CA, Dubas CM, Smith BK, Hughes KA, Hollingshaus JG, Clark CE, Benner EA, Ryanaxypyr^{tm}: A new insecticidal anthranilic diamide that acts as a potent and selective ryanodine receptor activator. *Bioorg Med Chem Lett* **17**:6274-6279 (2007).

Lai T, Su J, Assessment of resistance risk in *Spodoptera exigua* (Hubner) (Lepidoptera: Noctuidae) to chlorantraniliprole. *Pest Manag Sci* **67**:1468-1472 (2011).

Lande R. The minimum number of genes contributing to quantitative variation between and within population. *Genetics* **99**:541-553, 1981.

Larson JL, Redmont CT, Potter DA, Comparative impact of an anthranilic diamide and other insecticidal chemistries on beneficial invertebrates and ecosystem services in turfgrass. *Pest Manag Sci* **68**:740-748 (2012).

LeOra software, *Polo-plus: Probit and logit analysis computer program*, version 1.0, LeOra Software, Berkeley, CA (2002).

Liu X, Ning Y, Wang H, Wang K, Cross-resistance, mode of inheritance, synergism, and fitness effects of cyantraniliprole resistance in *Plutella xylostella*. *Entomol Exp Appl* **157**:271-278 (2015).

Lümmen P, Calcium channels as molecular target sites of novel insecticides, in *Advances in Insect Physiology*, vol. 44, ed. Cohen E, Academic Press, London, UK, pp. 287-347 (2013).

Morillo F, Notz A, Resistencia de *Spodoptera frugiperda* (Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) a lambdacihalotrina e metomil. *Entomotropica* **16**:79-87 (2001).

Muthusamy R, Vishnupriya M, Shivakumar MS, Biochemical mechanism of chlorantraniliprole resistance in *Spodoptera litura* (Fab) (Lepidoptera: Noctuidae). *J Asia Pac Entomol* **17**:865-869 (2014).

Nascimento RB, Farias JR, Bernardi D, Horikoshi RJ, Omoto C, Genetic basis of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) resistance to the chitin synthesis inhibitor lufenuron. *Pest Manag* Sci **72**:810-815 (2016).

Nauen R, Slater R, Sparks TC, Elbert A, Mccaffery A, IRAC: Insecticide resistance and mode-of-action classification of insecticides, in *Modern Crop Protection Compounds*, ed. Jeschke P, Witschel M, Krämer W, Schirmer U. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Alemanha, pp. 995-1012 (2019).

Nauen R, Insecticide mode of action: return of the ryanodine receptor. *Pest Manag Sci* **62**:690-692 (2006).

Okuma DM, Bernardi D, Horikoshi RJ, Bernardi O, Silva AP, Omoto C, Inheritance and fitness cost of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) resistance to spinosad in Brasil. Pest Manag Sci. 2017. doi: 10.1002/ps.4829

Omoto C, Bernardi O, Salmeron E, Sorgatto RJ, Dourado PM, Crivellari A, Carvalho RA, Willse A, Martinelli S, Head GP, Field-evolved resistance to Cry1Ab maize by *Spodoptera frugiperda* in Brazil. *Pest Manag Sci* **72:**1727-1736 (2016).

Pogue GM, A world revision of the genus *Spodoptera* Guenée (Lepidoptera: Noctuidae). *Mem Am Entomol Soc* **43**:1-202 (2002).

Qi S, Casida JE, Species differences in chlorantraniliprole and flubendiamide insecticide binding sites in the ryanodine receptor. *Pestic Biochem Physiol* **107**:321-326 (2013).

Qi S, Lümmen P, Nauen R, Casida JE, Diamide insecticide target site specificity in the *Heliothis* and *Musca* ryanodine receptors relative to toxicity. *J Agric Food Chem* **62**:4077-4082 (2014).

R Development Core Team, *R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing.* Vienna, Austria, (2017).

Ribeiro LM, Siqueira HA, Wanderley-Teixeira V, Ferreira HN, Silva WM, Silva JE, Teixeira ÁAC. Field resistance of Brazilian *Plutella xylostella* to diamides is not metabolism-mediated. *Crop Prot* **93**:82-88 (2017).

Ribeiro LMS, Wanderley-Teixeira V, Ferreira HN, Teixeira ÁAC, Siqueira HAA, Fitness costs associated with field-evolved resistance to chlorantraniliprole in *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae). *Bull Entomol Res* **104**:88-96 (2014).

Ribeiro RS. *Monitoramento da sucetibilidade de populações de* Spodoptera frugiperda *(J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) a inseticidas diamidas no Brasil*. Dissertação de mestrado, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil (2014). http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/11/11146/tde-11112014-153823/pt-br.php [acesso 7 de janeiro de 2018].

Robertson JL, Savin NE, Preisler HK, Russell RM, *Bioassays with Arthropods*. CRC Press, Boca Raton, FL, p. 224 (2007).

Roditakis E, Steinbach D, Moritz G, Vasakis E, Stavrakaki M, Ilias A, García-Vidal L, Martínez-Aguirre MR, Bielza P, Morou E, Silva JE, Silva WM, Siqueira HAA, Iqbal S, Troczka BJ, Williamson MS, Bass C, Tsagkarakou A, Vontas J, Nauen R, Ryanodine receptor point mutations confer diamide insecticide resistance in tomato leafminer, *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae). *Insect Biochem Mol Biol* **80**:11-20, 2017.

Roditakis E, Vasakis E, Grispou M, Stavrakaki M, Nauen R, Gravouil M, Bassi A, First report of *Tuta absoluta* resistance to diamide insecticides. *J Pest Sci* **88**:9-16 (2015).

Roush RT, Daly JC. The role of population genetics in resistance research and management, in *Pesticide resistance in arthropods*, ed. Roush RT, Tabashnik BE. Chapman and Hall, New York, NY, pp. 97-152 (1990).

Roush RT, Mckenzie JA, Ecological genetics of insecticide and acaricide resistance. *Ann Rev Entomol* **32**:361-380 (1987).

Sang S, Shu B, Yi X, Liu J, Hu M, Zhong G, Cross-resistance and baseline susceptibility of *Spodoptera litura* (Fabricius) (Lepidoptera: Noctuidae) to cyantraniliprole in the south of China. *Pest Manag Sci* **72**:922-928 (2016).

SAS Institute. Version 9.2. Cary, NC, (2010).

Sattelle D, Cordova D, Cheerk TR, Insect ryanodine receptors: molecular targets for novel pest control chemicals. *Invertebr Neurosci* **8**:107-119 (2008).

Silva JE, Assis CPO, Ribeiro LMS, Siqueira HAA, Field-evolved resistance and cross-resistance of Brazilian *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae) populations to diamide insecticides. *J Econ Entomol* **109**:2190-2195 (2016).

Sokal RR, Rohlf F, *Biometry: the principles and practice of statistics in biological research.* Freeman, New York, NY, p. 887 (1995).

Sparks AN, A review of the biology of the fall armyworm. *Fla Entomol* **62**:82-87 (1979).

Steinbach D, Gutbrod O, Lümmen P, Matthiesen S, Schorn C, Nauen R, Geographic spread, genetics and functional characteristics of ryanodine receptor based target-site resistance to diamide insecticides in diamondback moth, *Plutella xylostella*. *Insect Biochem Mol Biol* **63**:14-22 (2015).

Stone B, A formula for determining degree of dominance in cases of monofactorial inheritance of resistance to chemicals. *Bull WHO* **38**:325-326 (1968).

Takeshima H, Nishi M, Iwabe N, Miyata T, Hosoya T, Masaid I, Hottac Y, Isolation and characterization of a gene for a ryanodine receptor/calcium release channel in *Drosophila melanogaster*. *FEBS Lett* **337**:81-87 (1994).

Tohnishi M, Nakao H, Furuya T, Seo A, Kodama H, Tsubata K, Fujioka S, Kodama H, Hirooka T, Nishimatsu T, Flubendiamide, a novel insecticide highly active against lepidopterous insect 735 pests. *J Pestic Sci* **30**:354-360 (2005).

Troczka B, Zimmer CT, Elias J, Schorn C, Bass C, Davies TG, Field LM, Williamson MS, Slates R, Nauen R, Resistence to diamide inseticides in diamondback moth, *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae) is associated with a mutation in the membrane-spanning domain of the ryanodine receptor. *Insect Biochem Mol Biol* **42**:873-880 (2012).

Tsukamoto M. Methods of genetic analysis of insecticide resistance, in *Pest resistance to pesticides*, ed. Georghiou GP, Saito T. Plenum, New York, NY, pp. 71-98 (1983).

Wang X, Khakame SK, Ye C, Yang Y, Wu Y, Characterisation of field-evolved resistence to chlorantraniliprole in the diamond back moth, *Plutella xylostella*, from China. *Pest Manag Sci* **69**:661-665 (2013).

Wang XL, Wu YD, High levels of resistance to chlorantraniliprole evolved in field populations of *Plutella xylostella*. *J Econ Entomol* **105**:1019-1023 (2012).

Wen Z, Scott JG, Cross-Resistance to Imidacloprid in Strains of German Cockroach (*Blattella germanica*) and House Fly (*Musca domestica*). *Pestic Sci* **49**:367-371 (1997).

Yu SJ, Detection and biochemical characterization of insecticide resistance in fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae). *J Econ Entomol* **85**:675-682 (1992).

Yu SJ, Insecticide resistance in the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith). *Pestic Biochem Physiol* **39**:84-91 (1991).

Yu SJ, Nguyen SN, Abo-Elghar GE, Biochemical characteristics of insecticide resistance in the fall armyworm *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith). *Pestic Biochem Physiol* **77**:1-11 (2003).

Yu SK, Nguyen SN, Inhiritance of carbaryl resistance and microsomal oxidases in the fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae). *J Econ Entomol* **87**:301-304 (1994).

Zhao D, Zhou L, Zhang S, Yao R, Qiu Y, Gao C, Resistance monitoring and cross-resistance to the diamides in the rice stem borer, *Chilo suppressalis* (Lepidoptera: Pyralidae). *Chin J Rice Sci* **31**:307-314 (2017).

4. INVESTIGAÇÃO DOS MECANISMOS ASSOCIADOS À RESISTÊNCIA DE *Spodoptera frugiperda* A INSETICIDAS DIAMIDAS

Resumo

A lagarta-do-cartucho do milho, *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith), é um dos principais lepidópteros-praga na America Latina e na America do Norte, mas recentemente invadiu o continente Africano e Asisátio. Existem relatos de evolução da resistência de *S. frugiperda* a diversos inseticidas e toxinas de *Bacillus thuringiensis* (Bt) expressas em milho transgênico. Neste trabalho investigamos a extensão e os mecanismos de resistência a inseticidas diamidas em uma linhagem de *S. frugiperda* coletada em campo e selecionada com clorantraniliprole. A seleção contínua em laboratório com clorantraniliprole nesta linhagem resultou em razões de resistência de 224,5 vezes e > 5400 vezes para clorantraniliprole e flubendiamide, respectivamente, quando comparado a linhagem suscetível. A pré-exposição a diferentes sinergistas conhecidos por inibir enzimas de detoxicação [piperonyl butoxide (PBO), diethyl maleate (DEM) and S, S, S-tributyl phosphorotrithioate (DEF)] não resultou em aumento significativo da toxicidade larval, sugerindo um menor efeito de resistência metabólica. No sequenciamento dos domínios II a VI do receptor de rianodina (RyR) de *S. frugiperda* obteve-se um SNP associado à mutação I4734M, a qual foi recentemente descrita por conferir resistência devido à alteração do sítio de ação de diamidas em Lepidoptera. A genotipagem por pirosequenciamento de lagartas de *S. frugiperda*, coletadas em campo no ano agrícola 2018, sugere uma baixa frequência alélica de resistência. A mutação identificada no RyR foi descrita recentemente conferindo resistência a diamidas em outros lepidópteros-praga no campo. O desenvolvimento do ensaio de discriminação alélica baseado em PCR auxiliará na detecção, monitoramento e disseminação do alelo de resistência a diamidas em populações de campo de *S. frugiperda* auxiliará na implementação de medidas apropriadas de manejo da resistência.

Palavras-chave: Chlorantraniliprole; Flubendiamide; Lagarta-do-cartucho do milho; Mutação; Receptor de rianodina

Abstract

Fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith), is a major lepidopteran pest in Latin and North America, but very recently invaded the African and Asian continent. *S. frugiperda* evolved resistance to several different insecticides and transgenic corn expressing *Bacillus thuringiensis* (Bt) toxins. Here we investigated the extent and mechanisms of resistance to diamide insecticides in a Brazilian field-collected FAW strain selected with chlorantraniliprole. Continuous laboratory selection of a field-collected FAW strain with chlorantraniliprole resulted in resistance ratios of 224.5-fold and >5400-fold against chlorantraniliprole and flubendiamide, respectively, when compared to a susceptible strain. Pre-exposure to different synergists known to inhibit detoxification enzymes [piperonyl butoxide (PBO), diethyl maleate (DEM) and S, S, S-tributyl phosphorotrithioate (DEF)] did not result in significantly increased larval toxicity, suggesting a minor role of metabolic resistance. Sequencing of *S. frugiperda* ryanodine receptor (RyR) C-terminal domains II to VI revealed a SNP, resulting in a I4734M mutation recently described to confer target-site resistance to diamides in lepidopteran pests. Genotyping by pyrosequencing of field-collected *S. frugiperda* larvae sampled in crop season 2018 suggests a low resistance allele frequency.

The identified RyR mutation has been recently shown to confer field resistance in other lepidopteran pests. The development of PCR-based allelic discrimination assay to detect this mutation will help to monitor the frequency and future spread of the diamide resistance allele in *S. frugiperda* field populations and to implement appropriate resistance management measures.

Keywords: Chlorantraniliprole; Flubendiamide; Fall armyworm; Mutation; Ryanodine receptor

*Este capítulo foi subemtido na revista Pest Management Science. Referência: Boaventura D[1], **Bolzan A[1],** Padovez FEO, Okuma DM, Omoto C, Nauen R, Detection of a ryanodine receptor target-site mutation in diamide insecticide resistant fall armyworm, *Spodoptera frugiperda*.

[1] Primeira autoria compartilhada

4.1. Introdução

Entender os mecanismos associados à resistência de insetos a inseticidas é fundamental para o estabelecimento de estratégias de manejo da resistência. Dentre os principais mecanismos descritos estão a detoxificação pela ação de enzimas, mutações no sítio de ação, redução na penetração dos inseticidas por modificação na composição da cutícula e alterações comportamentais devido a exposição a inseticidas (IRAC, 2019). Entretanto a grande maioria dos casos de resistência está associado a mutações que causam alteração no aminoácido onde ocorre a ligação das moléculas inseticidas ou a enzimas detoxificativas, como esterases, citocromo P-450 e glutationa S-transferases (ffrench-Constant et al., 2004). Muitas vezes a resistência de um inseto a determinado xenobiótico pode estar associada a mais de um mecanismo atuando em conjunto, desta forma o conhecimento dos fatores associados a resistência direcionará as ações de manejo para retardar a evolução da resistência e preservar a vida útil dos inseticidas.

Os inseticidas diamidas pertencem a um dos mais recentes grupos químicos introduzidos para o controle de pragas, principalmente insetos da ordem Lepidoptera (Tohnish et al., 2005; Lahm et al., 2005). Este grupo apresenta um modo de ação inovador, atuando nos receptores de rianodina (RyRs) localizados no retículo sarcoplasmático das células musculares dos insetos, causando a saída desordenada do íon Ca^{2+} das reservas intracelulares para o citosol e levando o inseto a morte devido a paralisia muscular (Sattelle et al., 2008; Lümmen, 2013). Entretanto, apesar de ser um grupo químico recente, a alta adoção destas

moléculas para o controle de pragas fez aumentar os casos de resistência a diamidas nos últimos anos, sendo reportados atualmente mais de 100 casos de evolução da resistência no campo ou de linhagem selecionada em laboratório para pouco mais de 10 espécies de insetos (APRD, 2019).

Dentre os mecanismos associados à resistência a diamidas, existem relatos demostrando que para algumas espécies a detoxificação metabólica é o principal mecanismo envolvido, como por exemplo em *Spodoptera exigua* (Hubner) (Lepidoptera: Noctuidae), no qual foi demonstrado um aumento da atividade enzimática de esterases e monooxigenases quando expostas a pressões de seleção utilizando chlorantraniliprole (Lai; Li; Su, 2011). Da mesma forma, para *Choristoneura rosaceana* (Harris) (Lepidoptera: Tortricidae), foi sugerido o envolvimento de enzimas esterases na resistência a chlorantraniliprole (Sial; Brunner, 2011). Porém Wang et al. (2012) indicaram que para *Plutella xylostella* L. (Lepidoptera: Plutellidae) a detoxificação metabólica não é o principal mecanismo de resistência a chlorantraniliprole. Para este mesmo inseto Troczka et al. (2012) e Guo et al. (2014b) observaram que a resistência a diamidas está associado a uma mutação (G4946E) entre dois possíveis domínios transmenbranais do canal de rianodina, localizada na região que codifica o sítio de ligação das diamidas. Além deste, Guo et al. (2014a) encontrou três novas mutações em uma região altamente conservada nos RyRs de uma população de *P. xylostella* resistente a chlorantraniliprole, são elas E1338D, Q4594L e I4790M. Estes autores sugeriram que a co-existência entre estas três mutações seja responsável pela resistência a este inseticida nesta espécie. Porém, as mutações G4946E/V, I4790M/T (numeração de *P. xylostella*) também foram encontradas em linhagens selecionadas e populações de campo de *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) resistentes a inseticidas diamidas (Roditakis et al., 2017), indicando que estas mutações podem ser relacionadas ao mecanismo de resistência a diamidas de modo geral.

A lagarta-do-cartucho do milho, *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith), é um dos principais lepidópteros-praga na cultura do milho (*Zea mays* L.) na America Latina e sul America do Norte (Sparks, 1979), recentemente invadiu o continente Africano e Asisátio (Georgen et al., 2016; Shylesha et al., 2018). Para esta praga, já existem diversos casos de evolução da resistência inseticidas e toxinas de *Bacillus thuringiensis* (Bt) expressas em plantas transgências (APRD, 2019). Para inseticidas diamidas, a resistência de *S. frugiperda* já foi reportada no Brasil, conforme exposto no capítulo 3, e também em Porto Rico (Gutiérrez-Moreno et al., 2018), entretanto os mecanismos associados a resistência ainda não foram descritos. Conhecer os mecanismos associados à resistência a diamidas pode fornecer

informações crucias para o manejo de *S. frugiperda*, pois permite a adoção de métodos bioquímicos e/ou moleculares de detecção e monitoramento da resistência. Estes métodos permitem a otimização dos processos amostrais, reduzindo os custos operacionais e o tempo para detecção, além de aumentar a precisão dos resultados devido a possibilidade da verificação fenotípica.

Diante do contexto que *S. frugiperda* é uma das principais pragas de diversas culturas de importância econômica, e que os inseticidas diamidas representam uma eficaz alternativa de controle, se faz necessário para o aprimoramento dos métodos de detecção e monitoramento da resistência verificar os mecanismos que conferem resistência em *S. frugiperda*. Sendo assim, objetivou-se avaliar os mecanismos associados a resistência de *S. frugiperda* a inseticidas diamidas, avaliando envolvimento de enzimas detoxificativas na resistência e verificando a ocorrência de mutações no RyR de *S. frugiperda.*

4.2. Material e métodos

4.2.1. Linhagens e populações de campo

Neste estudo foram utilizadas lagartas das linhagens resistente (Chlorant-R) e suscetível (Sus) a diamidas (Tabela 4.1), cuja a obtenção e forma de criação foi mencionada no capítulo 3. A linhagem Chlorant-R foi mantida sob constante pressão de seleção, utilizando a concentração de 1,579 µg de chlorantraniliprole cm^{-2}. Já a linhagem Sus foi mantida sem pressão de seleção por inseticidas ou proteínas Bt. Também foram utilizadas lagartas de 9 populações de campo de *S. frugiperda* coletadas em milho durante o ano agrícola 2018 (Tabela 4.1, Figura 4.1). Para o sequenciamento do gene codifica os RyR nas linhagens e populações analisadas, as lagartas foram mantidas em RNA*later*® (Life Technology, USA) e encaminhadas para o Laboratório de Toxicologia e Resistência de Insetos da Bayer AG, Alemanha, no qual possui licença de exceção (SG 46/18-DE-NW) para trabalhar com *S. frugiperda* foi fornecida pela câmara de agricultura, NRW, Alemanha, e uma carta de autoridade emitida sob a diretriz 2008/61 / EC.

Tabela 4.1. Local e data de coleta das linhagens e populações de *Spodoptera frugiperda* testadas.

Código	Cidade, UF	Local de coleta		Data de Coleta
		Latitude	Longitude	
Linhagens				
Sus	Sete Lagoas, MG	-	-	1996
Chlorant-R	Correntina, BA	13º39’05”S	45º40’50”O	14.12.2015
Populações de campo (Ano agrícola 2018)				
PR-PG	Ponta Grossa, PR	25º00’08”S	50º10’43”O	07.02.2018
SP-IT	Ituverava, SP	20º21’50”S	47º48’39”O	15.01.2018
MS-CS	Chapadão do Sul, MS	18º48’20”S	52º39’16”O	09.11.2017
MT-SZ	Sapezal, MT	15º34’24”S	58º49’44”O	15.11.2017
MT-TS	Tangará da Serra, MT	14º36’48”S	57º30’45”O	12.12.2017
MT-PL	Primavera do Leste, MT	15º36'20”S	54º09’08”O	06.11.2017
MT-LV	Lucas do Rio Verde, MT	13º20’15”S	55º59’50”O	10.11.2017
BA-SD	São Desidério, BA	12º05’59”S	45º42’40”O	06.11.2017
RO-VI	Vilhena, RO	13º15’40”S	59º52’15”O	17.11.2017

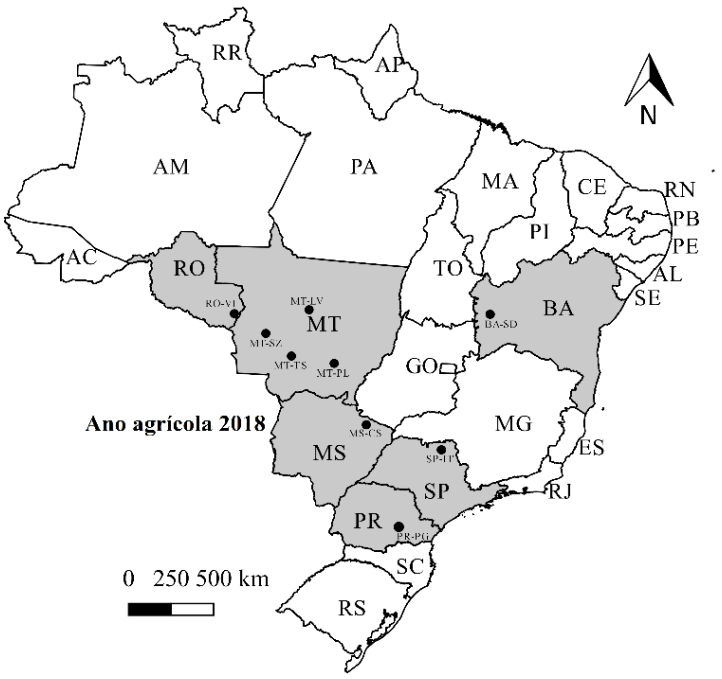

Figura 4.1. Locais de coleta das populações de *Spodoptera frugiperda* usadas para genotipagem de mutações no sítio de ação dos inseticidas diamidas (receptores de rianodina).

4.2.2. Inseticidas e sinergistas

Foram utilizados os inseticidas chlorantraniliprole (Premio® SC 200 g i.a. L^{-1}, DuPont do Brasil S.A., Barueri, SP, Brasil), flubendiamide (Belt® SC 480 g i.a. L^{-1}, Bayer S.A., São Paulo, SP, Brasil) e os sinergistas piperonyl butoxide (PBO, Sigma-Aldrich, 90 %, St. Louis, MO, USA), diethyl maleate (DEM, Sigma-Aldrich, 97 %, St. Louis, MO, USA) e S,S,S-

tributyl phosphorotrithioate (DEF, Chem Service, 97,2 %, West Chester, PA, USA), além de acetona P.A. (Synth®, 100 %, Diadema, SP, Brasil) para as diluições dos sinergistas.

4.2.3. Bioensaios com sinergistas

Para avaliar o envolvimento de enzimas do complexo citocromo P-450, glutationa S-transferases e esterases envolvidas no processo de detoxificação na resistência de *S. frugiperda* a inseticidas diamidas, foram realizados testes com os sinergistas PBO, DEM e DEF juntamente com bioensaios de concentração-resposta com lagartas de 3º ínstar das linhagens Sus e Chlorant-R para os inseticidas chlorantraniliprole e flubendiamide. O método de bioensaio foi de tratamento superficial de dieta artificial com solução inseticida, conduzidos em placas de acrílico de 24 células (Costar® Corning Incorporated, Corning, NY, USA), contendo 1,25 mL de dieta artificial por célula. Os inseticidas foram diluídos em água destilada e surfactante 0,1 % (Triton® X-100, Labsynth, Brasil), foram utilizadas de 7 a 9 concentrações de inseticidas espaçadas em escala logarítmica, e o tratamento controle foi composto apenas por água destilada e surfactante. Duas horas antes das lagartas serem expostas aos inseticidas, foi aplicado 1 µL lagarta^{-1} de sinergista diluído em acetona P.A., utilizando um microaplicador (Burkard Manufacturing, Rickmansworth, England). Os sinergistas foram utilizados nas seguintes concentrações: PBO (100 µg mL^{-1} - 0,1 µg lagarta^{-1}), DEM (1000 µg mL^{-1} - 1,0 µg lagarta^{-1}), DEF (320 µg mL^{-1} - 0,32 µg lagarta^{-1}) e acetona P.A. (1 µg lagarta^{-1} - tratamento controle). A concentração de cada sinergista foi estabelecida em bioensaios preliminares.

Os dados de mortalidade foram submetidos à análise Probit (Finney, 1971) para as estimativas da concentração que mata 50 % (CL_{50}), intervalos de confiança (IC 95 %) e valores de coeficiente angular para ambas as linhagens, utilizando o programa PoloPlus 1.0 (LeOra Software, 2002). A razão de sinergismo (RS) foi calculada pela divisão da CL_{50} da linhagem não exposta a sinergistas pela CL_{50} da linhagem exposta a sinergistas. A razão de resistência foi calculada pela divisão da CL_{50} da linhagem Chlorant-R pela CL_{50} da linhagem Sus em cada combinação de sinergista com inseticida. Houve diferença significativa entre as CL_{50s} das linhagens quando não houve sobreposição dos intervalos de confiança 95 %.

4.2.4. Sequenciamento parcial dos receptores de rianodina

O RNA total foi extraído individualmente de 10 lagartas de 4º ínstar das linhagens Sus e Chlorant-R utilizando o reagente TRizol® (Thermo Fisher Scientific, USA), posteriormente o RNA foi purificado seguindo as recomendações do RNeasy® Plus Universal Mini Kit (QIAGEN, Alemanha). O RNA foi quantificado por espectrometria (NanoQuant Infinite 200, Tecan, Suiça) e sua integridade foi avaliada por um sistema automático de eletroforese em gel, de acordo com o método CL-RNA (QIAxcel RNA QC Kit v2.0, QIAGEN, Alemanha). O RNA foi normalizado a 200 ng μL^{-1} e 1 µg do RNA total foi usado em 20 reações para a síntese de cDNA, usando SuperScript™ III Reverse Transcriptase e oligo(dT) 20 primer (Thermo Fisher Scientific, USA), de acordo com as instruções do fabricante.

Os pares de iniciadores foram desenhados utilizando o programa Primer3 v. 2.3.7 (Untergasser et al., 2012), baseado na sequência de cDNA do RyR de *S. exigua* (GenBank: KJ573633) e cobrindo a região entre os domínios transmenbranais II e VI. Os iniciadores Sf. 1-F e Sf. 1-R; Sf. 2-F e Sf. 1-R; Sf. 3-F e Sf. 2-R (Tabela 4.2) foram usados para amplificar fragmentos que se sobrepunham e totalizavam 1479 pares de base (bp). As reações de PCR continham 100 ng de cDNA, 500 nM de cada iniciador, 25 µL de High Fidelity Phusion Flash PCR Master Mix (Thermo Scientific, USA) e água livre de nucleases, totalizando um volume de 50 µL de reação. As reações foram submetidas a condições cíclicas de 10 s a 98 ºC, seguidas de 30 ciclos de 98 ºC por 1 s, 60 ºC por 5 s e 72 ºC por 15 s e uma extensão final de 72 ºC por 60 s, utilizando CFX-96 (BIO-RAD, USA). Os produtos de PCR foram verificados por um sistema automático de eletroforese em gel, de acordo com o método OM500 (QIAxcel DNA Screening Kit v2.0, QIAGEN, Alemanha), logo após os produtos de PCR foram purificados usando innuPREP PCRpure kit (Analytikjena, Germany) e enviados para o sequenciamento de Sanger pela Eurofins Genomics (Alemanha), usando os iniciadores senso e antisenso descritos na Tabela 4.2. Os resultados do sequenciamento foram montados e alinhados com a sequência parcial do RyR de *S. exigua* (GenBank: KJ573633). Posteriormente as sequências foram traduzidas e alinhadas com as sequências de *P. xylostella* (GenBank: AET09964), *T. absoluta* (GenBank: APC65631), *Chilo suppressalis* (Walker) (Lepidoptera: Crambidae) (GenBank: AFN70719) e *S. exigua* (GenBank: AFC36359) usando o software Geneious v. 10.2.3 (Biomatters Ltd., New Zealand).

Tabela 4.2. Lista de iniciadores usados no sequenciamento de Sanger e pirosequenciamento.

Primers/Sondas	Sequencias	
Sf. 1-F	5'-TCAAGGTGGCTGCAGTACTG-3'	Sequenciamento parcial do RyR - Sanger
Sf. 2-F	5'-GCCATCGAAGCTGAGAGCAA-3'	
Sf. 3-F	5'-AGGCAGCAAGGGACTGATTC-3'	
Sf. 1-R	5'-GTTCCTGTTGACCTCGTCGT-3'	
Sf. 2-R	5'-GAAGAAGTCCCAGCATCGCT-3'	
Sf. G4946-F	5'-GTGATGGGCAACTTCAAC	Pirosequenciamento
Sf. G4946-R.btn	5'-[btn]TTTTCCGTTATGCGTGAC-3'	
Sf. G4946-F.Seq	5'-ATTTGCTAGATGTCGCT-3'	
Sf. I4790-F.btn	5'-[btn]CGAGGACTTCTTCTACATGG-3'	
Sf. I4790-R	5'-AATTTACGGGCAATCTCC-3'	
Sf. I4790-R.Seq	5'-ATGGTAGTACCCGATGA-3'	

4.2.5. Pirosequenciamento para genotipagem de mutações no sítio de ação das diamidas

O DNA genômico individual de 10 a 23 lagartas de 3º e 4º ínstar das linhagens e populações descritas na tabela 4.1 foram extraídos utilizando DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN, Alemanha) ou QuickExtract™ DNA Extraction Solution 1.0 (Epicentre, USA), de acordo com os protocolos recomendados pelos fornecedores.

Os pares de iniciadores foram desenhados utilizando o software Piro Mark Assay Design (QIAGEN, Alemanha) visando marcar as mutações G4946E e I4790M (numeração de *P. xylostella*) separadamente. A confecção dos iniciadores foi baseada no cDNA da sequência parcial do RyR obtida no item 4.2.4 (GenBank: MK226188) (Tabela 4.2). Posteriormente, o PCR para o pirosequenciamento foi realizado em reações de 30 µL, contendo 15 µL de JumpStartTM Taq ReadyMixTM (Sigma-Aldrich, USA), 500 nM de primer senso e antisenso, sendo um deles biotinilado (Tabela 4.2), aproximadamente 50 ng de gDNA e água livre de nucleases. As reações foram expostas a condições cíclicas de 95 °C por 3 min, seguida de 40 ciclos de 95 °C por 30 s, 50 °C por 30 s e 72 °C por 60 s, além de uma fase de elongação final de 72 °C por 5 min. As reações de pirosequenciamento foram realizadas de metodologia descrita por Troczka et al. (2012), utilizando os iniciadores descritos na Tabela 4.2.

4.3. Resultados

4.3.1. Bioensaios com sinergistas

A linhagem Chlorant-R mantida sob pressão de seleção com chlorantraniliprole apresentou razões de resistência (RR) de 224,5 vezes e > 5400 vezes para chlorantraniliprole e flubendiamide, respectivamente. Na linhagem Sus, todos os sinergistas testados apresentaram pouco sinergismo para chlorantraniliprole, aumentando a toxicidade de chloranraniliprole em 1,5 a 2,2 vezes. Na linhagem resistente, os sinergistas não causaram redução significativa na CL_{50} para o chlorantraniliprole (Tabela 4.3). Para o inseticida flubendiamide, todos os sinergistas testados não potencializaram a atividade do inseticida para ambas as linhagens (Sus e Chlorant-R). As razões de resistência foram elevadas (> 5000-vezes) quando as linhagens foram ou não expostas aos sinergistas (Tabela 4.3).

4.3.2. Sequenciamento parcial do receptor de rianodina

Para identificar polimorfismos nos sítios de ligação dos inseticidas diamidas, a região entre os domínios transmenbranais II e VI dos RyR de *S. frugiperda* foi amplificada na linhagem Sus e Chlorant-R (Figura 4.2). Como a extração de RNA de alguns indivíduos resultou em um RNA de qualidade inferior, o fragmento que cobria os 1413 pb (GenBank: MK226188) teve que ser amplificado usando três diferentes pares de iniciadores, que amplificaram fragmentos menores, mas se sobrepuseram. Após o alinhamento dos fragmentos menores, um fragmento total foi obtido com sucesso, mostrando alta similaridade (98,3 % de identidade par a par no nível de aminoácidos) para a sequência de RyR de *S. exigua*. A análise das sequências obtidas revelou apenas um único polimorfismo de nucleotídeo simples (SNP) não sinônimo, causando uma substituição de isoleucina para metionina na posição 4734 (correspondendo a mutação I4790M no RyR de *P. xyllostella*) (Figura 4.3). Todos os indivíduos sequenciados pelo método de Sanger foram homozigotos para o alelo selvagem (Sus) ou para a mutação I4790M (Chlorant-R).

Tabela 4.3. Concentração-resposta das linhagens suscetível (Sus) e resistente (Chlorant-R) de *Spodoptera frugiperda* para os inseticidas chlroantraniliprole (Chlor) e flubendiamide (Flub) usando lagartas previamente tratadas com piperonyl butoxide (PBO), diethyl maleate (DEM) e S,S,S-tributyl phosphorotrithioate (DEF).

Inseticida	Sinergista	Sus					Chlorant-R					RR[c]
		n	Coef. Ang. (±EP)	CL_{50} (µg.cm^{-2}) (IC 95%)	χ^2(gl)[a]	RS[b]	n	Coef. Ang. (±EP)	CL_{50} (µg.cm^{-2}) (IC 95%)	χ^2(gl)[a]	RS[b]	
Chlor	Acetona	859	2,07 (±0,15)	0,020 (0,016-0,024)	7,3(6)	-	853	3,42 (±0,48)	4,490 (3,357-5,552)	11,8(6)	-	224,5
	PBO	854	2,14 (±0,15)	0,009 (0,08-0,010)	3,8(6)	2,2	860	3,99 (±0,40)	3,057 (2,637-3,464)	6,3(6)	1,5	339,7
	DEM	803	2,18 (±0,15)	0,010 (0,008-0,013)	8,2(6)	2,0	669	2,31 (±0,15)	2,603 (1,977-3,465)	10,7(5)	1,7	260,3
	DEF	856	1,84 (±0,13)	0,013 (0,011-0,015)	5,7(6)	1,5	829	2,84 (±0,28)	2,852 (2,218-3,543)	11,4(6)	1,6	219,4
Flub	Acetona	950	1,73 (±0,11)	0,051 (0,039-0,065)	12,9(7)	-	857	-	> 280	-	-	> 5400
	PBO	955	1,72 (±0,11)	0,055 (0,043-0,070)	12,3(7)	0,9	812	-	> 280	-	-	> 5000
	DEM	906	1,64 (±0,11)	0,051 (0,040-0,066)	12,5(7)	1,0	768	-	> 280	-	-	> 5400
	DEF	859	1,61 (±0,12)	0,045 (0,033-0,059)	11,8(6)	1,1	802	-	> 280	-	-	> 6200

[a] Graus de liberdade (gl).
[b] Razão de sinergismo (RS): CL_{50} da linhagem exposta ao sinergista / CL_{50} da linhagem não exposta ao sinergista.
[c] Razão de resistência (RR) = CL_{50} da linhagem resistente (chlorant-R) / CL_{50} da linhagem suscetível (Sus).

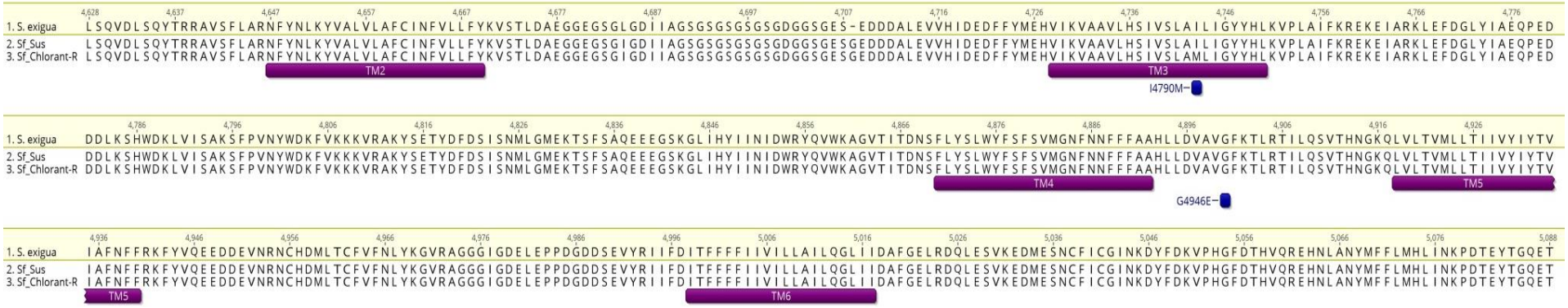

Figura 4.2. Alinhamento múltiplo do receptor de rianodina abrangendo os domínios transmembranais (TM) de II a VI em *Spodoptera exigua* (GenBank: AFC36359) e linhagens suscetível (Sf_Sus) e resistente a inseticidas diamidas (Sf_Chlorant-R).

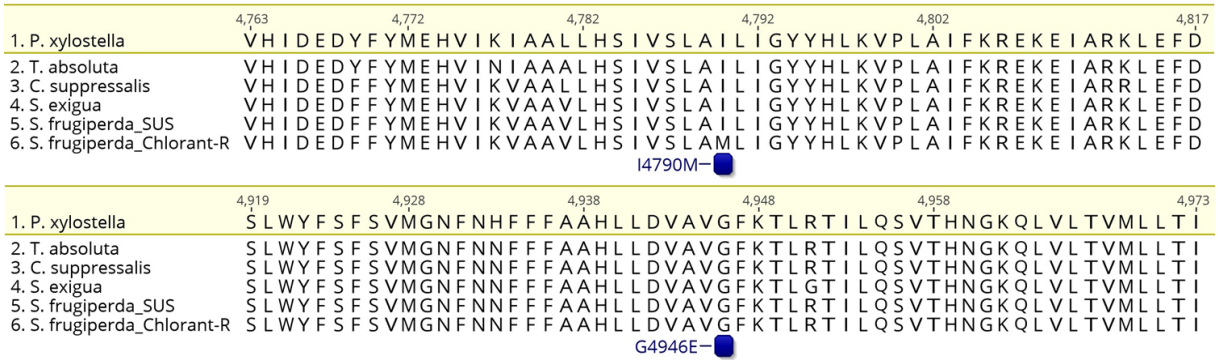

Figura 4.3. Alinhamento da sequência de aminoácidos do receptor de rianodina de diferentes lepidópteros-praga, cobrindo os locais onde as mutações G4946E e I4790M ocorrem. As características estruturais e a numeração foram baseadas no receptor de rianodina de *Plutella xylostella* (GenBank: AET09964). Números de acesso do GenBank para as sequencias alinhadas: *P. xylostella* (GenBank: AET09964), *Tuta absoluta* (GenBank: APC65631), *Chilo suppressalis* (GenBank: AFN70719), *Spodoptera exigua* (GenBank: AFC36359) e *Spodoptera frugiperda* "Sus" (GenBank: MK226188).

4.3.3. Genotipagem por pirosequenciamento

O ensaio por pirosequenciamento possibilitou a genotipagem da mutação I4790M dos RyRs de 9 populações de *S. frugiperda*, coletadas em 6 estados diferentes durante o ano agrícola 2018 (Tabela 4.1). Além disso, o ensaio por pirosequenciamento também foi validado pela genotipagem de 18 lagartas das linhagens Sus e Chlorant-R, sendo 100 % homozigotas I4790 (ATA) e M4790 (ATG), respectivamente (Tabela 4.4, Figura 4.4). Ao genotiparmos as lagartas coletadas a campo no ano agrícola 2018, todas as amostras foram homozigotas para o alelo selvagem (I4790). Devido ao baixo número de lagartas disponíveis, não foi possível avaliar com precisão a frequência da mutação I4790M nessas amostras de campo, no entanto, com base nos dados amostrados, é possivel afirmar que a frequência da mutação se encontra abaixo de 4 a 10 %, dependendo do local de coleta. Analisamos também todas as amostras de campo e as linhagens Sus e Chlorant-R para a presença de uma substituição de aminoácidos na posição G4891 (correspondendo a G4946 no RyR de *P. xylostella*), que mostrou recentemente conferir resistência a diamidas; entretanto nenhuma substituição de aminoácidos foi encontrada (Tabela 4.4, Figura 4.4).

Tabela 4.4. Genotipagem por pirosequenciamento das mutações no receptor de rianodina das linhagens suscetível (Sus) e resistente (Chlorant-R) de *Spodoptera frugiperda* a inseticidas diamidas, nas posições G4946 e I4790 (numeração de *Plutella xylostella*).

Posição	**G4946**						**Total**
Nucleotídeos	**GGC**				**-**		
Aminoácido	**Glicina**				**-**		
	N	**(SS) %**	**N**	**(RS) %**	**N**	**(RR) %**	
Sus	18	100	0	0	0	0	18
Chlorant-R	18	100	0	0	0	0	18
Posição	**I4790**		**I/M4790**		**M4790**		**Total**
Nucleotídeos	**ATA**		**ATA/ATG**		**ATG**		
Aminoácido	**Isoleucina**		**Isoleucina/Metionina**		**Metionina**		
	N	**(SS) %**	**N**	**(RS) %**	**N**	**(RR) %**	
Sus	18	100	0	0	0	0	18
Chlorant-R	0	0	0	0	18	100	18

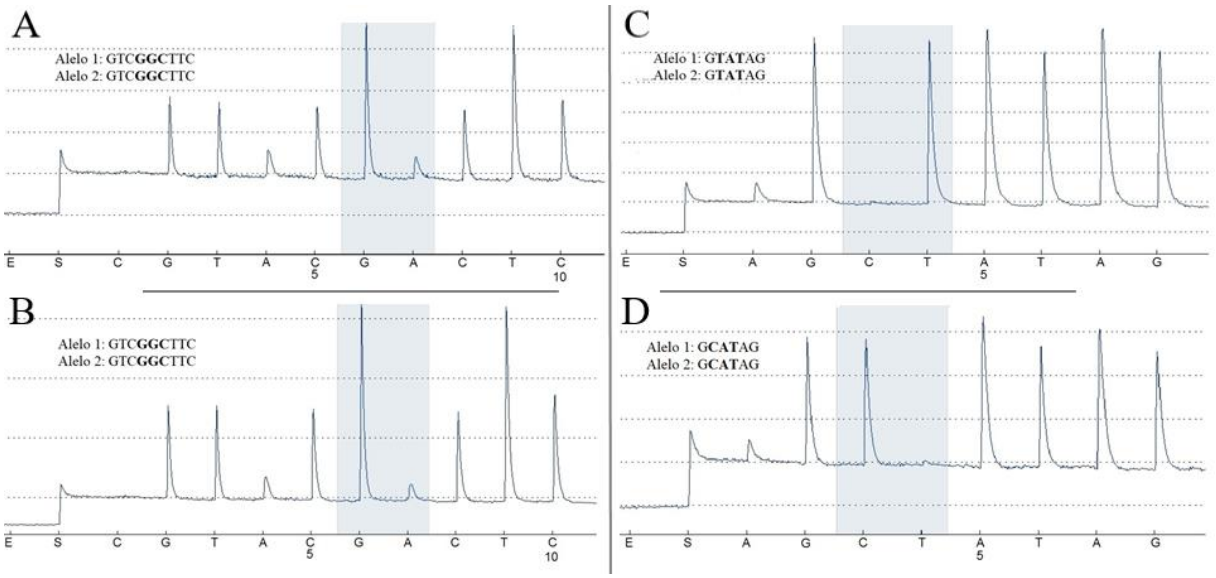

Figura 4.4. Resultados do pirosequenciamento para as posições 4946 (A-B) e 4790 (C-D) (numeração de *Plutella xylostella*) do receptor de rianodina de *Spodoptera frugiperda*. Homozigoto GGC (A - Sus; B - Chlorant-R). Homozigoto TAT (C - Sus) e homozigoto CAT (D - Chlorant-R). A-B foram sequenciados no sentido 5'-3' e C-D no sentido 3'-5'.

4.4. Discussão

Devido a evolução da resistência de *S. frugiperda* a proteínas Bt (*Bacillus thurigiensis* Berliner) expressas em milho (Farias et al., 2014; Omoto et al., 2016), o uso de inseticidas para o controle desta praga aumentou nos últimos anos nesta cultura no Brasil (Burtet et al., 2017). Entretanto, relatos de resistência a inseticidas químicos como piretroides (Diez-Rodriguez; Omoto, 2001), organofosforados (Carvalho et al., 2013), benzoilureias e espinosinas (Nascimento et al., 2016; Okuma et al., 2018), tornam desafiador o controle desta

praga no país. Como alternativa, os inseticidas diamidas têm sido utilizados com frequência em aplicações foliares e tratamento de sementes em diversas culturas, aumentando a pressão de seleção, principalmente sobre lepidópteros (Teixeira; Andarolo, 2013; Nauen; Steinbach, 2016).

A resistência de lepidópteros-praga a inseticidas diamidas tem sido associada a mutações nos RyRs, principalmente as mutações G4946E/V e I4790M (Troczka et al., 2012; Guo et al., 2014b; Roditakis et al., 2017). Como forma de constatação da relevância destas mutações com relação à resistência a diamidas, as mutações G4946V e M4790I foram introduzidas em *Drosophila melanogaster* (Meigen) (Diptera: Drosophilidae) utilizando a ferramenta de edição gênica CRISPER Cas9, a mutação G4946V foi responsável por aumentar as razão de resistência a diamidas, já a mutação M4790I causou uma redução na CL_{50} de *D. melanogaster*, uma vez que o tipo selvagem desta espécie naturalmente possui uma metionina na posição 4790 (Douris et al., 2017). Utilizando o mesmo método, a mutação G4946E foi introduzida em *S. exigua*, aumentando significativamente a razão de resistência para chlorantraniliprole, cyantraniliprole e flubendiamide, quando comparado com a linhagem sem a mutação (Zuo et al., 2017).

Para *S. frugiperda*, Ribeiro et al. (2014) verificou a frequência de alelos que conferem resistência a diamidas em populações coletadas nas safras 2012, 2013 e 2014, encontrando uma frequência de 0,0033, 0,0134 e 0,0176, respectivamente. Com os dados apresentados no capítulo 2 da presente tese, é possível perceber que a frequência alélica média das populações de *S. frugiperda* está aumentando ao longo das safras (média de 0,02), com destaque para populações do estado Bahia, de onde foi possível selecionar uma linhagem com altos níveis de resistência (Capítulo 3). A resistência de *S. frugiperda* a diamidas foi caracterizada como autossômica, incompletamente recessiva e monogênica, além disso, foi verificada a ocorrência de resistência cruzada com inseticidas diamidas e sobrevivência de heterozigotos quando aplicadas as doses de campo de chlorantraniliprole (Capítulo 3), fatores estes que contribuem para um alto risco de rápida evolução da resistência no campo. Nossos resultados reportam pela primeira vez a presença da mutação I4790M em uma linhagem de *S. frugiperda* resistente a diamidas. Entretanto, esta mutação não foi encontrada nas populações de campo testadas, ou seja, ainda se encontra em baixa frequência no campo. Além disso, a resistência a diamidas aparenta não estar diretamente associada a enzimas detoxificativas, devido a não redução significativa dos níveis de resistência com a adição de sinergistas.

A mutação I4790M está localizada no domínio transmenbranal 3 dos RyR, sendo importante para a formação do poro do canal de cálcio (Guo et al., 2014a). A isoleucina na

posição 4790 é altamente conservada em Lepidoptera, mas não em outras ordens de insetos, portanto, existe a hipótese de que a mudança de isoleucina para outro aminoácido pode contribuir com a seletividade dos inseticidas diamidas, como para flubendiamide (diamida do ácido ftálico), cujo é menos ativo contra coleópteros que possuem naturalmente uma metionina nesta posição do RyR (Nauen; Steinbach, 2016; Troczka et al., 2018). O mesmo acontece com *Drosophila*, que naturalmente apresenta metionina na posição 4790 e apresentou maior razão de resistência para flubendiamide comparado a diamidas antranílicas (Douris et al., 2017). Já a mutação G4946E/V já foi associada à resistência a diamidas em três lepidópteros-praga, *P. xylostella* (Trockza et al., 2012), *T. absoluta* e *C. supresalis* (Roditakis et al., 2017; Yao et al., 2017). Entretanto, na linhagem resistente e em todas as populações de campo de *S. frugiperda* testadas, a mutação G4946E/V não foi verificada.

Estudos envolvendo diferentes espécies de insetos mostraram diferenças na afinidade de ligação das diamidas antranílicas e diamidas do ácido ftálico no RyR, como descrito em *Musca domestica* L. (Diptera: Muscidae), onde sítios de ligação com alta afinidade a flubendiamide não foram encontrados. Entretanto, em *Chloridea virescens* (= *Heliothis virescensa*) (Fabricius) (Lepidoptera: Noctuidae) observou-se um sítio de ligação semelhante entre diamidas antranílicas e ácido ftálico com estrutura e atividades correlacionadas (Qi et al., 2014). Usando estudos de radioligação na membrana microssomal torácica da linhagem de *P. xylostella* resistente a diamidas, Steinbach et al. (2015) verificou que a mutação G4946E tem inferência funcional na ligação específica de flubendiamide e chlorantraniliprolle e está diretamente associada à resistência a inseticidas diamidas. Já a mutação I4790M está localizada diretamente oposta a G4946E, baseado no RyR1 do coelho *Oryctolagus cuniculus* L., sugerindo que essa mutação também pode ter papel funcional na ligação dos inseticidas diamidas (Steinbach et al. 2015). No entanto, a posição 4790 nos RyRs não é conservada entre diferentes ordens de insetos, podendo estar relacionada a diferenças na afinidade de ligação ao chlorantraniliprole e flubendiamide, como já relatado em *M. domestica* (M4790) e *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae) (M4790) comparado a lepidópteros (I4790) (Qi; Casida, 2013; Nauen; Steinbach, 2016). Considerando que a linhagem resistente (Chlorant-R) apresentou maior razão de resistência a flubendiamide em comparação às diamidas antranílicas (Capítulo 3), podemos inferir que a mutação I4790M está afetando diretamente a atividade de flubendiamide e afetando concomitantemente com menos intensidade a afinidade dos RyRs para chlorantraniliprole e cyantraniliprole em *S. frugiperda*.

Embora a mutação I4790M tenha sido verificada em 100 % dos indivíduos da linhagem resistente, não foram encontrados indivíduos portando as mutações I4790M e

G4946E/V nas populações de *S. frugiperda* coletadas no ano agrícola 2018, indicando uma possível baixa frequência destas mutações em condições de campo. Para que as estratégias de manejo da resistência sejam efetivas, elas devem ser implementadas enquanto a frequência de resistência ainda é baixa. Sendo assim, o método de genotipagem baseado em gDNA desenvolvido permitirá uma triagem de alto rendimento destas mutações em populações de campo, possibilitando uma correlação com os métodos de monitoramento "*in vivo*" e fornecendo suporte a estratégias de manejo a serem adotadas.

4.5. Conclusões

- A resistência metabólica não é um dos principais mecanismos de resistência de *S. frugiperda* a inseticidas diamidas.
- A mutação I4734M no receptor de rianodina é verificada nos indivíduos da linhagem resistente de *S. frugiperda* a diamidas.
- Há baixa frequência da mutação I4734M nas populações de campo de *S. frugiperda* coletadas no ano agrícola 2018.

Referências

APRD - Arthropod Pesticide Resistance Database (2019), Michigan State University. http://www.pesticideresistance.org/ [accesso 30 de janeiro de 2019].

Burtet LM, Bernardi O, Melo AA, Pes MP, Strahl TT, Guedes JVC, Managing fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae), with Bt maize and insecticides in southern Brazil. *Pest Manag Sci* **73**:2567-2577 (2017).

Carvalho RA, Omoto C, Field LM, Williansom MS, Bass C, Investigating the molecular mechanism of organophosphate and pyrethroid resistance in the fall armyworm *Spodoptera frugiperda*. *PloS ONE* **8**:1-11 (2013).

Diez-Rodriguez GI, Omoto C, Herança da resistência de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera:Noctuidae) a lambda-cialotrina. *Neotrop Entomol* **30**:311-316 (2001).

Douris V, Papapostolou K, Ilias A, Roditakis E, Kounadi S, Riga M, Nauen R, Vontas J, Investigation of the contribution of RyR target-site mutations in diamide resistance by CRISPR/Cas9 genome modification in *Drosophila*. *Insect Biochem Mol Biol* **87**:127-135 (2017).

Farias JR, Andow DA, Horikoshi RJ, Sorgatto RJ, Fresia P, Santos AC, Omoto C, Field-evolved resistance to Cry1F maize by *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in Brazil. *Crop Prot* **64**:150-158 (2014).

ffrench-Constant RH, Daborn PJ, Goff GL, The genetics and genomics of insecticide resistance. *Trends Genet* **20**:163-170 (2004).

Finney DJ, Probit Analysis. Cambridge University Press, Cambridge, UK. p. 333 (1971).

Goergen G, Kumar PL, Sankung SB, Togola A, Tamò M, Fisrt report of outbreaks of the fall armyworm *Spodoptera frugiperda* (J E Smith) (Lepidoptera, Noctuidae), a new alien invasive pest in west and central Africa. *PLoS ONE* **11**:1-9 (2016).

Guo L, Liang P, Zhou X, Gao X, Novel mutations and mutation combinations of ryanodine receptor in a chlorantraniliprole resistant population of *Plutella xylostella* (L.). *Sci Rep* **4**:1-7 (2014)a.

Guo L, Wang Y, Zhou X, Li Z, Liu S, Pei L, Gao X, Functional analysis of a point mutation in the ryanodine receptor of *Plutella xylostella* (L.) associate with resistance to chlorantraniliprole. *Pest Manag Sci* **70**:1083-1089 (2014)b.

Gutiérrez-Moreno R, Mota-Sanchez D, Blanco CA, Whalon ME, Terám-Santafimio H, Rodriguez-Maciel JC, DiFonzo C, Field-Evolved Resistance of the Fall Armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) to Synthetic Insecticides in Puerto Rico and Mexico, *J Econ Entomol* (2018). DOI 10.1093/jee/toy372.

IRAC - Inseticide Resistance Action Committee, Resistance mechanisms (2019). https://www.irac-online.org/about/resistance/mechanisms/. [Acesso 30 de janeiro de 2019].

Lahm GP, Selby TP, Freudenberger JH, Stevenson TM, Myers BJ, Seburyamo G, Smith BK, Flexner L, Clark CE, Cordova D, Insecticidal anthranilic diamides: a new class of potent ryanodine receptor activators. Bioorg Med Chem Lett 15:4898-906 (2005).

Lai T, Li J, Su J. Monitoring of beer armyworm *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae) resistence to chlorantraniliprole in China. *Pestic Biochem Physiol* **101**: 198-205 (2011).

LeOra software, *Polo-plus: Probit and logit analysis computer program*, version 1.0, LeOra Software, Berkeley, CA (2002).

Lümmen P, Calcium channels as molecular target sites of novel insecticides, in *Advances in Insect Physiology*, vol. 44, ed. Cohen E. Academic Press, London, UK, pp. 287-347 (2013).

Nascimento RB, Farias JR, Bernardi D, Horikoshi RJ, Omoto C, Genetic basis of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) resistance to the chitin synthesis inhibitor lufenuron. *Pest Manag Sci* **72**:810-815 (2016).

Nauen R, Steinbach D, Resistance to diamides insecticides in Lepidopteran pests, in *Advances in insect control and resistance management*, ed. Horowitz R, Ishaaya I. Springer International Publishing, Suiça, pp. 219-240 (2016).

Okuma DM, Bernardi D, Horikoshi RJ, Bernardi O, Silva AP, Omoto C, Inheritance and fitness cost of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) resistance to spinosad in Brasil. *Pest Manag Sci* **74**:1441-1448 (2018).

Omoto C, Bernardi O, Salmeron E, Sorgatto RJ, Dourado PM, Crivellari A, Carvalho RA, Willse A, Martinelli S, Head GP, Field-evolved resistance to Cry1Ab maize by *Spodoptera frugiperda* in Brazil. *Pest Manag Sci* **72:**1727-1736 (2016).

Qi S, Casida JE, Species differences in chlorantraniliprole and flubendiamide insecticide binding sites in the ryanodine receptor. *Pestic Biochem Physiol* **107**:321-326 (2013).

Qi S, Lümmen P, Nauen R, Casida JE, Diamide insecticide target site specificity in the *Heliothis* and *Musca* ryanodine receptors relative to toxicity. *J Agric Food Chem* **62**:4077-4082 (2014).

Ribeiro RS. *Monitoramento da sucetibilidade de populações de* Spodoptera frugiperda *(J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) a inseticidas diamidas no Brasil*. Dissertação de mestrado, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil (2014).

Roditakis E, Steinbach D, Moritz G, Vasakis E, Stavrakaki M, Ilias A, García-Vidal L, Martínez-Aguirre MR, Bielza P, Morou E, Silva JE, Silva WM, Siqueira HAA, Iqbal S, Troczka BJ, Williamson MS, Bass C, Tsagkarakou A, Vontas J, Nauen R, Ryanodine receptor point mutations confer diamide insecticide resistance in tomato leafminer, *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae). *Insect Biochem Mol Biol* **80**:11-20, 2017.

Sattelle D, Cordova D, Cheerk TR, Insect ryanodine receptors: molecular targets for novel pest control chemicals. *Invertebr Neurosci* **8**:107-119 (2008).

Shylesha AN, Jalali SK, Gupta A, Varshney R, Venkatesan T, Shetty P, et al., Studies on new invasive pest *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) and its natural enemies. *J Biol Control* **32**:145-151 (2018).

Sial AA, Brunner JF, Selection for resistance, reversion towards susceptibility and synergism of chlorantraniliprole and spinetoram in obliquebanded leafroller, *Choristoneura rosaceana* (Lepidoptera: Tortricidae). *Pest Manag Sci* **68**:462-468 (2012).

Sparks AN, A review of the biology of the fall armyworm. *Fla. Entomol*. **62**:82-87 (1979).

Steinbach D, Gutbrod O, Lümmen P, Matthiesen S, Schorn C, Nauen R, Geographic spread, genetics and functional characteristics of ryanodine receptor based target-site resistance to diamide insecticides in diamondback moth, *Plutella xylostella*. *Insect Biochem Mol Biol* **63**:14-22 (2015).

Teixeira LA, Andarolo JT, Diamide insecticides: Global efforts to address insect resistance stewardship challenges. *Pestic Biochem Physiol* **106**:76-78 (2013).

Tohnishi M, Nakao H, Furuya T, Seo A, Kodama H, Tsubata K, Fujioka S, Kodama H, Hirooka T, Nishimatsu T, Flubendiamide, a novel insecticide highly active against lepidopterous insect 735 pests. *J Pestic Sci* **30**:354-360 (2005).

Troczka B, Zimmer CT, Elias J, Schorn C, Bass C, Davies TG, Field LM, Williamson MS, Slates R, Nauen R, Resistence to diamide inseticides in diamondback moth, *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae) is associated with a mutation in the membrane-spanning domain of the ryanodine receptor. *Insect Biochem Mol Biol* **42**:873-880 (2012).

Troczka BJ, Richardson E, Homem RA, Davies TGE, Na analysis of variability in genome organization of intracellular calcium release channels across insect orders. *Gene* **670**:70-86 (2018).

Untergasser A, Cutcutache I, Koressaar T, Ye J, Faircloth BC, Remm M and Rozen SG, Primer3-new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Res* **40**:e115 (2012).

Wang X, Wu S, Yang Y, Wu Y, Molecular characterization and mRNA expression of ryanodine receptor gene from diamondback moth, *Plutella xylostella*. *Pestic Biochem Physiol* **102**:204-212 (2012).

Yao R, Zhao DD, Zhang S, Zhou LQ, Wang X, Gao CF, Wu SF, Monitoring and mechanisms of insecticide resistance in *Chilo suppressalis* (Lepidoptera: Crambidae), with special reference to diamides. *Pest Manag Sci* **73**:1169-1178 (2017).

Zuo Y, Wang H, Xu Y, Huang J, Wu S, Wu Y, Yang Y, CRISPR/Cas9 mediated G4946E substitution in the ryanodine receptor of *Spodoptera exigua* confers high levels of resistance to diamide insecticides. *Insect Biochem Mol Biol* **89**:79-85 (2017).

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A resistência de insetos a inseticidas é um dos entraves da produção agrícola mundial, portanto prolongar a eficiência das diferentes táticas de controle é essencial garantir que o método a ser empregado seja eficiente. Estratégias de detecção e monitoramento, além de estudos que caracterizam as bases genéticas e moleculares da resistência, são fundamentais para que um programa de manejo da resistência seja estabelecido de forma proativa e eficiente. Neste estudo foram utilizados diferentes métodos para monitorar a resistência de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) a inseticidas diamidas no Brasil, além da caracterização das bases genéticas associadas à resistência de *S. frugiperda* a chlorantraniliprole e a identificação de um possível mecanismo de resistência associado a mutação nos receptores de rianodina.

Os resultados obtidos no monitoramento da resistência de *S. frugiperda* a inseticidas diamidas demonstram que estratégias de manejo da resistência em algumas regiões do país devem ser adotadas de maneira correta e urgente, a fins de se evitar falhas no controle em razão da evolução da resistência. Além disso, a herança da resistência de *S. frugiperda* a chlorantraniliprole foi caracterizada como autossômica, incompletamente recessiva e monogênica, características que favorecem uma rápida evolução da resistência, em razão da sobrevivência de heterozigotos e do número de genes associados à resistência. O estudo também verificou a ocorrência de resistência cruzada entre os inseticidas diamidas, característica que afeta a evolução da resistência no campo devido a seleção de indivíduos resistentes não somente por um inseticida. Também foi verificada a ocorrência de uma mutação (I4734M) no gene que codifica o receptor de rianodina na linhagem resistente a diamidas, esta mutação já foi associada à resistência a diamidas em outros lepidópteros-praga e pode estar relacionada a resistência de *S. frugiperda* a este grupo, entretanto a ocorrência de mutações não foi reportada em indivíduos coletados no campo no ano agrícola 2018.

Inseticidas diamidas representam uma excelente opção para o manejo de *S. frugiperda*, pois devido a suas características toxicológicas, este grupo pode ser usado em associação a outras táticas controle dentro de um programa de manejo integrado de pragas. Este estudo fornece informações para que táticas de manejo da resistência sejam implementadas com o objetivo de diminuir a frequência de resistência no campo, reduzir a pressão de seleção e prolongar a vida útil dos inseticidas diamidas no controle de *S. frugiperda*.