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

**Dinâmica da resistência a inseticidas diamidas em populações de
Helicoverpa armigera (Lepidoptera: Noctuidae) do Brasil**

Dyrson de Oliveira Abbade Neto

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

**Piracicaba
2021**

Dyrson de Oliveira Abbade Neto
Engenheiro Agrônomo

Dinâmica da resistência a inseticidas diamidas em populações de *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) do Brasil
versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

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

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

Piracicaba
2021

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

Abbade Neto, Dyrson de Oliveira

Dinâmica da resistência a inseticidas diamidas em populações de *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) do Brasil / Dyrson de Oliveira Abbade Neto. - - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2021.

84 p.

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

1. Manejo da resistência de insetos 2. Flubendiamide 3. Custo adaptativo 4. Herança da resistência I. Título

AGRADECIMENTOS

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

Ao Programa de Pós-Graduação em Entomologia da USP-ESALQ e professores por todo o conhecimento transmitido, estrutura e todas as oportunidades proporcionadas durante minha trajetória como aluno de doutorado.

Ao Professor Celso Omoto, orientador e exemplo de profissional, agradeço por todos os ensinamentos, orientação, confiança, amizade e todas as oportunidades proporcionadas.

À equipe “Helicoverpa”: Douglas Amado, Igor Marques, Mariana Durigan, Murilo Basso, Pedro Henrique Campos, Rogério Machado, Sandy Spinelli e Thaini Gonçalves por toda a ajuda na condução dos trabalhos, por tudo que vivenciamos juntos e pela amizade

Aos colegas do Laboratório de Resistência de Artropódes (ESALQ/USP): Aline Sartori Guidolin, Anderson Bolzan, Antônio Rogério Bezerra do Nascimento, Cristiane Tibola, Daniela Miyuki Okuma, Dionei Muraro, Ewerton Lira, José Paulo Bentivenha, Juliana Rodrigues, Fernando Semmelroth, Fernando Padovez, Giovana Campos, Guilherme Brassoloto, Gustavo Zambom, Ingrid Schmidt Kaiser, Leonardo Miraldo, Marcelo Mocheti, Nicole Rocha, Renato Horikoshi, Rubens Kanno, pelo convívio, amizade e troca de conhecimentos.

Aos grandes amigos feitos em Piracicaba, Emanuel Sanches, Gabriel Gesteira e Getulio Caixeta.

À Dra. Eloisa Salmeron e Janice Soares pela amizade, e por cuidarem de cada detalhe, organização e por fornecerem todo apoio necessário no Laboratório de Resistência de Artrópodes.

À minha noiva Maria Eduarda Rodrigues Real, por todo companherismo e apoio nas horas boas e mais difíceis, sempre me encorajando a me empenhar cada vez mais nos meus objetivos.

Aos meus pais Dyrrson de Oliveira Abbade Junior e Maria Teresa Machado Gardim, ao meu irmão Henrique Gardim Abbade e nora Helena Rohden Serafim, minha tia Ana Lúcia Machado Gardim, e meus primos Heitor e Daniel por todo o apoio, incentivo, amor e por vibrar junto comigo à cada conquista.

Aos colegas do curso de doutorado do Programa de Pós-Graduação em Entomologia pelo agradável convívio e amizades feitas durante as disciplinas.

A todos os colaboradores do Departamento de Entomologia e Acarologia em especial à Regina Botequio de Moraes, Marta Colletti, Andrea Sintoni e Francisco Prata por todo o apoio, atenção e assistência.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa e ao comitê do IRAC Brasil pelo apoio financeiro para a projeto durante o meu doutorado.

À bibliotecária Eliana Maria Garcia pelo auxílio na formatação deste trabalho.

A todos os que estiveram envolvidos nesta jornada, obrigado!

“Nenhum vento sopra a favor de quem não sabe onde ir”

Sêneca

SUMÁRIO

RESUMO.....	8
ABSTRACT.....	10
1 INTRODUÇÃO	11
REFERÊNCIAS.....	15
2. MONITORAMENTO DA SUSCETIBILIDADE A INSETICIDAS DIAMIDAS EM POPULAÇÕES DE <i>Helicoverpa armigera</i> (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE) NO BRASIL.....	21
RESUMO.....	21
ABSTRACT.....	21
2.1 INTRODUÇÃO	24
2.2 MATERIAL E MÉTODOS	23
2.2.1 Coleta de populações de <i>H. armigera</i>	23
2.2.2 Criação e manutenção das populações de <i>H. armigera</i>	26
2.2.3 Monitoramento da suscetibilidade de <i>H. armigera</i> no decorrer das safras agrícolas	26
2.2.4 Análise estatística.....	27
2.3 RESULTADOS.....	27
2.3.1 Monitoramento da suscetibilidade de <i>H. armigera</i> no decorrer das safras agrícolas	27
2.4 DISCUSSÃO	31
REFERÊNCIAS	34
3. SELEÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO PADRÃO DE HERANÇA DA RESISTÊNCIA DE <i>Helicoverpa armigera</i> (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE) A FLUBENDIAMIDE E RESISTÊNCIA CRUZADA A OUTROS INSETICIDAS DIAMIDAS	37
RESUMO.....	37
ABSTRACT.....	37
3.1 INTRODUCTION	40
3.2 MATERIAL E MÉTODOS	39
3.2.1 Manutenção das linhagens	39
3.2.2 Caracterização da resistência de <i>H. armigera</i> ao inseticida flubendiamide	40
3.2.3 Herança da resistência	41
3.2.3.1 Dominância da resistência	41
3.2.3.2 Número de genes associados à resistência	42
3.2.4 Resistência cruzada entre inseticidas diamidas em <i>H. armigera</i>	42
3.2.5 Dominância funcional da resistência.....	43
3.3 RESULTADOS.....	43

3.3.1 Caracterização da resistência de <i>H. armigera</i> ao inseticida flubendiamide	43
3.3.2 Padrão de herança da resistência.....	43
3.3.2.1 Dominância da resistência	44
3.3.2.4 Dominância funcional da resistência.....	49
3.4 DISCUSSÃO.....	51
REFERÊNCIAS.....	52
4. CUSTOS ADAPTATIVOS ASSOCIADOS À RESISTÊNCIA DE <i>HELICOVERPA ARMIGERA</i> (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE) A FLUBENDIAMIDE	61
RESUMO.....	59
ABSTRACT.....	61
4.1 INTRODUÇÃO	60
4.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	61
4.2.1 Insetos.....	61
4.2.2 Tabela de vida de fertilidade	62
4.2.3 Comportamento de defesa em relação ao predador <i>Podisus nigrispinus</i>	63
4.2.3.1 Criação de <i>P. nigrispinus</i>	63
4.2.3.2 Testes de comportamento de defesa.....	63
4.2.4 Estabilidade da resistência de <i>H. armigera</i> a flubendiamide em condições de laboratório	65
4.3 RESULTADOS.....	66
4.3.1 Custos adaptativos associados à resistência de <i>H. armigera</i> a flubendiamide	66
4.3.1.1 Tabela de vida de fertilidade.....	66
4.3.1.2 Comportamento em relação ao predador <i>P. nigrispinus</i>	69
4.3.2 Estabilidade da resistência de <i>H. armigera</i> a flubendiamide em condições de laboratório	71
4.4 DISCUSSÃO	74
REFERÊNCIAS.....	76
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	83

RESUMO

Dinâmica da resistência a inseticidas diamidas em populações de *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) do Brasil

A evolução da resistência a inseticidas é atribuída a diversos fatores envolvendo a espécie de inseto, o inseticida e o sistema agrícola, o que torna a dinâmica da resistência inconstante e dependente desses fatores. A pressão de seleção devido ao uso de inseticidas gera um aumento na frequência de indivíduos resistentes no ambiente. Na ausência da pressão de seleção pelo inseticida, há possibilidade de se verificar o restabelecimento da suscetibilidade atribuído à presença de custos adaptativos associados à resistência e/ou fluxo gênico de indivíduos suscetíveis de áreas não tratadas para as tratadas. Sendo assim, para entender a dinâmica da resistência a inseticidas diamidas em *Helicoverpa armigera* (Hübner) no Brasil foram conduzidos estudos de (i) Monitoramento da suscetibilidade aos inseticidas flubendiamide, chlorantraniliprole e cyantraniliprole em populações de *H. armigera* coletadas nas principais regiões produtoras do Brasil nas safras de 2014 a 2020; (ii) Seleção e caracterização do padrão de herança da resistência de *H. armigera* a flubendiamide e resistência cruzada a outros inseticidas diamidas; e (iii) Custos adaptativos associados à resistência de *H. armigera* a flubendiamide mediante condução de estudos de tabela de vida de fertilidade, comportamento de defesa contra o predador *Podisus nigrispinus* (Dallas) e estabilidade da resistência na ausência de pressão de seleção em uma população heterogênea formada por 50% de indivíduos suscetíveis e 50% de indivíduos resistentes. O monitoramento da suscetibilidade a inseticidas diamidas foi realizado com bioensaios de tratamento superficial da dieta artificial com doses diagnósticas (DL_{99}) de cada inseticida definidas previamente. Reduções significativas na suscetibilidade a esses inseticidas foram observadas em populações de *H. armigera* no decorrer das safras agrícolas, com porcentagens de sobrevivência nas doses diagnósticas aumentando de 0% na safra de 2014 para 3,75 a 54,5 % na penúltima safra avaliada - 2019, dependendo do inseticida e da localidade. A seleção da linhagem de *H. armigera* resistente a flubendiamide foi realizada a partir da população dessa praga coletada em Luis Eduardo Magalhães-BA em 2016, mediante uso de doses crescentes de 2,64 $\mu\text{g i.a.cm}^{-2}$ a 157,89 $\mu\text{g i.a.cm}^{-2}$ por ≈ 14 gerações. A razão de resistência obtida para flubendiamide foi > 50.000 vezes. O padrão de herança da resistência a flubendiamide foi definida como autossômica, incompletamente dominante e monogênica. Foi observada uma baixa resistência cruzada entre flubendiamide e os inseticidas chlorantraniliprole e cyantraniliprole, com uma razão de resistência de 4,7 e 5,6 vezes respectivamente. Pela análise dos resultados da tabela de vida de fertilidade, há custo adaptativo associado à resistência de *H. armigera* a flubendiamide, com redução de 35% na fecundidade das fêmeas resistentes e heterozigotas em comparação com as fêmeas suscetíveis. A presença de custo adaptativo também foi observada no comportamento de defesa de lagartas de terceiro ínstar de *H. armigera* contra o ataque de *P. nigrispinus*, afetando a linhagem resistente com a redução da distância percorrida em 47% e da velocidade de movimento em 36% quando comparadas com as linhagens suscetível e heterozigota, indicando assim que as lagartas resistentes podem ser mais suscetíveis a serem predadas por *P. nigrispinus*. Por fim, houve restabelecimento da suscetibilidade de *H. armigera* a flubendiamide na população heterogênea, com redução da frequência de resistência de 53,9% para 5,54% em 9 gerações na ausência de pressão de seleção. Os resultados do presente trabalho evidenciam alto risco de evolução da resistência de *H. armigera* a inseticidas diamidas no Brasil, principalmente devido ao caráter dominante da resistência e à presença de resistência cruzada entre inseticidas diamidas. Contudo, a resistência de *H. armigera* a flubendiamide foi altamente instável devido à presença de custos adaptativos associados a parâmetros biológicos e suscetibilidade à predação por *P. nigrispinus*. Portanto, a instabilidade da resistência de *H. armigera* a flubendiamide pode ser explorada em programas de manejo da resistência para preservar a vida útil de inseticidas diamidas no manejo dessa praga no Brasil.

Palavras-chave: Manejo da resistência de insetos, Flubendiamide, Custo adaptativo, Herança da resistência

ABSTRACT

Dynamics of resistance to diamide insecticides in populations of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) from Brazil

The evolution of resistance to insecticides is attributed to several factors involving the insect species, the insecticide and the agricultural system, which make the dynamics of resistance inconstant and dependent on these factors. The selection pressure imposed by the use of insecticides increases the frequency of resistant individuals in the environment. On the other hand, resetting to susceptibility may be possible in the absence of selection pressure due to fitness costs associated with resistance and/or immigration of susceptible individuals from non-treated to treated areas. Thus, to understand the dynamics of resistance to diamide insecticides in *Helicoverpa armigera* (Hübner) in Brazil, we conducted studies of (i) monitoring the susceptibility to flubendiamide, chlorantraniliprole and cyantraniliprole insecticides in populations of *H. armigera* collected from major Brazilian crop growing regions from 2014 to 2020 seasons; (ii) selection and characterization of the inheritance of resistance of *H. armigera* to flubendiamide and cross-resistance to other diamide insecticides; and (iii) fitness costs associated with resistance of *H. armigera* to flubendiamide by conducting studies of life and fertility tables, defense behavior against the predator *Podisus nigrispinus* (Dallas) and stability of resistance in the absence of selection pressure in a heterogeneous population composed of 50% of susceptible individuals and 50% of resistant individuals. The monitoring of the susceptibility to diamide insecticides was conducted with diet-overlay bioassays with diagnostic doses (LD_{99}) for each insecticide were used in this study. Significant reductions in the susceptibility to these insecticides were observed in populations of *H. armigera* throughout cropping seasons. The survival rates at diagnostic doses increased from 0% in the 2014 season to 3.75 a 54.5% in the 2019 season, depending on the insecticide and the region. The selection of the resistant strain was conducted in a population of *H. armigera* collected in Luis Eduardo Magalhães, Bahia State, in 2016, with the use of increasing doses from 2.64 a.i.cm⁻² to 157.89 µg a.i.cm⁻² for $\approx$ 14 generations. The resistance ratio obtained to flubendiamide was > 50,000 fold. The inheritance pattern of resistance to flubendiamide was defined as autosomal, incompletely dominant and monogenic. There was a low cross-resistance between flubendiamide and the chlorantraniliprole and cyantraniliprole, with resistance ratios of 4.7 and 5.6-fold respectively. Based on life and fertility table analysis, there is a fitness cost associated with *H. armigera* resistance to flubendiamide, with 35% reduction in the fertility of resistant and heterozygous females in compare to susceptible ones. There is also fitness cost in the defense behavior of third instar larvae of *H. armigera* against the attack of *P. nigrispinus* with reduction of 47% in the distance covered and 36% in the speed movement of resistant larvae in compared to susceptible and heterozygous ones, suggesting that resistant larvae can be more susceptible to predation by *P. nigrispinus*. Finally, resetting to susceptibility of *H. armigera* to flubendiamide was detected in the heterogeneous population, with reduction in the frequency of resistance from 53.9% to 5.54% in 9 generations in the absence of selection pressure. Based on the results of this study, there is a high risk of resistance evolution of *H. armigera* to diamide insecticides in Brazil, mainly due to the genetic dominance of the resistance and the presence of cross-resistance between diamide insecticides. However, the resistance of *H. armigera* to flubendiamide was highly unstable due to fitness costs associated with life history traits and susceptibility to predation by *P. nigrispinus*. Thus, the instability of the resistance of *H. armigera* to flubendiamide can be exploited in resistance management programs to preserve the lifetime of the diamide insecticides to manage this pest in Brazil.

Keywords: Insect resistance management, Flubendiamide, Fitness cost, Inheritance of resistance

1 INTRODUÇÃO

A evolução da resistência a inseticidas é um dos grandes desafios no manejo de pragas em todo o mundo, visto que o controle químico tem sido uma das táticas mais utilizadas (Whalon et al. 2008; Pretty & Bharucha 2015). A cada ano o número de casos de resistência a inseticidas e proteínas Bt tem aumentado no mundo (Mota-Sanchez & Wise, 2020; Nauen et al., 2019). O aumento da frequência de indivíduos resistentes pode acarretar falhas de controle, tornando a resistência um problema econômico (Dennehy, 1987; Tabashnik et al. 2014). A evolução da resistência a inseticidas é atribuída a muitos fatores, tais como o cenário agrícola e métodos de controle implementados, o inseticida utilizado, o mecanismo de resistência e o padrão de herança da resistência (Roush & Daly 1990; Roush & McKenzie 1987; Georgiou & Taylor 1977a, b). Portanto, a dinâmica da resistência a inseticidas varia geográfica e temporalmente para uma determinada espécie de inseto praga (Georgiou, 1972).

Estudos de dinâmica da resistência visam monitorar as alterações na suscetibilidade a inseticidas ao longo do tempo no ambiente, mas pode ser também estudada em ambientes controlados, na ausência de pressão de seleção com inseticidas, a fim de compreender a estabilidade da resistência (Bird et al., 2020; Clarke & McKenzie, 1987; Georgiou 1972, 1983; Roush & McKenzie 1987). A caracterização do padrão de herança da resistência e custos adaptativos podem explicar o direcionamento da evolução da resistência (ffrench-Constant & Bass 2017; Roush & McKenzie 1987; Roush & Daly 1990). Portanto, o conhecimento da dinâmica da resistência é essencial para o desenvolvimento de estratégias de manejo de resistência de insetos (MRI).

As estratégias de MRI são componentes fundamentais em programas de manejo integrado de pragas (MIP) nos diversos agroecossistemas que utilizam produtos químicos (Forrester, 1990). A implementação destas estratégias não depende apenas da adoção do uso racional dos inseticidas mediante a redução de uso e a rotação de inseticidas com diferentes modos de ação (Georgiou, 1983), mas também do conhecimento de fatores genéticos e bioecológicos ligados à evolução da resistência (ffrench-Constant & Bass 2017; Roush & Daly 1990). Neste contexto, o monitoramento da suscetibilidade, avaliação do custo adaptativo associado a resistência, estimativa de intervalos mínimos para o restabelecimento da suscetibilidade, dentre outros fatores, ajudam a dimensionar estratégias efetivas de manejo da resistência (Georgiou, 1972; Dennehy, 1987; Roush & McKenzie, 1987; Tabashnik, 1989).

O monitoramento da suscetibilidade permite detectar as alterações na suscetibilidade a inseticidas em populações de insetos pragas antes que a frequência crítica de resistência seja atingida, possibilitando a tomada de decisão para o controle e, principalmente, retardar a evolução da resistência (Roush & Miller 1986). Uma das formas mais eficientes para avaliar a frequência de

indivíduos resistentes tem sido o monitoramento mediante o uso da dose diagnóstica (DL_{99}), ou seja, a dose capaz de matar 99% dos insetos estimada a partir de estudos de linhas básicas de suscetibilidade de uma praga a um determinado inseticida (ffrench-Constant & Roush, 1990; Roush & Miller 1986). As informações sobre variação de suscetibilidade ao longo do tempo são importantes para a tomada de medidas proativas de manejo da resistência. Sem dúvida, estratégias preventivas de manejo da resistência são mais efetivas que as estratégias curativas (Dennehy 1987; Georgiou, 1972; Roush & McKenzie 1987).

Os estudos de padrão de herança da resistência permitem definir se a herança da resistência é autossômica, ligada ao sexo ou mitocondrial; se a dominância da resistência é dominante ou recessiva; além de definir se a herança é monogênica ou poligênica (ffrench-Constant & Roush, 1990; Georgiou & Taylor 1977; Roush & Miller 1986). Esses fatores podem favorecer ou não a evolução da resistência, por isso precisam ser conhecidos para implementação de estratégias de MRI. Uma das estratégias comumente utilizadas, consiste em diminuir a pressão de seleção de um inseticida, aplicando outro com modo de ação diferente, mas para essa estratégia ser implementada assume-se que não há resistência cruzada entre os inseticidas utilizados na rotação e presença de custo adaptativo associado à resistência (Roush & McKenzie, 1987; Tabashnik, 1989, 1994; Tabashnik et al., 2005).

A resistência pode ser acompanhada de custo adaptativo evidenciado por desvantagens biológicas, fisiológicas e/ou comportamentais (ffrench-Constant & Bass, 2017; Gassmann et al., 2009; Rivero et al., 2011). Os efeitos pleiotrópicos de genes associados a resistência podem afetar outras características fenotípicas (Freeman et al., 2021; Rostant et al., 2017; Foster et al., 2003), tais como uma menor viabilidade total, menor fecundidade, maior tempo para o desenvolvimento, menor competitividade para o acasalamento (Passos & Siqueira, 2019), redução da capacidade dos insetos resistentes em suportarem a fase de diapausa (Bird et al., 2020), entre outros (ffrench-Constant & Bass, 2017; Freeman et al., 2021).

O custo adaptativo pode ser explorado nas estratégias de MRI pois ele desfavorece os indivíduos resistentes na ausência da pressão de seleção com inseticida, possibilitando retardar a evolução da resistência e restabelecer a suscetibilidade (Tabashnik, 1994; Tabashnik et al., 2005). A instabilidade da resistência pode ser explorada em programas de MRI estimando o intervalo mínimo para o restabelecimento da suscetibilidade, possibilitando assim a utilização da mesma molécula inseticida, sem que haja aumento líquido da frequência de resistência (Clarke & McKenzie, 1987; Dennehy, 1987). Esta estratégia foi implementada, por exemplo, para o manejo da resistência de *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) a piretroides na Austrália mediante a restrição do uso desses inseticidas somente por um período de 42 dias, correspondente

ao período crítico de infestação dessa praga na cultura do algodoeiro, o que resultou no retardamento da evolução da resistência (Forrester & Cahill, 1987). Outros estudos realizados na China demonstraram que após a adoção de algodão transgênico, houve redução no uso de inseticidas, observando-se o restabelecimento da suscetibilidade de *H. armigera* aos inseticidas utilizados para o seu controle, tais como piretroides, organofosforados e inibidores de biosíntese de quitina (Wu et al., 2005).

O cenário da agricultura tropical favorece a evolução da resistência a inseticidas, uma vez que inúmeras pragas são polípagas e se encontram em elevados níveis populacionais durante todo o ano em diferentes culturas (Haan et al., 2020; Oliveira et al., 2014), tornando necessário a adoção de medidas de controle, principalmente com uso de inseticidas. Dentre os insetos pragas presentes no Brasil, *H. armigera* se destaca por ser uma praga invasora polífaga que foi relatada pela primeira vez no Brasil em 2013 (Czepak et al., 2013; Specht et al., 2013), podendo ser encontrada em muitas regiões produtoras do país nas mais variadas culturas como soja, algodão, milho, feijão e tomate (Sosa-Gómez et al., 2016) com capacidade de voo que pode chegar a 1000 metros por dia (Feng et al., 2009; Hackett & Gatehouse, 1982). Esta praga é oriunda dos países do Velho Mundo (Tay et al., 2017), região em que populações de *H. armigera* demonstram dificuldade de controle em virtude dos mais de 840 casos de resistência reportados (Mota-Sanchez & Wise, 2020) para diferentes grupos de inseticidas, tais como oxadiazinas (Bird et al., 2020), carbamatos (Gunning et al., 1996), organofosforados (Gunning et al., 1998), piretroides (Armes et al. 1992), espinosinas (Wang et al., 2009) e proteínas Bt (Mahon et al., 2007).

As populações de *H. armigera* no Brasil apresentam baixa suscetibilidade aos piretroides, que se deve ao gene citocromo P450 CYP337B3 presente em mais de 95% das populações brasileiras (Durigan et al., 2017). O manejo dessa praga no Brasil vem sendo realizado efetivamente nas cultura da soja e algodão com uso de plantas expressando a proteína Cry1Ac (Dourado et al., 2016). No entanto conforme mencionado, *H. armigera* é uma praga polífaga que ataca outras culturas que não apresentam eventos transgênicos eficientes para seu controle, além do uso de soja e algodão convencional em alguns sistemas de produção e em áreas de refúgios que necessitam de táticas eficazes de controle, pois na ausência do controle as perdas de produtividade podem chegar a 60% (Stacke et al., 2018; Torres-Vila et al., 2003).

Dentre os grupos químicos de inseticidas recomendados para o controle de *H. armigera* no Brasil, destacam-se as diamidas por não haver relatos de resistência para essa espécie no mundo, além desse grupo químico apresentar grande eficiência no controle de lepidópteros pragas (Kato et al., 2009). As diamidas atuam ligando-se a receptores de rianodina dos insetos das células musculares, fazendo com que os canais de Ca^{+2} se abram e promovam uma saída descontrolada

desse íon do estoque interno da célula, provocando paralisia muscular e consequentemente a morte do inseto (Cordova et al., 2006). Embora mamíferos também possuam receptores de rianodina, existe uma diferença significativa entre a sequência da codificação de proteínas entre insetos e mamíferos, de modo que as diamidas sejam mais seletivos aos mamíferos (Jeanguenat, 2013; Lahm et al., 2007; Sattelle et al., 2008). Esse grupo químico é um grande aliado para os programas de MIP por apresentarem seletividade a *Podisus nigrispinus* (Dallas) (Hemiptera: Pentatomidae) e *Trichogramma galloi* (Zucchi) (Hymenoptera: Trichogrammatidae), que são importantes inimigos naturais de *H. armigera* (De Oliveira et al., 2016; Gontijo et al., 2018; Oliveira et al., 2013; Simonato et al., 2020).

Os inseticidas diamidas são divididos em dois subgrupos, o ácido ftálico com o ingrediente ativo flubendiamide e as diamidas antranílicas composta pelos ingredientes ativos: chlorantraniliprole e cyantraniliprole, tetraniliprole e cyclaniliprole. O primeiro ingrediente ativo desenvolvido foi o flubendiamide, lançado para fins comerciais em 2007 (Jeanguenat, 2013). Apesar de as diamidas estarem no mercado há pouco mais de uma década, existem vários relatos de lepidópteros pragas resistentes a esse grupo químico como: *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) (Bolzan et al., 2019), *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae) (Silva et al., 2019), *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae) (Zuo et al., 2017), *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae) (Wang et al., 2013). No Brasil, a caracterização das linhas-básicas de suscetibilidade de *H. armigera* a inseticidas diamidas (flubendiamide, chlorantraniliprole e cyantraniliprole), bem como o monitoramento da suscetibilidade nas safras 2014 -2016, demonstrou alta suscetibilidade na primeira safra monitorada, porém ocorreu a redução da suscetibilidade nas safras seguintes (Pereira 2017). Diante desses importantes estudos e dos inúmeros casos de resistência de insetos a diamidas, o aumento do uso desse grupo químico em pulverizações foliares e tratamentos de sementes (Nauen et al., 2019), e as dificuldades e encarecimento em desenvolver novas moléculas inseticidas (McDougall, 2016; Sparks, 2013), estratégias de MRI devem ser implementadas para retardar a evolução da resistência dos inseticidas hoje existentes.

Considerando que *H. armigera* é uma praga polífaga invasora que possui um histórico que indica alta capacidade de evolução da resistência a diversos inseticidas, tornando-a de difícil controle. O objetivo desse trabalho foi gerar subsídio para o desenvolvimento de estratégias de manejo da resistência de *H. armigera* a inseticidas diamidas, mediante melhor compreensão da dinâmica da resistência a inseticidas diamidas em populações de *H. armigera* das principais regiões produtoras do Brasil. Para tanto, foram realizados os seguintes estudos:

- Monitoramento da suscetibilidade a inseticidas diamidas em populações de *H. armigera* no Brasil (Capítulo 2);

- Seleção e caracterização do padrão de herança da resistência de *H. armigera* a flubendiamide e resistência cruzada a outros inseticidas diamidas (Capítulo 3); e
- Custos adaptativos associados à resistência de *H. armigera* a flubendiamide (Capítulo 4).

REFERÊNCIAS

- Armes, N. J. et al. Insecticide resistance in *Helicoverpa armigera* in South India. *Pesticide science*, v. 34, n. 4, p. 355–364, 1992.
- Bird, L.J., Drynan, L.J., Walker, P.W., 2020. Relative fitness and stability of resistance in a near-isogenic strain of indoxacarb resistant *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). *Pest Manag. Sci.* 76, 4077–4085. <https://doi.org/10.1002/ps.5962>
- Bolzan, A., Padovez, F.E.O., Nascimento, A.R.B., Kaiser, I.S., Lira, E.C., Amaral, F.S.A., Kanno, R.H., Malaquias, J.B., Omoto, C., 2019. Selection and characterization of the inheritance of resistance of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) to chlorantraniliprole and cross-resistance to other diamide insecticides 2019. <https://doi.org/10.1002/ps.5376>
- Clarke, G.M., Mckenzie, J.A., 1987. Developmental stability of insecticide resistant phenotypes in blowfly; a result of canalizing natural selection. *Nature* 325, 345–346. <https://doi.org/10.1038/325345a0>
- Cordova, D., Benner, E.A., Sacher, M.D., Rauh, J.J., Sopa, J.S., Lahm, G.P., Selby, T.P., Stevenson, T.M., Flexner, L., Gutteridge, S., Rhoades, D.F., Wu, L., Smith, R.M., Tao, Y., 2006. Anthranilic diamides: A new class of insecticides with a novel mode of action, ryanodine receptor activation. *Pestic. Biochem. Physiol.* 84, 196–214. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2005.07.005>
- Czepak, C., Albernaz, K.C., Vivan, L.M., Guimarães, H.O., Carvalhais, T., 2013. Primeiro registro de ocorrência de *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) no Brasil. *Pesqui. Agropecuária Trop.* 43, 110–113. <https://doi.org/10.1590/S1983-40632013000100015>
- De Oliveira, H.N., Simonato, J., Glaeser, D.F., Pereira, F.F., 2016. Parasitism of *Helicoverpa armigera* pupae (Lepidoptera: Noctuidae) by *Tetrastichus howardi* and *Trichospilus diatraeae* (Hymenoptera: Eulophidae). *Semin. Agrar.* 37, 111–115. <https://doi.org/10.5433/1679-0359.2016v37n1p111>
- Dennehy, T.J., 1987. Decision-making for managing pest resistance to pesticides, in: Ford, M.G., Hollaman, D.W., Khambay, B.P.S., Sawiki, R.M. (Eds.), *Combating Resistance to Xenobiotics : Biological and Chemical Approaches*. Ellis Horwood, Chichester, England, pp. 118–126.

- Dourado, P.M., Bacalhau, F.B., Amado, D., Carvalho, R.A., 2016. High Susceptibility to Cry1Ac and Low Resistance Allele Frequency Reduce the Risk of Resistance of *Helicoverpa armigera* to Bt Soybean in Brazil 1–15. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0161388>
- Durigan, M.R., Corrêa, A.S., Pereira, R.M., Leite, N.A., Amado, D., Sousa, D.R. De, Omoto, C., 2017. High frequency of CYP337B3 gene associated with control failures of *Helicoverpa armigera* with pyrethroid insecticides in Brazil. *Pestic. Biochem. Physiol.* 143, 73–80. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2017.09.005>
- Feng, H., Wu, X., Wu, B., Wu, K., 2009. Seasonal Migration of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) Over the Bohai Sea. *J. Econ. Entomol.* 102, 95–104. <https://doi.org/10.1603/029.102.0114>
- French-Constant, R.H., Bass, C., 2017. Does resistance really carry a fitness cost? *Curr. Opin. Insect Sci.* 21, 39–46. <https://doi.org/10.1016/j.cois.2017.04.011>
- French-Constant, R.H., Roush, R.T., 1990. Resistance Detection and Documentation: The Relative Roles of Pesticidal and Biochemical Assays, in: *Pesticide Resistance in Arthropods*. SPRINGER, Boston, MA, pp. 4–38.
- Forrester, N.W., 1990. Designing, implementing and servicing an insecticide resistance management strategy. *Pestic. Sci.* 28, 167–179. <https://doi.org/10.1002/ps.2780280205>
- Forrester, N.W., Cahill, M., 1987. Management of insecticide resistance in *Heliothis armigera* in Australia. *Combat. Resist. to Xenobiotics. Biol. Chem. Approaches* 127–137.
- Foster, S.P., Young, S., Williamson, M.S., Duce, I., Denholm, I., Devine, G.J., 2003. Analogous pleiotropic effects of insecticide resistance genotypes in peach-potato aphids and houseflies. *Heredity (Edinb.)* 91, 98–106. <https://doi.org/10.1038/sj.hdy.6800285>
- Freeman, J.C., Smith, L.B., Silva, J.J., Fan, Y., Sun, H., Scott, J.G., 2021. Fitness studies of insecticide resistant strains: Lessons learned and future directions. *Pest Manag. Sci.* <https://doi.org/10.1002/ps.6306>
- Gassmann, A.J., Carrière, Y., Tabashnik, B.E., 2009. Fitness costs of insect resistance to *Bacillus thuringiensis*. *Annu. Rev. Entomol.* 54, 147–163. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.54.110807.090518>
- Georghiou, G.P., 1983. Management of resistance in arthropods, in: Georghiou, G.P., Saito, T. (Eds.), *Pest Resistance to Pesticides*. Springer US, pp. 769–792.
- Georghiou, G.P., 1980. Insecticide resistance and prospects for its Management. *Residue Rev.* 76, 131–145. https://doi.org/10.1007/978-1-4612-6107-0_6
- Georghiou, G.P., 1972. The Evolution of Resistance to Pesticides. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 3, 133–168. <https://doi.org/10.1146/annurev.es.03.110172.001025>

- Georghiou, G.P., Taylor, C.E., 1977. Genetic and biological influences in the evolution of insecticide resistance. *J. Econ. Entomol.* 70, 319–323. <https://doi.org/10.1093/jee/70.3.319>
- Georghiou, G.P., Taylor, C.E., 1977. Operational Influences in the Evolution of Insecticide Resistance. *J. Econ. Entomol.* 70, 653–658. <https://doi.org/10.1093/jee/70.5.653>
- Gontijo, P.C., Abbade Neto, D.O., Oliveira, R.L., Michaud, J.P., Carvalho, G.A., 2018. Non-target impacts of soybean insecticidal seed treatments on the life history and behavior of *Podisus nigrispinus*, a predator of fall armyworm. *Chemosphere* 191, 342–349. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.10.062>
- Gunning, R. V., Moores, G.D., Devonshire, A.L., 1998. Insensitive acetylcholinesterase and resistance to organophosphates in australian *Helicoverpa armigera*. *Pestic. Biochem. Physiol.* 62, 147–151. <https://doi.org/10.1006/pest.1998.2380>
- Gunning, R. V., Moores, G.D., Devonshire, A.L., 1996. Insensitive acetylcholinesterase and resistance to thiodicarb in australian *Helicoverpa armigera* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae). *Pestic. Biochem. Physiol.* 55, 21–28. <https://doi.org/10.1006/pest.1996.0031>
- Hackett, D.S., Gatehouse, A.G., 1982. Studies on the biology of *Heliothis spp.* in Sudan [Cotton pest]. *Proc. Int. Work. Heliothis Manag. ICRISAT Center, Patancheru, India, 15-20 Novemb. 1981* / Ed. W. Reed V. Kumble.
- Haan, N.L., Zhang, Y., Landis, D.A., 2020. Predicting Landscape Configuration Effects on Agricultural Pest Suppression. *Trends Ecol. Evol.* <https://doi.org/10.1016/j.tree.2019.10.003>
- Jeanguenat, A., 2013. The story of a new insecticidal chemistry class: the diamides. *Pest Manag. Sci.* 69, 7–14. <https://doi.org/10.1002/ps.3406>
- Kato, K., Kiyonaka, S., Sawaguchi, Y., Tohnishi, M., Masaki, T., Yasokawa, N., Mizuno, Y., Mori, E., Inoue, K., Hamachi, I., Takeshima, H., Mori, Y., 2009. Molecular characterization of flubendiamide sensitivity in the lepidopterous ryanodine receptor Ca^{2+} release channel. *Biochemistry* 48, 10342–10352. <https://doi.org/10.1021/bi900866s>
- Lahm, G.P., Stevenson, T.M., Selby, T.P., Freudenberger, J.H., Cordova, D., Flexner, L., Bellin, C.A., Dubas, C.M., Smith, B.K., Hughes, K.A., Hollingshaus, J.G., Clark, C.E., Benner, E.A., 2007. Rynaxypyr: A new insecticidal anthranilic diamide that acts as a potent and selective ryanodine receptor activator. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* 17, 6274–6279. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2007.09.012>

- Mahon, R.J., Olsen, K.M., Downes, S., Addison, S., 2007. Frequency of Alleles Conferring Resistance to the Bt Toxins Cry1Ac and Cry2Ab in Australian Populations of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). J. Econ. Entomol. 100, 1844–1853. <https://doi.org/10.1093/jee/100.6.1844>
- McDougall, P., 2016. The Cost of New Agrochemical Product Discovery, Development and Registration in 1995 , 2000 and R&D expenditure in 2007 and expectations for 2012. Final Report A Consultancy Study for Crop Life America and the European Crop Protection Association Januar.
- Mota-Sanchez, D., Wise, J.C., 2020. Arthropod Pesticide Resistance Database [WWW Document]. Michigan State Univ. URL <http://www.pesticideresistance.org>
- Nauen, R., Slater, R., Sparks, T.C., Elbert, A., 2019. IRAC : Insecticide Resistance and Mode - of - action Classification of Insecticides 5–8.
- Oliveira, H.N., Antigo, M. de R., de Carvalho, G.A., Glaeser, D.F., Pereira, F.F., 2013. Selectivity of insecticides used in the sugar-cane on adults of *Trichogramma galloi* Zucchi (Hymenoptera: Trichogrammatidae). Biosci. J. 29, 1266–1273.
- Oliveira, C.M., Auad, A.M., Mendes, S.M., Frizzas, M.R., 2014. Crop losses and the economic impact of insect pests on Brazilian agriculture. Crop Prot. 56, 50–54. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2013.10.022>
- Pereira R. Caracterização da suscetibilidade a inseticidas diamidas e espinosinas em populações de *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) do Brasil. Universidade de São Paulo - ESALQ; 2017.
- Pretty, J., Bharucha, Z., 2015. Integrated Pest Management for Sustainable Intensification of Agriculture in Asia and Africa. Insects 6, 152–182. <https://doi.org/10.3390/insects6010152>
- Rivero, A., Magaud, A., Nicot, A., Vézilier, J., 2011. Energetic Cost of Insecticide Resistance in *Culex pipiens* Mosquitoes. J. Med. Entomol. 48, 694–700. <https://doi.org/10.1603/ME10121>
- Rostant, W.G., Bowyer, J., Coupland, J., Facey, J., Hosken, D.J., Wedell, N., 2017. Pleiotropic Effects of DDT Resistance on Male Size and Behaviour. Behav. Genet. 47, 449–458. <https://doi.org/10.1007/s10519-017-9850-6>
- Roush, R., Daly, J., 1990. The role of population genetics in resistance research and management, in: Pesticide Resistance in Arthropods, in: Roush, R., Tabashnik, B. (Eds.), . Chapman and Hall, New York, NY, pp. 97–152.
- Roush, R.T., McKenzie, J.A., 1987. Ecological genetics of insecticide and acaricide resistance. Annu. Rev. Entomol. 32, 361–380.

- Roush, R.T., Miller, G.L., 1986. Considerations for Design of Insecticide Resistance Monitoring Programs. *J. Econ. Entomol.* 79, 293–298. <https://doi.org/10.1093/jee/79.2.293>
- Sattelle, D.B., Cordova, D., Cheek, T.R., 2008. Insect ryanodine receptors: Molecular targets for novel pest control chemicals. *Invertebr. Neurosci.* 8, 107–119. <https://doi.org/10.1007/s10158-008-0076-4>
- Silva, Jefferson E, Lillian, Da, M., Ribeiro, S., Vinasco, N., Narciso, R., Guedes, C., Herbert, ., Siqueira, Á.A., 2019. Field-evolved resistance to chlorantraniliprole in the tomato pinworm *Tuta absoluta*: inheritance, cross-resistance profile, and metabolism. *J. Pest Sci.* (2004). 92, 1421–1431. <https://doi.org/10.1007/s10340-018-1064-z>
- Simonato, J., Oliveira, H.N. de, Grigolli, J.F.J., Grigolli, M.M.K., Silva, I.F. da, 2020. Potential of Predator *Podisus nigrispinus* Dallas (Hemiptera: Pentatomidae) in the Control of *Helicoverpa armigera* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae). *J. Agric. Sci.* 12, 204. <https://doi.org/10.5539/jas.v12n3p204>
- Sosa-Gómez, D.R., Specht, A., Paula-Moraes, S. V., Lopes-Lima, A., Yano, S.A.C., Micheli, A., Morais, E.G.F., Gallo, P., Pereira, P.R.V.S., Salvadori, J.R., Botton, M., Zenker, M.M., Azevedo-Filho, W.S., 2016. Timeline and geographical distribution of *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera, Noctuidae: Heliothinae) in Brazil. *Rev. Bras. Entomol.* 60, 101–104. <https://doi.org/10.1016/j.rbe.2015.09.008>
- Sparks, T.C., 2013. Insecticide discovery: An evaluation and analysis. *Pestic. Biochem. Physiol.* 107, 8–17. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2013.05.012>
- Specht, A., Sosa-Gómez, D.R., Paula-Moraes, S.V. de, Yano, S.A.C., 2013. Identificação morfológica e molecular de *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) e ampliação de seu registro de ocorrência no Brasil. *Pesqui. Agropecuária Bras.* 48, 689–692. <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2013000600015>
- Stacke, R.F., Arnemann, J.A., Rogers, J., Stacke, R.S., Strahl, T.T., Perini, C.R., Dossin, M.F., Pozebon, H., de Arruda Cavallin, L., Guedes, J.V.C., 2018. Damage assessment of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) in soybean reproductive stages. *Crop Prot.* 112, 10–17. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2018.05.002>
- Tabashnik, B.E., 1994. Evolution of Resistance to *Bacillus thuringiensis*. *Annu. Rev. Entomol.* 39, 47–79. <https://doi.org/10.1146/annurev.en.39.010194.000403>
- Tabashnik, B.E., 1989. Managing Resistance with Multiple Pesticide Tactics: Theory, Evidence, and Recommendations. *J. Econ. Entomol.* 82, 1263–1269. <https://doi.org/10.1093/jee/82.5.1263>

- Tabashnik, B.E., Dennehy, T.J., Carrière, Y., 2005. Delayed resistance to transgenic cotton in pink bollworm. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 15389–15393. <https://doi.org/10.1073/pnas.0507857102>
- Tabashnik, B.E., Mota-Sanchez, D., Whalon, M.E., Hollingworth, R.M., Carrière, Y., 2014. Defining terms for proactive management of resistance to Bt crops and pesticides. *J. Econ. Entomol.* 107, 496–507. <https://doi.org/10.1603/EC13458>
- Tay, W.T., Walsh, T.K., Downes, S., Anderson, C., Jermini, L.S., Wong, T.K.F., Piper, M.C., Chang, E.S., Macedo, I.B., Czepak, C., Behere, G.T., Silvie, P., Soria, M.F., Frayssinet, M., 2017. Mitochondrial DNA and trade data support multiple origins of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera, Noctuidae) in Brazil. *Nat. Publ. Gr.* 1–10. <https://doi.org/10.1038/srep45302>
- Torres-Vila, L.M., Rodríguez-Molina, M.C., Lacasa-Plasencia, A., 2003. Impact of *Helicoverpa armigera* larval density and crop phenology on yield and quality losses in processing tomato: Developing fruit count-based damage thresholds for IPM decision-making. *Crop Prot.* 22, 521–532. [https://doi.org/10.1016/S0261-2194\(02\)00205-3](https://doi.org/10.1016/S0261-2194(02)00205-3)
- Wang, D., Qiu, X., Ren, X., Niu, F., Wang, K., 2009. Resistance selection and biochemical characterization of spinosad resistance in *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae). *Pestic. Biochem. Physiol.* 95, 90–94. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2009.07.003>
- Wang, X., Khakame, S.K., Ye, C., Yang, Y., Wu, Y., 2013. Characterisation of field-evolved resistance to chlorantraniliprole in the diamondback moth, *Plutella xylostella*, from China. *Pest Manag. Sci.* 69, 661–665. <https://doi.org/10.1002/ps.3422>
- Whalon, M.E., Mota-Sanchez, D., Hollingworth, R.M., 2008. Global pesticide resistance in arthropods. CABI, Cambridge.
- Wu, K., Mu, W., Liang, G., Guo, Y., 2005. Regional reversion of insecticide resistance in *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera : Noctuidae) is associated with the use of Bt cotton in northern China 498, 491–498. <https://doi.org/10.1002/ps.999>
- Zuo, Y., Wang, H., Xu, Y., Huang, J., Wu, S., Wu, Y., Yang, Y., 2017. 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. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2017.09.005>

2. MONITORAMENTO DA SUSCETIBILIDADE A INSETICIDAS DIAMIDAS EM POPULAÇÕES DE *Helicoverpa armigera* (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE) NO BRASIL

RESUMO

Os inseticidas diamidas têm sido amplamente utilizados no controle de *Helicoverpa armigera* (Hübner) desde a detecção oficial dessa praga no Brasil em 2013. Para uma melhor compreensão da dinâmica da resistência de *H. armigera* a inseticidas diamidas, no presente estudo foi conduzido o monitoramento da suscetibilidade aos inseticidas flubendiamide, chlorantraniliprole e cyantraniliprole em populações de *H. armigera* coletadas nas principais regiões produtoras de soja e algodão do Brasil nas safras de 2014 a 2020. Foram realizados bioensaios de tratamento superficial da dieta artificial com doses diagnósticas (DL₉₉) de cada inseticida definidas previamente. Reduções significativas na suscetibilidade a esses inseticidas foram observadas em populações de *H. armigera* no decorrer das safras agrícolas, com porcentagens de sobrevivência nas doses diagnósticas aumentando de 0% na safra de 2014 para 3,75 a 54,5 % na safra de 2019, dependendo do inseticida e da localidade. Em geral, as menores suscetibilidades a inseticidas diamidas foram observadas em populações coletadas na região Oeste do Estado da Bahia. Houve aumento da suscetibilidade de *H. armigera* a inseticidas diamidas em populações coletadas na safra de 2020, provavelmente devido à redução de uso de inseticidas para o controle de lepidópteros pragas, principalmente com o aumento da penetração de cultivos Bt no Brasil. Os resultados obtidos no presente trabalho evidenciam a necessidade de implementação de estratégias de manejo da resistência de *H. armigera* a inseticidas diamidas para preservar a vida útil desse importante grupo químico de inseticida.

Palavras-chave flubendiamide, chlorantraniliprole, Manejo da Resistência de Insetos, dose diagnóstica

ABSTRACT

Diamide insecticides have been widely used in the management of *Helicoverpa armigera* (Hübner) since the official detection of this pest in Brazil in 2013. To better understanding the dynamics of diamide resistance in *H. armigera*, we conducted susceptibility monitoring to flubendiamide, chlorantraniliprole and cyantraniliprole in populations of *H. armigera* collected in the major Brazilian crop growing regions from 2014 to 2020 seasons. Diet-overlay bioassays with diagnostic doses (LD₉₉) for each insecticide were used in this study. Significant reductions in the susceptibility to these insecticides were observed in populations of *H. armigera* throughout cropping seasons. The survival rates at diagnostic doses increased from 0% in the 2014 season to 3.75 a 54.5% in the 2019 season, depending on the insecticide and the region. In general, lower susceptibility to diamide insecticides was detected in populations collected from the Western region of Bahia State. There was an increase in the susceptibility of *H. armigera* to diamide insecticides in populations collected in 2020 season, probably due to the reduction in the insecticide use against lepidopteran pests, mainly with the increase in the penetration of Bt crops in Brazil. Our results show the urgent need to implement strategies to manage *H. armigera* resistance to diamide insecticides in order to preserve the lifetime of this important chemical group.

Keywords: flubendiamide, chlorantraniliprole, Insect Resistance Management, diagnostic dose.

*Este capítulo foi publicado na revista Crop Protection. Referência: Pereira, R.M., **Abbade Neto, D.**, Amado, D., Durigan, M.R., Franciscatti, R.A., Mocheti, M., Omoto, C., 2020. Baseline susceptibility and frequency of resistance to diamide insecticides in *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) populations in Brazil. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2020.105266>

2.1 INTRODUÇÃO

Helicoverpa armigera (Hübner) é uma praga invasora que foi relatada pela primeira vez no Brasil em 2013 causando sérios prejuízos em diversas culturas (Czepak et al., 2013; Specht et al., 2013). Esta espécie é altamente polífaga, com mais de 100 plantas hospedeiras (Fitt, 1989; Zalucki et al., 1986) e pode ocorrer ao longo de todo ano, devido à sucessão de culturas hospedeiras como soja, algodão, feijão e milho em algumas regiões brasileiras (Czepak et al., 2013; Leite et al., 2014). Trata-se de uma espécie de difícil controle devido aos vários casos de resistência a inseticidas e proteínas Bt que foram relatados em todo o mundo (Bird 2016; Downes et al., 2016; Wang et al., 2009; Gunning et al., 1998, 1996; Armes et al., 1992). Os inúmeros casos de resistência aos inseticidas tradicionais dificultam o controle de *H. armigera* no Brasil e uma alternativa tem sido o uso de inseticidas mais novos que não apresentam casos de resistência a essa espécie como os inseticidas do grupo das diamidas.

Os inseticidas diamidas se ligam aos receptores de rianodina das células musculares dos insetos, promovendo a abertura do canal e levam ao efluxo descontrolado de cálcio (Ca^{+2}) das reservas musculares, causando letargia, interrupção alimentar e morte (Cordova et al., 2006; Lahm et al., 2009; Teixeira e Andaloro, 2013). Embora a introdução dos inseticidas diamidas tenham ocorrido há pouco mais de uma década para controlar espécies de lepidópteros pragas (Jeanguenat, 2013; Lahm et al., 2009), casos de resistência já foram relatados para várias espécies desta ordem (Mota-Sanchez & Wise, 2020; Bolzan et al., 2019; Roditakis et al., 2015; Ribeiro et al. 2014; Wu et al., 2014). Com o aumento nos números de casos de resistência a diamidas e a identificação de *H. armigera* no Brasil em 2013, é importante implementar programas de manejo de resistência antes que ocorra a seleção de populações resistentes a esses inseticidas para prolongar a efetividade desses inseticidas (Roush e McKenzie, 1987).

O aumento da frequência de indivíduos resistentes a inseticidas pode resultar em falhas de controle, tornando a resistência de insetos um problema econômico (Dennehy, 1987). O monitoramento da suscetibilidade é um dos principais passos para o desenvolvimento de um programa de manejo da resistência de insetos (MRI) eficiente, pois com o monitoramento é possível observar as variações da suscetibilidade a inseticidas em diferentes

populações de insetos pragas (Roush & Daly, 1990; Sims et al., 1996). O monitoramento com bioensaios de doses diagnósticas (DL_{99}) é uma das formas mais eficientes para avaliar a frequência de indivíduos resistentes (French-Constant & Roush, 1990; Roush & Miller, 1986). As informações sobre variação de suscetibilidade ao longo do tempo são importantes pois permitem a tomada de medidas proativas como o uso de outras estratégias de controle de pragas, podendo incluir a rotação de ingredientes ativos, o uso de tecnologias Bt e métodos alternativos de controle de pragas, tais como controle biológico, controle mecânico e outras práticas culturais no campo.

Para compreender a dinâmica da resistência de *H. armigera* resistentes a inseticidas diamidas, a suscetibilidade a flubendiamide, chlorantraniliprole e cyantraniliprole foi monitorada em populações de *H. armigera* coletadas nas principais regiões produtoras do Brasil ao longo das safras de 2014 a 2020.

2.2 MATERIAL E MÉTODOS

2.2.1 Coleta de populações de *H. armigera*

As populações de *H. armigera* utilizadas no presente estudo, foram coletadas pelas empresas Promip Manejo Integrado de Pragas e BioPartner Agro Soluções nos principais estados produtores agrícolas: Bahia, Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul e São Paulo nas safras agrícolas de 2017 a 2020. Foram coletadas aproximadamente 800 a 1.000 lagartas de cada localidade em diferentes culturas hospedeiras, tais com algodão, soja, feijão, milho e milheto. Para a análise temporal das mudanças na suscetibilidade a esses inseticidas no presente estudo, foram também consideradas os dados das populações de *H. armigera* coletadas nas safras de 2014 a 2016 e reportadas em Pereira (2017) (Figura 1) (Tabela 1).

A população BA33 foi a primeira obtida após a detecção oficial de *H. armigera* no Brasil em 2013, por esse motivo, foi utilizada como população suscetível (Sus) de referência. A linhagem Sus tem sido mantida em laboratório, na ausência de pressão de seleção, há mais de 50 gerações.

Figura 1. Identificação dos locais de coleta das populações de campo de *Helicoverpa armigera*, utilizadas para o monitoramento da suscetibilidade aos inseticidas diamidas nas safras de 2014 a 2020.

Tabela 1. Código, data de amostragem, localização e culturas hospedeiras em que foram coletadas as populações de *Helicoverpa armigera* utilizadas no monitoramento da suscetibilidade a inseticidas diamidas nas safras de 2014 a 2020.

Código População	Data de coleta	Localização (Cidade/Estado) ¹	Cultura hospedeira
Safra 2014			
BA 33 ²	Set/2013	Luís Eduardo Magalhães/BA	Feijão
BA 43	Fev/2014	Luís Eduardo Magalhães/BA	Soja
BA 34	Jan/2014	Luís Eduardo Magalhães/BA	Soja
Safra 2015			
BA 52	Dez/2014	São Desidério/BA	Soja
BA 55	Nov/2014	São Desidério/BA	Soja
BA 61	Abr/2015	Luís Eduardo Magalhães/BA	Milheto
BA 64	Jun/2015	Luís Eduardo Magalhães/BA	Algodão
MT 15	Maio/2015	Campo Verde/MT	Algodão
SP 15	Jan/2015	Viradouro/SP	Soja
Safra 2016			
BA 66	Out/2015	Luís Eduardo Magalhães/BA	Feijão
BA 68	Dez/2015	Luís Eduardo Magalhães/BA	Soja
BA 69	Jan/2016	Luís Eduardo Magalhães/BA	Soja
GO 06	Jan/2016	Mineiros/GO	Soja
MS 07	Jun/2016	Chapadão do Sul/MS	Sorgo
MT 17	Jan/2016	Sapezal/MT	Soja
MT 19	Mar/2016	Primavera do Leste/MT	Soja
MT 23	Maio/2016	Primavera do Leste/MT	Millet
SP 19	Abr/2016	Limeira/SP	Feijão
Safra 2017			
BA 74	Out/2016	Barreiras/BA	Milheto
BA 76	Abr/2017	Barreiras/BA	Algodão
GO 08	Dez/2016	Rio Verde/GO	Soja
GO 09	Maio/2017	Mineiros/GO	Algodão
MS 08	Dez/2016	Chapadão do Sul/GO	Soja
MS 09	Maio/2017	Chapadão do Sul/MS	Algodão
MT 26	Out/2016	Campo Novo do Parecis/MT	Soja
MT 28	Maio/2017	Juscimeira/MT	Algodão
MT 29	Maio/2017	Sapezal/MT	Algodão
SP 22	Nov/2016	Casa Branca/SP	Soja
SP 23	Abr/2017	Pilar do Sul/SP	Soja
Safra 2018			
BA 77	Jan/2018	Luís Eduardo Magalhães/BA	Soja
BA 78	Jun/2018	Luís Eduardo Magalhães/BA	Algodão
GO 11	Jul/2018	Mineiros/GO	Algodão
MS 11	Jul/2018	Chapadão do Sul/MS	Algodão
MT 30	Jan/2018	Campo Verde/ MT	Soja
MT 32	Jul/2018	Sapezal/MT	Algodão
MT 33	Jul/2018	Primavera do Leste/MT	Algodão
SP 24	Jan/2018	Leme/SP	Soja
Safra 2019			
BA 79	Dez/2018	Roda Velha/BA	Soja
BA 81	Jun/2019	Correntina/BA	Algodão

GO 12	Dez/2018	Mineiros/GO	Soja
MS 12	Jun/2019	Chapadão do Sul/MS	Algodão
MT 34	Jan/2019	Sapezal/MT	Soja
Safra 2020			
BA 84	Jan/2020	Luís Eduardo Magalhães/BA	Soja
MS 13	Mar/2020	Chapadão do Sul/MS	Algodão
MT 35	Dez/2019	Campo Verde/MT	Soja

¹ Abreviação dos estados: BA: Bahia; GO: Goiás; MS: Mato Grosso do Sul; MT: Mato Grosso; SP: São Paulo.

² População suscetível de referência.

2.2.2 Criação e manutenção das populações de *H. armigera*

As lagartas coletadas em campo foram transportadas para o laboratório e mantidas nas bandejas com dieta artificial à base de gérmen de trigo, levedura de cerveja, proteína de soja e caseína (Greene et al., 1976) até a fase de pupa. Posteriormente, as pupas foram retiradas e tratadas com solução de sulfato de cobre 0,65%, colocadas em gaiolas de tubos de PVC (30 cm de altura × 40 cm de diâmetro) e fechadas na parte superior com tecido do tipo tule para postura de ovos. Cada população consistia de pelo menos 200 casais por geração, divididos em gaiolas com aproximadamente 50 casais cada. As mariposas receberam a cada dois dias uma solução de água com mel a 10%. As populações foram mantidas em sala de criação com temperatura de $25 \pm 1^\circ \text{C}$, umidade relativa de $70 \pm 10\%$ e fotofase de 14 horas.

O tule contendo os ovos foi substituída a cada dois dias. As lagartas recém-eclodidas foram transferidas para copos plásticos de 100 mL contendo dieta artificial (Greene et al., 1976). Ao atingir o terceiro instar, parte das lagartas foi individualizada em copos plásticos de 50 ml com dieta artificial para serem mantidas em criação de laboratório, e as demais lagartas foram utilizadas para bioensaios de monitoramento. Para garantir que a frequência alélica da resistência fossem representativas a população coletada no campo, os bioensaios foram realizados em até três gerações em laboratório.

2.2.3 Monitoramento da suscetibilidade de *H. armigera* no decorrer das safras agrícolas

O monitoramento da suscetibilidade aos inseticidas flubendiamide, chlorantraniliprole e cyantraniliprole em populações de *H. armigera* foi realizado pelo método de bioensaio de ingestão, mediante tratamento superficial da dieta com inseticida em placas de 24 compartimentos (Costar®, São Paulo, Brasil), com aproximadamente 1,25 mL de dieta artificial por célula (área de $1,9 \text{ cm}^2$). Utilizando as doses diagnósticas (DL_{99}) previamente estimadas para cada inseticida (Pereira, 2017): flubendiamide $2,64 \mu\text{g i.a.cm}^{-2}$; chlorantraniliprole $0,99 \mu\text{g i.a.cm}^{-2}$; cyantraniliprole $1,61 \mu\text{g i.a.cm}^{-2}$.

Para cada inseticida foi testado 10 repetições de 24 lagartas de terceiro instar totalizando 240 lagartas por população. Foram monitoradas 26 populações entre as safras 2017 a 2020 e para a análise temporal da suscetibilidade, foram utilizados dados de monitoramento da suscetibilidade de 19 populações de *H. armigera* coletadas nas safras de 2014 a 2016 (Pereira, 2017). A mortalidade foi avaliada após 96 horas da inoculação e as lagartas foram consideradas mortas quando não se moviam após o toque de uma pinça.

2.2.4 Análise estatística

Para um melhor ajuste dos dados de monitoramento, foi utilizado o modelo linear generalizado com a função glm do pacote Stats no software R 3.5.2 (R Core Team, 2018). A distribuição binomial e suas possíveis funções de ligação (probit, logit, log, cloglog e cauchit) foram utilizadas para melhor ajustar os dados. O modelo foi avaliado com a função hnp do pacote hnp (Moral et al., 2017) e a análise de variância ANOVA com teste F para determinar a melhor opção para os dados. Após identificar o melhor modelo, a função glht do pacote multcomp (Hothorn et al., 2008) foi usada. O teste post-hoc de Tukey 5% foi realizado para comparar a sobrevivência das diferentes regiões avaliadas.

2.3 RESULTADOS

2.3.1 Monitoramento da suscetibilidade de *H. armigera* no decorrer das safras agrícolas

Foram observadas diferenças significativas na sobrevivência a fubendiamide em populações monitoradas ao longo do tempo em comparação com a população suscetível de referência BA 33 ($F_{34, 571} = 28,28$, $P < 0,001$). Todas as populações coletadas na Bahia, após a safra 2015 diferiram da população de referência BA 33. Os insetos coletados nas safras 2018 e 2019 neste estado apresentaram as maiores taxas de sobrevivência: as populações BA 77 (Luís Eduardo Magalhães - soja), BA 78 (Luís Eduardo Magalhães - algodão) e BA 81 (Correntina – algodão) apresentaram sobrevivência acima de 50,87% (Tabela 2). Em relação às populações coletadas em Mato Grosso estas se apresentaram com alta suscetibilidade a inseticidas diamidas até a safra 2016, no entanto nas últimas safras a suscetibilidade também reduziu assim como em populações de *H. armigera* provenientes de outros estados. De maneira geral a redução de suscetibilidade ocorreu de forma acelerada até a safra 2019 para todos os estados, nos quatro estados amostrados (BA, GO, MT e MS) onde as populações apresentaram sobrevivência superior a 33,75% (Tabela 2) (Figura 2).

Para chlorantraniliprole, os dados de sobrevivência indicaram diferenças significativas entre as populações estudadas ao longo do tempo em comparação com a população de referência BA 33 ($F_{35, 438} = 13,70$, $P < 0,001$). Durante o monitoramento nas três primeiras safras, os inseticidas não demonstraram redução da suscetibilidade, mas na safra 2017 uma (BA 76) das onze populações amostradas apresentou alta sobrevivência, diferenciando da população suscetível de referência (Tabela 2). Após essa safra a suscetibilidade reduziu gradualmente à cada safra, como é possível observar nos gráficos de Boxplot (Figura 2). As populações coletadas em São Paulo foram as que apresentaram as menores taxas de sobrevivência em todas as safras (Tabela 2).

Foram observadas também diferenças significativas na sobrevivência a cyantraniliprole em populações monitoradas ao longo do tempo em comparação com a população suscetível de referência ($F_{28, 378} = 12,65$, $P < 0,001$). As populações de *H. armigera* apresentaram alta suscetibilidade nas primeiras safras avaliadas (2014-2016) (Tabela 2). Após a safra 2017 é possível observar uma leve redução na suscetibilidade devido ao aumento de sobrevivência a cada safra. No entanto, diferente dos outros inseticidas apenas duas populações apresentaram sobrevivência superior a 20% uma população coletada na Bahia na safra 2017 (BA 77) e outra em Goiás em 2018 (G) 12) (Tabela 2).

Em geral, o monitoramento da suscetibilidade de populações de *H. armigera* a inseticidas diamidas demonstrou redução da suscetibilidade ao longo das safras, sendo mais evidente para flubendiamide (Figura 2). Também é possível observar que as maiores taxas de sobrevivência (outliers) foram para as populações coletadas na região Oeste da Bahia (Figura 2).

Tabela 2. Sobrevivência (%) de populações de *Helicoverpa armigera* a inseticidas diamidas na dose diagnóstica no decorrer das safras agrícolas de 2014 a 2020.

Código da População	Flubendiamide % Sobrevivência ($\pm$ EP)¹	Chlorantraniliprole % Sobrevivência ($\pm$ EP)¹	Cyantraniliprole % Sobrevivência ($\pm$ EP)¹
Safra 2014			
BA 33	0,28 ($\pm$ 0,28)	1,67 ($\pm$ 1,11)	0,83 ($\pm$ 0,57)
BA34	1,67 ($\pm$ 1,11)	-	-
BA43	0,00 ($\pm$ 0,00)	0,00 ($\pm$ 0,00)	0,00 ($\pm$ 0,00)
Safra 2015			
BA 52	7,08 ($\pm$ 1,63)	2,5 ($\pm$ 1,27)	3,33 ($\pm$ 1,27)
BA 55	-	0,83 ($\pm$ 0,83)	-
BA 61	24,07 ($\pm$ 1,77) *	5,83 ($\pm$ 1,78)	-
BA 64	9,09 ($\pm$ 1,67)	3,59 ($\pm$ 0,81)	6,87 ($\pm$ 1,61)
MT 15	2,50 ($\pm$ 0,88)	6,67 ($\pm$ 1,43)	6,67 ($\pm$ 1,55)
SP 15	-	0,00 ($\pm$ 0,00)	-
Safra 2016			
BA 66	17,50 ($\pm$ 2,90) *	7,50 ($\pm$ 2,62)	-
BA 68	15,61 ($\pm$ 2,25) *	1,70 ($\pm$ 0,99)	1,29 ($\pm$ 0,70)

BA 69	24,01 ($\pm$ 2,89) *	5,95 ($\pm$ 1,98)	12,82 ($\pm$ 1,33) *
GO 06	9,17 ($\pm$ 1,90)	1,25 ($\pm$ 0,68)	1,74 ($\pm$ 0,80)
MS 07	4,17 ($\pm$ 1,39)	5,00 ($\pm$ 2,22)	-
MT 17	2,73 ($\pm$ 1,94)	5,08 ($\pm$ 1,86)	-
MT 19	1,25 ($\pm$ 0,68)	1,25 ($\pm$ 0,68)	-
MT 23	1,45 ($\pm$ 0,98)	3,33 ($\pm$ 1,36)	5,00 ($\pm$ 2,22)
SP 19	8,75 ($\pm$ 1,54)	0,83 ($\pm$ 0,57)	4,71 ($\pm$ 1,56)
Safra 2017			
BA 74	22,13 ($\pm$ 1,97) *	4,24 ($\pm$ 1,45)	9,40 ($\pm$ 1,88)
BA 76	43,52 ($\pm$ 2,58) *	25,86 ($\pm$ 1,85) *	18,00 ($\pm$ 1,63) *
GO 08	12,54 ($\pm$ 1,86) *	9,66 ($\pm$ 1,53)	9,36 ($\pm$ 1,61)
GO 09	13,41 ($\pm$ 0,41) *	12,65 ($\pm$ 0,25)	-
MS 08	11,96 ($\pm$ 2,67) *	13,37 ($\pm$ 2,99)	9,32 ($\pm$ 2,08)
MS 09	14,24 ($\pm$ 0,51) *	7,95 ($\pm$ 0,27)	9,17 ($\pm$ 0,32)
MT 26	1,52 ($\pm$ 0,70)	2,38 ($\pm$ 0,85)	5,89 ($\pm$ 1,26)
MT 28	28,03 ($\pm$ 0,51) *	10,49 ($\pm$ 0,42)	12,76 ($\pm$ 0,47) *
MT 29	7,61 ($\pm$ 0,34)	5,18 ($\pm$ 0,34)	13,55 ($\pm$ 0,83) *
SP 22	5,41 ($\pm$ 0,63)	4,24 ($\pm$ 1,43)	5,95 ($\pm$ 2,62)
SP 23	6,86 ($\pm$ 2,68)	4,73 ($\pm$ 0,43)	6,32 ($\pm$ 0,39)
Safra 2018			
BA 77	51,99 ($\pm$ 0,97) *	29,59 ($\pm$ 0,77) *	31,23 ($\pm$ 0,58) *
BA 78	50,87 ($\pm$ 0,92) *	19,17 ($\pm$ 0,63) *	15,00 ($\pm$ 0,48) *
GO 11	13,48 ($\pm$ 0,97) *	13,04 ($\pm$ 0,45)	17,57 ($\pm$ 0,42) *
MS 11	18,75 ($\pm$ 0,65) *	29,58 ($\pm$ 0,74) *	15,83 ($\pm$ 0,45) *
MT 30	23,64 ($\pm$ 0,99) *	8,75 ($\pm$ 0,50)	8,33 ($\pm$ 0,37)
MT 32	4,58 ($\pm$ 0,35)	4,17 ($\pm$ 0,28)	1,67 ($\pm$ 0,14)
MT 33	3,33 ($\pm$ 0,21)	18,46 ($\pm$ 0,49) *	7,95 ($\pm$ 0,36)
SP 24	22,92 ($\pm$ 1,09) *	12,08 ($\pm$ 0,61)	6,67 ($\pm$ 0,23)
Safra 2019			
BA 79	44,53 ($\pm$ 0,97) *	21,67 ($\pm$ 0,76) *	14,17 ($\pm$ 0,60) *
BA 81	54,17 ($\pm$ 1,17) *	4,17 ($\pm$ 0,34)	3,75 ($\pm$ 0,32)
GO 12	52,52 ($\pm$ 0,67) *	33,68 ($\pm$ 0,53) *	21,25 ($\pm$ 0,54) *
MS 12	33,75 ($\pm$ 1,25) *	5,83 ($\pm$ 0,36)	12,67 ($\pm$ 0,46) *
MT 34	49,18 ($\pm$ 0,45) *	4,58 ($\pm$ 0,27) *	12,67 ($\pm$ 0,46) *
Safra 2020			
BA 84	17,70 ($\pm$ 0,58) *	8,75 ($\pm$ 0,84)	6,25 ($\pm$ 0,81)
MS 13	26,67 ($\pm$ 0,93) *	7,92 ($\pm$ 0,53)	2,92 ($\pm$ 0,26)
MT 35	27,50 ($\pm$ 1,24) *	15,00 ($\pm$ 0,60) *	12,08 ($\pm$ 0,37) *

¹Erro padrão;

* Diferença significativa dentro da coluna (Tukey test, $\alpha = 0.05$) com $p < 0.05$;

- População não avaliada

Figura 2. Boxplot ilustrando a média de sobrevivência de todas as populações de *Helicoverpa armigera* em cada safra na dose diagnóstica dos inseticidas flubendiamide, chlorantraniliprole e cyantraniliprole. Caixas verticais indicam quartis de sobrevivência por safras com barras de erro, linhas horizontais indicam os valores medianos; pontos vermelhos indicam a média; e pontos pretos indicam outliers.

2.4 DISCUSSÃO

O presente estudo demonstrou a redução da suscetibilidade das populações de *H. armigera* a flubendiamide, chlorantraniliprole e cyantraniliprole no decorrer das safras agrícolas de 2014 a 2020. Provavelmente essa redução se deve ao indiscriminado uso de inseticidas para o controle *H. armigera* desde o início de sua detecção no Brasil (Pomari-Fernandes et al., 2015). O uso de inseticidas diamidas têm aumentado significativamente na última década (Nauen et al., 2019). Esse aumento no uso, resultou em vários casos de resistência a diamidas para as principais pragas da ordem Lepidoptera no país, incluindo *Spodoptera frugiperda* (JE Smith) (Bolzan et al., 2019), *Plutella xylostella* (Linnaeus) (Ribeiro et al., 2014) e *Tuta absoluta* (Meyrick) (Silva et al., 2019). No entanto, para *H. armigera* mesmo com 800 casos de resistência pelo mundo (Mota-Sanchez & Wise, 2020), ainda não foram reportados casos de resistência a esse grupo químico, demonstrando a necessidade em proteger a vida útil desse grupo químico no controle de *H. armigera* no Brasil.

O monitoramento da suscetibilidade de populações coletadas nos estados da Bahia, Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul e São Paulo de 2014 a 2020 revelou que a suscetibilidade das populações de *H. armigera* aos inseticidas diamidas diminuiu ao longo das safras. As primeiras populações coletadas, de 2013 a 2015, apresentaram maior mortalidade, demonstrando que essas doses diagnósticas podem ser recomendadas para monitoramento de suscetibilidade. A partir da safra de 2016, a sobrevivência das populações expostas aos inseticidas diamidas aumentou em cada safra; principalmente para o flubendiamide, onde as sobrevivências atingiram até 50% em populações da Bahia na safra 2018 e nas safras seguintes todas as populações amostradas (BA, GO, MS e MT) apresentaram baixa suscetibilidade. Esses resultados podem indicar a rápida disseminação do alelo de resistência com redução concomitante na suscetibilidade a diamida em *H. armigera*. As maiores sobrevivências de *H. armigera* nas doses diagnósticas foram obtidas em populações do estado da Bahia. Esta região possui um sistema de cultivo mais intenso do que os outros estados (CONAB 2021), com maior sobreposição de lavouras hospedeiras ao longo do ano agrícola, provavelmente aumento a pressão de seleção aos inseticidas devido à necessidade de maior uso para controle de pragas.

Uma possível razão para esse declínio na suscetibilidade é que o flubendiamide assim como chlorantraniliprole foram as primeiras diamidas oficialmente recomendadas para o controle de *H. armigera* no Brasil (Embrapa 2013). Esse maior período de uso pode ter contribuído para um aumento na pressão de seleção no campo e consequentemente seleção de indivíduos resistentes ao longo deste tempo. A intensa utilização de diamidas no Brasil ocorreu por esses compostos apresentarem características químicas desejáveis, como baixa toxicidade para organismos não-alvo e alta atividade contra insetos da ordem Lepidoptera (Lahm et al., 2007; Selby et al., 2013; Teixeira

& Andaloro, 2013). Além disso, é possível que *H. armigera* esteja presente no Brasil desde 2008 (Sosa-Gómez et al., 2016). Antes mesmo de ser identificada, essa espécie pode ter sido exposta aos inseticidas diamidas usados no controle de outras pragas, como *Spodoptera frugiperda* e *Chrysodeixis includens*. Essas possibilidades podem explicar o rápido aumento da sobrevivência de *H. armigera* exposta ao flubendiamide nos últimos anos.

Houve um visível aumento na suscetibilidade a flubendiamide em populações de *H. armigera* coletadas na safra de 2020. Esse resultado provavelmente está relacionado com a crescente penetração da soja transgênica expressando a proteína Cry1Ac desde 2017 e consequente redução no uso de inseticidas para o controle de lepidópteros pragas (Céleres, 2019). Relato semelhante ocorreu na China, onde após a adoção de algodão transgênico, houve redução no uso de inseticidas, gerando o reestabelecimento da suscetibilidade de *H. armigera* aos inseticidas utilizados para o seu controle, tais como piretroides, organofosforados e inibidores de biossíntese de quitina (Wu et al. 2005).

Considerando o aumento do uso de inseticidas diamidas com pulverizações foliares e tratamentos de sementes (Nauen et al., 2019), e os resultados de monitoramento da suscetibilidade de *H. armigera* a inseticidas diamidas evidenciam a necessidade de implementação de estratégias de MRI para preservar a vida útil desse importante grupo químico de inseticida. A resistência de *H. armigera* a inseticidas diamidas pode ser instável e apresentar custo adaptativo o que seria uma característica a ser explorada em programas de MRI.

REFERÊNCIAS

- Armes, N. J. et al. Insecticide resistance in *Helicoverpa armigera* in South India. *Pesticide science*, v. 34, n. 4, p. 355–364, 1992.
- Bird, L.J., 2016. Genetics, cross-resistance and synergism of indoxacarb resistance in *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera : Noctuidae). *Pest Manag. Sci.* 73, 578–581. <https://doi.org/10.1002/ps.4334>
- Bolzan, A., Padovez, F.E.O., Nascimento, A.R.B., Kaiser, I.S., Lira, E.C., Amaral, F.S.A., Kanno, R.H., Malaquias, J.B., Omoto, C., 2019. Selection and characterization of the inheritance of resistance of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera : Noctuidae) to chlorantraniliprole and cross-resistance to other diamide insecticides 2019. <https://doi.org/10.1002/ps.5376>
- CÉLERES, 2019. Informativo de biotecnologia céleres novembro 2019. Disponível: http://www.celeres.com.br/wp-content/uploads/2019/11/BoletimBiotecnologiaC%C3%A9leres_Novembro2019-2.pdf (acessado 09 de abril de 2021).

- Cordova, D., Benner, E.A., Sacher, M.D., Rauh, J.J., Sopa, J.S., Lahm, G.P., Selby, T.P., Stevenson, T.M., Flexner, L., Gutteridge, S., Rhoades, D.F., Wu, L., Smith, R.M., Tao, Y., 2006. Anthranilic diamides: A new class of insecticides with a novel mode of action, ryanodine receptor activation. *Pestic. Biochem. Physiol.* 84, 196–214. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2005.07.005>
- CONAB (2021), Companhia Nacional de Abastecimento - Boletim da Safra de Grãos. <https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/graos> (acessado 17 de janeiro de 2021).
- Czepak, C., Albernaz, K.C., Vivan, L.M., Guimarães, H.O., Carvalhais, T., 2013. Primeiro registro de ocorrência de *Helicoverpa armigera*(Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) no Brasil. *Pesqui. Agropecuária Trop.* 43, 110–113. <https://doi.org/10.1590/S1983-40632013000100015>
- Dennehy, T.J., 1987. Decision-making for managing pest resistance to pesticides, in: Ford, M.G., Hollaman, D.W., Khambay, B.P.S., Sawiki, R.M. (Eds.), *Combating Resistance to Xenobiotics : Biological and Chemical Approaches*. Ellis Horwood, Chichester, England, pp. 118–126.
- Downes, S., Walsh, T., Tay, W.T., 2016. Bt resistance in Australian insect pest species. *Curr. Opin. Insect Sci.* 15, 78–83. <https://doi.org/10.1016/j.cois.2016.04.002>
- Fitt, G.P., 1989. The Ecology of *Heliothis* Species in Relation to Agroecosystems. *Annu. Rev. Entomol.* 34, 17–53. <https://doi.org/10.1146/annurev.en.34.010189.000313>
- Greene, G.L., Leppla, N.C., Dickerson, W.A., 1976. Velvetbean Caterpillar: A Rearing Procedure and Artificial Medium. *J. Econ. Entomol.* 69, 487–488. <https://doi.org/10.1093/jee/69.4.487>
- Gunning, R. V., Moores, G.D., Devonshire, A.L., 1998. Insensitive Acetylcholinesterase and Resistance to Organophosphates in Australian *Helicoverpa armigera*. *Pestic. Biochem. Physiol.* 62, 147–151. <https://doi.org/10.1006/pest.1998.2380>
- Gunning, R. V., Moores, G.D., Devonshire, A.L., 1996. Insensitive Acetylcholinesterase and Resistance to Thiodicarb in Australian *Helicoverpa armigera* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae). *Pestic. Biochem. Physiol.* 55, 21–28. <https://doi.org/10.1006/pest.1996.0031>
- Hothorn, T., Bretz, F., Westfall, P., 2008. Simultaneous Inference in General Parametric Models. *Biometrical J.* 50, 346–363. <https://doi.org/10.1002/bimj.200810425>
- Jeanguenat, A., 2013. The story of a new insecticidal chemistry class: the diamides. *Pest Manag. Sci.* 69, 7–14. <https://doi.org/10.1002/ps.3406>
- Lahm, G.P., Cordova, D., Barry, J.D., 2009. New and selective ryanodine receptor activators for insect control. *Bioorganic Med. Chem.* 17, 4127–4133. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2009.01.018>
- Leite, N.A., Alves-Pereira, A., Corrêa, A.S., Zucchi, M.I., Omoto, C., 2014. Demographics and Genetic Variability of the New World Bollworm (*Helicoverpa zea*) and the Old World Bollworm (*Helicoverpa armigera*) in Brazil. *PLoS One* 9, e113286. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0113286>
- Moral, R.A., Hinde, J., Demétrio, C.G.B., 2017. Half-Normal Plots and Overdispersed Models in R : The hnp Package. *J. Stat. Softw.* 81. <https://doi.org/10.18637/jss.v081.i10>
- Mota-Sanchez, D., Wise, J.C., 2020. Arthropod Pesticide Resistance Database [WWW Document]. Michigan State Univ. URL <http://www.pesticideresistance.org>

Nauen, R., Slater, R., Sparks, T.C., Elbert, A., 2019. IRAC : Insecticide Resistance and Mode - of-action Classification of Insecticides 5–8.

Pereira, R. M. Pereira, R., 2017. Caracterização da Suscetibilidade a inseticidas diamidas e espinosinas em populações de *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) do Brasil. (Tese de doutorado - Programa de Entomologia) Universidade de São Paulo – ESALQ; 97p. <https://doi.org/https://doi.org/10.11606/T.11.2017.tde-29092017-182858>

Pomari-Fernandes, A., De Freitas Bueno, A., Sosa-Gómez, D.R., 2015. *Helicoverpa armigera*: current status and future perspectives in Brazil. Curr. Agric. Sci. Technol. 21, 1–7. <https://doi.org/10.18539/cast.v21i1.4234>

R Core Team, 2018. R: A language and environment for statistical computing. R Found. Stat. Comput.

Ribeiro, L.M.S., Wanderley-Teixeira, V., Ferreira, H.N., Teixeira, Á.A.C., Siqueira, H.A.A., 2014. Fitness costs associated with field-evolved resistance to chlorantraniliprole in *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae). Bull. Entomol. Res. 104, 88–96. <https://doi.org/10.1017/S0007485313000576>

Roditakis, E., Vasakis, E., Grispou, M., Stavrakaki, M., Nauen, R., Gravouil, M., Bassi, A., 2015. First report of *Tuta absoluta* resistance to diamide insecticides. J. Pest Sci. (2004). 88, 9–16. <https://doi.org/10.1007/s10340-015-0643-5>

ROUSH, R.T., MCKENZIE, J.A., 1987. Ecological genetics of insecticide and acaricide resistance. Annu. Rev. Entomol. 32, 361–380.

Roush, R., Daly, J., 1990. The role of population genetics in resistance research and management, in: Pesticide Resistance in Arthropods, in: Roush, R., Tabashnik, B. (Eds.). Chapman and Hall, New York, NY, pp. 97–152.

Roush, R.T., Miller, G.L., 1986. Considerations for Design of Insecticide Resistance Monitoring Programs. J. Econ. Entomol. 79, 293–298. <https://doi.org/10.1093/jee/79.2.293>

Selby, T.P., Lahm, G.P., Stevenson, T.M., Hughes, K.A., Cordova, D., Annan, I.B., Barry, J.D., Benner, E.A., Currie, M.J., Pahutski, T.F., 2013. Discovery of cyantraniliprole, a potent and selective anthranilic diamide ryanodine receptor activator with cross-spectrum insecticidal activity. Bioorg. Med. Chem. Lett. 23, 6341–6345. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2013.09.076>

Sims, S.B., Greenplate, J.T., Stone, T.B., Caprio, M.A., Gould, F.L., 1996. Monitoring Strategies for Early Detection of Lepidoptera Resistance to *Bacillus thuringiensis* Insecticidal Proteins. pp. 229–242. <https://doi.org/10.1021/bk-1996-0645.ch023>

Silva, J.E., Ribeiro, L.M. da S., Vinasco, N., Guedes, R.N.C., Siqueira, H.Á.A., 2019. Field-evolved resistance to chlorantraniliprole in the tomato pinworm *Tuta absoluta*: inheritance, cross-resistance profile, and metabolism. J Pest Sci 92, 1421–1431. <https://doi.org/10.1007/s10340-018-1064-z>

Sosa-Gómez, D.R., Specht, A., Paula-Moraes, S. V., Lopes-Lima, A., Yano, S.A.C., Micheli, A., Morais, E.G.F., Gallo, P., Pereira, P.R.V.S., Salvadori, J.R., Botton, M., Zenker, M.M., Azevedo-Filho, W.S., 2016. Timeline and geographical distribution of *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera, Noctuidae: Heliothinae) in Brazil. Rev. Bras. Entomol. 60, 101–104. <https://doi.org/10.1016/j.rbe.2015.09.008>

Specht, A., Sosa-Gómez, D.R., Paula-Moraes, S.V. de, Yano, S.A.C., 2013. Identificação morfológica e molecular de *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) e ampliação de seu registro de ocorrência no Brasil. *Pesqui. Agropecuária Bras.* 48, 689–692. <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2013000600015>

Teixeira, L. a., Andaloro, J.T., 2013. Diamide insecticides: Global efforts to address insect resistance stewardship challenges. *Pestic. Biochem. Physiol.* 106, 76–78. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2013.01.010>

Wang, D., Qiu, X., Ren, X., Niu, F., Wang, K., 2009. Resistance selection and biochemical characterization of spinosad resistance in *Helicoverpa armigera*(Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae). *Pestic. Biochem. Physiol.* 95, 90–94.

Wu, Kongming, Wei Mu, Gemei Liang, and Yuyuan Guo. 2005. “Regional Reversion of Insecticide Resistance in *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera : Noctuidae) Is Associated with the Use of Bt Cotton in Northern China” 498 (January): 491–98. <https://doi.org/10.1002/ps.999>.

Zalucki, M.P., Daglish, G., Firempong, S., Twine, P., 1986. The biology and ecology of *Heliothis armigera* (Hübner) and *H. punctiger a wallengren* (Lepidoptera: Noctuidae) in Australia: What do we know? *Aust. J. Zool.* 34, 779–814. <https://doi.org/10.1071/ZO9860779>

3. SELEÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO PADRÃO DE HERANÇA DA RESISTÊNCIA DE *Helicoverpa armigera* (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE) A FLUBENDIAMIDE E RESISTÊNCIA CRUZADA A OUTROS INSETICIDAS DIAMIDAS

RESUMO

O uso de inseticidas do grupo químico das diamidas tem aumentado no controle de *Helicoverpa armigera* (Hübner) no Brasil. Para uma melhor compreensão dos fatores genéticos que afetam a evolução da resistência de *H. armigera* a inseticidas diamidas no Brasil, foram realizados estudos de seleção de uma linhagem de *H. armigera* resistente a flubendiamide, para posterior caracterização do padrão de herança da resistência e resistência cruzada a outras diamidas. A seleção da linhagem resistente foi realizada a partir da população de *H. armigera* coletada em Luis Eduardo Magalhães-BA em 2016, mediante uso de doses crescentes de 2,64 $\mu\text{g i.a.cm}^{-2}$ a 157,89 $\mu\text{g i.a.cm}^{-2}$ por ≈ 14 gerações. A razão de resistência obtida para flubendiamide foi > 50.000 vezes. O padrão de herança da resistência a flubendiamide foi definida como autossômica, incompletamente dominante e monogênica. Para avaliar a dominância funcional, lagartas de terceiro ínstar das linhagens suscetível, resistente a flubendiamide e heterozigotas foram alimentadas com folhas de soja tratadas com flubendiamide na concentração comercial recomendada de 112 mg i. a. L^{-1} . Houve mortalidade de 89,7% das lagartas suscetíveis; no entanto, a mortalidade da linhagem resistente e heterozigotas foram $< 5\%$, comprovando assim a dominância genética da resistência de *H. armigera* a flubendiamide. Foi observada uma baixa resistência cruzada entre flubendiamide e os inseticidas chlorantraniliprole e cyantraniliprole, com uma razão de resistência de 4,7 e 5,6 vezes respectivamente. Este foi o primeiro caso de resistência de *H. armigera* a um inseticida do grupo das diamidas no mundo. O padrão de herança dominante da resistência de *H. armigera* a flubendiamide e a presença de resistência cruzada a outras diamidas favorecerão a evolução da resistência, caso estratégias de manejo da resistência não sejam implementadas no Brasil.

Palavras-chave: Chlorantraniliprole; Herança da resistência; Manejo da Resistência a Insetos

ABSTRACT

The use of diamide insecticides to control *Helicoverpa armigera* (Hübner) has increased in Brazil. For a better understanding of the genetic factors that affect the evolution of *H. armigera* resistance to diamide insecticides in Brazil, studies were performed to select a resistant strain of *H. armigera* to flubendiamide in order to further characterize the inheritance pattern of resistance and cross-resistance to other diamides. The selection of the resistant strain was conducted in a population of *H. armigera* collected in Luis Eduardo Magalhães, Bahia State, in 2016, by using increasing doses from 2.64 a.i. cm^{-2} to 157.89 $\mu\text{g a.i.cm}^{-2}$ for ≈ 14 generations. The resistance ratio of the resistance strain was $> 50,000$ fold to flubendiamide. The inheritance pattern of resistance to flubendiamide was defined as autosomal, incompletely dominant and monogenic. To assess functional dominance, third instar larvae of the susceptible, resistant to flubendiamide and heterozygous strains were fed with soybean leaves treated with flubendiamide at the recommended field rate of 112 mg a.i. L^{-1} . There was a mortality of 89.7% of susceptible larvae; but on the other hand, the mortality of the resistant and heterozygous larvae was $< 5\%$, confirming the genetic dominance of *H. armigera* resistance to flubendiamide. A low cross-resistance was observed between flubendiamide and the chlorantraniliprole and cyantraniliprole, with resistance ratios of 4.7 and 5.6-fold respectively. This was the first case of resistance in *H. armigera* to a diamide insecticide in the world. The dominant inheritance pattern of *H. armigera* resistance to flubendiamide and the presence of cross-resistance to other diamide insecticides will favor the evolution of resistance if resistance management strategies are not implemented in Brazil.

Key words: Chlorantraniliprole; Inheritance of resistance; Insect Resistance Management

3.1 INTRODUÇÃO

O cenário da agricultura tropical favorece a evolução da resistência a inseticidas, devido à sucessão de culturas ao longo do ano, fornecendo alimento de forma continuada aos insetos pragas (Haan et al., 2020; Oliveira et al., 2014), tornando necessário o constante controle para diminuir as densidades populacional que na maioria das vezes é feito através de inseticidas. A pressão de seleção exercida pelo constante uso de inseticidas gera um aumento na frequência de indivíduos resistentes podendo causar falhas de controle (Dennehy, 1987; Tabashnik et al., 2014). A intensidade da evolução da resistência depende de fatores biológicos, genéticos e operacionais (Georghiou & Taylor, 1977 a, b). O que torna necessário estudos de padrão de herança da resistência que permitem definir se a herança da resistência é autossômica, ligada ao sexo ou mitocondrial; a dominância da resistência podendo ser dominante ou recessiva; definir se a herança é monogênica ou poligênica além da caracterização da resistência cruzada a outros inseticidas (French-Constant & Roush, 1990; Georghiou & Taylor 1977; Roush & Miller 1986). Esses fatores podem favorecer ou não a evolução da resistência, por isso precisam ser conhecidos para implementação do Manejo de Resistência a Insetos (MRI). Uma das estratégias comumente utilizada no MRI consiste em diminuir a pressão de seleção de um inseticida, aplicando outro com modo de ação diferente, mas para essa estratégia ser implementada é necessário que não haja resistência cruzada entre os inseticidas utilizados na rotação e presença de custo adaptativo associado à resistência (Roush & McKenzie, 1987; Tabashnik, 1989, 1994; Tabashnik et al., 2005).

Dentre os insetos pragas presentes no Brasil, *Helicoverpa armigera* (Hübner) se destaca por ser uma praga invasora polífaga que foi relatada pela primeira vez no Brasil em 2013 (CZEPAK et al., 2013). *Helicoverpa armigera* pode ser encontrada em muitas regiões cultivadas do país, nas mais variadas culturas como soja, algodão, milho, feijão e tomate (Sosa-Gómez et al., 2016). Esta praga apresenta dificuldade de controle em diversos países do mundo devido aos mais de 840 casos de resistência (Mota-Sanchez & Wise, 2020) para inseticidas de vários grupos químicos (Ahmad et al., 2001; Armes et al., 1992; Bird et al., 2016; 2018; Kranthi et al., 2002). No Brasil, populações de *H. armigera* vêm sendo controladas com inseticidas do grupo químico das diamidas, visto que não foram observados casos de resistência. No entanto, o monitoramento da suscetibilidade desta praga desde 2014, demonstra o rápido aumento da frequência de indivíduos resistentes no campo (Pereira et al., 2020). Estudos de padrão de herança da resistência a diamidas são necessários para gerar subsídios na implementação de um MRI proativo, antes que falhas de controle ocorram.

As diamidas foram lançadas ao mercado há pouco mais de uma década para controle de muitas espécies de lepidópteros (Jeanguenat, 2013; Lahm et al., 2009), no entanto, já existem vários casos de resistência reportados, tais como em *Spodoptera exigua* a chlorantraniliprole na China (Lai et al., 2011); de *Plutella xylostella* (L.) a chlorantraniliprole e flubendiamide nas Filipinas, Tailândia (Trocza et al., 2012) e no Brasil (Ribeiro et al., 2014); em *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Bolzan et al., 2019); de *Adoxophyes honmai* no Japão (Uchiyama and Ozawa, 2014); *Chilo suppressalis* na China (Wu et al., 2014); e *Tuta absoluta* na Itália e na Grécia (Roditakis et al., 2015) e no Brasil (Silva et al., 2019). O padrão de herança da resistência a inseticidas diamidas foi caracterizado como autossômico, incompletamente recessivo e monogênico em *S. frugiperda* (Bolzan et al., 2019), *P. xylostella* (Liu et al, 2015) e *T. absoluta* (Silva et al, 2019). Em relação à resistência cruzada, trabalhos demonstraram que existe resistência cruzada entre as moléculas do grupo diamidas nas espécies *S. frugiperda* (Bolzan et al., 2019), *P. xylostella* (Liu et al, 2015) e *T. absoluta* (Silva et al, 2019).

Devido aos problemas de resistência de *H. armigera* em todo o mundo e os riscos de resistência cruzada entre inseticidas diamidas é extremamente importante compreender as bases genéticas da resistência a diamidas para implementar estratégias de MRI antes que esse problema ocorra, com intuito de prolongar a vida útil dessas moléculas. Nesse contexto, para gerar subsídios que apoiem programas de manejo de resistência e compreender a rápida redução da suscetibilidade encontrada no capítulo de monitoramento; realizou-se seleção e caracterização do padrão de herança de *H. armigera* resistente a flubendiamide, avaliação da resistência cruzada entre chlorantraniliprole e cyantraniliprole, além da dominância funcional baseada na sobrevivência e consumo foliar de linhagens resistente, heterozigotos e suscetível em folhas de soja tratadas com flubendiamide.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1 Manutenção das linhagens

A linhagem suscetível foi coletada na cultura do feijoeiro em setembro de 2013 no município de Luiz Eduardo Magalhães, estado da Bahia (12°05'58" S e 45°47'54" W). A linhagem suscetível é mantida na ausência de pressão de seleção de inseticidas por 33 gerações, no Laboratório de Resistência de Artrópodes (ESALQ-USP).

A linhagem resistente a flubendiamide (Flub-R) foi proveniente de uma população coletada na cultura da soja no município de Luiz Eduardo Magalhães – Bahia (12°05'58" S e 45°47'54" W), em janeiro de 2016, onde foram selecionadas centenas de lagartas sobreviventes da dose diagnóstica de flubendiamide 2,64 µg.cm⁻² (Belt®, Bayer CropScience; 480g i.a. L⁻¹) (Pereira et al., 2020). A seleção foi iniciada em 2016 (Pereira, 2017) no Laboratório de Resistência de Artrópodes e com

intuito de elevar a homogeneidade da linhagem resistente, a dose de seleção foi aumentada gradualmente por 8 gerações até atingir $157,89 \mu\text{g a.i.cm}^{-2}$; em seguida após a 14ª geração de seleção os insetos foram utilizados para estudos caracterização da resistência. Lagartas de ambas as linhagens foram alimentadas com uma dieta artificial à base de feijão, levedo de cerveja, proteína de soja, germe de trigo e caseína (Greene et al., 1976). As lagartas da linhagem Sus foram individualizadas ao atingirem o terceiro ínstar em copos plásticos de 50 mL contendo dieta artificial. As lagartas da linhagem Flub-R ao atingirem terceiro ínstar foram expostas ao inseticida flubendiamide conforme descrito acima, todas as gerações e posteriormente as lagartas sobreviventes foram individualizadas em copos plásticos de 50ml com dieta artificial. Os adultos foram mantidos em gaiolas de PVC fechadas no topo com tecido do tipo tule para substrato de oviposição. A tecido do tipo tule contendo ovos foi substituído a cada dois dias, e as lagartas recém-eclodidas foram transferidas para copos plásticos de 100 mL contendo dieta artificial. Os insetos foram mantidos em condições controladas a $25 \pm 1^\circ\text{C}$, $70 \pm 10\%$ umidade relativa e fotofase de 14h em todas as etapas de desenvolvimento e nos bioensaios.

3.2.2 Caracterização da resistência de *H. armigera* ao inseticida flubendiamide

Para caracterizar a resistência a flubendiamide, lagartas de terceiro instar da linhagem resistente, suscetível a flubendiamide foram submetidas ao bioensaios de dose-resposta com o inseticida flubendiamide (Belt®). O inseticida foi diluído em água destilada contendo o surfactante Triton® em 0,1% para obter uma distribuição uniforme da solução sobre a superfície da dieta. O tratamento controle constituía de água destilada e Triton®. Foram testadas sete a nove doses logaritmicamente distribuídas, entre 0,003 e 0,088 $\mu\text{g i.a. cm}^{-2}$ (Sus) e 15,79 e 5052,63 $\mu\text{g i.a. cm}^{-2}$ (Flub-R); obtendo mortalidade de 5 a 95% das lagartas. O método de bioensaio utilizado foi aplicação de inseticida na superfície da dieta, em placas de acrílico de 24 células (Costar®), preenchida com 1,25 mL de dieta artificial (Greene et al., 1976) por poço. A solução de inseticida (30 μL) foi aplicada à superfície da dieta em cada célula. Os bioensaios foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizado, em cada dose foram testadas pelo menos 72 repetições, constituídas por uma lagarta de terceiro ínstar. As placas foram seladas com suas tampas e mantidas em condições controladas. A mortalidade das lagartas foi avaliada após 96 horas após a infestação das lagartas. Os dados de mortalidade foram submetidos à análise do Probit, utilizando-se o software Polo-Plus (LeOra-Software, 2002). Foram realizados testes de paralelismo e igualdade ($P < 0,05$) para testar as hipóteses de igualdade e paralelismo entre as linhagens (Robertson et al., 2007). Também foi calculada a razão de resistência da linhagem resistente a flubendiamide com

base na dose que mata 50% dos insetos testados (DL_{50}), obtida pela divisão do DL_{50} da linhagem Flub-R pelo DL_{50} da linhagem Sus (Robertson & Preisler, 1992).

3.2.3 Herança da resistência

Para avaliar a herança da resistência de *H. armigera* a flubendiamide, foram realizados cruzamentos recíprocos utilizando-se 50 casais para cada cruzamento recíproco H1 ($\text{♀ Sus} \times \text{♂ Flub-R}$) e H2 ($\text{♀ Flub-R} \times \text{♂ Sus}$). Os bioensaios de dose-resposta foram realizados com a lagartas de terceiro ínstar da prole F1. As lagartas foram expostas a oito doses de flubendiamide espaçadas em escala logaritmicamente, entre 15,79 e 5052,63 μg de flubendiamide cm^{-2} . Para cada dose foram testadas pelo menos 72 repetições, constituídas por uma lagarta de terceiro ínstar. Os dados de mortalidade foram avaliados conforme descrito acima.

3.2.3.1 Dominância da resistência

Para estimar a dominância da resistência ao flubendiamide, foram utilizados dados de mortalidade do bioensaios de dose-resposta delineados acima. De acordo com o método de Stone (Stone, 1968) o grau médio de dominância é dado por equação [1]:

$$[1] \quad D = \frac{(2X_F - X_R - X_S)}{(X_R - X_S)}$$

Onde os coeficientes X_F , X_R e X_S são logaritmos da DL_{50} estimada para os heterozigotos, linhagem Flub-R e Sus, respectivamente. Os valores de dominância (D) $D = 1$ indica completamente dominante, $0 < D < 1$ indica incompletamente dominante, $-1 < D < 0$ indica incompletamente recessivo, e $D = -1$ indica completamente recessivo.

A dominância da resistência também foi analisada utilizando-se o método proposto por Bourguet et al. 2000, dado pela equação [2], onde a dominância foi calculada para cada dose testada.

$$[2] \quad DML = \frac{(M_{RS} - M_{SS})}{(M_{RR} - M_{SS})}$$

Onde M_{RR} , M_{SS} e M_{RS} representam as mortalidades das linhagens resistentes, suscetíveis e heterozigotos para cada dose testada, respectivamente. Para os valores de dominância efetiva (D_{ML}) $D_{ML} = 1$ indica completamente dominante, D_{ML} próximo de 1 indica incompletamente dominante, próximo de 0 indica incompletamente recessivo, e $D_{ML} = 0$ indica completamente recessivo.

3.2.3.2 Número de genes associados à resistência

Para avaliar o número de genes associados à resistência de *H. armigera* ao flubendiamide em, foram realizados retrocruzamentos entre os heterozigotos (H1 e H2) e a linhagem suscetível (parental fenotipicamente mais distinta dos heterozigotos) conforme metodologia de Tsukamoto (1983) e Roush & Daly (1990). Os bioensaios de dose-resposta foram realizados com a prole, utilizando cinco doses entre 0,051 e 157.895 µg de flubendiamide cm⁻². Os bioensaios foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizado, em cada dose foram testadas pelo menos 72 lagartas de terceiro ínstar e os dados de mortalidade foram utilizados para testar a hipótese de herança monogênica pelo teste qui-quadrado, com a equação [3] (Sokal & Rohlf, 1995).

$$[3] \quad \chi^2 = \frac{(Ni - pni)^2}{pqni}$$

Onde Ni representa a mortalidade observada na dose i ; p é a mortalidade esperada, calculada com base na equação mendeliana [4] (Georghiou, 1969); ni é o número de indivíduos testados na dose i ; e $q = 1 - p$.

$$[4] \quad p = \frac{(a + b)}{2}$$

Onde a é a mortalidade da linhagem parental utilizada (Sus), e b é a mortalidade do heterozigoto, ambos em determinadas doses. A hipótese de herança monogênica é rejeitada quando χ^2 calculado $\geq \chi^2$ tabelado, com um grau de liberdade ($P < 0,05$).

3.2.4 Resistência cruzada entre inseticidas diamidas em *H. armigera*

Lagartas de terceiro ínstar s linhagens suscetível e resistente a flubendiamide foram utilizadas em bioensaios de dose-resposta com os inseticidas chlorantraniliprole (Premio[®], FMC; 200 g i.a./L) e cyantraniliprole (Cyazypyr[®], FMC; 100 g i.a./L) para estabelecer um perfil de resistência cruzada com flubendiamide. Ambas as linhagens foram expostas a sete doses de chlorantraniliprole (0,002 a 0,884 µg i.a. cm⁻²) e seis a sete doses para cyantraniliprole (0,005 a 1,579 µg a.i. cm⁻²). Para cada dose foram testadas pelo menos 72 lagartas. Os bioensaios e análise dos dados de mortalidade foram realizados como descrito anteriormente na caracterização da resistência.

3.2.5 Dominância funcional da resistência

Para compreender as implicações da resistência de *H. armigera* ao inseticida flubendiamide no manejo da resistência, foram utilizadas quatro linhagens: suscetíveis (Sus), resistente a flubendiamide (Flub-R) e heterozigotos H1 (♀ Sus × ♂ Flub-R) e H2 (♀ Flub-R × ♂ Sus). As linhagens foram avaliadas em folhas de soja tratadas e não tratadas com flubendiamide, na concentração de 112 mg i. a. L⁻¹ (máxima dose e volume de calda recomendado pela bula para aplicação na cultura da soja). O método de bioensaio utilizado foi imersão de folha, por 5 segundos, e após secagem, transferida para uma placa de vidro. Os testes foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizado, com uma lagarta de terceiro ínstar sobre cada folíolo, totalizando 30 repetições por tratamento (30 lagartas). Após 96h foi realizada a avaliação da sobrevivência larval, e foram consideradas mortas quando as lagartas não se moviam após serem tocadas por pinças; e o consumo foliar foi avaliado pela digitalização das folhas com uma câmera digital e o consumo estimado pelo software ImageJ (Rasband, 2016).

Todos os dados foram submetidos a testes de homoscedasticidade (Bartlett) e normalidade (Shapiro & Wilk). Como os dados de sobrevivência não se encaixavam nessa distribuição, foram analisados por meio de modelos lineares generalizados (GLM). Onde, as médias foram separadas para comparação em pares usando o pacote "multcomp" no software R (R Core Team, 2018). Os dados de consumo de folha foram submetidos ao teste two-way ANOVA e Tukey ($P < 0,05$) utilizando o pacote "ExpDes.pt". (R Core Team, 2018).

3.3 RESULTADOS

3.3.1 Caracterização da resistência de *H. armigera* ao inseticida flubendiamide

Os valores LD₅₀ (IC95%) foram de 0,018 (0,015-0,026) µg flubendiamide cm⁻² para linhagem suscetível e 927,11 (772,04-1098,28 µg flubendiamide cm⁻²) para linhagem resistente ao flubendiamide (Tabela 1), resultando em uma razão de resistência de > 50.000 vezes, com rejeição das hipóteses de igualdade ($\chi^2 = 613$; gl = 2; $P > 0,01$) e paralelismo ($\chi^2 = 4,74$; gl = 1; $P = 0,029$) entre slopes e intercepts das linhagens (Tabela 1).

3.3.2 Padrão de herança da resistência

As linhagens heterozigotas não diferiram umas das outras pelo teste de igualdade ($\chi^2 = 0,85$; gl = 2; $P = 0,653$) e paralelismo ($\chi^2 = 0,69$; gl = 1; $P = 0,405$). Os valores de LD₅₀ foram 548,23

(350,38-781,93) μg flubendiamide cm^{-2} para H1 (♀ Sus $\times$ ♂ Flub-R) e 504,35 (349,50-718,28 μg i.a. cm^{-2}) para H2 (♀ Flub-R $\times$ ♂ Sus) (Tabela 1). Portanto, este resultado confirma a hipótese de herança autossômica da resistência de *H. armigera* a flubendiamide e desconsidera a possibilidade de herança ligada ao sexo e a herança maternal.

Tabela 1. Dose-resposta ao inseticida flubendiamide em linhagens de *Helicoverpa armigera* suscetíveis (Sus), resistentes (Flub-R) e seus heterozigotos ao flubendiamide.

Linhagem	n ^a	Inclinação ($\pm$ EP)	DL ₅₀ (IC95%) ^b	χ^2 (d.f.) ^c	RR ^d
Sus	912	2,09($\pm$ 0,19)	0,018 (0,015 - 0,026)	4,24 (5)	-
Flub-R	805	1,67 ($\pm$ 0,14)	927,110 (772,04 – 1098,28)	1,52 (6)	51506,11
♀ SUS $\times$ ♂ Flub-R	803	1,20 ($\pm$ 0,11)	548,226 (350,38 – 781,93)	9,26 (6)	30457,00
♀ Flub-R $\times$ ♂ SUS	781	1,09 ($\pm$ 0,08)	504,347 (349,50 – 718,28)	10,07 (6)	28019,28

^a número de insetos testados;

^b (LD) Dose de flubendiamide necessária para matar 50% das lagartas (μg i.a. cm^{-2}) e intervalo de confiança (IC) em 95%;

^c Graus de liberdade;

^d Razão de resistência LD₅₀ de linhagem resistente/ LD₅₀ de linhagem suscetível.

3.3.2.1 Dominância da resistência

A análise da dominância foi avaliada por dois métodos, segundo o método de Stone (Stone, 1968) a estimativa dos graus médios de dominância para os heterozigotos foi de 0,90 para H1 (♀ Sus $\times$ ♂ Flub-R) e 0,89 para H2 (♀ Flub-R $\times$ ♂ Sus). Portanto, a resistência a flubendiamide foi caracterizada como incompletamente dominante. Da mesma forma, de acordo com o método de Bourguet et al. (2000), que calcula a dominância para cada dose testada, os valores de dominância foram superiores a 0,73 em todas as doses testadas, indicando uma dominância incompletamente dominante (Fig. 1). Com exceção na dose mais baixa testada que é a dose recomendada no campo, onde a dominância é completamente dominante (Fig. 1). Assim, os valores de dominância diminuem à medida que a dose de flubendiamide aumenta.

Figura 1. Dominância da resistência de *Helicoverpa armigera* ao flubendiamide em função da dose testada. Heterozigotos representados por H1 = ♀ Sus × ♂ Flub-R e H2 = ♀ Flub-R × ♂ Sus.

3.2.2 Número de genes associados à resistência

A mortalidade observada e esperada das lagartas de terceiro ínstar derivada do retrocruzamento entre os heterozigotos com o parental fenotipicamente mais distinto (Sus), foi comparada pelo teste qui-quadrado (Tabela 2). Esses resultados fenótipo indicam que a herança da resistência de *H. armigera* a flubendiamide tem um efeito monogênico, devido aos valores qui-quadrados calculados ($P > 0,05$) não serem significativos em todas as doses testadas, aceitando a hipótese monogênica.

Tabela 2. Análise qui-quadrado (χ^2) dos dados de mortalidade dos cruzamentos entre *Helicoverpa armigera* suscetível a flubendiamide (Sus) e a prole F1 dos cruzamentos recíprocos (H1 = ♀ Sus × ♂ Flub-R e H2 = ♀ Flub-R × ♂ Sus) exposta a diferentes doses de flubendiamide.

Dose μ g. cm ⁻²	Mortalidade de		χ ²	P
	Retrocruzamentos			
	Obs. ^a	Exp. ^b		
	♀ H1 × ♂ Sus			
0,051	27,14	38,54	1,78	0,182
0,158	43,25	50,00	0,93	0,335
1,579	38,93	50,00	3,38	0,066
15,789	51,79	50,00	0,38	0,540
157,895	68,93	63,54	1,62	0,203
	♂ H1 × ♀ Sus			
0,051	27,14	38,54	1,78	0,103
0,158	43,25	50,00	0,93	0,536
1,579	38,93	50,00	3,38	0,414
15,789	51,79	50,00	0,38	0,838
157,895	68,93	63,54	1,62	0,138
	♀ H2 × ♂ Sus			
0,051	38,54	26,06	2,66	0,299
0,158	50,00	46,06	0,38	0,540
1,579	50,00	45,07	0,67	0,307
15,789	50,00	48,24	0,04	0,540
157,895	63,54	70,42	2,2	0,232
	♂ H2× ♀ Sus			
0,051	38,54	29,79	1,08	0,299
0,158	50,00	45,74	0,38	0,540
1,579	50,00	43,62	1,04	0,838
15,789	50,00	52,13	0,38	0,683
157,895	62,86	68,09	1,43	0,160

^a Mortalidade observada;

^b Mortalidade esperada, baseada na herança mendeliana;

Diferença significativa ($P < 0,05$, gl=1) entre as mortes observadas e esperadas.

3.2.3 Resistência cruzada entre inseticidas diamidas em *H. armigera*

A linhagem resistente a flubendiamide mostrou baixa resistência cruzada com inseticidas diamidas antranílicas (Tabela 3). A linhagem Flub-R mostrou uma razão de resistência de 4,7 vezes para chlorantraniliprole e 5,6 vezes para cyantraniliprole, são valores significativamente baixos quando comparados à resistência a flubendiamide (>50.000 vezes). No entanto, mesmo com baixa razão de resistência quando exposta a chlorantraniliprole a linhagem resistente difere da linhagem suscetível pelo teste de igualdade ($\chi^2 = 107$; gl = 2; $p < 0,01$) e pela não sobreposição do intervalo de confiança em 95% para valores DL_{50} (Tabela 3), mas não pelo teste de paralelismo ($\chi^2 = 0,97$; gl = 1; $p = 0,326$), indicando que as curvas apresentam inclinações semelhantes. Da mesma forma na exposição ao cyantraniliprole, apresentaram diferença entre linhagem resistente e suscetível por teste de igualdade ($\chi^2 = 111$; gl = 2; $p < 0,01$) e pela não sobreposição do intervalo de confiança em 95% para valores DL_{50} (Tabela 3), mas inclinação semelhante por teste de paralelismo ($\chi^2 = 3,56$; gl = 1; $p = 0,06$).

Tabela 3. Dose-resposta das linhagens suscetíveis (Sus) e resistentes (Flub-R) de *Helicoverpa armigera* a chlorantraniliprole e cyantraniliprole.

Inseticida	Linhagem	n ^a	Inclinação ($\pm$ EP)	DL ₅₀ (IC 95%) ^b	χ^2 (d.f.) ^c	RR ^d
Chlorantraniliprole	Sus	643	1,42 ($\pm$ 0,15)	0,021 (0,014 - 0,029)	7,02 (5)	-
	Flub-R	863	1,59 ($\pm$ 0,11)	0,099 (0,073 – 0,137)	2,21 (5)	4,7
Cyantraniliprole	Sus	569	1,55 ($\pm$ 0,13)	0,041 (0,033 – 0,049)	1,6 (5)	-
	Flub-R	708	1,23 ($\pm$ 0,13)	0,222 (0,172 – 0,299)	2,11 (4)	5,6

^a número de insetos testados;^b (LD) Dose de flubendiamide necessária para matar 50% das lagartas ($\mu\text{g i.a. cm}^{-2}$) e intervalo de confiança (IC) em 95%;^c Graus de liberdade;^d Razão de resistência.

3.3.2.4 Dominância funcional da resistência

Não houve diferença estatística entre as linhagens testadas na sobrevivência e no consumo de folhas não tratadas com flubendiamide, com média superior a 96,6% de sobrevivência em todos os tratamentos ($F=0,935$; d.f.= 2; $p < 0,817$) (Fig. 2) e $0,773 \text{ cm}^2$ de consumo foliar/lagartas ($F=0,136$; d.f.= 2; $p = 0,938$) (Fig 3). No entanto, quando as linhagens foram alimentadas com folhas de soja tratadas com flubendiamide, as linhagens heterozigotas e resistente apresentaram sobrevivência média superior a 95%, enquanto a sobrevivência da linhagem suscetível foi de apenas $10,3\% \pm 4,17$ ($F=34,037$; d.f.= 2; $p = < 0,001$) (Fig. 2).

Em relação ao consumo foliar em folhas tratadas com flubendiamide, a linhagem suscetível apresentou o menor consumo foliar com média de $0,059 \pm 0,016 \text{ cm}^2/\text{lagarta}$, e as linhagens H1, H2 e Flub-R apresentaram o maior consumo foliar, com médias acima de $0,605 \text{ cm}^2/\text{lagarta}$ ($F=25,983$; d.f.= 2; $p < 0,001$) (Fig 3). Quando analisada a redução do consumo de folhas após a aplicação do inseticida flubendiamide, apenas a linhagem suscetível apresentou redução significativa de $0,744 \text{ cm}^2$ para $0,059 \text{ cm}^2$ ($F=21,051$; d.f.= 5; $p < 0,001$). As demais linhagens não apresentaram redução no consumo.

Em resumo, a sobrevivência dos heterozigotos, bem como o consumo foliar das folhas tratadas com flubendiamide foram semelhantes à linhagem resistente; demonstrando que a resistência de *H. armigera* a flubendiamide na concentração recomendada para campo é funcionalmente dominante.

Figura 2. Sobrevivência de linhagens de *Helicoverpa armigera* ($\pm$ EP) suscetíveis (Sus), resistentes (Flub-R) e heterozigotos (H1 = ♀ Sus X ♂ Flub-R; H2 = ♀ Flub-R X ♂ Sus) em folhas de soja com e sem flubendiamide (112 mg i. a. L⁻¹). *Diferença significativa entre as linhagens de acordo com o teste de Tukey (P <0,05).

Figura 3. Consumo de foliar ($\pm$ EP) de linhagens de *Helicoverpa armigera* suscetíveis (Sus), resistentes (Flub-R) e heterozigotos (H1 = ♀ Sus X ♂ Flub-R; H2 = ♀ Flub-R X ♂ Sus) em folhas de soja com e sem flubendiamide (112 mg i. a. L⁻¹). * Diferença significativa entre as outras linhagens de acordo com o teste de Tukey (P <0,05).

3.4 DISCUSSÃO

O presente estudo demonstra que a pressão de seleção de flubendiamide sobre *H. armigera*, favoreceu diretamente a evolução da resistência, possibilitando a seleção de uma linhagem com a razão de resistência superior a 50.000 vezes após 14 gerações sob pressão de seleção. A linhagem selecionada foi proveniente da região agrícola do Oeste da Bahia, que apresenta paisagem agrícola bastante intensa e complexa durante todo ano, o que pode ter favorecido a intensa pressão de seleção a inseticidas. Também foram relatados altos índices de resistência para flubendiamide em populações coletadas de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Bolzan et al., 2019) e *Tuta absoluta* (Meyrick) (Silva et al., 2019) coletadas na região Oeste da Bahia, indicando alta pressão de seleção com inseticidas diamidas no controle de lepidópteros pragas nessa região.

A caracterização das bases genéticas da resistência de *H. armigera* a flubendiamide foi definida como autossômica, incompletamente dominante e monogênica. Em partes, o padrão de herança semelhante foi reportado para outros lepidópteros pragas resistentes a diamidas, tais como em *S. frugiperda* (Bolzan et al., 2019), *T. absoluta* (Silva et al., 2019) e *Plutella xylostella* (L.) (Wang et al., 2013) onde a herança foi caracterizada como autossômica, monogênica, porém incompletamente recessiva. O padrão de herança da resistência dominante encontrado em nosso trabalho favorece a evolução da resistência, principalmente devido à sobrevivência dos heterozigotos após a aplicação do inseticida (Roush & McKenzie, 1987). A sobrevivência dos heterozigotos no campo aumenta a frequência dos indivíduos carreadores do alelo de resistência, acelerando a evolução da resistência, além da grande capacidade de voo de *H. armigera* (Feng et al., 2009) e reprodutiva o que pode potencializar a disseminação dos alelos da resistência para diferentes áreas.

Em condições de campo a dominância da resistência pode sofrer variações dependendo da concentração de inseticida utilizado e fatores ambientais (Bourguet et al., 1996). Os resultados de dominância funcional e consumo foliar são mais próximos ao que ocorre no campo, e demonstram os possíveis impactos da resistência de *H. armigera* a flubendiamide. As folhas de soja tratadas com flubendiamide na concentração comercial recomendada, não reduziram a sobrevivência e o consumo de folhas das linhagens resistente e heterozigotos. Em outras palavras, provavelmente no campo, esses insetos continuariam a causar danos e manter o alelo de resistência na área, mesmo após a pulverização de flubendiamide, favorecendo o processo evolutivo (Roush & Daly, 1990).

Além de dominante, a linhagem resistente de *H. armigera* a flubendiamide foi caracterizada como monogênica nas doses testadas. Este fato deve estar relacionado a mecanismos de resistência, pois altas razões de resistência a diamidas são geralmente associadas à mutação do canal de rianodina (RyR) (Richardson et al., 2020), como reportado para *S. frugiperda* e *T. absoluta*

(Boaventura et al., 2020; Roditakis et al., 2015) e essa mutação pontual no sítio de ação pode estar ligada a um único gene, o que talvez corresponda à resistência monogênica. Portanto, mais estudos de base molecular são necessários para investigar os mecanismos associados à resistência de *H. armigera* a flubendiamide.

Neste estudo, a linhagem de *H. armigera* resistente a flubendiamide (diamida derivada de ácido ftálico) apresentou baixa resistência cruzada a inseticidas diamidas antranílicas (chlorantraniliprole e cyantraniliprole). No entanto, apesar de baixa resistência cruzada, o uso de uma das moléculas favoreceria seleção de indivíduos resistentes para as demais. Comumente inseticidas do mesmo grupo químico, apresentam resistência cruzada, como vários casos relatados de resistência entre inseticidas diamidas para *S. frugiperda* (Bolzan et al., 2019), *P. xylostella* (Liu et al., 2015) e *T. absoluta* (Silva et al., 2019). A variação na resistência cruzada pode estar relacionada com estruturas moleculares do inseticida, apesar de pertencerem ao mesmo grupo químico, são de subgrupos diferentes e se ligam a locais ligeiramente diferentes no RyR (Cordova et al., 2006; Qi & Casida, 2013; Sattelle et al., 2008).

Este foi o primeiro caso de resistência de *H. armigera* a um inseticida do grupo das diamidas no mundo. O padrão de herança dominante da resistência de *H. armigera* a flubendiamide e a presença de resistência cruzada a outras diamidas favorecem a evolução da resistência. Portanto, para prolongar a vida útil das diamidas no Brasil é necessário a implementação de estratégias de MRI, explorando uso de plantas geneticamente modificadas, rotação com inseticidas que não apresentam resistência cruzada, além de táticas em conjunto com programas MIP.

REFERÊNCIAS

- Achaleke, J., Brévault, T., 2010. Inheritance and stability of pyrethroid resistance in the cotton bollworm *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) in Central Africa. *Pest Manag. Sci.* 66, 137–141. <https://doi.org/10.1002/ps.1843>
- Ahmad, M., Denholm, I., Bromilow, R.H., 2006. Delayed cuticular penetration and enhanced metabolism of deltamethrin in pyrethroid-resistant strains of *Helicoverpa armigera* from China and Pakistan. *Pest Manag. Sci.* 62, 805–810. <https://doi.org/10.1002/ps>
- Armes, N. J. et al. Insecticide resistance in *Helicoverpa armigera* in South India. *Pesticide science*, v. 34, n. 4, p. 355–364, 1992.
- Bird, Lisa J, Bird, L J, Drynan, L.J., Walker, P.W., 2018. The Use of F2 Screening for Detection of Resistance to Emamectin Benzoate , Chlorantraniliprole , and Indoxacarb in Australian Populations of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) Insecticide Resistance and Resistance Management The Use of F 2 Sc. <https://doi.org/10.1093/jee/tox037>

- Bird, L.J., 2016. Genetics, cross-resistance and synergism of indoxacarb resistance in *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). *Pest Manag. Sci.* 73, 578–581. <https://doi.org/10.1002/ps.4334>
- Boaventura, Debora, Anderson Bolzan, Fernando EO Padovez, Daniela M Okuma, Celso Omoto, Ralf Nauen. 2020. Detection of a ryanodine receptor target-site mutation in diamide insecticide resistant fall armyworm, *Spodoptera frugiperda*. *Pest Manag. Sci.* 76, 47–54. <https://doi.org/10.1002/ps.5505>
- Bolzan, A., Padovez, F.E.O., Nascimento, A.R.B., Kaiser, I.S., Lira, E.C., Amaral, F.S.A., Kanno, R.H., Malaquias, J.B., Omoto, C., 2019. Selection and characterization of the inheritance of resistance of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) to chlorantraniliprole and cross-resistance to other diamide insecticides 2019. <https://doi.org/10.1002/ps.5376>
- Bourguet, D., Genissel, A., Raymond, M., 2000. Insecticide Resistance and Dominance Levels. *J. Econ. Entomol.* 93, 1588–1595. <https://doi.org/10.1603/0022-0493-93.6.1588>
- Bourguet, D., Raymond, M., Wright, S., 1996. Dominance of Insecticide Resistance Presents a Plastic Response. *Genetics* 143, 407–416. <https://doi.org/10.1093/genetics/143.1.407>
- Cordova, D., Benner, E.A., Sacher, M.D., Rauh, J.J., Sopa, J.S., Lahm, G.P., Selby, T.P., Stevenson, T.M., Flexner, L., Gutteridge, S., Rhoades, D.F., Wu, L., Smith, R.M., Tao, Y., 2006. Anthranilic diamides: A new class of insecticides with a novel mode of action, ryanodine receptor activation. *Pestic. Biochem. Physiol.* 84, 196–214. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2005.07.005>
- Czepak, C., Albernaz, K.C., Vivan, L.M., Guimarães, H.O., Carvalhais, T., 2013. Primeiro registro de ocorrência de *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) no Brasil. *Pesqui. Agropecu. Trop.* 43, 110–113. <https://doi.org/10.1590/S1983-40632013000100015>
- Dennehy, T.J., 1987. Decision-making for managing pest resistance to pesticides, in: Ford, M.G., Hollaman, D.W., Khambay, B.P.S., Sawiki, R.M. (Eds.), *Combating Resistance to Xenobiotics: Biological and Chemical Approaches*. Ellis Horwood, Chichester, England, pp. 118–126.
- Feng, H., Wu, X., Wu, B., Wu, K., 2009. Seasonal Migration of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) Over the Bohai Sea. *J. Econ. Entomol.* 102, 95–104. <https://doi.org/10.1603/029.102.0114>
- French-Constant, R.H., Roush, R.T., 1990. Resistance Detection and Documentation: The Relative Roles of Pesticidal and Biochemical Assays, in: *Pesticide Resistance in Arthropods*. SPRINGER, Boston, MA, pp. 4–38

- Georghiou, G.P., Taylor, C.E., 1977. Genetic and biological influences in the evolution of insecticide resistance. *J. Econ. Entomol.* 70, 319–323. <https://doi.org/10.1093/jee/70.3.319>
- Georghiou, G.P., Taylor, C.E., 1977. Operational Influences in the Evolution of Insecticide Resistance. *J. Econ. Entomol.* 70, 653–658. <https://doi.org/10.1093/jee/70.5.653>
- Greene, G.L., Leppla, N.C., Dickerson, W.A., 1976. Velvetbean Caterpillar: A Rearing Procedure and Artificial Medium. *J. Econ. Entomol.* 69, 487–488. <https://doi.org/10.1093/jee/69.4.487>
- Haan, N.L., Zhang, Y., Landis, D.A., 2020. Predicting Landscape Configuration Effects on Agricultural Pest Suppression. *Trends Ecol. Evol.* <https://doi.org/10.1016/j.tree.2019.10.003>
- Jeanguenat, A., 2013. The story of a new insecticidal chemistry class: The diamides. *Pest Manag. Sci.* 69, 7–14. <https://doi.org/10.1002/ps.3406>
- Kranthi, K.R., Jadhav, D.R., Kranthi, S., Wanjari, R.R., Ali, S.S., Russell, D.A., 2002. Insecticide resistance in five major insect pests of cotton in India. *Crop Prot.* 21, 449–460. [https://doi.org/10.1016/S0261-2194\(01\)00131-4](https://doi.org/10.1016/S0261-2194(01)00131-4)
- Lahm, G.P., Cordova, D., Barry, J.D., 2009. New and selective ryanodine receptor activators for insect control. *Bioorganic Med. Chem.* 17, 4127–4133. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2009.01.018>
- Lai, T., Li, J., Su, J., 2011. Monitoring of beet armyworm *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae) resistance to chlorantraniliprole in China. *Pestic. Biochem. Physiol.* 101, 198–205. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2011.09.006>
- LeOra-Software, 2002. Polo-PLus. POLO, for windows computer program.
- Liu, X., Ning, Y., Wang, H., Wang, K., 2015. Cross-resistance, mode of inheritance, synergism, and fitness effects of cyantraniliprole resistance in *Plutella xylostella*. *Entomol. Exp. Appl.* 157, 271–278. <https://doi.org/10.1111/eea.12361>
- Mota-Sanchez, D., Wise, J.C., 2020. Arthropod Pesticide Resistance Database Michigan State Univ. URL <http://www.pesticideresistance.org>
- Oliveira, C.M., Auad, A.M., Mendes, S.M., Frizzas, M.R., 2014. Crop losses and the economic impact of insect pests on Brazilian agriculture. *Crop Prot.* 56, 50–54. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2013.10.022>
- Pereira, R., 2017. Caracterização da suscetibilidade a inseticidas diamidas e espinosinas em populações de *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) do Brasil. Universidade de São Paulo - ESALQ. <https://doi.org/https://doi.org/10.11606/T.11.2017.tde-29092017-182858>

- Pereira, R.M., Abbade Neto, D., Amado, D., Durigan, M.R., Franciscatti, R.A., Mocheti, M., Omoto, C., 2020. Baseline susceptibility and frequency of resistance to diamide insecticides in *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) populations in Brazil. *Crop Prot.* 105266. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2020.105266>
- Qi, S., Casida, J.E., 2013. Species differences in chlorantraniliprole and flubendiamide insecticide binding sites in the ryanodine receptor. *Pestic. Biochem. Physiol.* 107, 321–326. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2013.09.004>
- R Core Team, 2018. R: A language and environment for statistical computing. R Found. Stat. Comput.
- Richardson, E.B., Troczka, B.J., Gutbrod, O., Davies, T.G.E., Nauen, R., 2020. Diamide resistance: 10 years of lessons from lepidopteran pests. *J Pest Sci* 93, 911–928. <https://doi.org/10.1007/s10340-020-01220-y>
- Ribeiro, L.M.S., Wanderley-Teixeira, V., Ferreira, H.N., Teixeira, Á.A.C., Siqueira, H.A.A., 2014. Fitness costs associated with field-evolved resistance to chlorantraniliprole in *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae). *Bull. Entomol. Res.* 104, 88–96. <https://doi.org/10.1017/S0007485313000576>
- Robertson, J.L., Preisler, H.K., 1992. *Pesticide Bioassays with Arthropods*, 2nd Editio. ed. CRC Press, London, UK. <https://doi.org/10.1201/9781315373775>
- Robertson, J.L., Savin, N.E., Russell, R.M., Preisler, H.K., 2007. *Bioassays with Arthropods*, Second Edi. ed. CRC Press, Boca Raton, FL - USA.
- Roditakis, E., Steinbach, D., Moritz, G., Vasakis, E., Stavrakaki, M., Ilias, A., García-Vidal, L., Martínez-Aguirre, M. del R., Bielza, P., Morou, E., Silva, J.E., Silva, W.M., Siqueira, H.A.A., Iqbal, S., Troczka, B.J., Williamson, M.S., Bass, C., Tsagkarakou, A., Vontas, J., Nauen, R., 2017. Ryanodine receptor point mutations confer diamide insecticide resistance in tomato leafminer, *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae). *Insect Biochem. Mol. Biol.* 80, 11–20. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2016.11.003>
- Roush, R., Daly, J., 1990. The role of population genetics in resistance research and management, in: *Pesticide Resistance in Arthropods*, in: Roush, R., Tabashnik, B. (Eds.), . Chapman and Hall, New York, NY, pp. 97–152.
- Roush, R.T., Miller, G.L., 1986. Considerations for Design of Insecticide Resistance Monitoring Programs. *J. Econ. Entomol.* 79, 293–298. <https://doi.org/10.1093/jee/79.2.293>
- Roush, R.T., McKenzie, J.A., 1987. Ecological genetics of insecticide and acaricide resistance. *Annu. Rev. Entomol.* 361–380.

- Sattelle, D.B., Cordova, D., Cheek, T.R., 2008. Insect ryanodine receptors: Molecular targets for novel pest control chemicals. *Invertebr. Neurosci.* 8, 107–119. <https://doi.org/10.1007/s10158-008-0076-4>
- Silva, J.E., Ribeiro, L.M. da S., Vinasco, N., Guedes, R.N.C., Siqueira, H.Á.A., 2019. Field-evolved resistance to chlorantraniliprole in the tomato pinworm *Tuta absoluta*: inheritance, cross-resistance profile, and metabolism. *J. Pest Sci.* 92, 1421–1431. <https://doi.org/10.1007/s10340-018-1064-z>
- Sokal, R., Rohlf, F., 1995. *Biometry: The principles and practice of statistics in biological research*. W.H. Freeman and Company, New York, NY. <https://doi.org/10.2307/2412280>
- Sosa-Gómez, D.R., Specht, A., Paula-Moraes, S. V., Lopes-Lima, A., Yano, S.A.C., Micheli, A., Morais, E.G.F., Gallo, P., Pereira, P.R.V.S., Salvadori, J.R., Botton, M., Zenker, M.M., Azevedo-Filho, W.S., 2016. Timeline and geographical distribution of *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera, Noctuidae: Heliothinae) in Brazil. *Rev. Bras. Entomol.* 60, 101–104. <https://doi.org/10.1016/j.rbe.2015.09.008>
- Tabashnik, B.E., 1989. Managing Resistance with Multiple Pesticide Tactics: Theory, Evidence, and Recommendations. *J. Econ. Entomol.* 82, 1263–1269. <https://doi.org/10.1093/jee/82.5.1263>
- Tabashnik, B.E., 1994. Evolution of Resistance to *Bacillus thuringiensis*. *Annu. Rev. Entomol.* 39, 47–79. <https://doi.org/10.1146/annurev.en.39.010194.000403>
- Tabashnik, B.E., Dennehy, T.J., Carrière, Y., 2005. Delayed resistance to transgenic cotton in pink bollworm. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 15389–15393. <https://doi.org/10.1073/pnas.0507857102>
- Tabashnik, B.E., Mota-Sanchez, D., Whalon, M.E., Hollingworth, R.M., Carrière, Y., 2014. Defining terms for proactive management of resistance to Bt crops and pesticides. *J. Econ. Entomol.* 107, 496–507. <https://doi.org/10.1603/EC13458>
- Troczka, B., Zimmer, C.T., Elias, J., Schorn, C., Bass, C., Davies, T.G.E., Field, L.M., Williamson, M.S., Slater, R., Nauen, R., 2012. Resistance to diamide insecticides 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. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2012.09.001>
- Troczka, B.J., Williamson, M.S., Field, L.M., Davies, T.G.E., 2017. Rapid selection for resistance to diamide insecticides in *Plutella xylostella* via specific amino acid polymorphisms in the ryanodine receptor. *Neurotoxicology* 60, 224–233. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.neuro.2016.05.012>

- Tsukamoto, M., 1983. Methods of genetic analysis of insecticide resistance, in: Pest Resistance to Pesticides, in: Georgiou, G.P., Saito, T. (Eds.), . Springer US, Boston, MA, pp. 71–98. <https://doi.org/10.1007/978-1-4684-4466-7>
- Uchiyama, T. & Ozawa A. 2014. Rapid development of resistance to diamide insecticides in the smaller tea tortrix, *Adoxophyes honmai* (Lepidoptera: Tortricidae), in the tea fields of Shizuoka Prefecture, Japan. Applied Entomology and Zoology volume 49, 529–534. <https://doi.org/10.1007/s13355-014-0283-x>
- Wang, D., Qiu, X., Ren, X., Niu, F., Wang, K., 2009. Resistance selection and biochemical characterization of spinosad resistance in *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae). Pestic. Biochem. Physiol. 95, 90–94. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2009.07.003>
- Wang, X., Khakame, S.K., Ye, C., Yang, Y., Wu, Y., 2013. Characterisation of field-evolved resistance to chlorantraniliprole in the diamondback moth, *Plutella xylostella*, from China. Pest Manag. Sci. 69, 661–665. <https://doi.org/10.1002/ps.3422>

4. CUSTOS ADAPTATIVOS ASSOCIADOS À RESISTÊNCIA DE *Helicoverpa armigera* (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE) A FLUBENDIAMIDE

RESUMO

A magnitude de custos adaptativos da resistência de insetos a inseticidas interfere na intensidade da seleção e a presença desses custos pode ser explorada em programas de manejo da resistência de insetos (MRI). Com a caracterização da resistência de *Helicoverpa armigera* (Hübner) a flubendiamide (Capítulo 3), o objetivo do presente trabalho foi avaliar os possíveis custos adaptativos associados a essa resistência mediante condução de estudos de tabela de vida de fertilidade, comportamento de defesa contra o predador *Podisus nigrispinus* (Dallas) e estabilidade da resistência na ausência de pressão de seleção em uma população heterogênea formada por 50% de indivíduos suscetíveis e 50% de indivíduos resistentes. Pela análise dos resultados da tabela de vida de fertilidade, há custo adaptativo associado à resistência de *H. armigera* a flubendiamide, com redução de 35% na fecundidade das fêmeas resistentes e heterozigotas em comparação com as fêmeas suscetíveis. A presença de custo adaptativo também foi observada no comportamento de defesa de lagartas de terceiro ínstar de *H. armigera* contra o ataque de *P. nigrispinus*, afetando a linhagem resistente com a redução da distância percorrida em 47% e da velocidade de movimento em 36% quando comparadas com a linhagens suscetível e heterozigota, indicando assim que as lagartas resistentes podem ser mais suscetíveis à predação por *P. nigrispinus*. Por fim, houve restabelecimento da suscetibilidade de *H. armigera* a flubendiamide na população heterogênea, com redução da frequência de resistência de 53,9% para 5,54% em 9 gerações na ausência de pressão de seleção, com DL_{50} estimada de 0,017 $\mu\text{g i.a. cm}^{-2}$ que é próxima a da linhagem suscetível com DL_{50} de 0,020 $\mu\text{g i.a. cm}^{-2}$. Portanto, há custos adaptativos associados à resistência de *H. armigera* a flubendiamide afetando parâmetros biológicos e a suscetibilidade à predação por *P. nigrispinus*, indicando que a resistência é instável. Portanto, a instabilidade da resistência de *H. armigera* a flubendiamide pode ser explorada em programas de MRI no Brasil.

Palavras chaves: Tabela de vida de fertilidade; *Podisus nigrispinus*; estabilidade da resistência; Manejo da Resistência de Insetos

ABSTRACT

The magnitude of the fitness costs associated with insecticide resistance can affect the intensity of selection and the presence of these costs can be exploited in insect resistance management (IRM) programs. After characterizing the resistance of *Helicoverpa armigera* (Hübner) to flubendiamide (Chapter 3), the objective of this study was to assess the possible fitness costs associated with this resistance by evaluating life history traits, defense behavior against the predator *Podisus nigrispinus* (Dallas), and stability of the resistance in the absence of selection pressure in a heterogeneous population consisted of 50% of susceptible individuals and 50% of resistant individuals. Based on life and fertility table analysis, there is a fitness cost associated with *H. armigera* resistance to flubendiamide, with 35% reduction in the fertility of resistant and heterozygous females in compare to susceptible ones. There is also fitness cost in the defense behavior of third instar larvae of *H. armigera* against the attack of *P. nigrispinus* with reduction of 47% in the distance covered and 36% in the speed movement of resistant larvae in compared to susceptible and heterozygous ones, suggesting that resistant larvae can be more susceptible to predation by *P. nigrispinus*. Finally, resetting to susceptibility of *H. armigera* to flubendiamide was detected in the heterogeneous population, with reduction in the frequency of resistance from 53.9% to 5.54% in 9 generations in the absence of selection pressure, with LD_{50} of 0.017 $\mu\text{g a.i. cm}^{-2}$ which is close to the DL_{50} of 0.020 $\mu\text{g a.i. cm}^{-2}$ of the susceptible strain. Therefore, there are fitness costs associated with the resistance of *H. armigera* to flubendiamide related to life history traits and susceptibility to

predation by *P. nigrispinus*, indicating that the resistance is unstable. Therefore, the instability of the resistance of *H. armigera* to flubendiamide can be further exploited in IRM programs in Brazil.

Key words: Life and fertility table; *Podisus nigrispinus*; resistance stability; Insect Resistance Management

4.1 INTRODUÇÃO

A adaptação dos insetos para sobreviverem em um novo ambiente com a presença de inseticida requer a seleção dos raros indivíduos que possuem alelos de resistência (McKenzie, 1996), mas essa adaptação pode ser acompanhada por desvantagens biológicas, fisiológicas e/ou comportamentais na ausência de inseticida (ffrench-Constant & Bass, 2017; Gassmann et al., 2009). Essas desvantagens são causadas devido aos efeitos pleiotrópicos, onde os genes associados à resistência podem afetar outras características fenotípicas (Foster et al., 2003; Freeman et al., 2021; Rostant et al., 2017). Os custos adaptativos associados à resistência devem ser estudado comparando populações com a carga genética semelhantes, para garantir a avaliação dos efeitos pleiotrópicos (ffrench-Constant & Bass, 2017; Gassmann et al., 2009). O custo adaptativo pode ser avaliado mediante à diversos parâmetros, entre eles os biológicos como a tabela de vida de fertilidade e comportamentais referentes a diapausa, sucesso no acasalamento, alteração na produção de feromônios entre outros (Bird et al., 2020; Delisle & Vincent, 2002; Kliot & Ghanim 2012; Freeman et al., 2021; Xu et al., 2010). Outra maneira de se avaliar o custo adaptativo é através da estabilidade da resistência em populações heterogêneas na ausência de exposição de inseticida (Bird et al., 2020; Omoto et al., 1995; Santos-Amaya et al., 2017). A presença e a magnitude de custos adaptativos influenciam na intensidade da evolução da resistência, dessa forma o seu conhecimento dele é importante para o desenvolvimento de estratégias de manejo da resistência possibilitando evitar o aumento líquido da frequência de resistência ou mesmo colabore para o reestabelecimento da suscetibilidade (Carrière et al., 2010; Carrière & Tabashnik, 2001; Dennehy, 1987; Wu et al., 2005).

O desenvolvimento de um manejo de resistência efetivo para *Helicoverpa armigera* (Hübner) no Brasil, é muito importante por ser uma espécie invasora, polífaga, relatada no país desde 2013 (Czepak et al., 2013; Specht et al., 2021) e apresentar dificuldade de controle ao redor do mundo devido aos mais de 840 casos de resistência reportados (Mota-Sanchez & Wise, 2020) para os principais grupos químicos de inseticida (Ahmad et al., 2001; Armes et al., 1992; Bird et al., 2018; Durigan et al., 2017; Kranthi et al., 2002).

Os trabalhos de custo adaptativo associados à resistência a inseticidas diamidas na maioria das vezes se limitam em estudar os efeitos na biologia de insetos resistentes, como o estudo realizado com *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae) resistente a cyantraniliprole com custo adaptativo reduzindo a fertilidade, fecundidade de ovos e viabilidade de pupas, além do prolongamento da fase larval (Liu et al., 2015). Em outro trabalho utilizando a mesma espécie resistente a chlorantraniliprole, os insetos resistentes apresentaram peso e fecundidade significativamente mais baixos, além de maior período de desenvolvimento de larva e pupa (Ribeiro et al., 2014). No entanto, o custo adaptativo associado a resistência às diamidas pode estar associado ao comportamento dos insetos resistentes, uma vez que o principal mecanismos de resistência a esse grupo químico estão associadas a mutações no RyR (Richardson et al., 2020) e essa mutação poderia afetar sistema motor ou as rotas metabólicas do sistema muscular.

Devido à dificuldade de controle de *H. armigera*, para o manejo de sucesso dessa praga é importante a implementação de programas de MIP onde são utilizadas diferentes ferramentas de controle. Portanto, além das táticas tradicionais como o uso de inseticidas e plantas geneticamente modificadas, deve se explorar os inimigos naturais que apresentam potencial no controle de *H. armigera*, como o predador *Podisus nigrispinus* (Dallas, 1851) (Simonato et al., 2020) e os parasitoides *Tetrastichus howardi* and *Trichospilus diatraeae* (Hymenoptera: Eulophidae) (De Oliveira et al., 2016).

Tendo conhecimento que estudos de custos adaptativos associado a resistência são primordiais para o desenvolvimento de estratégias de MRI e os poucos trabalhos estudando o comportamento no custo adaptativo. O objetivo desse trabalho foi avaliar os custos adaptativos associados à resistência de *H. armigera* a flubendiamide, mediante avaliação de tabela de vida de fertilidade, comportamento de defesa contra um importante predador *P. nigrispinus* e a estabilidade da resistência em uma população heterogênea formada por 50% de indivíduos suscetíveis e 50% de indivíduos resistentes

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1 Insetos

A linhagem utilizada como suscetível de referência (Sus) foi obtida a partir de coleta de uma população de *H. armigera* em setembro de 2013 em Luiz Eduardo Magalhães - BA. Esta linhagem tem sido criada na ausência de pressão de seleção com inseticidas por ≈ 40 gerações. A linhagem resistente a flubendiamide (Flub-R) foi também coletada no município de Luiz Eduardo Magalhães – BA em janeiro de 2016 e foi mantida com pressão de seleção com o inseticida flubendiamide (Belt®, Bayer CropScience; 480g i.a. L⁻¹), por 23 gerações antes de serem realizados os bioensaios

de custo adaptativo. A manutenção das linhagens de *H. armigera* foram descritas nos capítulos anteriores e todos os experimentos foram realizados em sala climatizada a $25\pm 1^{\circ}\text{C}$, $70\pm 10\%$ umidade relativa e fotofase de 14h.

Os insetos utilizados nos bioensaios de custo adaptativo não tiveram contato com inseticida na geração avaliada e foram conduzidos os seguintes estudos: I. Avaliação do custo adaptativo investigando a tabela de vida de fertilidade; II. Avaliação do custo adaptativo investigando o comportamento de defesa de lagartas de *H. armigera* resistentes a flubendiamide quando expostas ao predador *P. nigrispinus*; e III. Avaliação da estabilidade da resistência ao inseticida flubendiamide em uma população heterogênea de *H. armigera*.

4.2.2 Tabela de vida de fertilidade

Para avaliar se existe custo adaptativo associado no desenvolvimento e reprodução de *H. armigera* resistente a flubendiamide, foram utilizadas as linhagens suscetível (Sus), linhagem resistente (Flub-R) e apenas um dos heterozigotos ($\text{♀ Flub-R} \times \text{♂ Sus}$). No capítulo anterior demonstramos que a herança da resistência de *H. armigera* a flubendiamide é autossômica, ou seja, ambas as progênes (heterozigotos) produzidas pelos parentais se comportam da mesma forma perante o inseticida, por esse motivo foi utilizado apenas um dos heterozigotos.

Cada tratamento foi composto por 13 bandejas (Advento do Brasil, São Paulo, Brasil) de 16 compartimentos contendo dieta artificial (Greene et al. 1976), totalizando 208 insetos. Posteriormente, as pupas formadas foram individualizadas em copos plásticos transparentes (50 mL), sobre um papel filtro umedecido, até a emergência dos adultos. Na fase adulta, foram formados 30 casais por tratamento, mantidos em gaiolas de PVC (23 cm de altura por 10 cm de diâmetro) e fechadas no topo com um tecido tipo tule (substrato de oviposição). As posturas foram retiradas diariamente para contagem do número de ovos e para avaliação da viabilidade dos ovos, foi contabilizado o número de neonatas eclodidas da 2ª postura.

Foram avaliados diariamente os parâmetros de duração (dias) e viabilidade (%) dos períodos embrionário, larval, pupal e ovo-adulto, além da duração dos adultos, fecundidade (ovos por fêmea) e fertilidade (neonatas por fêmea). Esses parâmetros avaliados foram utilizados na confecção da tabela de vida de fertilidade (Maia et al., 2000), para estimar os parâmetros populacionais como: taxa líquida de reprodução (R_0) que é a estimativa do número médio de fêmeas gerado por fêmea ao longo do período de oviposição e que chegarão na geração seguinte; intervalo entre gerações (TG) que representa o tempo médio entre a postura dos ovos de uma geração e a postura da geração seguinte;; taxa intrínseca de crescimento (r_m) que é o fator relacionado com a velocidade de crescimento da população; razão finita de aumento (λ) que é o fator de multiplicação de

crescimento diário da população. Esses parâmetros foram estimados conforme proposto com método Jackknife (McDonald et al., 1986), utilizando o software R conforme descrito em Maia et al. (2014).

$$R_0 = \sum (mx.lx);$$

$$TG = \sum (mx.lx.x) / \sum (mx.lx);$$

$$rm = \ln (R_0 / T);$$

$$\lambda = \exp (rm);$$

Onde mx é a taxa de fecundidade (fêmeas/fêmea/dia) na idade “ x ” e lx é o índice de sobrevivência acumulado na idade “ x ”.

As análises de duração (dias) e viabilidade (%) das fases de ovo, larva, pupa e ovo-adulto, foram conduzidas no programa R Core Team (2020). Onde os dados foram submetidos ao GLM (Modelos Lineares Generalizados) a qualidade do ajuste do modelo foi verificada com um envelope simulado meio normal “hnp” (Moral et al., 2017), em seguida submetidos a análise de variância ANOVA, separando as linhagens pelo teste Tukey ($P \leq 0,05$) utilizando o pacote "ExpDes.pt".

4.2.3 Comportamento de defesa em relação ao predador *Podisus nigrispinus*

4.2.3.1 Criação de *P. nigrispinus*

Os percevejos *P. nigrispinus* nas fases de ninfa e de adulto foram mantidos em gaiolas de plástico ($30 \times 20 \times 15$ cm) e em sala climatizada a 25 ± 2 °C, $70 \pm 10\%$ UR e 14 horas de fotofase. Ninfas e adultos foram alimentados com lagartas de *H. armigera* e *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) *ad libitum* e com fornecimento de água com um algodão umedecido à cada 48 horas.

As posturas dos percevejos foram coletadas nas gaiolas à cada dois dias, e os ovos foram mantidos em placas de Petri com algodão umedecido até que as ninfas eclodissem. Após 48 horas da eclosão, as ninfas foram colocadas em novas gaiolas plásticas e mantidas até a fase adulta.

4.2.3.2 Testes de comportamento de defesa

Para avaliar se existem alterações no comportamento de defesa de *H. armigera* resistentes a flubendiamide contra o predador *P. nigrispinus*, foram realizados vídeos de 10 minutos registrando o comportamento de defesa das lagartas de terceiro ínstar quando expostas aos adultos do predador *P. nigrispinus* com 48 horas após emergência, mantidos em jejum por 24 horas antes dos testes. A arena de filmagem era formada por uma placa de vidro (14,0 cm de diâmetro) com as paredes

internas revestidas com vaselina para evitar que os insetos subissem pelas paredes deixando a área de observação (base da placa). Foram avaliados três tratamentos de *H. armigera*: linhagem suscetível a flubendiamide (Sus), linhagem resistente (Flub-R) e heterozigoto ($\text{♀ Flub-R} \times \text{♂ Sus}$). Para cada tratamento foram realizadas 18 repetições, composta por um adulto de *P. nigrispinus* e uma lagarta de cada tratamento. As lagartas e os percevejos foram provenientes da criação de laboratório mantida no Laboratório de Resistência de Artrópodes USP-ESALQ.

Esses vídeos foram submetidos à análise usando o sistema de rastreamento de vídeo com o software Ethovision (Ethovision XT 7.0; Noldus Information Technology, Wageningen, Holanda). Foram avaliados: distância percorrida (cm) da lagarta, velocidade máxima da lagarta (cm/s) por ocorrer no momento de fuga/defesa contra o predador, sucesso na predação do percevejo ao final dos 10 minutos. O sucesso na predação era considerado quando o predador conseguia capturar a lagarta.

As análises dos dados foram conduzidas no programa R Core Team (2020). As variáveis contínuas (distância percorrida, velocidade média e velocidade máxima) foram analisadas com um modelo linear misto. Para isto empregou-se a função lmer (Bates et al., 2015). As pressuposições do modelo foram testadas por meio de testes de normalidade e homoscedasticidade. O método de transformação Box-Cox (Box and Cox, 1982) foi necessário apenas para a variável velocidade média. A função cld do pacote multcomp (Hothorn et al., 2008) foi utilizada para contrastar os tratamentos.

A variável predação foi analisada com um modelo linear generalizado bayesiano misto com distribuição do tipo binomial. A qualidade do ajuste do modelo foi verificada com um envelope simulado meio normal (Moral et al., 2017). Os tratamentos foram comparados por meio dos intervalos de credibilidade bayesianos. Nas análises foram utilizadas interações com o método de Monte Carlo e Cadeias de Markov MCMC com três cadeias para cada parâmetro. As convergências das cadeias foram verificadas por meio de análise gráfica (não expostas nesse trabalho). Para estimação dos parâmetros utilizou o pacote MCMCglmm (Hadfield, 2010).

Uma regressão múltipla stepwise (forward e backward), por meio dos testes F parciais, foi utilizada para avaliar os efeitos das variáveis contínuas como velocidade máxima e distância percorrida, o limite de decisão da regressão múltipla stepwise para incluir uma determinada variável independente em cada regressão foi baseado em $P < 0,05$, para isto foi utilizado o pacote olsrr (Hebbali, 2020).

4.2.4 Estabilidade da resistência de *H. armigera* a flubendiamide em condições de laboratório

Foram avaliados três tratamentos contendo diferentes proporções de *H. armigera* suscetíveis e resistentes ao inseticida flubendiamide, mantidos sem pressão insetida. O primeiro tratamento constituiu de uma linhagem 100% resistente ao inseticida flubendiamide (Flub-R), o segundo uma linhagem 100% suscetível (Sus), e o terceiro constituiu de população formada de 50% de casais resistentes e 50% de casais suscetíveis a flubendiamide (proporção 50:50), onde todos os casais contendo a mesma idade foram liberados em uma gaiola. Os 75 casais de cada tratamento foram mantidos por 9 gerações em gaiolas de PVC (30 cm de altura × 40 cm de diâmetro) e fechadas na parte superior com tecido do tipo tule para postura de ovos.

A manutenção dos insetos foi realizada da mesma forma descrita anteriormente com exceção da fase de lagarta, onde uma parte foi utilizada para manter as populações a cada geração e a outra parte utilizada para o monitoramento da resistência. O monitoramento foi realizado com lagartas de terceiro ínstar submetidas ao bioensaios de ingestão com o inseticida flubendiamide na dose diagnóstica (DL_{99}) ao longo das 9 gerações, sendo a mortalidade dos insetos avaliada após 96 horas de exposição ao inseticida. A cada geração foram testadas 21 repetições de 24 lagartas por tratamento, totalizando 504 insetos por geração/tratamento.

Os dados de estabilidade foram analisados utilizando o programa estatístico R Core Team (2020), com a função `gamlss` do pacote `gamlss` (Rigby & Stasinopoulos, 2005) e a distribuição ZIBI (Zero Inflated Binomial) e função de ligação `cloglog`. Logo em seguida foi realizado o teste Post Hoc, teste de Tukey, através da função `glht` do pacote `multcomp` (Hothorn et al., 2008), desta forma foi possível comparar as diferenças estatísticas significativas das médias de cada linhagem em cada geração.

Além do monitoramento à cada geração, também foi realizada uma curva de dose resposta nas populações suscetível (Sus), resistente (Flub-R) na geração F0 antes de iniciar o experimento. Após 9 gerações uma nova curva de dose resposta foi realizada avaliando as três populações (Flub-R, Sus e proporção 50:50). Os dados de mortalidade foram submetidos à análise do Probit, utilizando-se o software Polo-Plus (LeOra-Software, 2002). Foram realizados testes de paralelismo e igualdade ($P < 0,05$) para testar as hipóteses entre as linhagens (Robertson et al., 2007). A razão de resistência da linhagem resistente a flubendiamide foi obtida pela divisão do DL_{50} da linhagem Flub-R ou população heterogênea (50:50) pela DL_{50} da linhagem Sus (Robertson and Preisler, 1992).

4.3 RESULTADOS

4.3.1 Custos adaptativos associados à resistência de *H. armigera* a flubendiamide

4.3.1.1 Tabela de vida de fertilidade

Não houve diferença significativa no tempo de desenvolvimento embrionário entre as linhagens, com duração média de $3,8 \pm 0,14$ dias ($F = 0,98$; $gl = 2, 38$; $P = 0,233$). No entanto, o desenvolvimento da fase larval foi diferente entre as linhagens ($F = 17,13$; $gl = 2, 36$; $P > 0,01$) sendo mais curto nos heterozigota, com média de $24,4 \pm 0,22$ dias, diferente das linhagens resistente e suscetível, com duração de $28,81 \pm 0,36$ e $27,54 \pm 0,40$ dias respectivamente (Figura 1A). A fase de pupa também não apresentou diferença entre as três linhagens testadas com média em torno de 17 dias ($F = 1,57$; $gl = 2, 36$; $P = 0,104$). Para o período ovo-adulto houve diferença significativa entre as linhagens testadas ($F = 18,35$; $gl = 2, 38$; $P > 0,01$) onde o heterozigoto foi a linhagem com o ciclo de desenvolvimento mais curto, com média de $45,42 \pm 0,23$ dias, diferenciando das demais linhagens que apresentaram médias de $48,99 \pm 0,28$ dias e dos resistentes com $50,55 \pm 0,24$ dias (Figura 1A).

A viabilidade da fase de ovo demonstrou que não houve diferença significativa entre as linhagens, com médias variando de 49,41 a 51,19% ($F = 0,53$; $gl = 2, 36$; $P = 0,455$) (Figura 1B). No entanto na fase larval, a linhagem resistente apresentou menor desempenho, com $73,55 \pm 2,88$ %, diferenciando das linhagens suscetíveis e heterozigotos com resultados semelhantes e superiores a 85% ($F = 7,39$; $gl = 2, 36$; $P > 0,01$). Na fase de pupa a melhor viabilidade foi encontrada para os heterozigotos com $85,22 \pm 1,10$ %, seguida pela linhagem suscetível com $76,24 \pm 2,88$ % e a linhagem resistente com $72,10 \pm 2,08$ % ($F = 2,76$, $gl = 2, 36$; $P > 0,05$). Por fim, a viabilidade total de ovo-adulto foi significativamente diferente, apresentando a menor viabilidade média na linhagem resistente de $32,76 \pm 2,34$ %, seguido pela linhagem suscetível com média de $38,77 \pm 2,84$ % e os heterozigotos viabilidade média de $41,85 \pm 2,99$ % (Figura 1B).

Figura 1. Parâmetros biológicos avaliados em linhagem suscetível (Sus), heterozigotos (Het) e resistente (Flub-R) de *Helicoverpa armigera* a flubendiamide. (A) Duração em dias de cada fase de desenvolvimento. (B) Viabilidade em cada fase de desenvolvimento. Letras diferentes sobre as barras de erro representam diferença significativa pelo teste de (Tukey $P < 0,05$).

O ciclo mais curto de desenvolvimento dos heterozigotos (Figura 1A) faz com que o início da fase reprodutiva ocorra cerca de 4 dias antes das linhagens suscetível e resistente, quando as duas linhagens iniciam a oviposição a do heterozigoto já está reduzindo o pico de oviposição (Figura 2). No entanto, apesar desse início mais cedo da fase reprodutiva do heterozigoto, foi a linhagem que apresentou a menor quantidade de ovos por fêmea, assim como a linhagem resistente, se diferenciando significativamente da linhagem Sus onde as fêmeas ovipositaram em média 35% a mais ($F = 5,87$; $gl = 2, 54$; $P > 0,01$) (Tabela 1).

Figura 2. Padrão de oviposição de linhagens de *Helicoverpa armigera* de acordo com a idade das fêmeas. Grupo 1 linhagem suscetível (preto), grupo 2 linhagem resistente (vermelho) e grupo 3 heterozigoto (verde). Média diária de ovos por linhagem representada pela linha contínua.

Tabela 1. Idade reprodutiva (dias) e total de ovos por fêmea das linhagens: suscetível (Sus), resistente (Flub-R) e heterozigoto de *Helicoverpa armigera* a flubendiamide.

Linhagens	Idade da primeira postura	Total de ovos / fêmea
Sus	54,07 ($\pm 0,43$) a	1048,05 ($\pm 101,7$) a
Flub-R	54,48 ($\pm 0,47$) a	672,76 ($\pm 80,1$) b
Heterozigoto	50,11 ($\pm 0,59$) b	674,12 ($\pm 85,5$) b

Média $\pm$ erro padrão

Médias dentro da coluna com diferentes letras são significativamente diferentes (Tukey test, $P > 0,05$)

Como resultado final da tabela de vida gerando os parâmetros de crescimento populacional das linhagens suscetível, heterozigoto e resistente de *H. armigera* a flubendiamide, é possível observar que o tempo para a população dobrar de tamanho (TD) é maior na linhagem resistente ($P < 0,05$) e que não tem diferença entre as linhagens Sus e heterozigoto (Tabela 2). A linhagem resistente foi a que apresentou o menor R_0 , com valor de 101,63; seguido pelo heterozigoto de 135,85 e a linhagem suscetível com 179,78 ($P < 0,05$) (Tabela 2). Em relação aos parâmetros estimados de velocidade de crescimento da população (r_m) e razão finita de aumento (λ) apenas a linhagem Flub-R apresentou diferença significativa em comparação às demais linhagens ($P < 0,05$).

Os parâmetros “ r_m ” e o “ λ ”, são os parâmetros que correlacionam mais dados de desenvolvimento, reprodução e tempo de cada fase por isso são utilizados para medir o custo adaptativo. Dessa forma, usando como cálculo apenas o r_m é possível inferir que a linhagem

resistente de *H. armigera* a flubendiamide apresenta custo relativo de 1.1 em comparação a linhagem suscetível (Tabela 2).

Tabela 2. Parâmetros finais estimados da tabela de vida de fertilidade para as linhagens de *Helicoverpa armigera* suscetível (Sus), resistente a flubendiamide (Flub-R) e heterozigoto.

Linhagens	R_0	TG	r_m	λ
Sus	179,78 ($\pm 18,6$)a	60, 37 ($\pm 0,38$)a	0,08 ($\pm 0,001$)a	1.09 (± 0.002)a
Flub-R	101,63 ($\pm 12,5$)b	58,48 ($\pm 0,29$)b	0,07 ($\pm 0,002$)b	1.08 (± 0.002)b
Heterozigoto	135,85 ($\pm 20,8$)ab	54,59 ($\pm 0,33$)c	0,09 (± 0.003)a	1.09 ($\pm 0,002$)a

Média ($\pm$) erro padrão

Médias dentro da coluna com diferentes letras são significativamente diferentes (Tukey test, $P > 0,05$)

R_0 = taxa líquida de reprodução (número de fêmeas gerada por fêmea a cada geração); TG = tempo médio necessário para cada geração (dias); r_m = taxa intrínseca de crescimento da população (por dia); (λ) razão finita de aumento da população (por dia)

4.3.1.2 Comportamento em relação ao predador *P. nigrispinus*

Com as análises feitas sobre o registro gerado pelo software Ethovision (Figura 3), foi possível avaliar a variação no comportamento de defesa das linhagens suscetível (Sus), heterozigoto (Het) e resistente (Flub-R) de *H. armigera* ao inseticida flubendiamide. A distância média percorrida pelas linhagens Sus e Het foi de 19,36 cm ($\pm 1,80$ cm) cm e 20,05 cm ($\pm 1,49$ cm) respectivamente, diferenciando significativamente ($P < 0,05$) da linhagem Flub-R que se locomoveu apenas 10,25 ($\pm 2,87$) cm (Figura 4).

A velocidade máxima atingida é a velocidade no momento em que a lagarta se defende do ataque do percevejo predador. Esse parâmetro avaliado nos mostrou novamente que as lagartas da linhagem Flub-R são mais lentas que as demais linhagens testadas, apresentando uma velocidade máxima de 0,273 ($\pm 0,044$) cm/s, diferente ($P < 0,05$) das linhagens Sus com 0,424 ($\pm 0,032$) cm/s e Het com 0,404 ($\pm 0,021$) cm/s (Figura 5).

Em relação ao sucesso de predação pelo percevejo *P. nigrispinus*, não houve diferença significativa entre os tratamentos ($P > 0,05$), com médias de 33,33% para a linhagem Sus, 40,00% para os heterozigotos e 53,33% para os resistentes. No entanto, uma regressão múltipla stepwise (forward e backward), por meio dos testes F parciais, possibilitou a avaliação do efeito das variáveis contínuas na capacidade predatória, revelando que as variáveis velocidade média e distância percorrida possuem importância relativa na variação da predação. O limite de decisão da regressão múltipla stepwise para incluir uma determinada variável independente em cada regressão foi baseado em $P < 0,05$. Em resumo, *H. armigera* resistente ao inseticida flubendiamide apresentam custo adaptativo associado à resistência, gerando redução na velocidade e distância percorrida.

Figura 3. Ilustração das distâncias percorridas (DP) pelas linhagens suscetível, resistente e heterozigoto de *Helicoverpa armigera* em relação ao predador *Podisus nigrispinus*. Linhas vermelhas representam o caminhamento total das lagartas após 10 minutos de vídeo e as linhas azuis representam o caminhamento do predador.

Figura 4. Box-plot das distâncias percorridas pelas linhagens suscetível (Sus), heterozigoto (Het) e resistente (Flub-R) de *Helicoverpa armigera* ao inseticida flubendiamide ao tentarem se proteger do predador *Podisus nigrispinus*. Letras diferentes sobre as barras de erro representam a diferença significativa pelo teste de (Tukey $P < 0.05$). Linhas tracejadas dentro da barra representam as médias e linha contínua mediana.

Figura 5. Box-plot de velocidade máxima (cm/s) atingida pelas linhagens (Sus), heterozigoto (Het) e resistente (Flub-R) de *Helicoverpa armigera* ao inseticida flubendiamide ao tentarem se proteger do predador *Podisus nigrispinus*. Letras diferentes sobre as barras de erro representam a diferença significativa pelo teste de Tukey ($P < 0.05$). Linhas tracejadas dentro da barra representa as médias e linha contínua mediana.

4.3.2 Estabilidade da resistência de *H. armigera* a flubendiamide em condições de laboratório

Ocorreu redução na sobrevivência da população heterogênea (50:50) na dose diagnóstica ($2.64 \mu\text{g i.a./cm}^2$) de flubendiamide até a quinta geração ($P < 0,05$). Onde a sobrevivência inicial em F1 foi de 53,9%, chegando a 7,86% na quinta geração, posteriormente estabilizando nas demais gerações em torno de 7,86 – 5%. A partir da quinta geração a população heterozigota (50:50) não apresentou mais diferença significativa em relação à linhagem Sus ($P < 0,05$) (Figura 6).

Em relação à linhagem suscetível, os resultados demonstram que se manteve com sobrevivência em torno de 1,0% na dose diagnóstica ($2.64 \mu\text{g i.a./cm}^2$) de flubendiamide utilizada no monitoramento ao longo de 9 gerações. Assim como a linhagem resistente que manteve a sobrevivência acima de 98% na dose diagnóstica ($2.64 \mu\text{g i.a./cm}^2$) de flubendiamide utilizada no monitoramento ao longo de todas as gerações avaliadas (Figura 6).

Na geração F1 foi realizada uma curva dose resposta para caracterização das linhagens suscetível e resistente, onde a linhagem resistente demonstrou uma razão de resistência ao inseticida flubendiamide superior a 50 mil vezes em comparação com a suscetível. Após 9 gerações sem pressão de seleção foi possível observar que a linhagem suscetível continuou com alta suscetibilidade ao inseticida flubendiamide e a linhagem resistente permaneceu com alta razão de resistência (<16 mil vezes), mesmo sem pressão de seleção. No entanto, na população heterozigota

50:50 (Sus:Flub-R), após 9 gerações sem pressão de seleção o fenótipo suscetível foi favorecido e a população retomou a suscetibilidade ao inseticida flubendiamide, com DL_{50} da proporção 50:50 de 0,017 (IC: 0,011- 0,024) similar à linhagem Sus com DL_{50} de 0,020 (IC: 0,16 – 0,25) (Tabela3).

Figura 6: Porcentagem de sobrevivência de linhagens de *Helicoverpa armigera* na dose diagnóstica ($2,64 \mu\text{g i.a./cm}^2$) de flubendiamide ao longo de 9 gerações. Linhagem Suscetível (Sus), Resistente (Flub-R) e com a proporção 50:50 (suscetível: resistente).

Table 3. Dose-resposta das populações suscetível (Sus), resistente (RES) e com a proporção 50:50 (suscetível: resistente) de *Helicoverpa armigera* ao inseticida flubendiamide.

População - geração	n ^a	Inclinação ($\pm$ EP)	DL ₅₀ (95%IC) ^b	χ^2 (g.l.) ^c	RR ^d
Sus - F1	912	2,09($\pm$ 0,19)	0,018 (0,015 - 0,026)	4,24 (5)	-
Flub-R - F1	805	1,67 ($\pm$ 0,14)	927,110 (772,04 – 1098,28)	1,52 (6)	51506,11
Sus - F9	694	2,14 ($\pm$ 0,16)	0,020 (0,16 – 0,25)	7,39 (5)	-
Flub-R - F9	618	1,09 ($\pm$ 0,08)	294,063 (192,87 – 448,92)	6,62 (4)	16336,83
50:50 - F9	720	1,29 ($\pm$ 0,12)	0,017 (0,011- 0,024)	6,64 (4)	0,94

^a Número de insetos testados ;

^b (DL₅₀) Dose de flubendiamide necessária para matar 50% das lagartas ($\mu\text{g i.a. cm}^{-2}$) e (IC) Intervalo de confiança a 95%;

^c Graus de Liberdade;

^d Razão de Resistência DL₅₀ da linhagem resistente/ DL₅₀ da linha suscetível.

4.4 DISCUSSÃO

A resistência de *H. armigera* a flubendiamide foi instável na ausência da pressão inseticida. Foram verificados a presença de custos adaptativos afetando a biologia e o comportamento dos insetos resistentes. Quando o custo adaptativo é avaliado por meio de um único parâmetro esse efeito muitas vezes pode ser baixo ou até mesmo nulo, mas quando avaliamos múltiplos aspectos, possibilita encontrar diferença na aptidão entre as linhagens (Freeman et al., 2021). Por isso nesse estudo avaliamos o custo adaptativo não só na tabela de vida de fertilidade, mas também parâmetros comportamentais e na estabilidade da resistência.

Trabalhos de custo adaptativo e estabilidade da resistência são de suma importância para compreender a evolução da resistência a inseticidas e seus riscos, consequentemente servir de base para o desenvolvimento de programas de manejo de resistência proativo (Carrière & Tabashnik, 2001). O custo adaptativo deve avaliar o efeito pleiotrópico garantindo que apenas o alelo que confere resistência está afetando o fitness do inseto, para isso é necessário que use populações com a carga genética mais semelhantes possíveis (French-Constant & Bass, 2017; Gassmann et al., 2009). A baixa viabilidade reprodutiva de *H. armigera* em gaiolas (Bird et al., 2018; Reigada et al., 2016), torna inviável a seleção de uma linhagem isogênica, por isso optamos por comparar o custo adaptativo com uma linhagem suscetível coletada no mesmo município que originou a linhagem resistente, garantindo que ambas tivessem bagagens genéticas muito semelhantes.

Os parâmetros finais estimados pela tabela de vida de fertilidade demonstram a existência do custo relativo à resistência de *H. armigera* a flubendiamide, onde taxa intrínseca de crescimento (r_m), da linhagem resistente é inferior à suscetível. Essa diferença se dá devido a menor viabilidade ovo-adulto da linhagem resistente e principalmente devido a menor fecundidade por fêmea da linhagem resistente, sendo em torno de 35% menor que a população suscetível, resultando em crescimento populacional mais lento da linhagem resistente. Assim como a linhagem resistente a flubendiamide, os heterozigotos também apresentaram baixo número de ovos por fêmea, no entanto, esta linhagem apresentou a melhor viabilidade ovo-adulto e menor ciclo de desenvolvimento, resultando em uma taxa intrínseca de crescimento semelhante a linhagem suscetível. Essa redução significativa no número de ovos por fêmea nas linhagens de *H. armigera* heterozigota e resistente a flubendiamide, apesar de causar pouco impacto nos parâmetros finais estimados pela tabela de vida, foram avaliados em um sistema controlado de laboratório, provavelmente em campo esse impacto seria maior com a ação de eficientes predadores, parasitoides de ovos *H. armigera* e das variações ambientais (Cruz et al., 1995; Zuim et al., 2017).

Outros trabalhos de custo adaptativo a diamidas demonstraram resultados semelhantes, onde a resistência de *P. xylostella* ao inseticida cyantranilprole também resultou em menor

viabilidade das fases de desenvolvimento e redução da fecundidade das fêmeas resistentes, de acordo com os autores provavelmente causado devido ao maior gasto energético da resistência metabólica (Liu et al., 2015). Mutações geradas para conferir resistência a inseticida também podem resultar em alteração na função desses genes sob seleção de inseticida, gerando um custo adaptativo das linhagens resistentes na ausência do inseticida (Gassmann et al., 2009; Taylor & Feyereisen, 1996) ou desvantagens energéticas quando a resistência é metabólica (Rivero et al., 2011).

Os resultados de custos adaptativos em relação ao comportamento de defesa, demonstram claramente que os insetos da linhagem de *H. armigera* resistente a flubendiamide se locomove menos e mais lentamente que a linhagem suscetível. No entanto, como o sistema de filmagem foi fechado (placa de Petri) impossibilitou que a lagarta deixasse o local para fugir do predador *P. nigrispinus*, resultando em uma predação semelhante entre as linhagens. No campo, onde naturalmente ocorre o controle de *H. armigera* pelo predador *P. nigrispinus* (Simonato et al., 2020) essa redução da velocidade e movimentação favoreceriam a predação das lagartas resistentes. Além disso, no campo existem parasitoides de lagarta que também se beneficiariam da maior facilidade em capturar seu hospedeiro (Kumar et al., 1994). Estratégias do MIP, utilizando ferramentas como controle biológico com predadores e parasitoides eficientes no controle de *H. armigra* (Cruz et al., 1995; De Oliveira et al., 2016; Simonato et al., 2020) e uso de inseticidas seletivos garantindo que inimigos naturais permaneçam na área (Carvalho et al., 2019) podem ser exploradas para o manejo de *H. armigra* resistente a flubendiamide.

O flubendiamide atua no canal de Rianodina (RyR), fazendo com que o RyR se abra e promova uma saída descontrolada de Cálcio (Ca^{+2}), provocando paralisia muscular (Cordova et al., 2006). A alta razão de resistências a inseticidas diamidas geralmente estão associadas a mutações no RyR (Richardson et al., 2020) e essa mutação pode estar gerando efeitos pleiotrópicos no sistema motor ou nas rotas metabólicas do sistema muscular das lagartas resistentes. Outros trabalhos já relataram o efeito do custo adaptativo no comportamento dos insetos resistentes (Bird et al., 2020; Rostant et al., 2017), inclusive a resistência a chlorantraniliprole prejudicando o acasalamento de machos resistentes em *P. xylostella* (Passos & Siqueira, 2019).

No estudo estabilidade da resistência na ausência de inseticida foi demonstrado que após 9 gerações sem pressão de seleção, a suscetibilidade foi reestabelecida, mesmo em uma população com 50% dos indivíduos sendo homozigotos resistentes. Ou seja, após 5 - 6 gerações sem inseticida a sobrevivência na dose diagnóstica de flubendiamide da população heterozigota passou a ser inferior a 8% e na 9ª geração a curva de dose resposta indicou não haver diferença entre a população heterozigota e a linhagem suscetível. Diversos trabalhos relatam que explorar o custo adaptativo

associado à resistência de inseticida no MRI pode retardar a disseminação do alelo da resistência (Carrière et al., 2010) ou até mesmo restabelecer a suscetibilidade (Wu et al., 2005).

Apesar de os heterozigotos serem os principais carreadores do alelo da resistência e não apresentarem custo adaptativo no crescimento intrínseco de população, eles apresentaram a fecundidade de fêmea 35% menor que a linhagem suscetível, o que provavelmente explique o maior sucesso na linhagem suscetível. Se observamos os resultados dos acasalamentos da população heterozigota com proporção 50:50 (suscetível: resistente) desde geração 1, os indivíduos suscetíveis e resistentes apesar de estarem na mesma gaiola, aparentemente não acasalaram de forma aleatória, dando preferência a indivíduos da mesma linhagem. Em outras palavras, a sobrevivência da prole na geração 1 do monitoramento utilizando dose diagnóstica de flubendiamide, resultou em 53,9% de sobrevivência, sugerindo que nessa primeira geração existem quantidades semelhantes de indivíduos resistentes e suscetíveis. Caso esse acasalamento ocorresse aleatoriamente, devido a herança da resistência de *H. armigera* a flubendiamide ser incompletamente dominante, cerca de 75% da prole deveria sobreviver ao monitoramento por apresentar o alelo da resistência segundo o equilíbrio de Hardy-Weinberg (50% heterozigotos e 25% de resistentes homozigotos). Estudos com outras espécies de insetos resistentes a inseticidas, demonstram que essa alteração na escolha do parceiro para o acasalamento pode ocorrer devido a alterações no feromônio sexual, alterações nos tamanhos dos insetos resistentes, além de alterações no comportamento de acasalamento, como mudanças no horário de cópula (Cordeiro et al., 2017; Passos & Siqueira, 2019; Xu et al., 2010). Sendo esse mais um fator que pode ter favorecido o crescimento populacional da linhagem suscetível.

De maneira geral os resultados desse capítulo relatam que existe custo adaptativo associado à resistência de *H. armigera* ao inseticida flubendiamide, afetando a reprodução e locomoção de lagartas da linhagem resistente. Portanto é essencial o desenvolvimento de estratégias de MRI explorando a instabilidade da resistência de *H. armigera* a flubendiamide para prolongar a vida útil das diamidas que estão no mercado há pouco mais de uma década.

REFERÊNCIAS

- Ahmad, M., Arif, M.I., Ahmad, Z., 2001. Resistance to carbamate insecticides in *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) in Pakistan 20.
- Armes, N.J., Jadhav, D.R., Bond, G.S., King, A., 1992. Insecticide resistance in *Helicoverpa armigera* in South India. Pestic. Sci. 34, 355–364.

- Bates, D., Mächler, M., Bolker, B.M., Walker, S.C., 2015. Fitting linear mixed-effects models using lme4. J. Stat. Softw. 67. <https://doi.org/10.18637/jss.v067.i01>
- Bird, L.J., Drynan, L.J., Walker, P.W., 2020. Relative fitness and stability of resistance in a near-isogenic strain of indoxacarb resistant *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). Pest Manag. Sci. 76, 4077–4085. <https://doi.org/10.1002/ps.5962>
- Bird, Lisa J, Bird, L J, Drynan, L.J., Walker, P.W., 2018. The Use of F2 Screening for Detection of Resistance to Enamectin Benzoate , Chlorantraniliprole , and Indoxacarb in Australian Populations of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) Insecticide Resistance and Resistance Management The Use of F 2 Sc. <https://doi.org/10.1093/jee/tox037>
- Box, G.E., Cox, D.R., 1982. An analysis of transformations revisited, rebutted. J. Am. Stat. Assoc. 77, 209–210. <https://doi.org/10.1080/01621459.1982.10477788>
- Carrière, Y., Crowder, D.W., Tabashnik, B.E., 2010. Evolutionary ecology of insect adaptation to Bt crops. Evol. Appl. 3, 561–573. <https://doi.org/10.1111/j.1752-4571.2010.00129.x>
- Carrière, Y., Tabashnik, B.E., 2001. Reversing insect adaptation to transgenic insecticidal plants. Proc. R. Soc. B Biol. Sci. 268, 1475–1480. <https://doi.org/10.1098/rspb.2001.1689>
- Carvalho, G.A., Grützmacher, A.D., Passos, L.C., de Oliveira, R.L., 2019. Physiological and Ecological Selectivity of Pesticides for Natural Enemies of Insects, in: Natural Enemies of Insect Pests in Neotropical Agroecosystems. Springer, Cham, pp. 469–478.
- Cordeiro, E.M.G., Corrêa, A.S., Rosi-Denadai, C.A., Tomé, H.V. V., Guedes, R.N.C., 2017. Insecticide resistance and size assortative mating in females of the maize weevil (*Sitophilus zeamais*). Pest Manag. Sci. 73, 823–829. <https://doi.org/10.1002/ps.4437>
- Cordova, D., Benner, E.A., Sacher, M.D., Rauh, J.J., Sopa, J.S., Lahm, G.P., Selby, T.P., Stevenson, T.M., Flexner, L., Gutteridge, S., Rhoades, D.F., Wu, L., Smith, R.M., Tao, Y., 2006. Anthranilic diamides: A new class of insecticides with a novel mode of action, ryanodine receptor activation. Pestic. Biochem. Physiol. 84, 196–214. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2005.07.005>
- Cruz, I., Alvarenga, C.D., Figueiredo, P.E., 1995. Biologia de *Doru luteipes* (Scudder) e sua capacidade predatória de ovos de *Helicoverpa zea* (Boddie). An. da Soc. Entomológica do Bras. 24, 21–27.
- Czepak, C., Albernaz, K.C., Vivan, L.M., Guimarães, H.O., Carvalhais, T., 2013. Primeiro registro de ocorrência de *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) no Brasil. Pesqui. Agropecuária Trop. 43, 110–113. <https://doi.org/10.1590/S1983-40632013000100015>

- De Oliveira, H.N., Simonato, J., Glaeser, D.F., Pereira, F.F., 2016. Parasitism of *Helicoverpa armigera* pupae (Lepidoptera: Noctuidae) by *Tetrastichus howardi* and *Trichospilus diatraeae* (Hymenoptera: Eulophidae). *Semin. Agrar.* 37, 111–115. <https://doi.org/10.5433/1679-0359.2016v37n1p111>
- Delisle, J., Vincent, C., 2002. Modified pheromone communication associated with insecticidal resistance in the obliquebanded leafroller, *Choristoneura rosaceana* (Lepidoptera: Tortricidae). *Chemoecology* 12, 47–51. <https://doi.org/10.1007/s00049-002-8325-1>
- Dennehy, T.J., 1987. Decision-making for managing pest resistance to pesticides, in: Ford, M.G., Hollaman, D.W., Khambay, B.P.S., Sawiki, R.M. (Eds.), *Combating Resistance to Xenobiotics: Biological and Chemical Approaches*. Ellis Horwood, Chichester, England, pp. 118–126.
- Durigan, M.R., Corrêa, A.S., Pereira, R.M., Leite, N.A., Amado, D., Sousa, D.R. De, Omoto, C., 2017. High frequency of CYP337B3 gene associated with control failures of *Helicoverpa armigera* with pyrethroid insecticides in Brazil. *Pestic. Biochem. Physiol.* 143, 73–80. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2017.09.005>
- French-Constant, R.H., Bass, C., 2017. Does resistance really carry a fitness cost? *Curr. Opin. Insect Sci.* 21, 39–46. <https://doi.org/10.1016/j.cois.2017.04.011>
- Foster, S.P., Young, S., Williamson, M.S., Duce, I., Denholm, I., Devine, G.J., 2003. Analogous pleiotropic effects of insecticide resistance genotypes in peach-potato aphids and houseflies. *Heredity (Edinb.)* 91, 98–106. <https://doi.org/10.1038/sj.hdy.6800285>
- Freeman, J.C., Smith, L.B., Silva, J.J., Fan, Y., Sun, H., Scott, J.G., 2021. Fitness studies of insecticide resistant strains: Lessons learned and future directions, *Pest Management Science*. <https://doi.org/10.1002/ps.6306>
- Gassmann, A.J., Carrière, Y., Tabashnik, B.E., 2009. Fitness costs of insect resistance to *Bacillus thuringiensis*. *Annu. Rev. Entomol.* 54, 147–163. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.54.110807.090518>
- Greene, G.L., Leppla, N.C., Dickerson, W.A., 1976. Velvetbean Caterpillar: A Rearing Procedure and Artificial Medium. *J. Econ. Entomol.* 69, 487–488. <https://doi.org/10.1093/jee/69.4.487>
- Hadfield, J.D., 2010. MCMCglmm: MCMC Methods for Multi-Response GLMMs in R. *J. Stat. Softw.* 33, 1–22.
- Hebbali, A., 2020. Tools for Building OLS Regression Models 1–76.

- Horikoshi, R.J., Bernardi, O., Bernardi, D., Okuma, D.M., Farias, J.R., Miraldo, L.L., Amaral, F.S.A., Omoto, C., 2016. Near-isogenic Cry1F-resistant strain of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) to investigate fitness cost associated with resistance in Brazil. J. Econ. Entomol. 109, 854–859. <https://doi.org/10.1093/jee/fov387>
- Hothorn, T., Bretz, F., Westfall, P., 2008. Simultaneous Inference in General Parametric Models. Biometrical J. 50, 346–363. <https://doi.org/10.1002/bimj.200810425>
- Kliot, A., and M. Ghanim. 2012. Fitness costs associated with insecticide resistance. Pest Manag. Sci. 68: 1431–1437.
- Kranthi, K.R., Jadhav, D.R., Kranthi, S., Wanjari, R.R., Ali, S.S., Russell, D.A., 2002. Insecticide resistance in five major insect pests of cotton in India. Crop Prot. 21, 449–460. [https://doi.org/10.1016/S0261-2194\(01\)00131-4](https://doi.org/10.1016/S0261-2194(01)00131-4)
- Kumar, N., Kumar, A., Tripathi, C.P.M., 1994. Functional Response of *Camponotus chloridae* Uchida (Hymenoptera: Ichneumonidae), a Parasitoid of *Heliothis armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) in an Enclosed Experimental System. Biol. Agric. Hortic. 10, 287–295. <https://doi.org/10.1080/01448765.1994.9754680>
- LeOra-Software, 2002. Polo-PLus. POLO, for windows computer program.
- Liu, X., Ning, Y., Wang, H., Wang, K., 2015. Cross-resistance, mode of inheritance, synergism, and fitness effects of cyantraniliprole resistance in *Plutella xylostella*. Entomol. Exp. Appl. 157, 271–278. <https://doi.org/10.1111/eea.12361>
- Maia, A. de H.N., Luiz, A.J.B., Campanhola, C., 2000. Statistical Inference on Associated Fertility Life Table Parameters Using Jackknife Technique: Computational Aspects. J. Econ. Entomol. 93, 511–518. <https://doi.org/10.1603/0022-0493-93.2.511>
- Maia, A.D.H.N., Pazianotto, R.A.D.A., Luiz, A.J.B., Marinho-Prado, J.S., Pervez, A., 2014. Inference on Arthropod Demographic Parameters: Computational Advances Using R. J. Econ. Entomol. 107, 432–439. <https://doi.org/10.1603/EC13222>
- McDonald, L.L., Boyce, M.S., Meyer, J.S., 1986. Estimating Uncertainty in Population Growth Rates: Jackknife vs. Bootstrap Techniques Author(s): Joseph S. Meyer, Christopher G. Ingersoll, Lyman L. McDonald, Marks S. Boyce Published by: Ecological Society of America Stable URL: <http://www.Ecol.Soc.Am.67.1156-1166>
- McKenzie, J.A., 1996. Ecological and Evolutionary Aspects of Insecticide Resistance. R. G. Landes Co. (Academic Press). 1996. ISBN 0 12 484825 7. Genet. Res. 1, 885. <https://doi.org/10.1017/S0016672300034078>

- Moral, R.A., Hinde, J., Demétrio, C.G.B., 2017. Half-Normal Plots and Overdispersed Models in R: The hnp Package. J. Stat. Softw. 81. <https://doi.org/10.18637/jss.v081.i10>
- Mota-Sanchez, D., Wise, J.C., 2020. Arthropod Pesticide Resistance Database. Michigan State Univ. URL <http://www.pesticideresistance.org/>
- Omoto, C., DENNEHY, T.J., McCOY, C.W., CRANE, S.E., LONG, J.W., 1995. Management of Citrus Rust Mite (Acari: Eriophyidae) Resistance to Dicofol in Florida Citrus. J. Econ. Entomol. 88, 1120–1127.
- Passos, D.A., Siqueira, H.A.A., 2019. Behavioral response and adaptive cost in resistant and susceptible *Plutella xylostella* to chlorantraniliprole. Bull. Entomol. Res. 1–10.
- R Core Team, 2020. R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing.
- Reigada, C., Guimarães, K.F., Parra, J.R.P., 2016. Relative fitness of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) on seven host plants: A perspective for IPM in Brazil. J. Insect Sci. 16. <https://doi.org/10.1093/jisesa/iev158>
- Richardson, E.B., Troczka, B.J., Gutbrod, O., Davies, T.G.E., Nauen, R., 2020. Diamide resistance: 10 years of lessons from lepidopteran pests. J. Pest Sci 93, 911–928. <https://doi.org/10.1007/s10340-020-01220-y>
- Rigby, R.A., Stasinopoulos, D.M., 2005. Generalized additive models for location, scale and shape,(with discussion). Appl. Stat. 54, 507–554.
- Rivero, A., Magaud, A., Nicot, A., Vézilier, J., 2011. Energetic Cost of Insecticide Resistance in *Culex pipiens* Mosquitoes. J. Med. Entomol. 48, 694–700. <https://doi.org/10.1603/ME10121>
- Ribeiro, L.M.S., Wanderley-Teixeira, V., Ferreira, H.N., Teixeira, Á.A.C., Siqueira, H.A.A., 2014. Fitness costs associated with field-evolved resistance to chlorantraniliprole in *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae). Bull. Entomol. Res. 104, 88–96. <https://doi.org/10.1017/S0007485313000576>
- Robertson, J.L., Preisler, H.K., 1992. Pesticide Bioassays with Arthropods, 2nd Editio. ed. CRC Press, London, UK. <https://doi.org/10.1201/9781315373775>
- Robertson, J.L., Savin, N.E., Russell, R.M., Preisler, H.K., 2007. Bioassays with Arthropods, Second Edi. ed. CRC Press, Boca Raton, FL - USA.
- Rostant, W.G., Bowyer, J., Coupland, J., Facey, J., Hosken, D.J., Wedell, N., 2017. Pleiotropic Effects of DDT Resistance on Male Size and Behaviour. Behav. Genet. 47, 449–458. <https://doi.org/10.1007/s10519-017-9850-6>

- Santos-Amaya, O.F., Tavares, C.S., Rodrigues, J.V.C., Campos, S.O., Guedes, R.N.C., Alves, A.P., Pereira, E.J.G., 2017. Fitness costs and stability of Cry1Fa resistance in Brazilian populations of *Spodoptera frugiperda*. *Pest Manag. Sci.* 73, 35–43. <https://doi.org/10.1002/ps.4312>
- Simonato, J., Oliveira, H.N. de, Grigolli, J.F.J., Grigolli, M.M.K., Silva, I.F. da, 2020. Potential of Predator *Podisus nigrispinus* Dallas (Hemiptera: Pentatomidae) in the Control of *Helicoverpa armigera* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae). *J. Agric. Sci.* 12, 204. <https://doi.org/10.5539/jas.v12n3p204>
- Specht, A., Sosa-Gómez, D.R., Rios, D.A.M., Claudino, V.C.M., Paula-Moraes, S.V., Malaquias, J.V., Silva, F.A.M., Roque-Specht, V.F., 2021. *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) in Brazil: the Big Outbreak Monitored by Light Traps. *Neotrop. Entomol.* <https://doi.org/10.1007/s13744-020-00836-0>
- Taylor, M., Feyereisen, R., 1996. Molecular biology and evolution of resistance of toxicants. *Mol. Biol. Evol.* 13, 719–734. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a025633>
- Wu, K., Mu, W., Liang, G., Guo, Y., 2005. Regional reversion of insecticide resistance in *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera : Noctuidae) is associated with the use of Bt cotton in northern China 498, 491–498. <https://doi.org/10.1002/ps.999>
- Xu, Z., Cao, G., Dong, S., 2010. Changes of Sex Pheromone Communication Systems Associated with Tebufenozide and Abamectin Resistance in Diamondback Moth , *Plutella xylostella* (L .). *J. chem* 36, 526–534. <https://doi.org/10.1007/s10886-010-9785-3>
- Zuim, V., Rodrigues, H. de S., Pratisoli, D., Torres, J.B., Fragoso, D.F.M., Bueno, R.C.O. de F., 2017. Age and density of eggs of *Helicoverpa armigera* influence on *Trichogramma pretiosum* parasitism. *Acta Sci. - Biol. Sci.* 39, 513–520. <https://doi.org/10.4025/actascibiols.v39i4.34943>

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O monitoramento da suscetibilidade a inseticidas diamidas em populações de *H. armigera* nas safras de 2014 a 2020, demonstrou reduções significativas aos inseticidas flubendiamide, chlorantraniliprole e cyantraniliprole no decorrer das safras agrícolas. Para o inseticida flubendiamide na safra 2019 as porcentagens de sobrevivência nas doses diagnósticas foram superiores a 49% nos estados da Bahia, Goiás e Mato Grosso. Em geral, as menores suscetibilidades a inseticidas diamidas foram observadas em populações coletadas na região Oeste do Estado da Bahia. Na última safra monitorada (2020) foi possível observar o aumento da suscetibilidade de *H. armigera* a inseticidas diamidas, provavelmente devido à aumento da penetração de cultivos Bt no Brasil, gerando redução de uso de inseticidas para o controle de lepidópteros pragas.

A constante pressão de seleção sobre uma população de *H. armigera* coletada no campo, resultou na seleção de uma linhagem resistente a flubendiamide com a razão de resistência superior a 50.000 vezes. O padrão de herança da resistência a flubendiamide foi definido como autossômica, incompletamente dominante e monogênica. A dominância funcional caracterizada com lagartas de terceiro instar em folhas de soja tratadas com inseticida na concentração comercial recomendada, resultou na mortalidade < 5% das linhagens resistente e heterozigotas, comprovando assim a dominância genética da resistência. A resistência cruzada entre flubendiamide e os inseticidas chlorantraniliprole e cyantraniliprole foi considerada baixa, com uma razão de resistência de 4,7 e 5,6 vezes respectivamente. O padrão de herança dominante da resistência a flubendiamide em *H. armigera* favorece a evolução da resistência, caso práticas de manejo de resistência não sejam implementadas.

Os resultados do presente estudo demonstram que há custos adaptativos associados à resistência de *H. armigera* a flubendiamide. O custo adaptativo foi evidenciado na redução de 35% da fecundidade das fêmeas resistentes e heterozigotas em comparação com as fêmeas suscetíveis. Além do custo adaptativo no comportamento de defesa de lagartas de *H. armigera* contra o ataque de *P. nigrispinus*, afetando a linhagem resistente com a redução da distância percorrida em 47% e da velocidade de movimento em 36% quando comparadas com a linhagem suscetível e heterozigota. Por fim, a resistência de *H. armigera* a flubendiamide é instável, e na ausência de pressão de seleção por inseticida, a suscetibilidade pode ser reestabelecida. Dessa forma, a instabilidade da resistência de *H. armigera* a flubendiamide pode ser explorada em programas de MRI no Brasil.

Em suma, os resultados do presente trabalho evidenciam alto risco de evolução da resistência de *H. armigera* a inseticidas diamidas no Brasil, principalmente devido ao caráter dominante da resistência e à presença de resistência cruzada entre inseticidas diamidas. Contudo, a

resistência de *H. armigera* a flubendiamide foi altamente instável devido à presença de custos adaptativos associados a parâmetros biológicos e suscetibilidade à predação por *P. nigrispinus*. Portanto, a instabilidade da resistência de *H. armigera* a flubendiamide pode ser explorada em programas de manejo da resistência para preservar a vida útil de inseticidas diamidas no manejo dessa praga no Brasil. Dentre as práticas de MRI, o uso de plantas que expressam proteína Bt, a rotação de ingredientes ativos que não apresentam resistência cruzada e a conservação de inimigos naturais presentes em áreas de cultivo deve ser explorada. Além de que o monitoramento da suscetibilidade deve ser contínuo, para compreender a dinâmica da resistência nas próximas safras com aumento da penetração de cultivos Bt no Brasil.