

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

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

**Rebeca da Silva Ribeiro**

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

**Piracicaba  
2014**

Rebeca da Silva Ribeiro  
Licenciada em Ciências Biológicas

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

Orientador:  
Prof. Dr. **CELSONO OMOTO**

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

**Piracicaba  
2014**

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

Ribeiro, Rebeca da Silva

Monitoramento da suscetibilidade de populações de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) a inseticidas diamidas no Brasil / Rebeca da Silva Ribeiro. - - Piracicaba, 2014.

86 p: il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2014.

1. Lagarta-do-cartucho 2. *Chlorantraniliprole* 3. *Flubendiamide* 4. Manejo da resistência de insetos I. Título

CDD 632.78  
R484m

**"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte - O autor"**

A Deus

Aos meus pais Sara e Luiz,

Ao meu estimado companheiro Levy,

**AGRADEÇO e OFEREÇO**



## AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Celso Omoto, graças as brilhantes observações, empenho, oportunidade e confiança depositada em mim, hoje posso dar esse importante passo em minha carreira. Com a nossa convivência, pude aprender lições valiosas, as quais levarei comigo por toda a vida.

À Dra. Eloisa Salmeron e a técnica Gislaine A. A. de O. Campos do laboratório de Resistência de Artrópodes a Pesticidas, ESALQ/USP, por terem me encorajado a perseguir este sonho e pelo apoio e paciência no amadurecimento pessoal e profissional dos meus conhecimentos e conceitos. Ambas me inspiraram a ter apreço e comprometimento pelo trabalho científico como também a preservar uma visão ampla a cerca do trato com a vida e com as pessoas. É com grande satisfação que pude trabalhar ao lado de vocês e desenvolver ao longo desses anos uma amizade verdadeira a qual jamais esquecerei. Vocês são exemplos de profissional e de mulheres as quais sempre terão minha sincera admiração.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Entomologia da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ/USP), pelo companheirismo e ensinamentos transmitidos.

Ao Comitê Brasileiro de Ação a Resistência a Inseticidas (IRAC-BR) pela concessão da bolsa de estudo e pelo envio de amostras de inseticidas e populações de *S. frugiperda*.

Aos amigos do Programa de Pós-Graduação em Entomologia da ESALQ/USP pelo agradável convívio e companheirismo.

Aos queridos amigos que são ou foram do Laboratório de Resistência de Artrópodes a Pesticidas, ESALQ/USP: Antonio R. B. Nascimento, Daniel Bernardi,

Daniela Okuma, Dariane S. O. Souza, Felipe A. Domingues, Juliano R. Farias, Luis R. Sesso, Maria Edilene Oliveira, Mariana Durigan, Natália A. Leite, Oscar A. B. N. Silva, Pablo F. Coronel, Patrick Marques Dourado, Rodrigo José Sorgatto, Rogério Machado, Renato J. Horikoshi, pela excelente convivência, auxílio e momentos divertidos que pudemos desfrutar juntos, sem dúvidas cada um de vocês deixou uma marca indelével em minha formação.

A todos os funcionários do Departamento de Entomologia e Acarologia da ESALQ/USP pela dedicação aos serviços prestados.

Às bibliotecárias Silvia Maria Zinsly e Eliana Maria Garcia da Biblioteca Central da ESALQ/USP, pelo auxílio na formatação deste trabalho.

Agradeço aos meus pais Sara da Silva Ribeiro e Luiz Lopes Ribeiro por tanto amor. Por não medirem esforços para que eu chegasse até esta etapa de minha vida e por contribuírem de maneira decisiva na busca de uma vida guiada pelos princípios de Deus.

Ao meu namorado e companheiro Levy Boccato com quem tenho a felicidade de compartilhar minha vida, pelo amor, carinho, bom humor e apoio incondicionais. Pelo estimo e dedicação em me orientar, cujo incentivo e dicas foram indispensáveis para que este trabalho tenha chegado a bom termo. Agradeço a Deus por ter colocado alguém tão especial em minha vida.

A Deus por me tornar um testemunho de fé e dedicação.

*“A vida não dá nem empresta;  
não se comove nem se apieda.  
Tudo quanto ela faz é retribuir e transferir  
aquilo que nós lhe oferecemos”.*

Albert Einstein





## SUMÁRIO

RESUMO .....	11
ABSTRACT.....	13
LISTA DE FIGURAS.....	15
LISTA DE TABELAS.....	17
1 INTRODUÇÃO.....	19
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	23
2.1 Aspectos bioecológicos de <i>Spodoptera frugiperda</i> .....	23
2.2 Resistência de <i>Spodoptera frugiperda</i> a inseticidas.....	25
2.3 Fatores que afetam a evolução da resistência de <i>S. frugiperda</i> .....	28
2.4 Diamidas.....	30
2.5 Detecção e Monitoramento da Resistência .....	35
3 MATERIAL E MÉTODOS .....	39
3.1 Coleta das populações de <i>S. frugiperda</i> .....	39
3.2 Criação e manutenção de populações de <i>S. frugiperda</i> em laboratório .....	41
3.3 Caracterização da suscetibilidade de populações de <i>S. frugiperda</i> a chlorantraniliprole e flubendiamide .....	42
3.4 Monitoramento da suscetibilidade de populações de <i>S. frugiperda</i> a chlorantraniliprole e flubendiamide .....	43
3.5 Estimativa da frequência inicial do alelo que confere resistência de <i>S. frugiperda</i> a chlorantraniliprole .....	45
3.5.1 Coleta de populações de <i>S. frugiperda</i> para “F2 Screen”.....	45
3.5.2 Criação de populações de <i>S. frugiperda</i> em laboratório para “F2 Screen” .....	46
3.5.3 Teste da progênie F2.....	49
3.5.4 Análise estatística.....	49
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	51
4.1 Caracterização da suscetibilidade a diamidas em populações de <i>S. frugiperda</i> no Brasil.....	51
4.2 Monitoramento da suscetibilidade de populações de <i>S. frugiperda</i> a diamidas coletadas na cultura do milho no Brasil .....	56

4.3 Estimativa da frequência inicial do alelo que confere resistência de <i>S. frugiperda</i> a chlorantraniprole .....	64
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	71
6 CONCLUSÕES.....	73
REFERÊNCIAS .....	74

## RESUMO

### **Monitoramento da suscetibilidade de populações de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) a inseticidas diamidas no Brasil**

*Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) é uma das pragas mais importantes da cultura do milho no Brasil. Vários casos de resistência de *S. frugiperda* a inseticidas de grupos químicos distintos já foram documentados. A busca contínua de alternativas para o controle de *S. frugiperda* tem possibilitado o desenvolvimento de novas tecnologias como plantas de milho geneticamente modificadas, e até mesmo a introdução de inseticidas que aliam segurança ambiental e alta atividade inseticida, como o recente grupo das diamidas. Estudos de caracterização e monitoramento da suscetibilidade de *S. frugiperda* são fundamentais para a implementação de programas de Manejo da Resistência de Insetos (MRI) no Brasil. Com o intuito de se prolongar a vida útil das diamidas, os objetivos deste trabalho foram: (a) caracterizar a suscetibilidade a diamidas em populações de *S. frugiperda* nas principais regiões produtoras de milho no Brasil na safra 2011/12; (b) monitorar a suscetibilidade de populações de *S. frugiperda* a chlorantraniliprole e flubendiamide coletadas na cultura do milho em oito estados do Brasil nas safras 2011/12, 2012/13 e 2013/14; (c) estimar a frequência inicial do alelo de resistência a chlorantraniliprole em populações de *S. frugiperda*. O método de bioensaio para a caracterização da suscetibilidade de populações de *S. frugiperda* a chlorantraniliprole e flubendiamide foi o de aplicação superficial do inseticida sobre a dieta. As linhas-básicas de suscetibilidade foram definidas para uma população suscetível de referência e cinco populações de campo de *S. frugiperda*. Posteriormente, foram definidas concentrações diagnósticas para o monitoramento da suscetibilidade para ambos inseticidas em populações de *S. frugiperda*. As  $CL_{50}$  estimadas para as populações de *S. frugiperda* avaliadas variaram de 1,15 a 2,55  $\mu\text{g}$  de chlorantraniliprole/mL de água [I.A. (ppm)] (variação de 1,4 vezes), e de 1,75 a 4,17  $\mu\text{g}$  de flubendiamide/mL de água [I.A. (ppm)] (variação de 2,4 vezes). As concentrações diagnósticas de 10 e 32  $\mu\text{g}$  de chlorantraniliprole/mL e de 100 e 180  $\mu\text{g}$  de flubendiamide/mL foram definidas para o monitoramento da resistência. As populações de *S. frugiperda* apresentaram alta suscetibilidade nas concentrações diagnósticas de chlorantraniliprole e flubendiamide na safra 2011/12. No entanto, foram observadas variações na sobrevivência de 0 a 12,7% para chlorantraniliprole e de 1 a 6% para flubendiamide de acordo com a safra agrícola e localidade. A frequência do alelo resistente a chlorantraniliprole em *S. frugiperda* estimado pelo método de "F2 Screen" foi baixa para a safra 2011/12 ( $<0,0033$ ). No entanto, aumento significativo na frequência do alelo resistente foi observado nas safras 2012/13 [0,0134 (0,0082 - 0,0198)] e 2013/14 [0,0176 (0,0084 - 0,0277)] em populações testadas, indicando alto risco de evolução da resistência a chlorantraniliprole no Brasil.

Palavras-chave: Lagarta-do-cartucho; Chlorantraniliprole; Flubendiamide; Manejo da resistência de insetos



## ABSTRACT

### Monitoring the susceptibility to diamide insecticides in *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) populations in Brazil

*Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) is one of the most important maize pests in Brazil. Several cases of *S. frugiperda* resistance to insecticides of different chemical class have been documented. The continuous search for alternatives to control *S. frugiperda* has enabled the development of new technologies such as genetically modified corn plants, and even the introduction of insecticides that combine environmental safety and high insecticidal activity, such as the recent class of diamides. Baseline studies and monitoring the susceptibility of *S. frugiperda* to insecticides are fundamental to the implementation of Insect Resistance Management (IRM) programs in Brazil. In order to prolong the lifetime of diamides, the objectives of this work were: (a) characterize the susceptibility to diamides in populations of *S. frugiperda* collected from major corn-producing regions in Brazil in 2011/12 season; (b) monitor the susceptibility of *S. frugiperda* populations to chlorantraniliprole and flubendiamide collected in maize in eight states of Brazil in the 2011/12, 2012/13 and 2013/14 growing seasons; (c) estimate the initial frequency of the allele for resistance to chlorantraniliprole in *S. frugiperda* populations. The baseline susceptibility of *S. frugiperda* populations to chlorantraniliprole and flubendiamide was determined using the diet surface treatment bioassays. Baselines were defined for a susceptible population and five field populations of *S. frugiperda*. Subsequently, diagnostic concentrations for monitoring susceptibility to both insecticides were defined. LCs<sub>50</sub> estimated for populations of *S. frugiperda* ranged from 1.15 to 2.55 mg of chlorantraniliprole / mL of water [IA (ppm)] (1.4-fold variation) and 1.75 to 4.17 mg of flubendiamide / ml water [IA (ppm)] (2.4-fold variation). The diagnostic concentrations of 10 and 32 mg of chlorantraniliprole / mL and 100 and 180µg of flubendiamide / mL were defined for the resistance monitoring. The populations of *S. frugiperda* showed high susceptibility to chlorantraniliprole and flubendiamide in 2011/12 growing season at diagnostic concentrations. However, variations in survival from 0 to 12.7% for chlorantraniliprole and 1 to 6% for flubendiamide were observed based on growing season and location. The frequency of the resistant allele to chlorantraniliprole in *S. frugiperda* estimated by using "F2 Screen" method was low during 2011/12 growing season (<0.0033). However, significant increase in the frequency of the resistant allele was observed in 2012/13 [0.0134 (0.0082 to 0.0198)] and 2013-14 [0.0176 (0.0084 to 0.0277)] growing seasons, indicating a high risk of resistance evolution to chlorantraniliprole in Brazil.

Keywords: Fall armyworm; Chlorantraniliprole; Flubendiamide; Insect resistance management



## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Detalhes do método de bioensaio de ingestão. A) Esterilização e secagem das placas de bioensaio; B) Diluição do inseticida; C) Aplicação do inseticida nas células; D) Inoculação de lagartas de 3º instar; E) Placas mantidas dentro de câmaras climatizadas com temperatura de  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  e fotofase de 14h. ; F) Placas de bioensaio para avaliação após 96h após a inoculação de lagartas..  
.....44
- Figura 2 - Detalhes do método de “F2 Screen”. A) Coleta de indivíduos de campo; B) Individualização das pupas; C) Isofêmeas estabelecidas (Geração Parental); D) Indivíduos da geração F1 criados dentro de sua respectiva linhagem; E) Adultos da geração F1 acondicionados em gaiolas para reprodução; F) Lagartas da geração F2 inoculadas para os bioensaios discriminatórios.....48
- Figura 3 - Curvas de concentração-resposta a chlorantraniliprole em populações de *S. frugiperda* no Brasil .....54
- Figura 4 - Curvas de concentração-resposta a flubendiamide em populações de *S. frugiperda* no Brasil .....54
- Figura 5 - Análise conjunta dos dados de suscetibilidade de uma população suscetível de laboratório e de cinco populações de campo de *S. frugiperda* coletadas nas safras 2011/12 a chlorantraniliprole. A área hachurada indica a faixa de concentrações diagnósticas sugeridas para o monitoramento da resistência.  
.....55
- Figura 6 - Análise conjunta dos dados de suscetibilidade de uma população suscetível de laboratório e de cinco populações de campo de *S. frugiperda* coletadas nas safras 2011/12 a flubendiamide. A área hachurada indica a faixa de concentrações diagnósticas sugeridas para o monitoramento da resistência.55
- Figura 7 - Distribuição das populações de *S. frugiperda* usadas no “F2 Screen” .....65





**LISTA DE TABELAS**

Tabela 1 - Populações de <i>S. frugiperda</i> testadas em estudos de caracterização e monitoramento da suscetibilidade .....	40
Tabela 2 - Populações de <i>S. frugiperda</i> usada para o “F2 Screen” .....	45
Tabela 3 - Caracterização da linha-básica de suscetibilidade a chlorantraniliprole para populações de <i>S. frugiperda</i> de laboratório e coletadas na cultura do milho nas safras 2011/2012.....	53
Tabela 4 - Caracterização da linha-básica de suscetibilidade a flubendiamide para populações de <i>S. frugiperda</i> de laboratório e coletadas na cultura do milho nas safras 2011/2012.....	53
Tabela 5 - Sobrevivência de populações de <i>S. frugiperda</i> coletadas em diferentes regiões do Brasil na concentração diagnóstica de 10 µg chlorantraniliprole/mL na cultura do milho nas safras de 2011/12 e 2012/13 .....	58
Tabela 6 - Sobrevivência de populações de <i>S. frugiperda</i> coletadas em diferentes regiões do Brasil na concentração diagnóstica de 32 µg chlorantraniliprole/mL na cultura do milho na safra 2011/12, 2012/13 e 2013/14.....	59
Tabela 7 - Sobrevivência de populações de <i>S. frugiperda</i> coletadas em diferentes regiões do Brasil nas concentrações diagnósticas de 100 µg flubendiamide/mL na cultura do milho na safra 2011/12, 2012/13 e 2013/14 .....	60
Tabela 8 - Sobrevivência de populações de <i>S. frugiperda</i> coletadas em diferentes regiões do Brasil na concentração diagnóstica de 180 µg flubendiamide/mL na cultura do milho nas safras de 2011/12 e 2012/13.....	61
Tabela 9 - Populações de <i>Spodoptera frugiperda</i> e resultado do procedimento de “F2 Screen” nas safras de 2011/12, 2012/13 e 2013/14.....	62

- Tabela 10 - Frequência do alelo resistente a chlorantraniliprole em populações de *Spodoptera frugiperda* no Brasil na safra 2011/12 estimada pelo método de “F2 Screen” .....69
- Tabela 11 - Frequência do alelo resistente a chlorantraniliprole em populações de *Spodoptera frugiperda* no Brasil na safra 2012/2013 estimada pelo método de “F2 Screen” .....70
- Tabela 12 - Frequência do alelo resistente a chlorantraniliprole em populações de *Spodoptera frugiperda* no Brasil na safra 2013/2014 estimada pelo método de “F2 Screen” .....70

## 1INTRODUÇÃO

A lagarta-do-cartucho-do-milho *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) é uma das pragas mais nocivas da cultura do milho no Brasil (CRUZ, 1999; CAPINERA, 2002; WAQUIL et al., 2008), responsável por danos econômicos tanto na fase vegetativa quanto na fase reprodutiva, desde o plantio até a colheita. Apesar dos avanços nos programas de Manejo Integrado de Pragas (MIP), o curto tempo de desenvolvimento, alta fecundidade e o uso frequente de inseticidas no controle de *S. frugiperda* resultaram em inúmeros casos de resistência aos principais grupos de inseticidas como piretroides (lambda-cyhalothrin), organofosforados (clorpyrifos) e carbamatos (thiodicarb), além de inseticidas de grupos químicos mais recentes como benzoilureias (lufenuron) e espinosinas (spinosad) (McCORD, JR. 1987; OMOTO, 2000; DIEZ-RODRÍGUEZ; OMOTO, 2001; YU; NGUYEN; ABO-ELGHAR, 2003; YU, 2006; YU; MCCORD, JR. 2007; CARVALHO et al., 2013). Dessa forma, a resistência de *S. frugiperda* a inseticidas tem sido um dos grandes entraves para o controle dessa praga no Brasil.

Uma busca contínua de alternativas para o controle de *S. frugiperda* tem possibilitado o desenvolvimento de novas tecnologias como plantas de milho geneticamente modificadas que expressam proteínas de *Bacillus thuringiensis* Berliner os quais compõem uma estratégia adicional de proteção de plantas nos programas de Manejo Integrado de Pragas (MIP). Essa nova tecnologia tem contribuído para a redução do uso de inseticidas proporcionando uma produção mais sustentável, além de contribuir potencialmente para o restabelecimento da suscetibilidade em populações de *S. frugiperda* a inseticidas, que aliado ao desenvolvimento de novas moléculas inseticidas, proporciona a introdução de produtos cada vez mais adequados ao MIP (MARTINELLI; OMOTO, 2005).

Recentemente no Brasil foram lançados no mercado para o controle de pragas, inseticidas do grupo das diamidas que aliam segurança ambiental e alta atividade inseticida para uma série de lepidópteros-praga, incluindo *S. frugiperda*. Os inseticidas diamidas atuam como moduladores de receptores de rianodiana provocando cessação da alimentação, letargia, paralisia e morte do inseto. Este modo peculiar de ação apresenta grande eficácia no controle de diversas pragas das culturas de milho, soja, algodão, tomate entre outras (CORDOVA et al., 2006). As características das diamidas - eficiência no combate de organismos alvo, menor efeito ambiental, boa ação residual, baixa

toxicidade a insetos benéficos e mamíferos (EBBINGHAUS-KINTSCHER, 2006), além de um mecanismo de ação único – possibilitam uma nova opção no MIP pautada no manejo da resistência a inseticidas (JONES et al., 2005), uma vez que os inseticidas tradicionais não apresentam resistência cruzada com as diamidas (LAHM, 2005).

Diversos fatores, como a constante exposição de certas pragas a inseticidas, o cultivo intenso nos últimos anos, a expansão da época e da área de plantio em áreas tradicionais, o aparecimento de novas condições climáticas e práticas culturais, contribuíram para o aumento nos casos de resistência no Brasil e no mundo para inúmeros inseticidas (DIEZ-RODRIGUEZ; OMOTO, 2001; ZHAO et al., 2006). Dessa forma, apesar das diamidas constituírem uma recente e inovadora classe de inseticidas, já existe relatos de baixa suscetibilidade para várias espécies de insetos: *Plutella xylostella* (Linnaeus, 1758) (Lepidoptera: Plutellidae) a chlorantraniliprole no oeste de Pernambuco no Brasil (SILVA, 2012), China (WANG, 2013) Tailândia e Filipinas (TROCZKA et al., 2012), *Choristoneura rosaceana* (Harris, 1841) (Lepidoptera: Tortricidae) em Wenatchee, Estados Unidos (SIAL, 2011), *Spodoptera exigua* (Hübner, 1808) (Lepidoptera: Noctuidae) na China (LAI, 2011); *Helicoverpa armigera* (Hübner, 1805) (Lepidoptera: Noctuidae) na China ( CAO et al., 2010). Baseado nesses relatos fica claro o potencial de evolução da resistência de lepidópteros a diamidas, bem como à necessidade imediata de um programa pró-ativo de manejo da resistência para retardar a evolução da resistência.

Os estudos de monitoramento da resistência têm sido fundamentais para a implementação de estratégias de manejo da resistência (ROUSH; MILLER, 1986). A resistência a inseticidas tem sido detectada e monitorada mediante as caracterizações de linhas-básicas de suscetibilidade de populações de campo obtidas por meio da regressão de Probit. No entanto, este método não é sensível para detectar indivíduos resistentes em situações em que a frequência de resistência é baixa na população (ROUSH; MILLER, 1986; FFFRENCH-CONSTANT; ROUSH,1990). Vários métodos têm sido desenvolvidos para monitorar a resistência precoce de lepidopteros a inseticidas. Um deles é o método de “F2 Screen” que foi originalmente desenvolvido para a detecção inicial da resistência a plantas que expressam uma única proteína Bt no campo. A técnica de “F2 Screen” tem sido considerada um método preciso no início da resistência em condições de campo, além de prover evidências sobre a eficácia de manejo (ANDOW; ALSTAD 1998).

A fim de prolongar a vida útil das diamidas e estabelecer um programa de Manejo da Resistência de Insetos (MRI), objetivou-se com esse trabalho caracterizar a suscetibilidade aos inseticidas chlorantraniliprole e flubendiamide em populações de *S. frugiperda* coletadas na cultura do milho em diferentes Estados do Brasil e estimar a frequência inicial do alelo que confere resistência de *S. frugiperda* a chlorantraniliprole.



## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Aspectos bioecológicos de *Spodoptera frugiperda*

*Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) é uma espécie polífaga originária da zona tropical e subtropical das Américas (CRUZ, 1995; MOREIRA et al., 2003). Alimenta-se de mais de 80 espécies de plantas (CAPINERA, 2002; POGUE, 2002) incluindo inúmeras culturas de importância econômica como milho, algodão, sorgo, amendoim, arroz e pastagens diversas no Brasil e no mundo (CORTEZ; WAQUIL, 1997; BOTTON et al., 1998). Apesar da amplitude de hospedeiros, *S. frugiperda* é considerada a praga mais importante da cultura do milho no Hemisfério Ocidental (NAGOSHI; MEAGHER, 2008; VALICENTE; TUELHER, 2009). A distribuição de *S. frugiperda* limita-se a regiões de clima quente do continente americano devido à ausência de mecanismos de diapausa e à necessidade contínua de uma planta hospedeira para desenvolvimento (CAPINERA, 2002), exigindo constantes migrações dos indivíduos adultos para áreas mais quentes durante os invernos rigorosos dos EUA (NAGOSHI; MEAGHER, 2008). No Brasil, em função do intenso sistema de cultivo, diversidade e disponibilidade de hospedeiros durante todo o ano, a espécie não precisa migrar como ocorre nos EUA, além disso, em virtude da sucessão de culturas, condições climáticas favoráveis (alta temperatura e baixa umidade relativa do ar), *S. frugiperda* é encontrada praticamente em todo território nacional (SANTOS et al., 2004; SÁ, 2009).

O ciclo completo do inseto (ovo-adulto) se dá em aproximadamente 30 dias, com cerca de doze gerações por ano. O número de posturas depositado por fêmea é de no máximo treze, e um único indivíduo pode por dia depositar até oito posturas (CRUZ, 1995). A média de ovos por fêmea, segundo VALICENTE e COSTA (1995), varia em torno de 1000 ovos por postura, indicando uma alta capacidade reprodutiva dessa espécie. Entretanto, a alimentação que o inseto recebe no período larval pode afetar a fertilidade das fêmeas (MURUÁ; VIRLA, 2004). O acasalamento começa ao pôr do sol e atinge seu pico entre duas e quatro horas mais tarde. A longevidade do adulto é de cerca de doze dias e a oviposição ocorre a partir do terceiro dia após a emergência da fêmea (CRUZ, 1995). O período embrionário é de aproximadamente quatro dias e o período larval varia conforme a alimentação, temperatura, sexo e genética, mas geralmente ocorre entre quatro a sete instares. PITRE e HOGG (1983) propuseram que lagartas alimentadas



com algodão, soja e milho apresentaram maior tempo de desenvolvimento e pupas mais leves em comparação àquelas geradas de lagartas alimentadas com folhas de milho.

Na cultura do milho, *S. frugiperda* é também conhecida por lagarta-do-cartucho, pois apesar de alimentar-se em todas as fases de crescimento da cultura, prefere os cartuchos de plantas jovens (GIOLO et al., 2002). A conformação estrutural das plantas de milho (cartucho) garante proteção à praga e dificulta seu controle. Dessa forma, podem ser encontradas larvas de diferentes instares dentro de um mesmo cartucho, porém devido ao hábito canibal geralmente se encontra uma lagarta por cartucho (CRUZ et al., 1997). Atualmente tem se tornado comum o ataque de *S. frugiperda* na base da espiga do milho (GASSEN, 1996), provocando a penetração de patógenos nocivos à saúde humana e de animais domésticos, através do orifício deixado pela lagarta após danificar os grãos, gerando elevados prejuízos ao agricultor (ÁVILA et al., 1997). Ao atingir completamente seu desenvolvimento, a lagarta deixa o cartucho, penetra no solo, preferencialmente arenoso, e se transforma em pupa, fase que dura de dez a doze dias em média (SARMENTO et al., 2002). Os adultos medem cerca de 35 mm de envergadura e apresentam dimorfismo sexual nas asas anteriores. As fêmeas têm asas com coloração marrom acinzentado uniforme, com manchas sutis. Nos machos, a coloração é mais escura, com manchas brancas características no ápice e entre as manchas orbicular e reniforme (CRUZ, 1995). BUTT e CANTU (1962) mencionaram que a fase mais segura para caracterizar as diferenças sexuais entre macho e fêmea é na fase de pupa, onde os caracteres morfológicos se situam nos urômeros genitais (VIII e IX).

Diante da contínua disponibilidade de hospedeiros, expansão da época e da área de plantio, desequilíbrio ecológico causado por inúmeras aplicações de inseticidas, alta capacidade de dispersão dos adultos e condições climáticas favoráveis, *S. frugiperda* tornou-se um grave problema para o agronegócio no Brasil por causa do difícil controle e dos significativos danos que produz durante a safra (WISEMAN et al., 1966; CRUZ, 1995). Alterações ambientais, provocadas pelo homem, como a expansão de fronteiras e o desenvolvimento de novas tecnologias de produção são uma das principais razões para o aumento gradativo dessa praga e de outras no Brasil (PARRA; OMOTO, 2004).

Outro obstáculo enfrentado para o sucesso do controle dessa praga é a existência de raças de *S. frugiperda*. Sabe-se desde 1985 da existência de diferenças genéticas entre duas raças associados à cultura do milho e do arroz nos EUA (PASHLEY; JOHNSON; SPARKS, 1985). Atualmente já identificadas e caracterizadas como espécies crípticas associadas às plantas hospedeiras (PASHLEY; MARTIN, 1987; DRÈS; MALLET,

2002). No Brasil, a hipótese da existência das raças “milho” e “arroz” de *S. frugiperda* foi constatada tendo em vista diferenças fenotípicas e genotípicas (BUSATO et al., 2002; BUSATO et al. 2004, 2005; NAGOSHI et al. 2007a,b; MACHADO et al. 2008). A existência de um nível significativo de fluxo gênico foi confirmada em populações de *S. frugiperda* provenientes de plantas de algodão e milho da região Centro-Oeste do Brasil (MARTINELLI et al. 2006). A existência de raças associadas a diferentes hospedeiros em uma mesma região está intimamente associada a medidas de controle e manejo de resistência, uma vez que, os insetos podem apresentar diferenças na suscetibilidade a princípios ativos de acordo com as raças (MCCORD; YU, 1987; ADAMCZYK et al., 1997).

O conhecimento das características bioecológicas de *S. frugiperda* como: hábito alimentar das fases do inseto, a capacidade de dispersão, fecundidade, número de gerações da praga por ano, eficiência de hospedeiros alternativos como substratos alimentares, associado à integração de diferentes táticas de controle são de suma importância para a tomada de decisão e refinamento de estratégias sustentáveis de manejo da resistência de insetos a inseticidas (GEORGHIOU; TAYLOR,1977a; MARTINELLI et al., 2006).

## **2.2 Resistência de *Spodoptera frugiperda* a inseticidas**

Embora sejam significativos os avanços nos programas de manejo integrado de pragas (MIP), o controle de *S. frugiperda* continua a ser realizado predominantemente por meio de inseticidas, o que potencializou o desenvolvimento da resistência de *S. frugiperda* a inseticidas pertencentes a principais classes de inseticidas (YU et al., 2003; MARTINELLI ; OMOTO, 2006). Organismos capazes de suportar doses toxicológicas letais para a maioria da população normal (suscetível) da mesma espécie são classificados como resistentes. A resistência dos insetos evolui em resposta à seleção natural. A pressão contínua de seleção imposta pelo uso abusivo de inseticidas limita a eficiência e viabilidade desses tóxicos em longo prazo. A resistência é um caso típico de evolução Darwiniana onde a aplicação constante de um mesmo produto químico aumenta a frequência relativa de alguns indivíduos "pré-adaptados" presentes em uma população.

O desempenho não satisfatório de um produto aplicado para o controle *S. frugiperda* pode estar associado à qualidade da aplicação ou aplicação em alta densidade populacional da praga; utilização de dosagens do produto acima das recomendações do

rótulo ou bula, assim como misturas indevidas de produtos e aplicações em condições climáticas desfavoráveis (CRUZ, 2002). Essas condições contrapõem-se à teoria do MIP, pois não somente comprometem a eficiência dos organismos benéficos, como também contaminam o meio ambiente com pesticidas, arriscando a saúde de trabalhadores rurais e dos consumidores devido à possível elevação do nível de resíduos químicos nos alimentos, o que por fim, contribui para aumentar os custos de controle da praga (CRUZ, 1999). Falhas no controle de *S. frugiperda* utilizando-se pesticidas sintéticos têm sido relatadas em diversos agroecossistemas. Segundo Arthropod Pesticide Resistance Database of Michigan State University (2012), os primeiros registros de resistência de *S. frugiperda* ocorreram em 1965 na Bolívia. Contudo, o primeiro caso de resistência constatado foi no estado da Flórida (EUA) ao inseticida carbaryl em consequência do aumento da detoxificação metabólica (YOUNG; McMILIAN, 1979). Posteriormente, Yu (1991) observou resistência de populações de *S. frugiperda* coletadas em campos de milho para praticamente todos os grupos de pesticidas com razão de resistência de 2 a 271, para o grupo dos fosforados (chlorpyrifos, methyl parathion, diazinon, sulprofos, dichlorvos e malathion), 2 a 216 para os piretróides (permethrin, cypermethrin, cyhalothrin, fenvalerate, tralomethrin, bifenthrin, tetramethrin, e fluvalinate) e de 4 a 192 vezes para carbamatos (methomyl, carbaryl e thiodicarb). YU, NGUYEN e ABO-ELGHAR (2003) detectaram uma razão de resistência de 562 vezes a carbaryl, 354 vezes a methyl parathion. Atualmente estudos indicam resistência aos produtos mais recentes do grupo dos reguladores de crescimento de insetos e de origem microbiana como *Bacillus thuringiensis* (SHELTON et al., 2000). Alguns trabalhos desenvolvidos em Porto Rico, México e EUA demonstram a existência de populações de *S. frugiperda* resistentes a proteínas Bt Cry1F expressas no milho geneticamente modificado (STORER et al., 2010). Recentemente, a evolução da resistência à proteína Cry1F foi confirmada em condições de campo no Brasil (FARIAS et al., 2014).

Mecanismos como redução da penetração cuticular do produto, degradação, mutação do sítio de ação, detoxificação metabólica e resistência comportamental têm sido desenvolvidos pelos insetos ao longo de milhões de anos de coevolução com as plantas em resposta às defesas químicas das plantas (GEORGHIOU, 1972; SCOTT, 1990; SCOTT, 1995; DESPRÉS et al., 2007). Em lepidópteros, tais como *Spodoptera littoralis* (Fabricius), *Helicoverpa armigera* (Hübner) (HUANG; HAN, 2007), *Plutella xylostella* (L.) (TALEKAR; SHELTON, 1993) uma grande quantidade de casos de resistência a organofosforados, piretroides, carbamatos, benzilureias e espinosinas foi resultado da

maior atividade enzimática, caracterizada como detoxificação metabólica. Em geral para *S. frugiperda*, a degradação de xenobióticos por enzimas é mediada por monooxigenases dependentes do citocromo P-450 (P450s ou CYPs), glutatona S-transferases (GSTs) e esterases (carboxilesterases e fosfotriesterases) (YU, 1991;1992;2003; CARVALHO et al.,2013). O complexo citocromo P450 tem sido intensamente estudado e é responsável pela catalização de uma diversidade de reações de detoxificação nos insetos, incluindo hidroxilação de DDT, epoxidação de ciclodienos, hidroxilação de anéis aromáticos de carbamatos e oxidação de fosforotioatos (SCOTT, 1999; FEYEREISEN, 2005). Além da detoxificação causada por alta atividade enzimática (YU, 1992) NGUYEN e ALBO-ELGHAR (2003) também confirmam vestígios de insensibilidade de sítios de ação como responsáveis pelo alto nível de resistência em lepidópteros. Essa resistência é decorrente da mudança na estrutura do receptor da molécula, que interage diretamente com o pesticida, diminuindo sua toxicidade. Ambos os receptores em acetilcolinesterase (AChE) e ácido  $\delta$ -aminobutírico (GABA) possuem casos de resistência relacionados à sua sensibilidade às moléculas inseticidas (DEVONSHIRE; MOORES, 1984). Muitos casos de resistência a análogos do hormônio juvenil são devido à detoxificação metabólica e à diminuição na penetração da molécula pela cutícula, fazendo com que uma menor quantidade de produto penetre no interior do inseto (GEORGHIOU, 1972).

A integração de diferentes táticas de controle constitui a estratégia para o sucesso do manejo da resistência de *S. frugiperda*, portanto recomenda-se empregar de maneira conjunta o controle cultural, biológico e comportamental; realizar o controle com inseticidas apenas quando a lagarta atinge o nível de desfolha ou o nível de controle (CRUZ, 2002); conhecer a biologia da praga e a mudança na frequência de resistência no decorrer do tempo, pois em casos onde há instabilidade da resistência, muitas vezes devido à ausência de pressão de seleção, torna-se vantajoso utilizar um programa de rotação de produtos com diferentes mecanismos de ação; reduzir o número de doses dos inseticidas aplicados; usar inseticidas seletivos, os quais trazem um impacto menor sobre os agentes de controle biológico; preservar os inimigos naturais nas áreas agrícolas e introduzir plantas geneticamente modificadas (CRUZ, 1995). A alternativa mais viável para a eficiência no manejo de resistência de *S. frugiperda* é compreender o manejo de resistência a inseticidas como parte integrante do MIP, o qual deve ser utilizado antes do início do plantio permanecendo até a colheita (CROFT, 1990), uma das principais vantagens do MIP é a racionalização do uso de inseticidas, o que contribui para uma produção mais sustentável (CRUZ, 1999).

### 2.3 Fatores que afetam a evolução da resistência de *S. frugiperda*

São vários os fatores que afetam a resistência de *S. frugiperda* a inseticidas, os quais podem ser agrupados em fatores biológicos, genéticos e operacionais. A resistência de *S. frugiperda* a inseticidas é uma característica genética, pré-adaptativa e ocorre em função de um fator intrínseco do organismo em resposta a uma pressão de seleção, por isso o conhecimento das bases genéticas da evolução da resistência, bem como os fatores bioecológicos e operacionais envolvidos no processo de seleção de indivíduos é essencial para o entendimento da evolução da resistência e implementação adequada de um programa de manejo (GEORGHIOU; TAYLOR, 1977a, b). Dentre os fatores genéticos, GEORGHIOU e TAYLOR (1977a) mencionaram a frequência inicial dos alelos resistentes, o padrão de herança da resistência (número e dominância do alelo resistente) e o custo adaptativo associado à resistência. Quanto maior a frequência inicial dos alelos resistentes, mais rápido constituirá a evolução da resistência, sendo essa geralmente baixa, de  $10^{-6}$  a  $10^{-3}$  (ROUSH; MCKENZIE, 1987). No início da evolução da resistência, os indivíduos resistentes são menos adaptados que os indivíduos suscetíveis, por isso a frequência inicial de alelos dentro da população é baixa, no entanto este valor tende subir se a pressão de seleção for intensa (CRUZ, 2002). Geralmente o custo adaptativo dos indivíduos resistentes está associado à capacidade de sobrevivência e reprodução (“fitness”) da espécie. De acordo com ROUSH e MCKENZIE (1987), esses indivíduos apresentam menor fecundidade e viabilidade total, menor competitividade para o acasalamento, maior suscetibilidade a inimigos naturais, maior tempo para o desenvolvimento, etc. No entanto, em função da coadaptação, essas desvantagens associadas à resistência podem ser melhoradas com o decorrer do tempo (OMOTO, 2000).

O padrão de herança da resistência fornece informações sobre a dominância da resistência e tem relação com o número de genes envolvidos na resistência. Em programas de manejo da resistência é importante o manejo dos indivíduos heterozigotos, independentemente se a herança é dominante ou recessiva. Apesar da carência de estudos para determinar o padrão de herança da resistência de *S. frugiperda* a inseticidas, a herança da resistência de *S. frugiperda* já foi identificada como autossômica recessiva para o inseticida lambda-cyhalothrin (DIEZ-RODRIGUEZ; OMOTO, 2001) e para a proteína Cry1F (STORER et al., 2010). A evolução da resistência tende a ser mais lenta quando a herança é recessiva (GEORGHIOU; TAYLOR 1977a; ROUSH;

MCKENZIE 1987). Um fator que deve ser levado em consideração no uso de testes de resistência tem sido a caracterização dos biótipos da praga, pois, segundo PASHLEY et al. (1987) e ADAMCZYK et al. (1997) os biótipos (raças) poderão apresentar uma suscetibilidade diferenciada ao inseticida. A ampla gama de hospedeiros de *S. frugiperda*, proporcionou mudanças comportamentais e fisiológicas devido à utilização de um ou outro hospedeiro, permitindo a diferenciação de raças de *S. frugiperda* encontradas em plantas de milho e de arroz (BUSATO et al, 2005). A existência de raças associadas a hospedeiros influenciam nas medidas de controle e manejo de resistência desse inseto. No entanto a existência de desvantagem adaptativa dos indivíduos resistentes associada à imigração de indivíduos suscetíveis possibilita o restabelecimento da suscetibilidade dos indivíduos na ausência de pressão de seleção.

Os fatores biológicos e ecológicos podem afetar significativamente a evolução da resistência e referem-se às características bióticas (número de gerações por ano, progênie por geração, tipo de reprodução) e comportamentais (capacidade de dispersão, hábito alimentar: monofagia/polifagia, monogamia/poligamia, sobrevivência casual, refúgio) (GEORGHIOU; TAYLOR, 1977a). Quanto maior o número de gerações da praga por ano mais rápida será a evolução da resistência, assim como, quanto maior o número de descendentes a cada geração, pois um maior número de descendentes estará sofrendo pressão de seleção. A lagarta do cartucho do milho, *S. frugiperda* tem em média de doze gerações por ano e o número de ovos/fêmea pode variar de 500 a 1000 (VALICENTE; COSTA 1995) assim sendo, em um tempo relativamente curto, poderá ocorrer à evolução da resistência a qualquer inseticida (CRUZ et al, 2002). Além disso, o ciclo de vida relativamente curto e a maior disponibilidade de alimento e refúgio em relação os insetos monófagos, aumentam a probabilidade de sobrevivência de *S. frugiperda* à pressão de seleção. O hábito alimentar polífago pode retardar o desenvolvimento da resistência porque os indivíduos suscetíveis podem imigrar para áreas tratadas, proporcionado à diluição da resistência. Entretanto, sob o ponto de vista bioquímico, a evolução da resistência pode ser acelerada para insetos polífagos porque podem apresentar maior atividade metabólica em relação aos monófagos (GEORGHIOU; TAYLOR, 1986). Os fatores genéticos e biológicos não podem ser controlados e, geralmente, sua importância só pode ser estudada após o desenvolvimento da resistência.

Os fatores operacionais da resistência são os únicos que podem ser efetivamente planejados e controlados pelo homem na implementação de estratégias de manejo da

resistência e estão relacionados ao inseticida e às características de aplicação do produto, tais como: persistência do resíduo químico, época de aplicação do produto, dose e frequência de aplicação desses produtos, seletividade a inimigos naturais e grupo químico, bem como o nível de ação adotado no controle da praga, estágio de desenvolvimento da praga e modo de aplicação (GEORGHIOU; TAYLOR, 1977b). O processo de evolução da resistência também está relacionado à dose e ao número de aplicações de inseticidas. A aplicação constante de um mesmo agente de controle leva a um aumento na frequência relativa de alguns indivíduos pré-adaptados presentes na população. O uso de inseticida persistente pode eliminar os insetos suscetíveis imigrantes e assim evitar a diluição de genes da resistência (GEORGHIOU; TAYLOR, 1977a). No entanto, dentro do contexto do manejo de resistência, um produto persistente já comprometido pela resistência, agrava ainda mais o problema uma vez que aumenta a pressão de seleção, pois expõe mais de uma geração da praga ao produto (CRUZ, 1995). Quanto aos produtos que preservam a fauna benéfica, eles dificultam a evolução da resistência, pois permitem que os indivíduos resistentes sejam controlados por seus inimigos naturais, reduzindo a necessidade do uso de pesticidas (ROUSH, 1989). O estudo destes fatores que afetam a resistência de *S. frugiperda* pode orientar bem como ampliar, de maneira mais adequada, a confiabilidade das estratégias de manejo e a capacidade efetiva de retardar e até mesmo evitar a evolução da resistência.

## 2.4 Inseticidas Diamidas

Durante a década de 1940, estudos a partir de extratos da casca de *Ryania speciosa* (Flacourtiaceae) uma planta nativa da América do Sul e Central (WARE, 1892) conduziram à identificação de uma série de moléculas com atividade inseticida de ação paralisante, denominadas rianoides (EDWARDS et al., 1948; JEFFERIES et al., 1992). Dentre os rianoides descobertos, a rionidina detém maior estudo e atenção, devido a sua alta afinidade a determinados canais de cálcio (receptores) no retículo sarcoplasmático. Atribuiu o nome comum de receptores de rianodina (RyRs), os receptores que mediam a regulação da concentração intracelular de íons cálcio, em virtude da alta afinidade desses receptores a rianodina (FILL; CORONADO, 2002). Sabe-se que os RyRs estão presentes na membrana do retículo sarcoplasmático do músculo e do retículo endoplasmático de neurônios, células epiteliais entre outras células, tanto em mamíferos como insetos

(FRANZINI-ARMSTRONG, 1997). O advento e caracterização dos receptores de rianodina nos insetos permitiu uma maior compreensão dos mecanismos fisiológicos de controle muscular, além de compor um novo alvo bioquímico.

A contração do músculo dos insetos depende da liberação intracelular regulada de vesículas de cálcio através da ativação dos receptores de rianodina (RyR) (LAHM, 2000). Os insetos possuem apenas uma única forma de RyR que é composto por quatro subunidades idênticas que formam os canais de cálcio. Estes canais, juntamente com várias proteínas, estão localizados no retículo sarcoplasmático do músculo e retículo endoplasmático de células não musculares (GULLAN; CRANSTON, 2005). Devido a eficácia da rianodina como inseticida natural, sua afinidade a canais de  $Ca^{2+}$  bem como, o conhecimento da dinâmica do sistema muscular de insetos, especulou-se que os RyRs seriam um excelente alvo para inseticidas sintéticos. Esta ideia culminou no desenvolvimento das diamidas, moléculas inseticidas que atuam nos receptores da rianodina localizado na membrana do retículo sarcoplasmático da célula muscular. As diamidas ativam a liberação irregular dos estoques de cálcio das células, o qual se liga à troponina e muda sua configuração fazendo com que ela se desligue da tropomiosina. Em seguida, ocorre a liberação do sítio de ligação da actina na miosina o que resulta na contração muscular (CAMPBELL et al., 1986, SATELLE et al., 2008). Em decorrência da intoxicação pelas diamidas, o inseto sofre uma súbita cessação de alimentação, letargia, paralisia e por fim morte (HANNING, 2009). Estes inseticidas atuam diretamente sobre o receptor sem a necessidade de uma proteína acessória (CORDOVA et al., 2006; WHALON, 2008).

As diamidas são derivadas do ácido ftálico ou antranílicas (SATELLE et al., 2008). As diamidas do ácido ftálico foram a primeira classe de diamidas descoberta curiosamente pelo pesquisador da empresa Nihon Nohyaku e codesenvolvido pela empresa Bayer por meio do trabalho em torno do herbicida pirazinedicarboxamida, o qual levou a elaboração do flubendiamida, uma nova molécula de alta atividade inseticida sobre lepidópteros pragas (TOHNISHI et al., 2005). Como descrito por EBBINGHAUS-KINTSCHER (2006), as diamidas do ácido ftálico agem diretamente no início da contração muscular, provocando um aumento rápido da concentração de cálcio citosólico livre nos neurônios de *Heliothis virescens*, mas em neurônios isolados a partir do gânglio da raiz dorsal de ratos, não induziu qualquer resposta detectável de  $Ca^{2+}$  mesmo em células que reagem à cafeína e rianodina. Tal experimento para avaliação de seletividade foi realizado sobre as três linhas celulares de mamíferos que naturalmente expressam as



três isoformas RyR, não ocorrendo nenhum efeito. Um fator importante que contribui para segurança das diamidas quanto ao risco de intoxicação é a sua seletividade para RyRs insetos sobre aqueles dos mamíferos. (LAHM et al., 2007; CORDOVA et al., 2006). A divergência estrutural entre os RyRs de mamíferos e insetos implica que os RyRs de insetos podem servir de alvo de inseticidas com baixa toxicidade a mamíferos (TAKESHIMA et al., 1994; SATTELLE, 2008). Ao contrário dos insetos, mamíferos possuem três isoformas de RyR. Concentrações micromolares de flubendiamide ou seu análogo sulfóxido foram ineficazes na estimulação de liberação de cálcio a partir de células que naturalmente expressam as três isoformas, quer individualmente ou em combinação (EBBINGHAUS-KINTSCHER, 2006).

Após a descoberta das diamidas do ácido ftálico, a empresa DuPont otimizou as diamidas com a criação das diamidas antranílicas, contendo o ftálico 2-metil-4-trifluorometil, formando o princípio ativo chlorantraniliprole e cyantraniliprole, que são comercializados pela DuPont e Syngenta, que possuem maior atividade inseticida e segurança ambiental. Assim como no caso das diamidas do ácido ftálico as diamidas antranílicas se ligam a um local distinto da rianodina e até a presente data não houve relatos de resistência múltipla com outros inseticidas comerciais (LAHM, 2005; 2009). Esse inseticida apresenta alta atividade contra espécies de Lepidoptera, pragas bem como contra espécies de Coleoptera, Diptera e Hemiptera (LAHM, 2005; KUHAR et al., 2007; TEMPLE et al., 2009). Recentemente foi desenvolvido o cyantraniliprole, uma segunda geração de inseticidas da classe das diamidas que além de controlarem lepidópteros, também são eficazes no controle de hemípteros (FOSTER et al., 2012). A maioria dos moduladores exógenos partilha o mesmo local de ligação com a rianodina. Contudo, estudos bioquímicos revelaram que as diamidas do ácido ftálico e antranílicas ligam a um novo sítio no RyR, distinto da rianodina (CORDOVA et al., 2006).

Chlorantraniliprole é um excelente inseticida não apenas devido a sua alta atividade larvívora, longa duração e seletividade a mamíferos, mas também por ser seguro para aves, mariscos e artrópodes benéficos, incluindo abelhas e aranhas (LAHM et al., 2007, 2009; BRUGGER et al., 2010). No entanto, apesar da literatura limitada, é sabido que o inseticida chlorantraniliprole é relativamente seguro para vespas parasitoides (HUANG, 2011). As diamidas são relativamente seguras para os inimigos naturais de insetos (BRUGGER et al., 2010). No entanto, devem-se aumentar as preocupações e estudos em relação aos efeitos negativos desses produtos sobre inimigos naturais, de forma a integrar e incrementar seu uso em programas de manejo integrado de pragas a

fim de determinar o impacto em longo prazo destes produtos sobre a dinâmica populacional das pragas de insetos e insetos benéficos. Embora chlorantraniliprole e flubendiamide sejam produtos químicos novos e distintos quanto à estrutura química, é inevitável a pré-existência de alelos que conferem resistência e resistência cruzada relacionada entre eles para *S. frugiperda* uma vez que desfrutam do mesmo sítio alvo. Conforme descrito por TROCZKA (2012) e WANG (2012), três populações de campo de *P. xylostella* coletados do sul da China em 2011 demonstraram altos níveis de resistência cruzada entre chlorantraniliprole (18-1150-vezes) e flubendiamide (15-800 vezes) quando comparadas com a população suscetível de referência. Com base nesses resultados é bastante provável que a resistência cruzada possa ocorrer também com outras pragas alvo. Portanto, chlorantraniliprole e flubendiamide não devem ser incorporados em rotação em um mesmo programa de gerenciamento de resistência, tal como já sugerido e publicado pelo Comitê Brasileiro de Ação a Resistência de Inseticidas (IRAC).

LAI e SU (2011) relataram que a maior parte da mortalidade de *Spodoptera exigua* causada por chlorantraniliprole, ocorreu nos primeiros quatro dias de exposição, por se tratar de um inseticida de ingestão de modo de ação lenta (LAI; SU, 2011). A mortalidade retardada observada para as diamidas (1 - 4 dias) pode ser atribuída, pelo menos em parte, ao fato de que as diamidas precisam ser ingeridas para que se inicie sua atividade. No entanto, as diamidas agem rapidamente na praga alvo, e em menos de 24 horas ocorre à interrupção da alimentação se comparado com os demais inseticidas recentemente desenvolvidos (HANNING et al., 2009). Em estudos com concentrações subletais de chlorantraniliprole, KNIGHT e LINDSEY (2006) evidenciaram uma redução na proporção de acasalamentos de *Cydia pomonella*. Segundo IORIATTI (2009), chlorantraniliprole também demonstra atividade ovicida em ovos de *Lobesia botrana*. Tais efeitos comportamentais são decorrentes da intoxicação muscular, no entanto os mecanismos fisiológicos específicos e a redução do acasalamento devem ser mais estudados (KNIGHT ; LINDSEY, 2006; IORIATTI, 2009). Estudos de potencial de ligação incluindo a presença de rianodina para potencializar a ligação dos RyR a flubendiamide, realizados em membranas do músculo de *Heliothis virescens* relataram um aumento positivo na afinidade para [3H] rianodinas a qual não mais exibiram uma dependência da concentração de cálcio (CORDOVA et al., 2006). Em contraste com os estudos de ligação flubendiamide, o valor Bmax (radiomarcado) para a [3H] diamida antranílico em músculos de *Periplaneta americana* foi aproximadamente semelhante ao obtido para [3H]-rianodina sugerindo uma estequiometria 1:1 com o tetrâmero (CORDOVA et al., 2007). No entanto,

como este estudo de ligação incluindo a presença de rianodina foi realizado sobre preparações diferentes (músculo *P. americana* e *H. virescens*), não se pode concluir se as duas classes de diamidas ligam de forma diferente a RyR (EBBINGHAUS-KINTSCHER et al., 2006) e, portanto, os mecanismos fisiológicos específicos afetados serão estudados com mais detalhes (KNIGHT ; LINDSEY, 2006).

A evolução de resistência a inseticidas e a possibilidade de resistência cruzada são os principais entraves no desenvolvimento de novos inseticidas. Por se tratar de um dos poucos inseticidas eficazes ainda disponíveis para o controle de lepidópteros, houve uma adoção generalizada das diamidas em muitas regiões do mundo. Como consequência do uso incorreto de padrões de aplicação, muitas vezes devido à falta de especialização dos envolvidos em gestão da resistência aos inseticidas, já existem relatos de baixa suscetibilidade para várias espécies de insetos: *Plutella xylostella* (L., 1758) (Lepidoptera: Plutellidae) a chlorantraniliprole no oeste de Pernambuco no Brasil (SILVA et al., 2012), no sul da China entre 2010 e 2012 (WANG et al. 2013) na Tailândia e Filipinas (TROZKA, 2012); *Choristoneura rosaceana* (Harris, 1841) (Lepidoptera: Tortricidae) em Wenatchee, Estados Unidos (SIAL, 2011); *Spodoptera exigua* (Hübner, 1808) (Lepidoptera: Noctuidae) na China (LAI ; SU, 2011) e *Helicoverpa armigera* (Hübner, 1805) (Lepidoptera: Noctuidae) na China (CAO et al., 2010). Segundo RIBEIRO et al. (2014), os níveis de resistência de populações de *P. xylostella* no Brasil foram de 27,7 vezes, particularmente em áreas do Nordeste do Brasil são alarmantes. Uma vez que estes níveis de resistência foram muito maiores do que os reportados por outros trabalhos recentes (TROZKA et al, 2012;. WANG & WU, 2012;. WANG et al, 2012), sugerindo uma rápida evolução da resistência no campo devido ao uso indevido de chlorantraniliprole reduzindo a sua eficácia.

Mecanismos bioquímicos responsáveis pela resistência a diamidas já foram descritos para várias espécies de insetos: *Choristoneura rosaceana* (SIAL, 2011;), *Plutella xylostella* (TROZKA et al., 2012; WANG et al., 2012, LIN et al., 2013), *Spodoptera exigua* (LAI ; SU, 2011, ZHAN, 2014) e *Helicoverpa armigera* ( CAO et al., 2010). LAI e SIAL (2011) baseados em estudos com *S. exigua* e *C. rosaceana* indicam que a resistência a diamidas é mediada por esterases e monooxigenases, envolvidas na detoxificação metabólica enzimática. WANG et al. (2012) sugeriram que a detoxificação metabólica não é o principal mecanismo de resistência de *P. xylostella* a chlorantraniliprole. BARTEK et al. (2012) verificaram que a resistência de *P. xylostella* a diamidas ocorre devido uma mutação entre dois possíveis domínios transmembranais do canal de rianodina na

posição G4946 na região do gene que codifica o sítio de ligação das diamidas. Segundo WANG et al (2012), a resistência de *P. xylostella* a chorantraniliprole foi parcialmente recessiva e instável, o que sugere a presença de custos adaptativos associado à resistência. Em indivíduos resistentes, os custos adaptativos podem prejudicar o estabelecimento da resistência no campo na ausência de um inseticida (GASSMANN et al., 2009), e até mesmo reverter a resistência em função da natureza de tais custos. Apesar de poucas gerações avaliadas, o estudo de RIBEIRO et al. (2014) reportaram que a reversão da suscetibilidade de populações resistentes de *P. xylostella* está associada ao custo adaptativo.

Apesar da severidade do ataque e infestações de *S. frugiperda* nas diferentes culturas do Brasil e do mundo não há estudos sobre o mecanismo de resistência de *S. frugiperda* a diamidas. Recentemente o cDNA de um gene do receptor de rianodina foi clonado e caracterizado para vários insetos: *Bombyx mori* (sRyR), *Plutella xylostella* (PxRyR) e *Cnaphalocrocis medinalis* (Cm RyR) o que permitirá esclarecer com base molecular a resistência de pragas a inseticidas diamidas (KATO et al., 2009; GUO et al., 2012; WANG et al., 2012; 2013).

Apesar dos relatos pontuais publicados de resistência de insetos a diamidas, o controle contra diversas pragas tem sido eficaz. No entanto, vale lembrar que para os inseticidas diamidas, assim como para qualquer outro inseticida, o risco de evolução da resistência de pragas deve ser considerado, mediante implementação de estratégias pró-ativas de manejo da resistência (ROUSH, 1989; ROUSH; DALY.,1990). Devido às características ecotoxicológicas favoráveis, os inseticidas diamidas podem ser considerada como uma opção apropriada para programas de MIP (LAHM et al.,2007; 2009).

## **2.5 Detecção e Monitoramento da Resistência**

Alterações na suscetibilidade de populações praga, antes que a frequência crítica de resistência seja atingida, torna o monitoramento de pragas uma ferramenta fundamental para orientar a tomada de decisão de controle; implementar estratégias proativas para gerenciar e manter a suscetibilidade de populações de campo; retardar a evolução da resistência e manter a vida útil dos inseticidas (ROUSH; MILLER, 1986). Segundo FFFRENCH-CONSTANT e ROUSH (1990), a resistência a inseticidas tem sido detectada e monitorada mediante as caracterizações de linhas-básicas de suscetibilidade

de populações de campo obtidas por meio da regressão de Probit. A caracterização da suscetibilidade permite estimar a razão de resistência e comparar estatisticamente as  $CL_{50}$  e os coeficientes angulares obtidos. No entanto, os fenótipos resistentes em populações naturais serão distinguidos apenas quando a frequência do alelo para resistência for relativamente alta ou quando a resistência for herdada como dominante (VENETTE et al. 2000). Portanto, este método não é sensível para detectar indivíduos resistentes, pois seria necessário testar muitos indivíduos para encontrar um indivíduo resistente em situações em que a frequência de resistência é baixa na população (ROUSH; MILLER, 1986). Considerando que no início da evolução da resistência a frequência de alelos de resistência é baixa em uma população, apresentando-se na ordem de  $10^{-3}$  a  $10^{-2}$  (ROUSH; MCKENZIE, 1987), recomenda-se o uso de concentrações diagnósticas ou discriminatórias, se possível, as quais são testadas um número maior de insetos somente nas concentrações mais informativas sobre as alterações dos fenótipos resistentes em populações naturais (ROUSH ; MILLER, 1986; SIEGFRIED et al.,1995). O termo dose ou concentração discriminatória é usado quando se sabe com base genética e toxicológica que a dose é capaz de distinguir a resposta entre o genótipo (suscetível – resistente) da espécie estudada; já o termo dose diagnóstica é menos criterioso e é utilizado quando se quer monitorar a resistência, é uma dose próxima a  $CL_{90}$  ou  $CL_{95}$ , ou seja, não mata todos os suscetíveis, porém mata alguns resistentes, sendo menos precisa que a discriminatória (HALLIDAY; BURNHAM, 1990).

Há diversos métodos utilizados para o monitoramento da resistência de insetos a inseticidas, dentre as quais se destacam os fenotípicos e genotípicos. Os métodos fenotípicos são eficientes para o monitoramento da resistência de alelos aditivos ou dominantes em alta frequência na população natural (ANDOW, 2008). Contudo, programas de manejo da resistência são mais efetivos quando implementados de modo preventivo, ou seja, no início da evolução da resistência (ROUSH; MCKENZIE, 1987), sendo assim, se o objetivo é estimar a frequência inicial de alelos resistentes em populações de campo os métodos genotípicos tais como o “F1 Screen” (GOULD et al., 1997) ou “F2 Screen” ALSTAD ; ANDOW, 1995; ANDOW ; ALSTAD, 1998) são mais apropriados. No entanto, o método “F2 Screen”, apesar de trabalhoso e de alto custo, dispensa o uso de linhagem resistente, reduz o número de insetos amostrados e o tempo de detecção de alelos raros em populações de campo sendo muito mais eficiente se comparado: ao “F1 Screen” que requer o uso de linhagem resistente; e métodos fenotípicos que dependem de um grande número de indivíduos amostrados para a

detecção da resistência (ANDOW ; ALSTAD, 1998; BERNARDI et al., 2011). A triagem da progênie F2 ou “F2 Screen” utiliza um número reduzido de insetos amostrados, sendo considerado o único método sensível e capaz de em pouco tempo estimar variações na frequência de um alelo recessivo ou parcialmente recessivo mesmo quando sua frequência inicial é baixa (ANDOW; ALSTAD 1998). Em suma, a triagem da progênie F2 ou “F2 Screen” constitui nas seguintes etapas: a) inicialmente fêmeas adultas e fecundadas devem ser coletadas no campo; b) no laboratório devem ser estabelecidas diferentes linhagens a partir de uma fêmea trazida do campo; c) em seguida, os indivíduos resultantes da geração F1 devem ser criados e reproduzidos dentro de sua respectiva linhagem; d) os descendentes da geração F2 devem ser utilizados em bioensaios discriminatórios para verificar a suscetibilidade dos indivíduos e (e) os dados são analisados pelos métodos de estatística Bayesiana e a frequência dos alelos de resistência na população fundadora é estimada com um intervalo de confiança. Dessa forma, a técnica de “F2 Screen” pode com eficiência refinar estratégias de manejo e assim aumentar a longevidade de inseticidas e evitar falhas de controle no campo (ANDOW; ALSTAD 1998).

Métodos convencionais de monitoramento e detecção de resistência de pragas a pesticidas são indispensáveis e podem ser mais eficientes se aplicados em conjunto com o método de F2 Screen visando uma gestão efetiva do manejo da resistência.



### 3 MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi realizado no Laboratório de Resistência de Artrópodes a Pesticidas, no Departamento de Entomologia e Acarologia da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ), Universidade de São Paulo (USP), Piracicaba/SP.

#### 3.1 Coleta das populações de *S. frugiperda*

A população suscetível de referência (SUS) foi proveniente de colônia de laboratório da Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas-MG e mantida na ausência de pressão de seleção com inseticidas por mais de 10 anos. As populações de *S. frugiperda* foram coletadas nas culturas de milho nas safras agrícolas de 2011/2012, 2012/2013 em oito regiões, e na safra 2013/14 em seis Estados do Brasil (Tabela 1). Para cada população, aproximadamente 300-500 lagartas foram coletadas e colocadas em copos plásticos de 100 mL contendo dieta artificial (KASTEN et al., 1978) e/ou acondicionadas em caixas de isopor contendo folhas de milho e enviadas ao Laboratório de Resistência de Artrópodes a Pesticidas na ESALQ/USP para posterior triagem.



Tabela 1 - Populações de *S. frugiperda* testada em estudos de caracterização e monitoramento da suscetibilidade

Safra	Estado	Município	Longitude	Latitude	Data da coleta
	SUS	Laboratório	-	-	-
	Bahia	São Desidério	46°09'83,0"	13°00'78,1"	20/01/2012
	Mato Grosso	Campo Novo dos Parecis	57°57'51,97"	13°24'47,16"	02/04/2012
	Mato Grosso do Sul	Chapadão do Sul	52°45'09,2"	18°39'49,2"	03/05/2012
2011/12	Minas Gerais	Uberlândia	-	-	29/05/2012
	São Paulo	Palmital	50°13'46,64"	22°46'31,84"	20/04/2012
	Goiás	Rio Verde	-	-	16/12/2011
	Paraná	Sabáudia	51°29'43,9"	23°18'43,7"	06/01/2012
	Rio Grande do Sul	Santo Ângelo	54°15'38,9"	28°37'51,0"	24/11/2011
	Bahia	Luiz Eduardo Magalhães	46°17'21,6"	11°50'16,5"	11/04/2013
	Mato Grosso	Sapezal	58°57'26,05"	13°42'5,19"	17/04/2013
	Mato Grosso do Sul	Chapadão do Sul	52°45'09,2"	18°39'49,2"	25/03/2013
2012/13	Minas Gerais	Cambé	-	-	13/03/2013
	São Paulo	Palmital	50°11'30,2"	22°46'36,7"	03/06/2013
	Goiás	Montividiu	51°10'31,4"	17°28'27,4"	17/04/2013
	Paraná	Sabáudia	51°29'43,9"	23°18'43,7"	06/01/2013
	Rio Grande do Sul	Não Me Toque	52°41'23,75"	28°26'30,02"	14/02/2013
	Bahia	Luis Eduardo Magalhães	-	-	23/01/2014
	Minas Gerais	Araguari	48°01'5,2"	18°38'43,7"	18/11/2013
2013/14	São Paulo	Casa Branca	47°10'57,1"	21°53'42,4"	13/11/2013
	Goiás	Cabeceiras	47°08'28,3"	15°82'10,08"	20/01/2014
	Paraná	Arapoti	-	-	05/12/13
	Rio Grande do Sul	Victor Graeff	52°73'72,20"	28°59'51,5"	10/12/2013

### 3.2 Criação e manutenção de *S. frugiperda* em laboratório

As lagartas provenientes do campo que vieram nas folhas de milho foram retiradas das plantas e colocadas em copos plásticos contendo dieta artificial até a formação de pupa. As que já vieram em dieta artificial foram mantidas no mesmo recipiente até a formação da pupa. As pupas obtidas das lagartas de campo foram retiradas da dieta e desinfetadas com solução de sulfato de cobre a 10%. Em seguida, foram colocadas em placas de Petri de 10 cm de diâmetro por 1,5 cm de altura contendo papel filtro, onde foram mantidas cobertas por um copo plástico transparente até emergirem os adultos. Foram transferidos cerca de 20 casais de mariposas por gaiola de tubo de PVC de 10 cm de diâmetro por 20 cm de altura, revestidas internamente com papel jornal para acasalamento e oviposição. Dentro das gaiolas foi colocado um recipiente de plástico contendo solução de mel na concentração de 10% para alimentação dos adultos. Os substratos para postura e a solução de mel foram trocados a cada dois dias. As gaiolas foram mantidas em condições controladas em sala de criação à temperatura de  $23 \pm 2^\circ\text{C}$ , umidade relativa de 70% e fotofase de 14h. As posturas contidas no papel jornal foram recortadas e colocadas em copos plásticos transparentes (100 mL), juntamente com um pedaço de papel filtro umedecido com água, a fim de manter a umidade interna. Os copos com as posturas foram mantidos em câmaras climatizadas reguladas à temperatura de  $20^\circ\text{C}$  e fotofase 14h até a eclosão das lagartas.

Para a realização dos bioensaios de aplicação superficial de inseticida em dieta artificial foram destinadas aproximadamente 95% das lagartas neonatas de cada população, os 5% restantes foram destinadas para a manutenção da população correspondente, as quais semanalmente foram inoculadas em copos plásticos transparentes (50 mL) contendo dieta artificial. Para os bioensaios foram utilizadas placas plásticas (Costar®, Cambridge, Massachusetts, EUA) com 24 células, onde em cada célula foi colocado 1,25 mL de dieta artificial. Após a secagem as placas foram mantidas em câmara de fluxo laminar com luz ultravioleta para esterilização. Os inseticidas testados foram chlorantraniliprole (Premio®, 200 g I.A./L) e flubendiamide (Belt®, 480 g I.A./L). As diferentes concentrações dos inseticidas foram obtidas mediante a diluição em água destilada com adição de 0,1% (v/v) do surfactante Triton® a cada concentração testada. Na sequência, em cada placa foi aplicado, por célula, 30  $\mu\text{L}$  da solução inseticida na concentração a ser testada. Após secagem das placas, lagartas de terceiro instar foram inoculadas individualmente para cada célula. Para o fechamento das células foi utilizada a

tampa das placas e transparências plásticas perfuradas. As placas foram mantidas em câmaras climatizadas com temperatura de  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  e fotofase de 14h e após 96h, realizou-se as avaliações para ambos os inseticidas tendo como critério de mortalidade os indivíduos sem movimento aparente após serem tocados com um estilete nos últimos segmentos abdominais.

### **3.3 Caracterização da suscetibilidade de *S. frugiperda* a chlorantraniliprole e flubendiamide**

Para a caracterização da suscetibilidade de *S. frugiperda* a chlorantraniliprole e flubendiamide foi utilizada a população suscetível de referência (SUS) e cinco populações de campo coletadas na safra agrícola de 2011/12 em diferentes regiões geográficas do Brasil. Foram testadas oito concentrações distribuídas logaritmicamente proporcionando uma mortalidade entre 5 e 95%. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com seis repetições, sendo testadas no mínimo 96 lagartas por concentração e avaliadas com 96h após a infestação. Os dados de mortalidade foram submetidos à análise de Probit através do programa Polo-PC (LeOra Software, 1987) e posteriormente calculados os valores das concentrações letais (CL) e respectivos intervalos de confiança (I.C 95%). Para estimativa das concentrações diagnósticas, os dados de mortalidade das cinco populações de *S. frugiperda* foram agrupados e analisados conjuntamente, segundo o método proposto por SIMS et al (1996). Os dados de mortalidade foram submetidos ao modelo binomial com função de ligação complemento log-log (modelo CLL) que foi usado para descrever a relação entre a concentração de inseticida e a probabilidade de mortalidade acumulada (ROBERTSON; PREISLER, 1992) utilizando o procedimento de Probit através do programa Polo-PC (LeOra Software, 1987). Por meio deste modelo foi estimada a  $CL_{99}$  e seu respectivo intervalo de confiança (I.C 95%) e definida a concentração diagnóstica de monitoramento da suscetibilidade *S. frugiperda*

### 3.4 Monitoramento da suscetibilidade de *S. frugiperda* a chlorantraniliprole e flubendiamide

A suscetibilidade de populações de *S. frugiperda* aos inseticidas chlorantraniliprole e flubendiamide foi avaliada em oito estados produtores de milho do Brasil: Bahia, Minas Gerais, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Goiás, Paraná, Rio Grande do Sul e São Paulo nas safras 2011/12 2012/13 e seis estados: Bahia, Minas Gerais, Goiás, Paraná, Rio Grande do Sul e São Paulo na safra 2013/14. O monitoramento da suscetibilidade foi realizado por meio de bioensaios de ingestão (Figura 1) utilizando-se duas concentrações diagnósticas definidas anteriormente. Os bioensaios foram realizados com no mínimo 480 lagartas testadas por concentração e avaliadas em 96h após a infestação. Os dados de mortalidade ( $X$ ) foram transformados para  $\arcsen\sqrt{X/100}$  e submetidos à análise de variância. Para discriminação dos tratamentos, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro ( $p \leq 0,05$ ), utilizando o software SAS (SAS Institute, 2004).

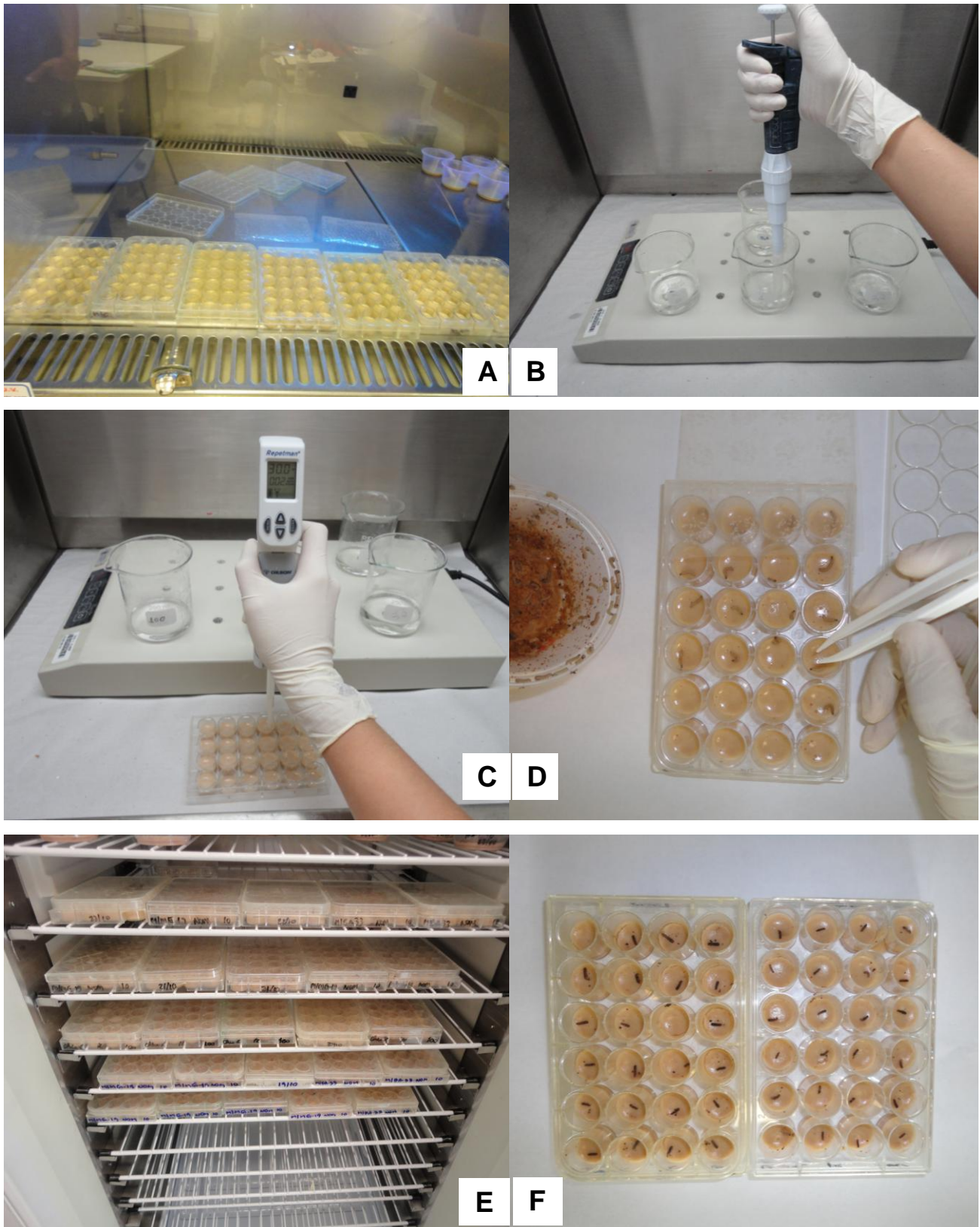


Figura 1 - Detalhes do método de bioensaio de ingestão. A) Esterilização e secagem das placas de bioensaio; B) Diluição do inseticida; C) Aplicação do inseticida nas células; D) Inoculação de lagartas de 3º instar; E) Placas mantidas dentro de câmaras climatizadas com temperatura de  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  e fotofase de 14h. ; F) Placas de bioensaio para avaliação após 96h após a inoculação de lagartas

### 3.5 Estimativa da frequência inicial do alelo que confere resistência de *S. frugiperda* a chlorantraniprole

#### 3.5.1 Coleta de *S. frugiperda* para “F2 Screen”

As populações de *S. frugiperda* foram coletadas nas principais regiões de produção de milho no Brasil, nas safras agrícolas de 2011/12, 2012/13 e 2013/14 (Tabela 2).

Tabela 2 - Populações de *S. frugiperda* usadas para o “F2 Screen”

Estado	Município	Código da população	Longitude	Latitude
Bahia	São Desidério	M/BA 27	46°09'83,0"	13°00'78,1"
	Luiz Eduardo Magalhães	M/BA 31	46°17'21,6"	11°50'16,5"
	Luiz Eduardo Magalhães	M/BA 33	46°17'21,6"	11°50'16,5"
	Correntina	M/BA 34	45°72'70"	13°67'55"
	Luiz Eduardo Magalhães	M/BA 35	-	-
	Roda Velha	M/BA 36	-	-
	Estrondo	M/BA 37	-	-
	Sinop	M/MT 19	-	-
Mato Grosso	Campo Novo do Parecis	M/MT 20	57°57'51,97"	13°24'47,16"
	Sorriso	M/MT 23	55°50'09,21"	12°13'01,6"
Mato Grosso do Sul	São Gabriel do Oeste	M/MS 11	-	-
	Chapadão do Sul	M/MS 12	52°50'36,39"	18°43'01,21"
Minas Gerais	Dourados	M/MS 13	54°32'03,55"	22°01'13,43"
	Uberlândia	M/MG 17	-	-
Goiás	Montividiu	M/GO 22	51°14'50,3"	17°15'35,6"
	Caiapônia	M/GO 23	51°38'38,6"	17°13'02,03"
Paraná	Rio Verde	M/GO 24	-	-
	Sabáudia	M/PR 34	51°29'43,9"	23°18'43,7"
	Sabáudia	M/PR 37	51°29'43,9"	23°18'43,7"
	Campo Mourão	M/PR 38	-	-
	Cambé	M/PR 44	-	-

### 3.5.2 Criação de *S. frugiperda* em laboratório para “F2 Screen”

As lagartas provenientes do campo foram retiradas das plantas ou placas plásticas e em seguida inoculadas individualmente em copos plásticos contendo um pedaço de dieta artificial (KASTEN et al., 1978). As pupas obtidas das lagartas de campo foram retiradas da dieta e desinfetadas com solução de sulfato de cobre a 10%. Em seguida em uma bandeja de 30x40 cm contendo papel filtro, cada pupa foi individualizada e coberta por um copo plástico (50 ml) transparente até emergirem os adultos. As fêmeas adultas foram individualizadas em copos plásticos transparentes (500 mL), colocados com a abertura virada para baixo sobre uma mesa revestida com papel jornal para acasalamento e oviposição. Cada copo plástico representou uma isolinha (casal: fêmea + macho) e dentro dos copos plásticos foi colocado uma placa de cultura de células de acrílico (35 mm de diâmetro x 10 mm, BD Falcon™) com algodão absorvente de água embebido em solução de mel na concentração de 10% para alimentação dos adultos. Os substratos (copo e papel jornal) para postura e a solução de mel foram trocados a cada dois dias.

As isolinhas foram mantidas em condições controladas em sala de criação à temperatura de  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ , umidade relativa de 70% e fotofase de 14h. As posturas contidas no papel jornal foram recortadas e colocadas nos copos plásticos transparentes (500 mL) correspondentes a isolinha, juntamente com um pedaço de papel filtro umedecido com água, a fim de manter a umidade interna. Os copos com as posturas foram mantidos em câmaras climatizadas à temperatura de  $20^\circ\text{C}$  e fotofase 14h até a eclosão das lagartas. As lagartas neonatas foram transferidas com auxílio de um pincel para copos plásticos transparentes (100 mL) contendo dieta artificial (corresponde à progênie F1). Ao atingirem o 3º instar foi inoculado cinco lagartas por copo, num total de 22 copos plásticos (100 mL), contendo dieta artificial por isolinha. As pupas obtidas de cada isolinha foram retiradas da dieta e desinfetadas com solução de sulfato de cobre a 10%. Em seguida as pupas foram transferidas para uma gaiola de tubo de PVC de 10 cm de diâmetro por 25 cm de altura, revestidas internamente com papel jornal para acasalamento e oviposição.

Dentro das gaiolas foi colocado um recipiente de plástico contendo solução de mel na concentração de 10% para alimentação dos adultos. Os substratos para postura e a solução de mel foram trocados a cada 3 dias. Foram realizadas aproximadamente 3 trocas de gaiolas. As gaiolas correspondentes as isolinhas foram mantidas em sala de criação à temperatura de  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ , umidade relativa de 60% e fotofase de 14h. As posturas contidas no papel jornal foram recortadas e colocadas em copos plásticos

transparentes (500 mL), juntamente com um pedaço de papel filtro umedecido com água, a fim de manter a umidade interna. Os copos com as posturas foram mantidos em câmaras climatizadas à temperatura de 20°C e fotofase 14h, até a eclosão das lagartas (corresponde à progênie F2) (Figura 2).



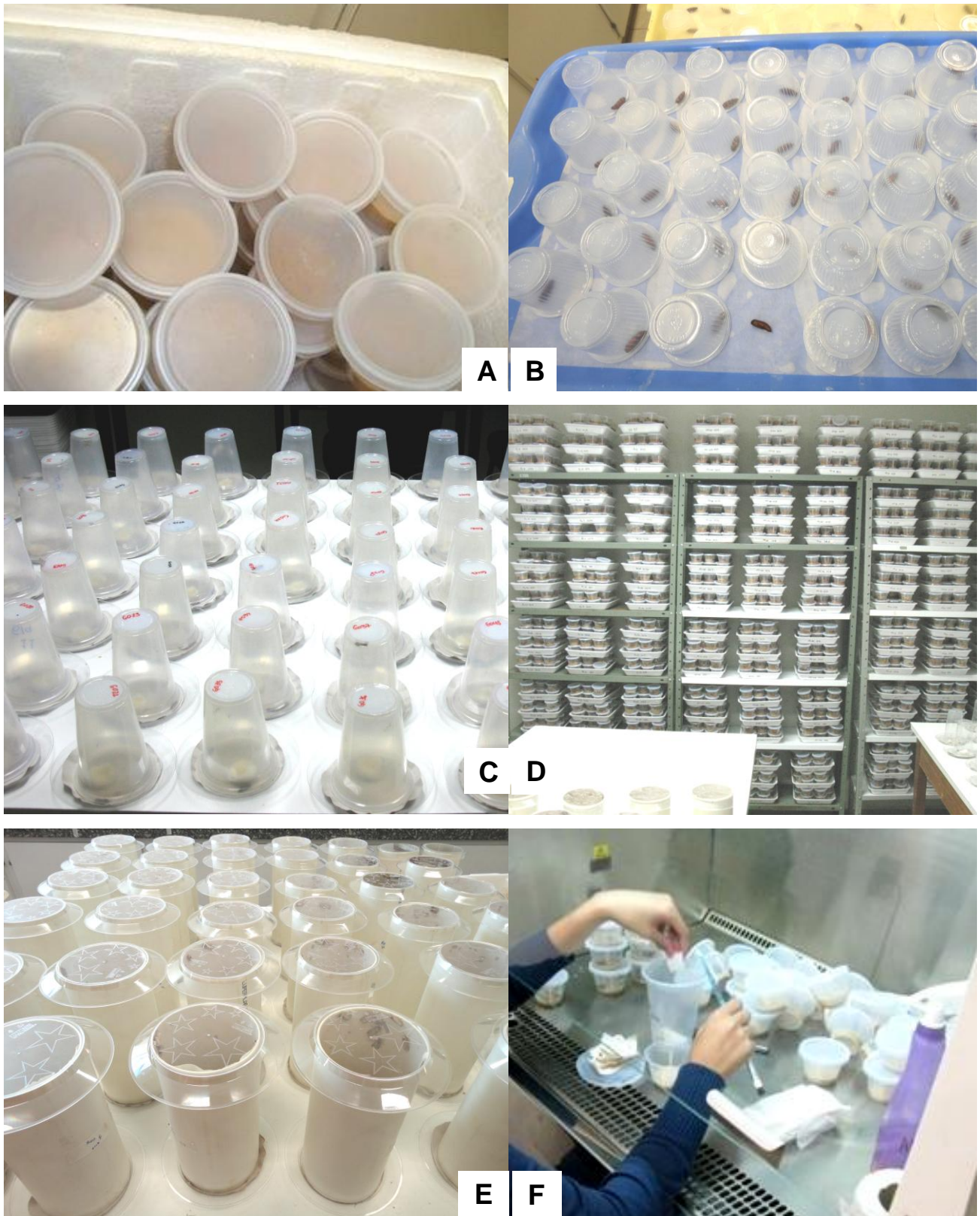


Figura 2 - Detalhes do método de "F2 Screen". A) Coleta de indivíduos de campo; B) Individualização das pupas; C) Isofêmeas estabelecidas (Geração Parental); D) Indivíduos da geração F1 criados dentro de sua respectiva linhagem; E) Adultos da geração F1 acondicionados em gaiolas para reprodução; F) Lagartas da geração F2 inoculadas para os bioensaios discriminatórios

### 3.5.3 Teste da progênie F2

As neonatas da progênie F2 foram inoculadas em copos plásticos transparentes (50 mL) contendo dieta artificial (KASTEN et al., 1978), as quais ao atingirem o 3º instar foram destinadas ao bioensaio de monitoramento. O teste da progênie F2 foi realizado com bioensaio de ingestão utilizando-se uma concentração discriminatória de 32 µg de chlorantraniliprole/mL de água [I.A. (ppm)] .Para os bioensaios foram utilizadas placas plásticas (Costar®, Cambridge, Massachusetts, EUA) com 24 células, onde em cada célula foi colocado 1,25 mL de dieta artificial. Foram utilizadas 5 placas para cada isolinha, totalizando 120 insetos testados por isolinha. Após a secagem as placas foram mantidas em câmara de fluxo laminar com luz ultravioleta para esterilização. Na sequência, em cada placa foi aplicado, por célula, 30 µL da solução inseticida diluição em água destilada com adição de 0,1% (v/v) do surfactante Triton®. Após secagem das placas, lagartas de terceiro instar foram inoculadas individualmente para cada célula. Para o fechamento das células foi utilizada a tampa das placas e transparências plásticas perfuradas. As placas foram mantidas em câmaras climatizadas com temperatura de 25± 2°C e fotofase de 14h e após 96h foram realizadas As avaliações por isolinha, tendo como critério de mortalidade os indivíduos sem movimento aparente após serem tocados com um estilete nos últimos segmentos abdominais. Foram consideradas isolinhas positivas, as isolinhas que obtiveram indivíduos F2 sobreviventes após 96h, as quais foram retestadas na geração F3 com o mesmo método e concentração e sobreviveram.

### 3.5.4 Análise estatística

Os dados foram analisados pela inferência Bayesiana (BRUNK, 1975) para estimar a frequência do alelo resistente, com um intervalo de confiança de 95%. Nessa análise foi usado o modelo para fêmeas e machos coletados antes do acasalamento (difere do modelo de fêmeas coletadas acasaladas) (ANDOW ; ALSTAD, 1998). Uma vez que,  $p$  corresponde à frequência de alelos resistentes testadas,  $N$  é o número de isolinhas testadas e  $S$  o número de isolinhas positivas. O valor esperado do alelo resistente foi estimado a partir de  $E[p] = \frac{S+1}{4(N+2)}$ . Uma vez que contamos com a probabilidade de que qualquer um da linhagem parental possui um alelo resistente, pode-se encontrar 4 alelos

resistentes em cada isolinha, a frequência de alelos de resistência é um quarto da frequência de linhagens resistentes. Sendo assim, na progênie F2 espera-se que uma em cada dezesseis larvas, seja homozigótica para o alelo de resistência . Assumindo uma distribuição prévia uniforme, acasalamento ao acaso e resistência monogênica. O intervalo de confiança de 95% (IC) foi estimado a partir de  $\int_p^1 g(p | S) dp = 0.05$  .

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Caracterização da suscetibilidade a diamidas em populações de *S. frugiperda* no Brasil

As  $CL_{50}$  de populações de *S. frugiperda* variaram de 1,15 a 2,55  $\mu\text{g}$  de chlorantraniliprole/mL de água [I.A. (ppm)] , representando uma diferença de apenas 1,4 vezes entre as populações avaliadas (Tabela 3, Figura 3) e 1,75 a 4,17  $\mu\text{g}$  de flubendiamide/mL de água [I.A. (ppm)], representando uma diferença de 2,4 vezes entre as populações (Tabela 4 , Figura 4). A população do Rio Grande do Sul foi a mais suscetível a chlorantraniliprole com  $CL_{50}$  de 1,42  $\mu\text{g}$  de chlorantraniliprole/mL de água [I.A. (ppm)] e flubendiamide com  $CL_{50}$  de 1,57  $\mu\text{g}$  de flubendiamide/mL de água [I.A. (ppm)] na safra 2011/12. Comparando os valores das  $CL_{50}$ , não houve diferenças significativas na resposta a chlorantraniliprole e flubendiamide entre as populações testadas, devido à sobreposição de valores estimados para os respectivos intervalos de confiança (Tabela 3 e 4). Por se tratar de uma molécula nova, a ausência de diferenças estatísticas entre as  $CL_{50}$  das populações testadas era esperada, dado que a frequência de indivíduos resistentes a diamidas no campo ainda é baixa. Observando os limites do IC 95% das  $CL_{50}$ , pode-se considerar que o bioensaio utilizado foi de alta precisão uma vez que o IC 95% das populações estudadas não ultrapassou duas vezes o valor da  $CL_{50}$  determinada (NAVON; ASCHER, 2000). As diferenças de  $CL_{50}$  observadas apesar de estreitas são normais, pois existe variabilidade genética natural das populações de *S. frugiperda* coletadas, o que ocasiona diferenças de suscetibilidade entre as populações. Todas as populações de campo de *S. frugiperda* apresentaram elevada suscetibilidade a chlorantraniliprole e flubendiamide.

Linhas básicas de suscetibilidade a chlorantraniliprole já foram estabelecidas para outras espécies de insetos e assim como para os dados obtidos no presente estudo para *S. frugiperda*, as variações na suscetibilidade a chlorantraniliprole foram também baixas em populações de *Plutella xylostella* no Brasil (3,7 vezes) (SILVA et al.,2012) e na China (5 vezes) (WANG et al., 2010), *Bemisia tabacino* Arizona, EUA (5 vezes) (LI et al., 2011) , *Choristoneura rosaceana*em Washington, EUA (5,3 vezes) (SIAL ; BRUNNER, 2010), *Cnaphalocrocis medinalis* na China (5,8 vezes) (ZHENG et al., 2011), *Spodoptera exigua* naChina (6 vezes) (LAI et al., 2011) e *Chilo suppressalis* na China(9,4 vezes) (HUANG

et al.2011). Para flubendiamide, as variações na suscetibilidade também foram baixas para populações de *Itame argillacearia* no Canadá (2,1 vezes) (RAMANAIDU et al., 2011), *Spodoptera litura* na Índia (4,2 vezes) (SHARMA, P.C ; PATHANIA, A.K., 2012) e *Chrysodeixis includens* em Mississippi e Louisiana, EUA (9 vezes) (OWEN et al.,2013).

Verificou-se que os valores de coeficiente angular das curvas de concentração-mortalidade para chlorantraniliprole foram maiores que os valores estimados para flubendiamide. Um alto coeficiente angular permite maximizar as diferenças entre as linhagens suscetíveis e resistentes, identificar a progressão de resistência e a variação genotípica na tolerância a um inseticida (HOSKINS; GORDON, 1956). Portanto, o elevado valor do coeficiente angular do inseticida chlorantraniliprole, indica uma maior atividade inseticida e maior homogeneidade genotípica das populações testadas. Os valores de  $CL_{50}$  estimados para chlorantraniliprole foram inferiores aos de flubendiamide para todas as populações de *S. frugiperda* testadas (Tabelas 3 e 4; Figuras 3 e 4). A maior atividade inseticida de chlorantraniliprole também foi observada em outras espécies como *P. xylostella* e *C. rosaceana* (TROCZKA et al.,2012; WANG et al., 2012).

Tabela 3 - Caracterização da linha-básica de suscetibilidade a chlorantraniliprole para populações de *S. frugiperda* de laboratório e coletadas na cultura do milho nas safras 2011/2012

População	n <sup>a</sup>	Coef. Ang. ( $\pm$ EP)	CL <sub>50</sub> (IC 95%) <sup>b</sup>	$\chi^2$	gl <sup>c</sup>
SUS	1584	2,13 ( $\pm$ 0,11)	1,15 (0,88 - 1,50)	6,78	8
RS	1584	2,32 ( $\pm$ 0,12)	1,42 (1,29 - 1,58)	3,72	8
PR	1584	2,12 ( $\pm$ 0,11)	1,77 (1,55 - 2,02)	8,52	8
SP	1584	2,26 ( $\pm$ 0,11)	2,11 (1,90 - 2,34)	4,22	8
MT	1584	2,22 ( $\pm$ 0,11)	2,25 ( 2,02 - 2,52)	3,35	8
BA	1584	2,30 ( $\pm$ 0,12)	2,55 (2,30 - 2,83)	4,57	8

a Número de lagartas testadas

b  $\mu$ g de I.A./mL de água

c Graus de liberdade

Tabela 4 - Caracterização da linha-básica de suscetibilidade a flubendiamide para populações de *S. frugiperda* de laboratório e coletadas na cultura do milho nas safras 2011/2012

População	n <sup>a</sup>	Coef. Ang. ( $\pm$ EP)	CL <sub>50</sub> (IC 95%) <sup>b</sup>	$\chi^2$	gl <sup>c</sup>
SUS	1584	1,83 ( $\pm$ 0,09)	1,75 (1,52 – 1,99)	7,6	8
RS	1584	1,57 ( $\pm$ 0,09)	2,93 (2,53 – 3,35)	5,42	8
PR	1584	1,49 ( $\pm$ 0,08)	3,05 (2,63 – 3,51)	4,30	8
SP	1584	1,47 ( $\pm$ 0,09)	3,65 (3,18 - 4,22)	7,62	8
MT	1584	1,47 ( $\pm$ 0,09)	3,71 ( 3,21 - 4,27)	7	8
BA	1584	1,40 ( $\pm$ 0,09)	4,17 (3,60 - 4,82)	6	8

a Número de lagartas testadas

b  $\mu$ g de I.A./mL de água

c Graus de liberdade

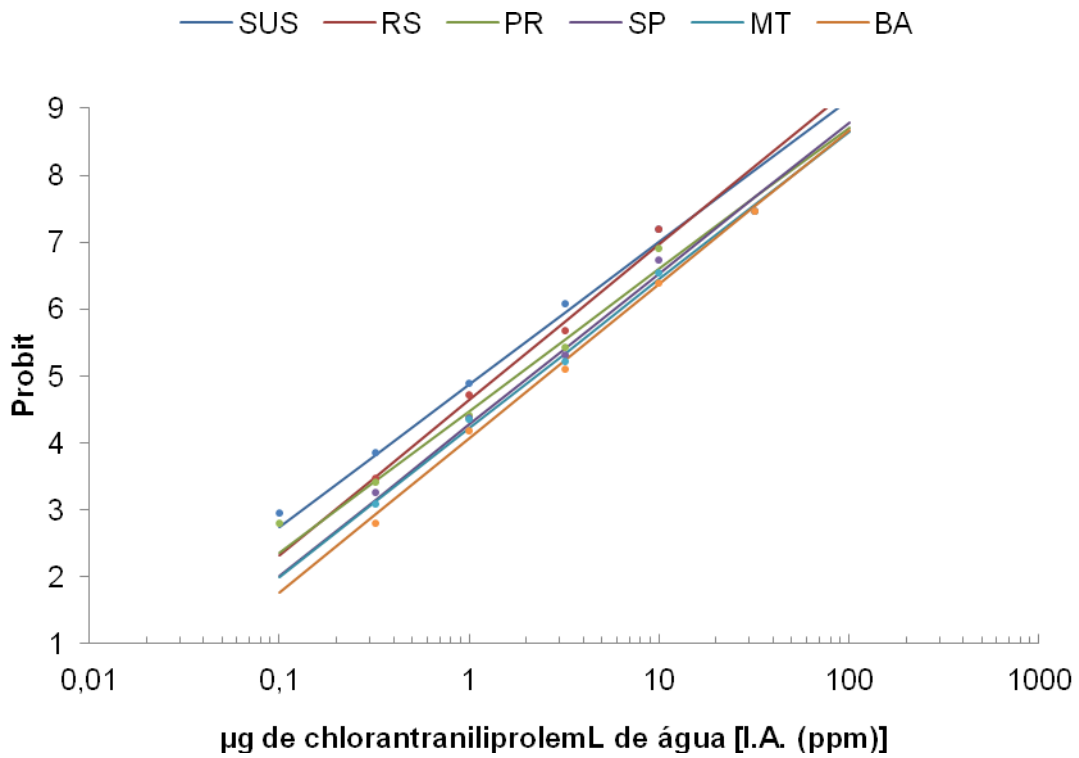


Figura 3 - Curvas de concentração-resposta a chlorantraniliprole em populações de *S. frugiperda* no Brasil

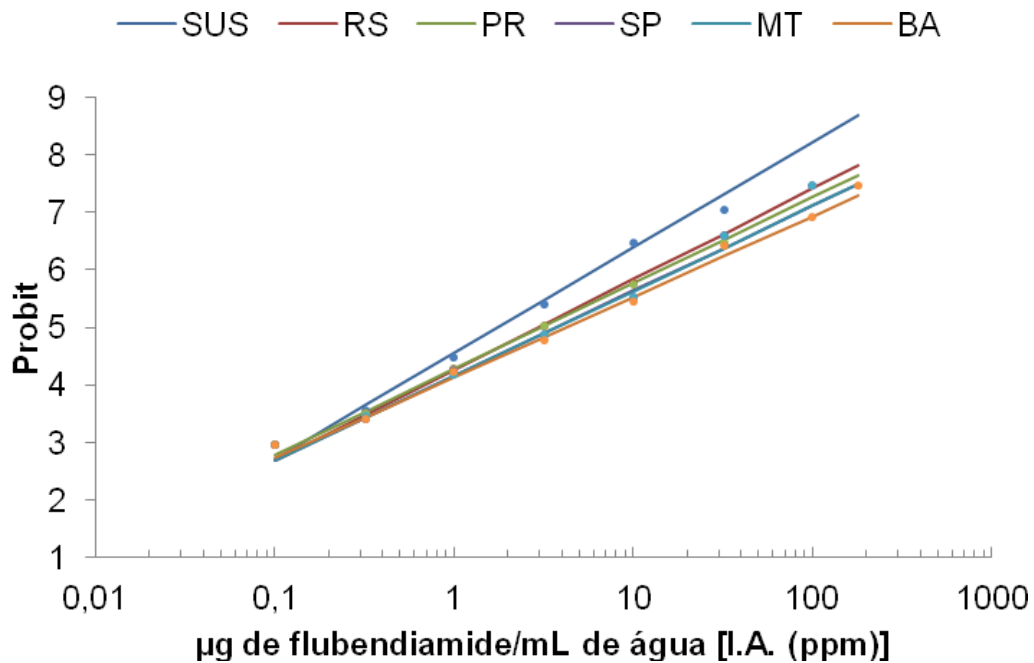


Figura 4 - Curvas de concentração-resposta a flubendiamide em populações de *S. frugiperda* no Brasil

Com a análise conjunta dos dados de concentração-mortalidade da população de laboratório e das cinco populações de campo de *S. frugiperda* coletadas nas safras 2011/12, foram estimadas a  $CL_{99} = 22,9$  (I.C95% 18,9 – 28,7)  $\mu\text{g}$  de chlorantraniliprole/mL de água [I.A. (ppm)] e  $CL_{99} = 125,5$  (I.C95% 106,7 – 149,7)  $\mu\text{g}$  de flubendiamide/mL de água [I.A. (ppm)] (Figura 5 e 6).

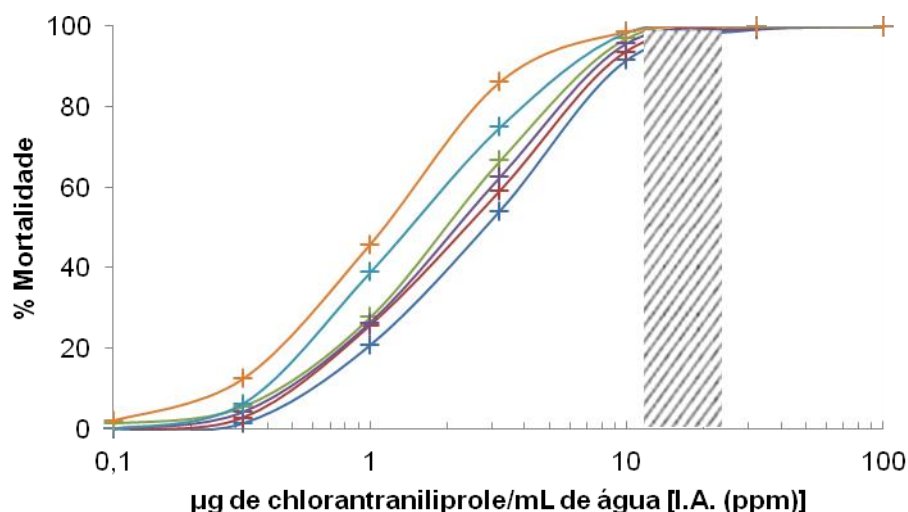


Figura 5 - Análise conjunta dos dados de suscetibilidade de uma população suscetível de laboratório e de cinco populações de campo de *S. frugiperda* coletadas nas safras 2011/12 a chlorantraniliprole. A área hachurada indica a faixa de concentrações diagnósticas sugeridas para o monitoramento da resistência.

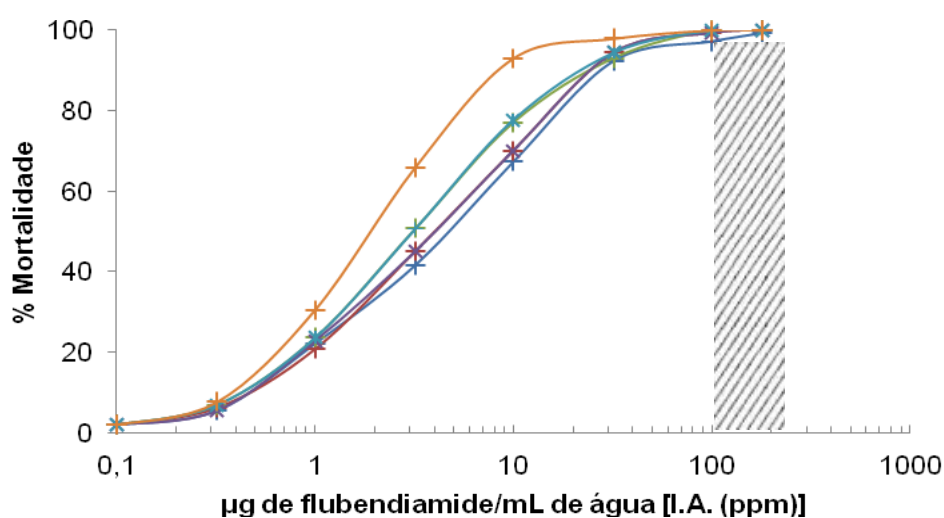


Figura 6- Análise conjunta dos dados de suscetibilidade de uma população suscetível de laboratório e de cinco populações de campo de *S. frugiperda* coletadas nas safras 2011/12 a flubendiamide. A área hachurada indica a faixa de concentrações diagnósticas sugeridas para o monitoramento da resistência.



Baseado nas respostas de concentração-resposta da população suscetível de referência, as concentrações diagnósticas de 10 e 32 µg de chlorantraniliprole/mL de água [I.A. (ppm)] e 100 e 180 µg de flubendiamide/mL de água [I.A. (ppm)] foram definidas para o monitoramento da suscetibilidade. Segundo SILVA et al. (2012) no Brasil a concentração diagnóstica projetada para *Plutella xylostela* foi de 30 µg de chlorantraniliprole/mL de água [I.A. (ppm)] e mostrou ser adequada para detectar precocemente sobreviventes ao inseticida chlorantraniliprole.

#### **4.2 Monitoramento da suscetibilidade de populações de *Spodoptera frugiperda* a diamidas coletadas na cultura do milho no Brasil**

As populações de *S. frugiperda* apresentaram alta suscetibilidade a chlorantraniliprole (Tabela 5) e flubendiamide (Tabela 6) nas safras de 2011/12 e 2012/13. A sobrevivência de *S. frugiperda* na safra 2011/12 a 10 µg de chlorantraniliprole/mL de água [I.A. (ppm)] variou de 1,2% no RS a 2,6% na Bahia (Tabela 5). Para 100 µg flubendiamide/m mL de água [I.A. (ppm)] a sobrevivência de *S. frugiperda* variou de 1,0% no Rio Grande do Sul a 2,4% na Bahia (Tabela 7). Tradicionalmente, programas de monitoramento da suscetibilidade de pragas a inseticidas utilizam comparações de doses letais e coeficientes angulares de curvas de concentração-resposta estimadas entre populações suscetíveis de laboratório e de campo (TWINE; REYNOLDS, 1980; FFFRENCH-CONSTANT; ROUSH 1990). Entretanto, em alguns casos, em que o programa de monitoramento tem caráter preventivo, o uso de concentrações letais e coeficientes angulares não são suficientes para distinguir com precisão populações suscetíveis das supostamente resistentes quando comparado com testes diagnósticos, uma vez que são menos sensíveis a pequenas mudanças na frequência de indivíduos resistentes, principalmente no início da evolução da resistência em que a frequência de resistência é baixa (ROUSH; MILLER 1986; et al.,2000). FFFRENCH-CONSTANT e ROUSH (1990) propuseram que testes diagnósticos baseados em concentrações diagnósticas ou discriminatórias são mais vantajosos do que o uso de concentrações letais e coeficientes angulares visto que demandam menos tempo e indivíduos para obtenção dos resultados, pois todos os indivíduos são testados numa determinada concentração, cujas percentagens de mortalidade são de interesse.

As pequenas variações de suscetibilidade podem refletir variações naturais entre as populações geograficamente distintas. Os estados da Bahia e Mato Grosso

apresentaram menor suscetibilidade para ambos os inseticidas. No entanto, apesar de terem sido encontrados alguns sobreviventes no monitoramento da suscetibilidade de *S. frugiperda* para os inseticidas observou-se uma alta suscetibilidade em todas as populações tanto nas concentrações menores (100 e 10 µg de I.A./mL de água) quanto nas maiores (180 e 32 µg de I.A./mL de água) respectivamente para o flubendiamide e chlorantraniliprole. TROCZKA et al. (2012) verificaram que na Tailândia e Filipinas a falha no controle de *Plutella xylostella* com diamidas seja devido ao elevado grau de plasticidade genética da praga e contínua pressão de seleção que resultou em uma alta razão de resistência. De um modo geral, populações da região sul do Brasil apresentaram maior suscetibilidade para as diamidas, possivelmente devido ao clima frio de inverno que diminui as gerações da praga por ano e resulta em uma menor pressão de seleção.

Até o momento não há registros na literatura de casos de resistência de *S. frugiperda* a diamidas, fato que pode estar relacionado ao mecanismo de ação distinto de outros grupos de inseticidas associado à menor pressão seletiva. Apesar disto, baseado nos resultados do monitoramento da suscetibilidade de *S. frugiperda* na safra 2012/13 e na safra 2013/14, foram observados aumento no percentual de sobrevivência, particularmente no estado da Bahia e Goiás, apesar de persistir uma estreita variabilidade nas respostas das populações testadas a chlorantraniliprole e flubendiamide entre todos os estados (Tabela 6 e 7). A sobrevivência de *S. frugiperda* na safra 2012/13 a 10 µg de chlorantraniliprole/mL de água [I.A. (ppm)] variou de 2,7% no Rio Grande do Sul a 12,7% na Bahia (Tabela 5). Na concentração de 32 µg de chlorantraniliprole/mL de água [I.A. (ppm)] a sobrevivência variou de 0,4% no estado de São Paulo a 0,83% no estado da Bahia (Tabela 6). No entanto, na safra 2013/14 para a concentração de 32 µg de chlorantraniliprole/mL de água [I.A. (ppm)] observou-se um aumento ainda maior que o observado na segunda safra com variação de 0,59% para a população coletada no estado de São Paulo a 3,97% no estado de Goiás (Tabela 6). Na safra 2012/13, a sobrevivência de *S. frugiperda* variou de 1,46% no Rio Grande do Sul a 4,96% na Bahia para 100 µg de flubendiamide/mL de água [I.A. (ppm)]. Na safra 2013/14, a sobrevivência para flubendiamide variou de 1,4% para as populações coletadas no Rio Grande do Sul a 6,04% em Goiás (Tabela 7). A suscetibilidade a um inseticida em particular pode variar entre populações coespecíficas, bem como dentro de uma população através do tempo devido a mudanças nas frequências alélicas, variações ambientais ou ambas (TABASHNIK et al., 1992).

Tabela 5 - Sobrevivência de populações de *S. frugiperda* coletadas em diferentes regiões do Brasil na concentração diagnóstica de 10 µg chlorantraniliprole/mL na cultura do milho nas safras de 2011/12 e 2012/13

<b>População</b>	<b>N<sup>a</sup></b>	<b>Chlorantraniliprole 10 µg/mL</b>	
		<b>% Sobrevivência ±epm<sup>b</sup></b>	
		<b>2011/12</b>	<b>2012/13</b>
BA	480	2,58 ±0,61 a	12,70 ±0,37 a
GO	480	2,18 ±0,47 a	3,54 ±0,76 b
MG	480	1,04 ±0,41 a	1,25 ±0,44 b
MS	480	1,88 ±0,50 a	2,92 ±0,80 b
MT	480	2,27 ±0,60 a	3,75 ±0,67 b
PR	480	1,39 ±0,43 a	3,13 ±0,73 b
RS	480	1,19 ±0,41 a	2,71 ±0,76 b
SP	480	1,98 ±0,47 a	2,18 ±0,47 b

<sup>a</sup> número de indivíduo testados; <sup>b</sup> erro padrão da média

Médias com a mesma letra na coluna, não diferem significativamente ( $P < 0,05$ )

Tabela 6 - Sobrevivência de populações de *S. frugiperda* coletadas em diferentes regiões do Brasil na concentração diagnóstica de 32 µg chlorantraniliprole/mL na cultura do milho na safra 2011/12, 2012/13 e 2013/14

<b>População</b>	<b>n<sup>a</sup></b>	<b>Chlorantraniliprole 32 µg/mL</b>		
		<b>% Sobrevivência ±epm<sup>b</sup></b>		
		<b>2011/12</b>	<b>2012/13</b>	<b>2013/14</b>
BA	480	0,80 ±0,33 a	0,83 ±0,49 a	0,83 ±0,38 b
GO	480	0,20 ±0,20 a	0,21 ±0,21 a	3,97 ±1,53 a
MG	480	0,00 ±0,00 a	0,42 ±0,42 a	0,79 ±0,46 b
MS	480	0,42 ±0,40 a	0,42 ±0,29 a	-
MT	480	0,40 ±0,27 a	0,67 ±0,56 a	-
PR	480	0,20 ±0,20 a	0,21 ±0,21 a	0,00 ±0,00 b
RS	480	0,20 ±0,20 a	0,42 ±0,29 a	0,00 ±0,00 b
SP	480	0,20 ±0,20 a	0,40 ±0,27 a	0,59 ±0,59 b

<sup>a</sup> número de indivíduo testados; <sup>b</sup> erro padrão da média

Médias com a mesma letra na coluna, não diferem significativamente ( $P < 0,05$ )

Tabela 7 - Sobrevivência de populações de *S. frugiperda* coletadas em diferentes regiões do Brasil nas concentrações diagnósticas de 100 µg flubendiamide/mL na cultura do milho na safra 2011/12, 2012/13 e 2013/14

<b>População</b>	<b>n<sup>a</sup></b>	<b>Flubendiamide 100 µg/mL</b>		
		<b>% Sobrevivência ±epm<sup>b</sup></b>		
		<b>2011/12</b>	<b>2012/13</b>	<b>2013/14</b>
BA	480	2,38 ±0,46 a	4,96±0,62 a	5,63 ±,2,12ab
GO	480	1,79 ±0,46 a	1,88 ±0,64 b	6,04 ±2,06 a
MG	480	1,59 ±0,54 a	1,46 ±0,46 b	1,58 ±1,05 ab
MT	480	2,08 ±0,53 a	2,29 ±0,90 b	-
PR	480	1,19 ±0,41 a	1,67 ±0,69 b	0,20 ±0,20 b
RS	480	0,99 ±0,40 a	1,46 ±0,61 b	0,78 ±0,55 ab
SP	480	1,79 ±0,45 a	1,98 ±0,50 b	1,58 ±0,97 ab

<sup>a</sup> número de indivíduo testados; <sup>b</sup> erro padrão da média

Médias com a mesma letra na coluna, não diferem significativamente ( $P < 0,05$ )

Tabela 8 - Sobrevivência de populações de *S. frugiperda* coletadas em diferentes regiões do Brasil na concentração diagnóstica de 180 µg flubendiamide/mL na cultura do milho nas safras de 2011/12 e 2012/13

<b>População</b>	<b>n<sup>a</sup></b>	<b>Flubendiamide 180 µg/mL</b>	
		<b>% Sobrevivência ±epm<sup>b</sup></b>	
		<b>2011/12</b>	<b>2012/13</b>
BA	480	0,60 ±0,33 a	4,17 ±0,70 a
GO	480	0,40 ±0,27 a	0,42 ±0,42 b
MG	480	0,40 ±0,27 a	0,42 ±0,29 b
MT	480	0,40 ±0,27 a	1,00 ±0,50 b
PR	480	0,20 ±0,20 a	0,20 ±0,20 b
RS	480	0,00 ±0,00 a	0,20 ±0,20 b
SP	480	0,40 ±0,27 a	0,40 ±0,27 b

<sup>a</sup> número de indivíduo testados; <sup>b</sup> erro padrão da média

Médias com a mesma letra na coluna, não diferem significativamente ( $P < 0,05$ )

Sabe-se que populações de *S. frugiperda* na região nordeste e centro oeste do Brasil são resistentes a inúmeros inseticidas (RODRIGUEZ, 2000; SCHMIDT, 2002; MARTINELLI, 2006; OLIVEIRA, 2008; DOURADO, 2009), e devido ao uso indiscriminado de novas moléculas por parte dos produtores, o risco de evolução de resistência é alto. SILVA et al. (2012) em estudos de caracterização de suscetibilidade de *P. xilostela* a chlorantraniliprole observaram que as populações do centro-leste de Pernambuco apresentaram maior tolerância a chlorantraniliprole e devido à alta plasticidade genética, a praga apresenta alto potencial de evolução de resistência a diamidas. Portanto, programas de monitoramento da suscetibilidade são fundamentais na implementação de estratégias de manejo da resistência.

De modo geral, as populações de *S. frugiperda* da Bahia e Goiás foram mais tolerantes do que as demais populações, particularmente para a safra 2013/14. O monitoramento da população do estado da Bahia para 10 µg de chlorantraniliprole/mL revelou um aumento na sobrevivência na safra de 2012/13, que foi quatro vezes maior comparada com a sobrevivência identificada na safra 2011/12. Já a porcentagem de sobrevivência para a população do estado de Goiás para 100 µg de flubendiamide/mL de água [I.A. (ppm)] na safra de 2013/14 foi três vezes maior se comparado a safra de 2011/12. O aumento na sobrevivência de indivíduos resistentes não ocorre apenas devido a frequência dos indivíduos resistentes, mas também pode estar relacionada à densidade da praga, estrutura etária da população, ocorrência de inimigos naturais (FRENCH-CONSTANT; ROUSH, 1990), qualidade da pulverização e condições climáticas. Devido à sobreposição temporal de culturas hospedeiras, a praga desfruta de condições favoráveis para se desenvolver ao longo do ano todo, sendo realizadas aplicações sucessivas de agroquímicos por ciclo da cultura do milho. A crescente utilização das diamidas para o controle de *Helicoverpa armigera* (Hübner) nos diferentes cultivos pode contribuir com o aumento da pressão de seleção em lagartas de *S. frugiperda* também presentes na lavoura. Desta forma, o problema da resistência de *S. frugiperda* a inseticidas tenderá a se agravar. A variação de suscetibilidade entre as populações e safras agrícolas obtidas no presente estudo pode ser considerada baixa, no entanto, medidas preventivas de manejo da resistência devem ser implementadas para prolongar a vida útil das diamidas no controle de *S. frugiperda* e outras pragas.

Houve diferença entre as médias de sobrevivência das populações de *S. frugiperda* coletadas nas diferentes safras para chlorantraniliprole e flubendiamide, sendo observados incrementos na sobrevivência a cada safra em todos os estados. Assim como

os estados da Bahia e Goiás, o estado do Rio Grande do Sul se destaca dos demais estados, pelo grande aumento da sobrevivência de *S. frugiperda* entre as safras, principalmente para chlorantraniliprole, o que pode ser associado ao sistema de manejo empregado na região de coleta. Apesar de pequena, a diminuição da suscetibilidade observada a cada safra no monitoramento evidencia a seleção instável de populações resistentes de *S. frugiperda* a diamidas nas regiões do Brasil. A instabilidade da resistência a diamidas, poderá ser explorada através de um programa de rotação de produtos o que pode facilitar a implementação de estratégias de manejo da resistência, uma vez que o restabelecimento da suscetibilidade em populações de artrópodes está associado ao custo adaptativo dos indivíduos resistentes na ausência de pressão de seleção e à imigração de indivíduos suscetíveis. Contudo, uma pressão de seleção contínua pode aumentar o valor adaptativo dos resistentes, devido à coadaptação (ROUSH; MCKENZIE, 1987). Os dados de sobrevivência das oito populações testadas para flubendiamide para ambas às concentrações para a safra 2012/13 e 2014/14 apresentaram níveis de sobrevivência semelhantes aos das populações testadas para chlorantraniliprole. Vale lembrar que as diamidas assim como qualquer outro inseticida tem um risco de evolução de resistência no campo, porém se realizado táticas de manejo da resistência, pode-se prolongar a vida útil de novos inseticidas (ROUSH, 1989; ROUSH; DALY, 1990; DALY, 1993; OMOTO, 2001).

Embora experimentos de laboratório não reflitam completamente as condições de campo, o monitoramento e seleção de pragas em laboratório, como o realizado neste trabalho, demonstram o potencial de resistência da praga num cenário com reduzida variação ambiental (ZHANG et al., 2000). A frequência de resistência de *S. frugiperda* a diamidas no Brasil ainda é baixa. Dessa forma, para a implementação de um programa de manejo da resistência de *S. frugiperda* a diamidas, deve-se elaborar um método de bioensaio realizado em condições de campo para validar os resultados apresentados pelo monitoramento em condições de laboratório. Os resultados desse estudo são encorajadores, especialmente por indicarem que as diamidas tem um forte potencial de controle para *S. frugiperda* em um momento em que a maioria dos inseticidas organofosforados e piretroides estão restritos ou até mesmo eliminados das opções de controle. Como descrito por CAO et al. (2010), as diamidas também são candidatas adequadas para incorporação em programas de MIP pois servem de apoio para utilização conjunta com plantas que expressam a toxina Bt. Considerando o histórico de resistência de *S. frugiperda* a inseticidas, a resistência a diamidas não deve ser ignorada. Gestões de



estratégias de controle da resistência devem começar no início da vida útil de um novo pesticida e não em resposta a um problema percebido (JUTSUM, 1998). Dessa forma, para controlar *S. frugiperda* de modo eficaz e prolongar a vida útil das diamidas deve-se aderir o uso criterioso deste composto, incluindo orientação a agricultores e técnicos com relação à adoção da rotação de inseticidas baseado no seu modo de ação, tempo de pulverização limitante, doses adequadas, e aplicação de técnicas corretas de manejo.

#### **4.3 Estimativa da frequência inicial do alelo que confere resistência de *S. frugiperda* a chlorantraniprole**

Na safra 2011/12 foi realizado os testes com “F2 screen” nos estados da Bahia, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Goiás, e Paraná. Para a safra 2012/13 foram realizados testes com “F2 Screen” nos estados da Bahia, Mato Grosso, Goiás, Minas Gerais e Paraná. Na safra 2013/14 foram realizados testes com “F2 Screen” somente para o estado da Bahia (Tabela 9, Figura 7). Um total de 5.379 (safra 2011/12), 3.258 (safra 2012/2013) e 2.032 (safra 2013/14) lagartas foram amostradas para o teste de “F2 screen”, o que permitiu a formação de 953 (safra 2011/12), 651 (safra 2012/13), 175 (safra 2013/14) isolinhas na geração P (parental proveniente do campo), respectivamente. Dessas isolinhas, 325 (safra 2011/12), 280 (safra 2012/2013) e 7 (safra 2013/14) não foram obtidas posturas ou foram perdidas durante o manuseio dos adultos. Um total de 346 (safra 2011/12), 371 (safra 2012/13) e 168 (safra 2013/14) isolinhas produziram ovos na geração F1 (Tabela 9), as quais foram selecionadas 120 neonatas por isolinha para chlorantraniliprole com bioensaios de aplicação superficial de 30 µL da solução inseticida na concentração discriminatória de 32 µg de chlorantraniliprole/mL, definida anteriormente a partir da linha básica de suscetibilidade. Isolinhas derivadas de fêmeas e/ou machos podem concentrar alelos de resistência na descendência F2 homozigótica que podem ser distinguidos por concentrações discriminatórias (ANDOW; ALSTAD 1998).

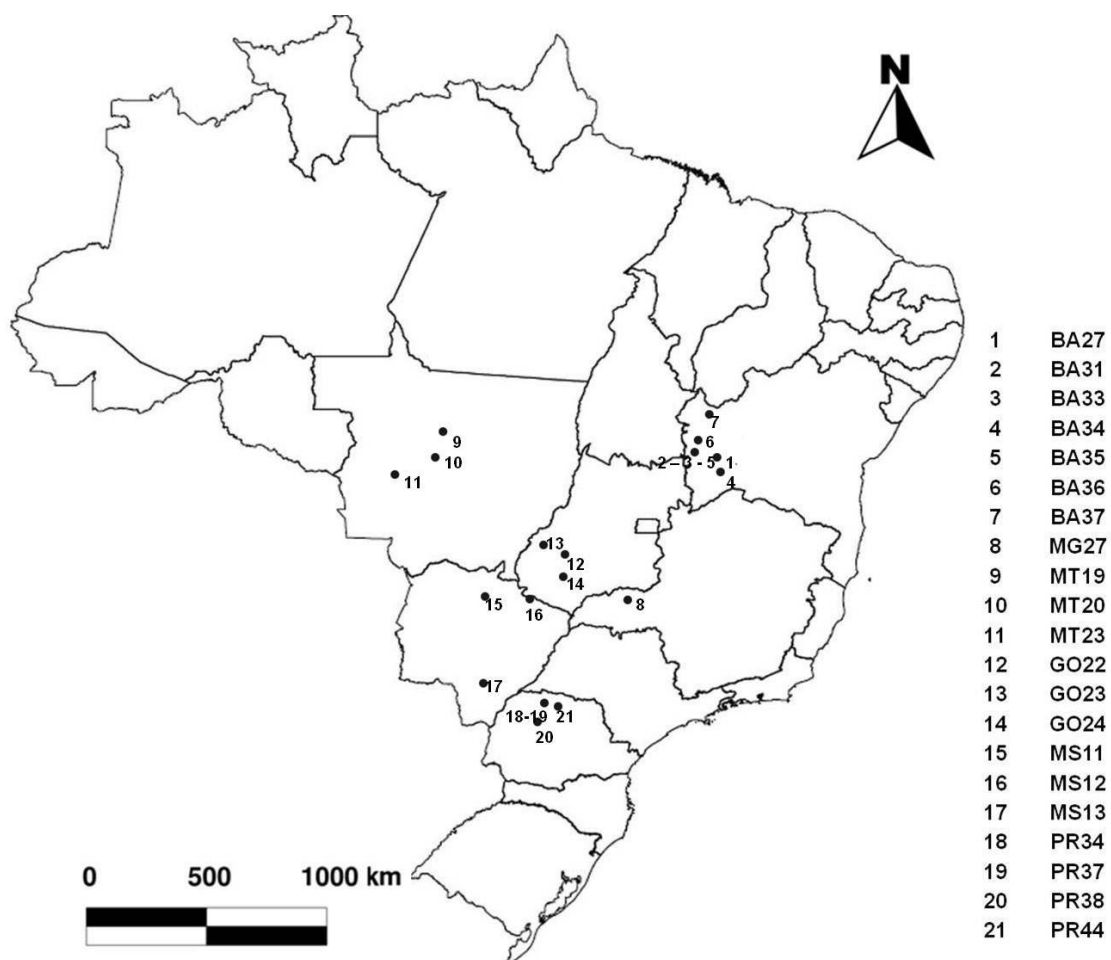


Figura 7 - Distribuição das populações de *S. frugiperda* usadas no "F2 Screen"

Tabela 9 - Populações de *Spodoptera frugiperda* e resultado do procedimento e “F2 Screen” nas safras de 2011/12, 2012/13 e 2013/14

Código	Local	Milho <sup>a</sup>	Data	n <sup>b</sup>	Geração P		Geração F <sub>1</sub>	
					Casal <sup>c</sup>	C. P <sup>d</sup>	Adulto <sup>e</sup>	C.P
BA27	São Desidério/BA	TC150 7	Janeiro 2012	480	116	97	31,3	97
BA31	Luís Eduardo Magalhães/BA	Não-Bt	Junho 2012	500	83	69	44,7	59
BA33	Luís Eduardo Magalhães/BA	Não-Bt	Abril 2013	400	101	83	25,0	68
BA34	Correntina/BA	Não-Bt	Dezembro 2013	1342	150	95	17,8	92
BA35	Luís Eduardo Magalhães/BA	Não-Bt	Fevereiro 2014	490	118	58	12,3	57
BA36	Roda Velha/BA	Não-Bt	Fevereiro 2014	120	31	15	34,2	12
BA37	Estrondo/BA	Não-Bt	Fevereiro 2014	80	15	7	20,0	7
PR34	Sabáudia/PR	Não-Bt	Fevereiro 2012	248	37	29	24,3	27
PR37	Sabáudia/PR	Não-Bt	Mai 2012	474	73	46	34,7	46
PR38	Campo Mourão/PR	Não-Bt	Mai 2012	601	46	38	37,1	38
PR44	Cambé/PR	Não-Bt	Março 2013	750	132	96	22,0	84
GO22	Montividiu/GO	Não-Bt	Março 2012	550	119	92	27,3	75
GO23	Caiapônia/GO	Não-Bt	Mai 2012	524	124	57	33,3	56
GO24	Rio Verde/GO	Não-Bt	Dezembro 2012	650	145	105	44,6	102
MS11	São Gabriel do Oeste/MS	Não-Bt	Março 2012	486	101	52	30,0	52
MS12	Chapadão do Sul/MS	Não-Bt	Mai 2012	150	50	26	36,4	20
MS13	Dourados/MS	Não-Bt	Mai 2012	228	33	27	30,7	27
MT19	Sinop/MT	Não-Bt	Abril 2012	568	84	59	25,2	59
MT20	Campo Novo dos Parecis/MT	Não-Bt	Abril 2012	570	87	36	32,7	31
MT23	Sorriso/MT	Não-Bt	Março 2013	1015	164	111	23,9	106
MG27	Uberlândia/MG	Não-Bt	Fevereiro 2013	443	127	77	30,2	74

<sup>a</sup> milho amostrado; <sup>b</sup> número de insetos (larvas e pupas); <sup>c</sup> número de casais formados na geração Parental (geração proveniente de campo); <sup>d</sup> C.P, número de casais (isolinhas) com postura <sup>e</sup> média de adultos normais por isolinha na geração F<sub>1</sub> (primeira geração em laboratório).

Utilizando o método de “F2 Screen”, populações de campo de *S. frugiperda* apresentaram uma mudança significativa na frequência do alelo de resistência a chlorantraniliprole no Brasil entre 2011 e 2014 (Tabelas 10 a 12). Na safra 2011/12, a frequência total de alelos resistentes a chlorantraniliprole ( $<0,0033$ ) em populações de campo de *S. frugiperda* no Brasil foi baixa. Após um ano, estudos de monitoramento da safra 2012/13 mostraram um aumento de 4 vezes na frequência total de alelos de resistência (0,0134) em comparação com o estimado para as populações coletadas em 2011/12. Em 2014 a frequência de resistência total, em particular para o estado da Bahia (0,0176) foi 1,4 maior que a estimada para a safra 2011/12.

Para cada estado, foi rastreada uma média de 9.000 lagartas de 3º instar na safra 2011/12 e 8904 lagartas na safra 2012/13 e 16.800 na safra 2013/14 somente para o estado da Bahia. Na safra 2011/12 em todos os estados aproximadamente 5 isolinhas obtiveram sobreviventes, no entanto apenas 6 isolinhas do estado da Bahia (9 lagartas em F2) sobreviveram após 5 dias de exposição ao produto. Com base nos dados (Tabela 8), a frequência estimada para alelos que conferem resistência a chlorantraniliprole na Bahia foi de 0,0125, com um intervalo de confiança de 95% (IC) entre 0,0051 e 0,0233 na safra 2011/12. Após um período de um ano a frequência do alelo R na safra 2012/13 praticamente triplicou apresentando uma frequência de 0,0654 com intervalo de credibilidade de 95% (IC) entre 0,0387 e 0,0984. Cerca de, 16 isolinhas do estado da Bahia ( $\pm 70$  lagartas em F2) sobreviveram após 5 dias de exposição ao inseticida. Após um período de dois anos a frequência do alelo R na safra 2013/14 praticamente se manteve apresentando uma frequência de 0,0508 com intervalo de credibilidade de 95% (IC) entre 0,0246 - 0,0793. No entanto o número de indivíduos resgatados por isolinhas positivas aumentou ( $\pm 100$  lagartas em F2) (Tabela 11 e 12). Diante disso, as populações da Bahia para todas as safras testadas obtiveram uma frequência de alelos de resistência maior do que qualquer outro estado. Todas as isolinhas positivas para o estado da Bahia foram reavaliadas por meio de bioensaios de seleção. Já para o estado do Mato Grosso não houve diferenças na frequência do alelo R entre as safras. Embora as populações do Mato Grosso apresentem a segunda maior frequência para as safras 2011/12 e 2012/13, elas não foram significativamente maiores do que as populações de Goiás, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais ou Paraná (Tabela 11).

A agricultura brasileira tem batido recordes de produção, podendo em breve, segundo provisões oficiais, tornar-se o maior produtor mundial. Recentemente o oeste da Bahia, devido ao sistema intensivo de cultivo tornou-se uma importante região de

produção de milho no Brasil. A frequência de resistência de *S. frugiperda* mais alta na Bahia pode estar relacionada a diversos fatores. Nos últimos cinco anos os agricultores do estado passaram a investir em tecnologia: melhoraram a adubação do solo, investiram em sistemas de irrigação e usaram sementes selecionadas. Além disso, as condições climáticas favoráveis contribuíram para o aumento da produção de milho do oeste da Bahia resultando em três safras de milho por ano no estado, e assim disponibilizando alimento contínuo para o desenvolvimento de pelo menos 3 gerações de *S. frugiperda* durante todo o ano (baseado em experiências de desenvolvimento de laboratório) (BUSATO et al , 2005). Em contrapartida os estados de Goiás e Mato Grosso apesar da semelhança climática com a Bahia, seguem um sistema de cultivo diferenciado e apresentam uma frequência de resistência mais baixa assim como os estados de Mato do Sul, Minas Gerais e principalmente no estado do Paraná onde o clima subtropical com inverno frio gera infestações mais baixas, especialmente na estação principal.

A frequência do alelo resistente a chlorantraniliprole em *S. frugiperda* estimado pelo método de "F2 Screen" foi baixa para a safra 2011/12. No entanto, aumento significativo na frequência do alelo resistente foi observado nas safras 2012/13 e 2013/14, principalmente para as populações da Bahia e de Goiás, indicando alto risco de evolução da resistência a chlorantraniliprole no Brasil, caso estratégias de manejo da resistência não sejam implementadas.

Tabela 10 - Frequência do alelo resistente a chlorantraniliprole em populações de *Spodoptera frugiperda* no Brasil na safra 2011/12 estimada pelo método de "F2 Screen"

Estado	Código	Isolinhas Testadas	Isolinhas Positivas	Frequência (95% IC)
Bahia	BA27	93	3	0,0105 (0,0029 - 0,0230)
	BA31	45	3	0,0213 (0,0060 - 0,0463)
	Subtotal	138	6	0,0125 (0,0051 - 0,0233)
Mato Grosso	MT19	25	0	<0,0093 (0 - 0,0341)
	MT20	33	0	<0,0071 (0 - 0,0264)
	Subtotal	58	0	<0,0042 (0 - 0,0154)
Goiás	GO22	71	0	<0,0034 (0 - 0,0128)
	GO23	56	0	<0,0043 (0 - 0,0160)
	Subtotal	127	0	<0,0019 (0 - 0,0073)
Mato Grosso do Sul	MS11	49	0	<0,0049 (0 - 0,0182)
	MS12	20	0	<0,0114 (0 - 0,0418)
	MS13	26	0	<0,0089 (0 - 0,0330)
	Subtotal	95	0	<0,0026 (0 - 0,0096)
Paraná	PR34	26	0	<0,0089 (0 - 0,0330)
	PR37	43	0	<0,0056 (0 - 0,0205)
	PR38	38	0	<0,0063 (0 - 0,0231)
	Subtotal	107	0	<0,0023 (0 - 0,0085)
<b>Total</b>		525	6	<0,0033 (0 - 0,0062)

Tabela 11 - Frequência do alelo resistente a chlorantraniliprole em populações de *Spodoptera frugiperda* no Brasil na safra 2012/2013 estimada pelo método de "F2 Screen"

Estado	Código	Isolinhas Testadas	Isolinhas Positivas	Frequência (95% CI)
Bahia	BA33	63	16	0,0654 (0,0387 - 0,0984)
Mato Grosso	MT23	96	3	0,0102 (0,0028 - 0,0222)
Goiás	GO24	73	0	<0,0034 (< 0,0001- 0,0123)
Minas Gerais	MG27	65	0	<0,0038 (< 0,0001- 0,0138)
Paraná	PR44	74	0	<0,0033 (<0,0001 - 0,0122)
	<b>Total</b>	371	19	0,0134 (0,0082 - 0,0198)

Tabela 12 - Frequência do alelo resistente a chlorantraniliprole em populações de *Spodoptera frugiperda* no Brasil na safra 2013/2014 estimada pelo método de "F2 Screen"

Estado	Código	Isolinhas Testadas	Isolinhas Positivas	Frequência (95% CI)
Bahia	BA 34	92	0	<0,0027 (<0,0007 - 0,0098)
	BA 35	57	11	0,0508 (0,0246 - 0,0793)
	BA 36	12	0	0,0179 (0,005 - 0,0652)
	BA 37	7	0	0,0278 (0,001 - 0,0825)
	<b>Total</b>	168	12	0,0176 (0,0084 - 0,0277)

## 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

*S. frugiperda* tornou-se uma das principais pragas em diversas culturas principalmente para o milho no Brasil e no mundo. Vários inseticidas não são mais capazes de controlar essa espécie devido à resistência. O presente estudo estabeleceu a linha básica de suscetibilidade de *S. frugiperda* a diamidas no Brasil, e estes dados podem servir como ponto inicial para acompanhar a evolução da resistência de *S. frugiperda* além de proporcionarem subsídios para a gestão e implementação de um programa de manejo da resistência de *S. frugiperda* no futuro. Além disso, esta foi a primeira vez que a frequência inicial dos alelos que conferem resistência de *S. frugiperda* a chlorantraniliprole foi estimada. O método de “F2 Screen” foi eficiente para o estudo de estimativa do alelo resistência de *S. frugiperda* ao inseticida chlorantraniliprole. No entanto, houve necessidade de algumas adaptações do método proposto por Andow et al. (1998). A primeira modificação refere-se ao processo de amostragem de insetos do campo. O primeiro trabalho de “F2 Screen” foi realizado com fêmeas de *O. nubilalis* acasaladas em campo, sendo considerado a princípio, o método mais eficiente para adquirir adultos na geração P<sub>0</sub> (ANDOW et al. , 1998). Contudo, devido ao sucesso da versão realizada por HUANG e colaboradores utilizando larvas coletadas em campo (HUANG ; LEONARD ; ANDOW , 2007a), a facilidade na coleta e à qualidade do material biológico, o “F2 Screen” do presente estudo foi realizado com isolinhas provenientes de larvas de *S. frugiperda* coletadas em campo. A segunda modificação, teve como meta minimizar os custos e o trabalho da seleção das isolinhas. Para tanto, maximizou-se o número de produtos selecionados para cada isolinha (serão apresentados apenas os dados para chlorantraniliprole), e a quantidade de lagartas (5) inoculadas por copo na geração F1 para a realização do “F2 Screen”. A terceira modificação diz respeito ao método de bioensaio. Sabe-se que o “F2 Screen” é um método eficaz e originalmente desenvolvido para detectar alelos de resistência recessivos raros e estimar a sua frequência em populações de praga para plantas transgênicas (ANDOW, IVES, 2002). Uma vez que o procedimento adotado, compreende uma adaptação do método “F2 Screen” para a detecção da resistência a inseticidas, foi necessário também repensar no método de bioensaio. Os três principais bioensaios de detecção utilizados no método de “F2 Screen”: (1) triagem diretamente na planta Bt (BOURGUET et al., 2003), (2) tecido



lioofilizado (HUANG; LEONARD; ANDOW, 2007a), e (3) dieta artificial com toxina incorporada, dieta artificial com aplicação superficial (ZHAO et al, 2002; BOURGUET et al., 2003). Nos experimentos realizados neste trabalho, utilizou-se o bioensaio de ingestão com aplicação superficial na dieta, pelo fato de já ser um método bem caracterizado e consolidado para a detecção de resistência de *S. frugiperda* a inseticidas.

A resistência de *S. frugiperda* já foi detectada para praticamente todos os grupos de pesticidas e para retardar a evolução da resistência e até mesmo restabelecer a suscetibilidade dessa praga a diamidas é necessário compreender que o manejo da resistência deve ser administrado de maneira complementar ao MIP e vice-versa. No presente trabalho, a suscetibilidade a diamidas em populações de *S. frugiperda* testadas foi alta. No entanto, a presença de variabilidade genética que confere resistência a inseticidas diamidas foi detectada. Dessa forma, recomenda-se a integração de diferentes táticas de controle, portanto os controles cultural, biológico e comportamental devem ser empregados em conjunto e o controle com inseticidas deve ser utilizado apenas quando a lagarta atingir o nível de desfolha ou o nível de controle (CRUZ, 2002). Atualmente estudos com plantas geneticamente modificadas, que expressam toxinas de *Bacillus thuringiensis* Berliner, conhecidas como culturas Bt, recentemente aprovadas e introduzidas no Brasil, indicam uma nova estratégia para o sucesso do manejo da resistência de *S. frugiperda* a inseticidas, uma vez que com a introdução de culturas geneticamente modificadas, o uso de inseticidas pode ser reduzido, resultando na reversão da suscetibilidade da praga a inseticidas.

O sucesso do restabelecimento da suscetibilidade em populações de *S. frugiperda* a inseticidas, e em particular a diamidas, depende do empenho em conjunto entre produtores rurais, agentes de extensão rural, empresas de insumos, e pesquisadores, a fim de reduzir o número de doses dos inseticidas aplicados, usar inseticidas seletivos, os quais trazem um impacto menor sobre os agentes de controle biológico, preservar os inimigos naturais nas áreas agrícolas, realizar a rotação de grupos de pesticidas para que com auxílio de plantas Bt o Brasil obtenha sucesso no manejo da resistência de *Spodoptera frugiperda*. Diante disso, é essencial que todos estejam conscientes que o emprego de inseticidas químicos deve ser feito de maneira racional, e que não cabe plenamente a eles o sucesso do manejo de pragas.

## 6 CONCLUSÕES

- A suscetibilidade a diamidas ainda é alta entre as populações de *S. frugiperda* no Brasil coletadas na cultura do milho nas safras 2011/12, 2012/13 e 2013/14.
- As concentrações diagnósticas de 10 e 32 µg de chlorantraniliprole/mL de água [I.A. (ppm)] e 100 e 180 µg de flubendiamide/mL de água [I.A. (ppm)] são apropriadas para o monitoramento da suscetibilidade de *S. frugiperda*.
- A frequência de alelos que conferem resistência a diamidas é baixa.

## REFERÊNCIAS

- ADAMCZYK JR., J.J.; HOLLOWAY, J.W.; LEONARD, B.R.; GRAVES, J.B. Defining the period of boll susceptibility to fall armyworm injury in cotton. In: BELTWIDE COTTON CONFERENCE, 1997. Memphis. **Proceedings...** Memphis: National Cotton Council, 1997.p. 941-947.
- ALSTAD, D.N.; ANDOW, D.A. Managing the evolution of insect resistance to transgenic plants. **Science**, Washington, v. 268, p. 1394-1396, 1995.
- ANDOW, D.A.; ALSTAD, D.N. F2 Screen for rare resistance alleles. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 91, p. 572-578, 1998.
- ANDOW, D.A. The risk of resistance evolution in insects to transgenic insecticidal crops. **Collection of Biosafety Reviews**, Trieste, Italia, v. 4, p. 142-199, 2008.
- ÁVILA, C.J.; DEGRANDE, P.E.; GOMEZ, S.A. Insetos-pragas: reconhecimento, comportamento, danos e controle. In: \_\_\_\_\_ **Milho: Informações Técnicas**. Dourados:EMBRAPA, 1997. p.168-180 ( Circular Técnica 5),
- BERNARDI, O.; ALBERNAZ, K. C.; VALICENTE, F. H.; OMOTO, C. Resistência de insetos-praga a plantas geneticamente modificadas. In: BORÉM, A.; DIAS, G. (Ed.). **Plantas geneticamente modificadas: desafios e oportunidades para regiões tropicais**. Visconde do Rio Branco: Suprema, cap. 9, p. 179-204, 2011.
- BOTTON, M.; CARBONARI, J.J.; GARCIA, M.S.; MARTINS, J.F. Preferência alimentar de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) em arroz e capim arroz. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Jaboticabal, v. 27, p. 207-212, 1998.
- BRUGGER, K.E.; COLE, P.G.; NEWMAN, I.C.; PARKER, N.; SCHOLZ, B.; SUVAGIA, P.; WALKERF, G.; HAMMOND, T.G.. Selectivity of chlorantraniliprole to parasitoid wasps. **Pest Management Science, Sussex**, Brighton, v. 66, p. 1075-1081, 2010.
- BRUNK, H D. **An introduction to mathematical statistics**. 3rd ed. Lexington, 1975. p.513.
- BUSATO, G.R.; GRUTZMACHER, A.D.; GARCIA, M.S.; GIOLO, F.P.; MARTINS, A.F. Consumo e utilização de alimento por *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) originária de diferentes regiões do Rio Grande do Sul, das culturas do milho e do arroz irrigado. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 31, p. 525-529, 2002.
- BUSATO, G.R. ; GRÜTZMACHER, A.D. ; OLIVEIRA, A.C. ; VIEIRA, E.A.; ZIMMER, P. D.; KOPP, M.M. ; BANDEIRA, J.M.; MAGALHÃES, T.R. Análise da estrutura e da diversidade genética de populações de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) com a utilização de marcadores AFLP. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 33, n. 6, p. 709-716, 2004.
- BUSATO, G.R.; GRUTZMACHER A.D.; GARCIA M.S.; GIOLO F.P.; ZOTTI M. J; STEFANELLO JUNIOR G.J. Biologia comparada de populações de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) em folhas de milho e arroz. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 34, n. 5, p. 743-750, 2005.

BUTT, B.A.; CANTU, E. **Sex determination of lepidopterous pupae**. Washington: USDA, , 1962. p.17

CAMPBELL, K.P.; KNUDSON, C.M.; IMAGAWA, T.; LEUNG, A.T.; SUTKO, J.L.; KAHL, S.D.; RAAB, C.R.; MADSON, L. Identification and characterization of the high affinity [3H]Ryanodine receptor of the junctional sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> release channel. **Journal of Biological Chemistry** , Bethesda, v. 262, p. 6460-6463, 1987.

CARVALHO, R.A.; OMOTO, C.; FIELD, L.M.; WILLIAMSON, M.S.; BASS, C. Investigating the Molecular Mechanisms of Organophosphate and Pyrethroid Resistance in the Fall Armyworm *Spodoptera frugiperda*. **PLOS ONE**, Berkeley, v.8, n.4,p. e62268, 2013.

CAO, G; LU, Q; ZHANG, L; GUO, F; LIANG, G; WU, K; WYCKHUYS, K.A.G; GUO, I. Toxicity of chlorantraniliprole to Cry1Ac-susceptible and resistant strains of *Helicoverpa armigera* . **Pesticide Biochemistry and Physiology**, San Diego, v. 98, p. 99–103,2010.

CAPINERA, J L. **Handbook of vegetable pests**. San Diego: Academic Press, 2002. p. 2700,

CAPRIO, M.A.; TABASHINIK, B.E. Gene flow accelerates local adaptation among finite populations: simulating the evolution of insecticide resistance. **Journal of Economic Entomology**, Laham, v. 85, p. 610-620, 1992.

CÉLERES. Relatório de biotecnologia. In: Boletim Técnico, 16 Dezembro 2013. Available: <http://www.celeres.com.br/post.php?p=46&lang=pt>. Accessed 21 Abril 2013.

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,LU.; SMITH,R.M.;TAO, Y. Anthranilic diamides: A new class of insecticides with a novel mode of action, ryanodine receptor activation. **Pesticide Biochemistry and Physiology** , San Diego, v.84, p. 196–214, 2006.

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.; CASPAR, T.; RAGGHIANI, J.J; GUTTERIDGE, S.; RHOADES, D.F.; WU, L.; SMITH, R.M.; TAO, Y. Elucidation of the mode of action of Rynaxypyr®, a selective ryanodine receptor activator. p. 121-126. In: OHKAWA, H. MIYAGAWA, H.; LEE, P.W. (Ed.). **Pesticide chemistry, crop protection, public health, and environmental safety**. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH, 2007. KGaA, , p. 121-126.

CORTEZ, M.G.R.; WAQUIL, J.M. Influência de cultivar e nível de infestação de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) no rendimento de sorgo. **Anais da Sociedade Entomológica Brasileira**, Jaboticabal, v. 26, p. 407-410, 1997.

CROFT, B.A. **Arthropod biological control agents and pesticides**. New York 1990.732p.

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

CRUZ, I; FIGUEIREDO, M.L.C.; GONÇALVES, E.P.; LIMAL, D.A.N.; DINIZ, E. E. Efeito da idade de lagartas de *Spodoptera frugiperda* (Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) no desempenho do parasitóide *Campoletis flavicincta* (Ashmead) (Hymenoptera: Ichneumonidae) e consumo foliar por lagartas parasitadas e não parasitadas. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Jaboticabal, v.26, n.2, p.229-234, 1997.

CRUZ, I.; VALICENTE, F.H.; SANTOS, F.H. dos; WAQUIL, J.M.; VIANA, P.A. **Manual de identificação de pragas da cultura do milho**. Sete Lagoas: EMBRAPA - CNPMS, 1999. p. 71.

CRUZ, I. Controle biológico em manejo integrado de pragas. In: PARRA, J.R.P.; BOTELHO, P.S.M.; CORREA-FERREIRA, B.S.; BENTO, J.M.S. (Ed.). **Controle biológico no Brasil: parasitóides e predadores**. São Paulo: Manóel, 2002. p.543-570.

CRUZ, J.C.; PEREIRA FILHO, I.A. Manejo e tratamentos culturais para o cultivo do milho verde. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2002., p.1-9, Jan., Circular Técnica, 16).

DESPRÉS, L.; DAVID, J.P.; GALLET, C. The evolutionary ecology of insect resistance to plant chemicals. **Trends in Ecology and Evolution**. Amsterdam, v. 22, p.345-352, 2007.

DEVONSHIRE, A.L.; MOORES, G.D. Different forms of insensitive acetylcholinesterase in insect-resistance house flies (*Musca domestica*). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, San Diego, v. 21, p. 336-340, 1984.

DIEZ-RODRIGUEZ, G.I.; OMOTO, C. Herança da resistência de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera:Noctuidae) a lambda-cialotrina. **Neotropical Entomology**, Londrina, v.30, p. 311-316, 2001.

DRÈS, M.; MALLETT, J. Host races in plant-feeding insects and their importance sympatric speciation. **Philosophical Transactions: Biological Sciences**, London, v. 357, n. 1420, p. 471-492, 2002.

EBBINGHAUS-KINTSCHER, U.; LÜMMEN, P.; LOBITZ, N.; SCHULTE, T.; FUNKE, C.; FISCHER R. Phthalic acid diamides activate ryanodine sensitive Ca<sup>2+</sup> release channels in insects. **Cell Calcium** , Manchester, v.39, p. 21–33, 2006.

EDWARDS, G.A.; WEIANT, E.A.; SLOCOMBE, A.G.. The action of ryanodine on the contractile process in striated muscle. **Science** , Washington, v.108, p. 330–332, 1948.

FARIAS, J.R.; ANDOW, D.A.; HORIKOSHI, R.J.; SORGATTO, R.J.; FRESIA, P.; SANTOS, A.C.; OMOTO, C. Field-evolved resistance to Cry1F maize by *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in Brazil. **Crop Protection**, Guildford, v.64, p.150-158, 2014.

FEYEREISEN, R.X. Insect cytochrome P 450. In: GILBERT, L.I. (Ed.). **Comprehensive molecular insects science**. London, 2005. p. 1-77.

FFRENCH-CONSTANT, R.H.; ROUSH, R.T. Resistance detection and documentation: the relative roles of pesticidal and biochemical assays. In: ROUSH, R.T.; TABASHNIK, B.E. (Ed.). **Pesticide resistance in arthropods**. New York, 1990. p. 4-38.

FIGUEIREDO, M.L.C. **Interação de inseticidas e controle biológico natural na redução dos danos de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae)** na cultura do milho. 2004. 225 p. Tese (Doutorado na área de Ecologia e Recursos Naturais) - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2004. p. 205.

FILL, M. ; COPELLO, J.A. Ryanodine receptor calcium release channels. **Physiological Reviews** , New York, v. 82, p. 893–922, 2002.

FOSTER, S.P.; DENHOLM, I.; RISON, J.L.; PORTILLO, H.E.; MARGARITOPOULIS, J.; SLATERE, R. Susceptibility of standard clones and European field populations of the green peach aphid, *Myzus persicae*, and the cotton aphid, *Aphis gossypii*, (Hemiptera: Aphididae), to the novel anthranilic diamide insecticide cyantraniliprole. **Pest Management Science**, Sussex, v. 68, p. 629-633, 2012.

FRANZINI-ARMSTRONG, C. ; PROTASI, F. Ryanodine receptors of striated muscle: a complex channel capable of multiple interactions. **Physiological Reviews** , New York, v.77, p. 699-729, 1997.

GASSEN, D. **Manejo de pragas associadas à cultura do milho**. Passo Fundo: Aldeia Norte, Passo Fundo, 1996. p.127.

GASSMANN, A.J.; CARRIÈRE, Y. ; TABASHNIK, B.E. Fitness costs of insect resistance to *Bacillus thuringiensis*. **Annual Review of Entomology**, Standfort, v 54, p. 147–163, 2009.

GEORGHIOU, G.P. The evolution of resistance to pesticides. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**, California, v. 3, p. 133-168, 1972.

GEORGHIOU, G.P.; TAYLOR, C.E. Genetic and biological influences in the evolution of insecticide resistance. **Journal of Economic Entomology**, Laham, v. 70, p. 319-323, 1977a.

GEORGHIOU, G.P.; TAYLOR, C.E. Operational influences in the evolution of insecticide resistance. **Journal of Economic Entomology**, Laham, v.70, n.5, p.653-658, 1977b.

GEORGHIOU, G.P.; TAYLOR, C.E. Factors influencing the evolution of resistance. In: NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES.(Ed.). **Pesticide resistance: strategies and tactics for management**, Washington, cap.3, 1986. p.157-169.

GIOLO, F.P.; GRUTZMACHER, A.D.; GARCIA, M.S.; BUSATO, G.R. Parâmetros biológicos de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) (Lep.: Noctuidae) oriundas de diferentes localidades e hospedeiros. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v.8, n.3, p. 219-224, 2002.

GOULD, F.; ANDERSON, A.; JONES, A.; SUMERFORD, D.; HECKEL, D.G.; LOPEZ, J. MICINSKI, S.; LEONARDI, R.; LASTER, M. Initial frequency of alleles for resistance to

*Bacillus thuringiensis* toxins in field populations of *Heliothis virescens*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 94, p. 3519-3523, 1997.

GULLAN, P.J.; CRANSTON P.S. **The Insects: An Outline of Entomology**, 3<sup>rd</sup> ed.. Oxford: Blackwell Publishing, 2005.p 505.

GUO, L.; TANG, B.; DONG, W.; LIANG, P.; GAO, X. Cloning, characterisation and expression profiling of the cDNA encoding the ryanodine receptor in diamondback moth, *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Plutellidae). **Pest Management Science**, Sussex, v.68, p. 1605-1614, 2012.

HALLIDAY, W.R. ; BURNHAM, K.P. Choosing the optimal diagnostic dose for monitoring insecticide resistance . **Journal of Economic Entomology**, Laham, v. 83, p.1151-1159, 1990.

HANNIG, G.T.; ZEIGLER, M. ; MARCON. P.G. 2009. Feeding cessation effects of chlorantraniliprole, a new anthranilic diamide insecticide, in comparison with several insecticides in distinct chemical classes and mode-of-action groups. **Pest Management Science**, Sussex, v.65, p. 969– 974, 2009.

HOSKINS, W.M. ; H.T. GORDON. Arthropod resistance to chemicals. **Annual Review of Entomology**, Standfort, v.1, p.89-122, 1956.

HOY, M.A. Proactive management of pesticide resistance in agricultural pest. **Phytoparasitica**, Beit Dagan, v. 20, p. 93-97, 1992.

HOY, M.A. Multitactic resistance management: an approach that is longoverdue. **Florida Entomologist**, Gainesville, v.78, p. 443-451, 1995.

HUANG, S.; HAN, Z. Mechanisms for multiple resistances in field populations of common cutworm, *Spodoptera litura* (Fabricius) in China. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, Lanham, v. 87, p. 14–22, 2007.

HUANG, J.; WU, S.F. ; YE, G. Y. Evaluation of lethal effects of chlorantraniliprole on *Chilo suppressalis* and its larval Parasitoid, *Cotesia chilonis*. **Agriculture Science**.China, v. 10, p.134 - 138, 2011.

IORIATTI, C.; ANFORA, G.; ANGELI, G.; MAZZONI, V. and TRONA, F. Effects of chlorantraniliprole on eggs and larvae of *Lobesia botrana* (Denis ; Schifferm " uller) (Lepidoptera: Tortricidae). **Pest Managment Science**, Sussex, v.65, p. 717–722, 2009.

JEFFRIES P.R., YU P., CASIDA J.E. Structural modifications increase the insecticidal activity of ryanodine. **Pest Management Science** , Sussex, v.51, p. 33–38, 1997.

- JONES, T.; SCOTT-DUPREE, C.; HARRIS, R.; SHIPP, L.; HARRIS, B. The efficacy of spinosad against the western flower thrips, *Frankliniella occidentalis*, and its impact on associated biological control agents on greenhouse cucumbers in southern Ontario. **Pest Management Science**, Sussex, v.61, p. 179–185, 2005.
- JUTSUM, A.R.; HEANEY, S.P; PERRIN, B.M. ;WEGE, P.G. Pesticide resistance: assessment of risk and the development and implementation of effective management strategies. **Pest Management Science** , Sussex, v.54, p.435-446, 1998.
- KASTEN Jr., P.; PRECETTI, A.A.C.M.; PARRA, J.R.P. Dados biológicos comparativos de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) 1797) em duas dietas artificiais e substrato natural. **Revista de Agricultura**, Piracicaba, v.53, n.1/2, p.68, 1978.
- KATO, T.; MANOHA, S.L.; TANAKA, S.; PARK, E.Y. High-titer preparation of *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus (BmNPV) displaying recombinant protein in silkworm larvae by size exclusion chromatography and its characterization. **BMC Biotechnology**, Portugal, v. 9, p.55-65, 2009.
- KNIGHT, A.L. ; FLEXNER, L. Disruption of mating in codling moth (Lepidoptera: Tortricidae) by chlorantranilipole, an anthranilic diamide insecticide. **Pest Management Science**, Sussex, v.63, p.180–189, 2007.
- KUHAR, T.P.; DOUGHTY, H.; HITCHNER, E. and CASSELL, M. Evaluation of foliar insecticides for the control of Colorado potato beetle in potatoes. **Arthropod Management Tests**, Stillwater, v. 33, p. E8, 2008.
- LAHM, B.G.D. Excitation-contraction coupling in skeletal muscle: comparisons with cardiac muscle. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology** ,New Jersey, v. 27, p. 216-224, 2000.
- LAHM, G.P.; SELBY, T.P.; STEVENSON, T.M.; MYERS,B.J.; SEBURYAMO,G.; SMITH, B.K.; FLEXNER,L.;CLARK,C.E.; DANIEL CORDOVA,D. Insecticidal anthranilic diamides: a new class of potent ryanodine receptor activators. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters** , Grã Bretanha, v.15, p. 4898-4906, 2005.
- LAHM, G.P.; STEVENSON, T. M.; SELBY, T. P.; FREUDENBERGER, D. C.; FLEXBER, L.; BELLIN, C. A.; DUBAS, C. M.; SMITH, K. A. H.; HOLLINGSHAUS, J. G.; CLARK, C. E.; BENNER, E.A. Rynaxypyr<sup>tm</sup>: A new insecticidal anthranilic diamide that acts as a potent and selective ryanodine receptor activator. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, Grã Bretanha, v. 17, p. 6274-6279, 2007.
- LAHM, G.P.; CORDOVA, D.; BARRY, J.D.; New and selective ryanodine receptor activators for insect control. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, Grã Bretanha v. 17, p. 4127- 4133, 2009.
- LAI, T.; LI, J.; SU, J. Monitoring of beet armyworm *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae) resistance to chlorantraniliprole in China. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, Lanham, v. 101, p. 198-205, 2011.



LEORA SOFTWARE. **POLO-PC**: a user's guide to Probit or logit analysis. Berkeley, 1987. p. 20.

LI, X.C.; DEGAIN, B.A.; HARPOLD, V.S.; MARÇON, P.G.; NICHOLS, R.L.; FOURNIER, A.J.; NARANJO, S.E.; PALUMBO, J.C. and ELLSWORTH, P.C. Baseline susceptibilities of B- and Q-biotype *Bemisia tabaci* to anthranilic diamides in Arizona. **Pest Management Science**, Sussex, v.68, p.83–91, 2012.

LIN, Q.; JIN, F.; HU, Z.; CHEN, H.; YIN, F.; LI, Z.; DONG, X.; ZHANG, D.; REN, S.; FENG, X. Transcriptome Analysis of Chlorantraniliprole Resistance Development in the Diamondback Moth *Plutella xylostella*. **PLOS ONE**, Berkeley, v.8, 72314, 2013

MACHADO, V.; WUNDER, M.; BALDISSERA, V.D.; OLIVEIRA, J.V.; FIÚZA, L.M.; NAGOSHI, R.N. Molecular Characterization of Host Strains of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in Southern Brazil. **Annals of the Entomological Society of America**, Columbus, v. 101, p. 619-626, 2008.

MARTINELLI, S.; OMOTO, C. Resistência de Insetos a plantas geneticamente modificadas. **Biotecnologia Ciência ; Desenvolvimento**, Brasília, v.34, p. 67-77, 2005.

MARTINELLI, S.; BARATA, R.M.; ZUCCHI, M.I.; SILVA-FILHO, M.C.; OMOTO, C. Characterization of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) populations associated to maize and cotton crops in Brazil. **Journal of Economic Entomology**, Laham, v. 99, p. 519-526, 2006.

MARTINELLI, S.; OMOTO, C. Resistência de lepidóteros-praga a inseticidas na cultura do algodão no Brasil. **Revista Brasileira de Oleaginosas e Fibrosas**, Campina Grande, v.10, n.3, p.1167-1182, 2006.

McCORD, E.; YU, S.J. The mechanisms of carbaryl resistance in the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith). **Pesticide Biochemistry Physiology**, San Diego, v. 27, p. 114-122, 1987.

Michigan State University Center for Integrated Plant Systems, "**The database of arthropods resistance to pesticides**", Michigan, [Accessed 01, Abril, 2012].

MOREIRA, M.D.; MIRANDA, J.E.; SILVA, C.A.D.; SOUZA JÚNIOR, J.D.A.; AZEVEDO, A. I. B. Aspectos biológicos e exigências térmicas da lagarta militar (*Spodoptera* spp.) (Lepidoptera: Noctuidae) em algodão. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ALGODÃO, 2003. Goiânia. **Anais...Goiânia**, 2003.

MURÚA, G. ; VIRLA, E. Population parameters of *Spodoptera frugiperda* (Smith) (Lep.: Noctuidae) fed on corn and two predominant grasses in Tucuman (Argentina). **Acta Zoológica Mexicana**, México, v. 20, n. 1, p. 199-210, 2004.

NAGOSHI R.N.; SILVIE P.; MEAGHER, R.L. Comparison of haplotype frequencies differentiate fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) corn-strain populations from Florida and Brazil. **Journal of Economic Entomology**, Laham, v.100, p. 954-961, 2007a.

NAGOSHI R.N.; SILVIE P., MEAGHER Jr R. L.; LÓPEZ J.; MACHADO. V. Identification and comparison of fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) host strains in Brazil, Texas, and Florida. **Annals of Entomological Society of America**, Columbus, v.100, p. 394-402, 2007b.

NAGOSHI, R.N.; MEAGHER, R.L. Review of fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) genetic complexity and migration. **Florida Entomologist**, Miami, v.91. p.4, 2008.

NAVON, A.; ASCHER K.R.S. Bioassays of Entomopathogenic Microbes and Nematodes. **Science**, Washington, p. 324, 2000.

OMOTO, C.; SCHIMIDT, F.B.; SILVA, R.B.; ZUCCHI, T.D.; RISCO, M.D.M. Bases for insecticide resistance management of *Spodoptera frugiperda* in corn in Brazil. In: I. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF ENTOMOLOGY, 21.2000., Foz do Iguaçu. **Abstract Book...** Foz do Iguaçu., 2000. p. 347.

OMOTO, C. Modo de ação dos inseticidas e resistência de insetos a inseticidas In: GUEDES, J.C.; COSTA, I.D.; CASTIGLIONI, E. (Ed.). **Bases e técnicas de manejo de insetos**. Univ. Federal de Santa Maria, Sta. Maria, RS., 2000. p. 30-49.

OWEN , N. L.; CATCHOT, A.L.; MUSSER, F.R.; GORE, J.; COOK, D.C; JACKSON, R. Susceptibility of *Chrysodeixis includens* (Lepidoptera: Noctuidae) to Reduced-Risk Insecticides. **BioOne**, Flórida, v. 96, p.554-559, 2013.

PARRA, J.R.P.; C. OMOTO. Cada vez mais terríveis. **Revista Cultivar**, Pelotas, v. 6, p.18-20, 2004.

PASHLEY, D.P.; MARTIN, J.A. Reproductive incompatibility between host strains of the fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae). **Annals of Entomological Society of America**, Columbus, v. 80, p. 731-733, 1987.

PASHLEY, D.P.; JOHNSON S.J.; SPARKS A.N. Genetic population of migratory moths: The fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae). **Annals of Entomological Society of America** , Columbus, v. 78, p.756-762, 1985.

PASHLEY, D.P.; HAMMOND, A.M. ; HARDY, T.N. Reproductive isolating mechanisms in fall armyworm host strains (Lepidoptera: Noctuidae). **Annals of the Entomological Society of America**, Columbus, v. 85,p. 400–405, 1992.

PEREIRA, E.J.G.; STORER, N.P.; SIEGFRIED, B.D. Inheritance of Cry1F resistance in laboratory-selected European corn borer and its survival on transgenic corn expressing the Cry1F toxin. **Bulletin of Entomological Research**, Farnham Royal, v. 98, p. 621-629, 2008.

PITRE , H.N.; HOGG, D.B. Development of the fall armyworm on cotton, soybean and corn. **Journal of the Georgia Entomological Society**, Geórgia, v. 18, n. 2, p. 115-121, 2008.

POGUE, G.M.A world revision of the genus *Spodoptera* Guenée (Lepidoptera: Noctuidae). **Memoirs of the American Entomological Society**, Philadelphia, v. 43, p. 1-202, 2002.

PRABHAKER, N.; CASTLE, S.; BYRNE, F.; HENNEBERRY, T.J.; TOSCANO, N.C. Establishment of baseline susceptibility data to various insecticides for *Homalodisca coagulata* (Homoptera: Cicadellidae) by comparative bioassay techniques. **Journal of Economy Entomology**, Laham, v. 99, p. 141- 154, 2006.

RAMANAIDU, K.; HARDMAN, J.M.; CUTLER, G.C. Laboratory and field susceptibility of blueberry spanworm *Itame argillacearia* Packard (Lepidoptera: Geometridae) to conventional and reduced-risk insecticides. **Crop Protection**, Guildford, v.30, p. 1643-1648, 2011.

RIBEIRO, L.M.S.; WANDERLEY-TEIXEIRA, V; , FERREIRA, H.N.; TEIXEIRA, A.A.C; SIQUEIRA, H.A.A. Fitness costs associated with field-evolved resistance to chlorantraniliprole in *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae). **Bulletin of Entomological Research**, Cambridge, v. 104, p. 88-96, 2014.

ROBERTSON, J. L.; PREISLER, H.K. **Pesticide bioassays with arthropods**. Boca Raton: CRC Press, 1992. p. 127.

ROBERTSON, J. L.; PREISLER, H.K. **Pesticide Bioassays with Arthropods**. 2<sup>nd</sup> ed. Boca Raton, Florida :CRC Press, ,2007. 127p.

ROUSH, R.T ; DALY, J.C. The role of population genetics in resistance research and management. In: ROUSH, R.T.; TABASHNIK, B.E. Ed.]. **Pesticide resistance in arthropods**. NewYork, 1990. p. 97-152.

ROUSH, R.T. Designing resistance management programs: How can you choose?. **Pesticide Science**, Washington, v.26, p.423-441, 1989.

ROUSH, R.T.; MCKENZIE, J.A. Ecological genetics of insecticide and acaricide resistance. **Annual Review of Entomology**, Stanford, v.32, p. 361-380,1987.

ROUSH, R.T.;MILLER, G.L. Considerations for design of insecticide resistance monitoring programs. **Journal of Economy Entomology**, Laham, v. 79, p.293-298, 1986.

SÁ, V.G.M.; FONSECA, B.V.C.; BOREGAS, K.G.B.; WAQUIL, J M. Sobrevivência e desenvolvimento larval de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) em hospedeiros alternativos. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 38, n. 1, p. 108-115, 2009.

SANTOS, L.M.; REDAELLI, L.R.; DIEFENBACH, L.M.G.; EFROM, C.F.S. Fertilidade e longevidade de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) em genótipos de milho. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.34, n. 2, p. 345-350, 2004.

SHARMA, P.C ; PATHANIA, A.K. Relative susceptibility of *Spodoptera litura* (fabricius) to some insecticides and biopesticides. **Journal of Insect Science**, Wisconsin v.2, p. 326-329, 2012.

SARMENTO, R.A.; AGUIAR, R.S.; AGUIAR, R.A.S.S.; VIEIRA, S.M.J.; OLIVEIRA, H. G.; HOLTZ, A.M. Revisão da biologia, ocorrência e controle de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera, Noctuidae) em milho no Brasil. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 18, n. 2, p. 41-48, 2002.

SAS INSTITUTE. **SAS user's guide statistics** . Cary, 2004.

SATTELLE, D.B.; CORDOVA, D.; CHEEK, T.R. Insect ryanodine receptors: molecular targets for novel pest control chemicals. **Invertebrate Neuroscience** , Southampton, v. 8, p. 107-119, 2008.

SIEGFRIED, B.D.; MARCON, P.; WITKOWSKI, J.F. ; WRIGHT, R.J.; WARREN, G.W. Susceptibility of field populations of the European corn borer, *Ostrinia nubilalis* (Hübner) to *Bacillus thuringiensis* (Berliner). **Journal of Agricultural Entomology**, Carolina do Sul, v.12, p.267-273, 1995.

SIAL, A.A.; BRUNNER, J.F.; GARCZYNSKI, S.F.; Biochemical characterization of chlorantraniliprole and spinetoram resistance in laboratory-selected oblique-banded leafroller, *Choristoneura rosaceana* (Harris) (Lepidoptera: Tortricidae). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, Lanham, v. 99, p. 274-279, 2011.

SILVA, J.E.; SIQUEIRA, A.A.; TADEU, B.M.; MATHEUS, R.C.; BARROS, R. Baseline susceptibility to chlorantraniliprole of Brazilian populations of *Plutella xylostella*. **Crop Protection**, Guildford, v. 35, p. 97-101, 2012.

SIMS, S.R.; GREENPLATE, J.P.; STONE, T.B.; CAPRIO, M.A.; GOULD, F.L. Monitoring strategies for early detection of Lepidoptera resistance to *Bacillus thuringiensis* insecticidal proteins. In: BROWN, T.M. (Ed.). **Molecular genetics and evolution pesticides resistance**. Washington: American Chemical Society, 1996. p. 229-242. (Symposium Series, 645).

SCOTT, J.A. The molecular genetics of resistance: resistance as a response to stress. **Florida Entomologist**, Gainesville, v. 78, p. 399-414, 1995.

SCOTT, J.A. Cytochromes P450 and insecticide resistance. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 29, p. 757-777, 1999.

SHELTON, A.M.; TANG, J.D.; ROUSH, R.T.; METZ, T.D.; EARLE, E.D. Field tests on managing resistance to Bt-engineered plants. **Nature Biotechnology**, London, v.18, p.339- 342, 2000.

SIAL, A.A.; BRUNNER, J.F.; GARCZYNSKI, S.F.; Biochemical characterization of chlorantraniliprole and spinetoram resistance in laboratory-selected oblique-banded leafroller, *Choristoneura rosaceana* (Harris) (Lepidoptera: Tortricidae). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, Lanham, v. 99, p. 274-279, 2011.

SILVA, J.E.; SIQUEIRA, A.A. Baseline susceptibility to chlorantraniliprole of Brazilian populations of *Plutella xylostella*. **Crop Protection**, Guildford, v. 35, p. 97-101, 2012

STORER, N.P.; BABCOCK, J.M.; SCHLENZ, M.; MEADE, T.; THOMPSON, G.D.; BING, J. W.; HUCKABA, R.M. Discovery and Characterization of Field Resistance to Bt Maize: *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in Puerto Rico. **Journal of Economic Entomology**, Laham, v. 103, n.4, p. 1031-1038, 2010.

TABASHNIK, B.E.; SCHWARTZ, J.M.; FINSON, N. ; JOHNSON, M.W. Inheritance of resistance to *Bacillus thuringiensis* in diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae). **Journal of Economy Entomology**, Laham, v.85, p.1046–1055, 1992.

TALEKAR, N.S. ; SHELTON, A.M. Biology, ecology, and management of the diamondback moth. **Annual Review Entomology**, Standfort, v 38, p. 275-301, 1993.

TEMPLE, J.H.; POMMIREDDY, P.L.; COOK, D.C.; MARCON, P.; LEONARD, B. R. Susceptibility of selected lepidopteran pests to Rynaxypyr, a novel insecticide. **Journal Cotton Science**, Tennessee, v.13. p.23–31, 2009.

TROCZKA, B; ZIMMER, CT; ELIAS, J; SCHORN, C; BASS, C; DAVIES, TG; FIELD, LM; WILLIAMSON, MS; SLATER, R; NAUEN, R. 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 Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 42, p. 873–880, 2012.

TOHNISHI, M.; NAKAO, H.; FURUYA, T.; SEO, A.; KODAMA, H.; TSUBATA, K.; FUJIOKA, S.; KODAMA, H.; HIROOKA, T.; NISHIMATSU, T. Flubendiamide, a novel insecticide highly active against lepidopterous insect pests. **Journal Pesticide Science**, Technikerstrasse, v. 30, p. 354, 2005.

TWINE, P.H. ; REYNOLDS, H.T. Relative susceptibility and resistance of the tobacco budworm to methyl parathion and synthetic pyrethroids in southern California. **Journal of Economy Entomology**, Laham, v. 73, p. 239-242, 1980.

VALICENTE, F.H.; COSTA, E.F., da. Controle da lagarta do cartucho, *Spodoptera frugiperda*, com *Baculovirus*, aplicado via água de irrigação Londrina, 1995. 14p.. **Circular técnica, n.114, Embrapa – Centro Nacional de Pesquisa de Milho e Sorgo**,

VALICENTE, F.H.; TUELHER, E.S. Controle biológico da lagarta do cartucho, *Spodoptera frugiperda*, com *Baculovirus*. Londrina 2009. , p.14. (**Circular Técnica, n.114, Embrapa - Centro Nacional de Pesquisa de Milho e Sorgo**)

VENETTE, R.C.; HUTCHISON, W.D.; ANDOW, D. An In-Field Screen for Early Detection and Monitoring of Insect. Resistance to *Bacillus thuringiensis* in Transgenic Crops. **Journal of Economic Entomology**, Laham, v. 93, n.4, p.1055-1064, 2000.

WAQUIL, J.M.; BOREGAS, K.G.B.; MENDES, S.M. Viabilidade do uso de hospedeiros alternativos como área de refúgio para o manejo da resistência da lagarta-do-cartucho, *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) no cultivo do milho-Bt. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2008. 10p. (**Embrapa Milho e Sorgo. Comunicado Técnico**, 160),

WANG, X.; WU, S.; YANG, Y.; WU, Y. Molecular characterization and mRNA expression of a ryanodine receptor gene from diamondback moth, *Plutella xylostella*. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, Lanham, v.102, p. 204-212, 2012.

WANG, X.; KHAKAME, S. K.; YE, C.; YANG, Y.; WU, Y. Characterisation of field-evolved resistance to chlorantraniliprole in the diamondback moth, *Plutella xylostella*, from China. **Pest Management Science**, Sussex, v. 69, p. 661-665, 2013.

WANG, J.; LI, Y.; HAN, Z.; ZHU, Y.; XIE, Z.; WANG, J.; LIU, Y.; LI, X. Molecular Characterization of a Ryanodine Receptor Gene in the Rice Leafhopper, *Cnaphalocrocis medinalis* (Guenée). **Plos One**, Berkeley, v. 7, n.5, p.e36623, 2013.

WARE, G.W. **Fundamentals of pesticides: a self-instruction guide**. 3rd ed. Fresno, CA, 1982. p. 78-79.

WHALON, M.E.; MOTA-SANCHEZ, D.; HOLLINGWORTH, R.M. Analysis of global pesticide resistance in arthropods. In: WHALON, M.E. (Ed.). **Global Pesticide Resistance in Arthropods**. Wallingford, United Kingdom: CABI, v. 5 p. 31, 2008.

WHITFORD, F.; QUISENBERRY, S.S.; RILEY, T.J. citar todos et al. Oviposition preference, mating compatibility, and development of two fall armyworm strains. **Florida Entomologist**, Winter Haven, v. 71, n. 3, p. 234-243, 1988.

WISEMAN, B.R.; PAINTER, R. H.; WASSON, C.E. Detecting corn seedling differences in the greenhouse by visual classification of damage by the fall armyworm. **Journal of Economic Entomology**, Laham, v.59, p.1211-1214, 1966.

YOUNG, J.R.; MCMILLIAN, W.W. Differential feeding by two strains of fall armyworm larvae on carbaryl surfaces. **Journal of Economic Entomology**, Laham, Lanham, v. 72, p. 202-204, 1979.

YU, S.J. Insecticide resistance in the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, San Diego, v. 39, p. 84, 1991.

YU, S.J.; NGUYEN, S.N.; ABO-ELGHAR, G.E. Biochemical characteristics of insecticide resistance in the fall armyworm *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, San Diego, v. 77, p. 1-11, 2003.

YU, S.J. Insensitivity of acetylcholinesterase in a field strain of the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, San Diego, v. 84, p. 135-142, 2006.

YU, S.J.; MCCORD JR. E. Lack of cross-resistance to indoxacarb in insecticide-resistant *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) and *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Yponomeutidae). **Pest Management Science**, Sussex, v. 63, p. 63-67, 2007.

ZHANG, L.S.J. ; GAO, X. Inheritance of beta-cypermethrin resistance in the housefly *Musca domestica* (Diptera: Muscidae). **Pest Management Science**, Sussex, v. 64, p.185–190, 2000.

ZHANG, P; GAO,M; MU,W; ZHOU, C; LI, X. Resistant levels of *Spodoptera exigua* to eight various insecticides in Shandong, China. **Journal of Pesticide Science**, Nagoya, v.39, p. 7-13, 2014.

ZHAO J.Z.; COLLINS H.L.; LI , Y.X.; MAU R.F.L.; THOMPSON, G.D.;HERTLEIN, M.et al., Monitoring of diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae) resistance to spinosad, indoxacarb, and emamectin benzoate. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v.99, p.176–181, 2006.

ZHENG, X.; REN, X.; SU, J. Insecticide susceptibility of *Cnaphalocrocis medinalis* (Lepidoptera: Pyralidae) in China, **Journal of Economy Entomology**, Laham, v. 104, p. 653–658, 2011.