

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

Risco de evolução da resistência a espinosinas em *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) no Brasil

Sandy Spineli Silva

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

**Piracicaba
2019**

Sandy Spinelí Silva
Engenheira Agrônoma

**Risco de evolução da resistência a espinosinas em *Helicoverpa armigera*
(Lepidoptera: Noctuidae) no Brasil**

versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

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

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

Piracicaba
2019

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

Silva, Sandy Spineli

Risco de evolução da resistência a espinosinas em *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) no Brasil / Sandy Spineli Silva. - - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2019.

61 p.

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

1. Manejo da resistência de insetos 2. Bases genéticas 3. Resistência cruzada 4. Spinosad 5. Spinetoram. I. Título

*Aos meus pais, Osvaldo Francisco Silva e Rosangela Spinesi Silva,
e aos meus irmãos Samuel F. Spinesi Silva e Samira Spinesi Silva,
por todo o amor, incentivo e apoio necessário para concluir mais essa etapa em minha vida.*

Dedico e Agradeço

Agradecimentos

À Deus, pela vida e pelas oportunidades proporcionadas durante este período.

Ao Professor Dr. Celso Omoto, pela orientação com valiosos ensinamentos, paciência, amizade, confiança, conselhos e oportunidade para a realização deste trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Entomologia (USP/ESALQ) pelos conhecimentos adquiridos durante o mestrado com professores de excelência e pelas oportunidades e amizades realizadas.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudo e ao Comitê Brasileiro de Ação à Resistência a Inseticidas (IRAC-BR) pelo financiamento parcial para a execução deste trabalho.

Aos amigos e colegas que foram e são do Laboratório de Resistência de Artrópodes (USP/ ESALQ), Aline Sartori Guidolin, Anderson Bolzan, Antônio Rogério Bezerra do Nascimento, Dayana Rosalina de Souza, Daniel Bernardi, Daniela Miyuki Okuma, Dionei Schimidt Muraro, Ewerton da Costa Lira, Felipe Antônio Domingues, Fernando Semmelroth do Amaral, Fernando Padovez, Ingrid Schimidt Kaiser, José Paulo Bentivenha, Juliana Rodrigues, Leonardo Miraldo, Marcelo Mochetti, Natália Alves Leite, Oderlei Bernardi, Osmar Arias, Renato Jun Horikoshi, Rogério Machado Pereira e Rubens Hideo Kanno, pelo convívio, amizade e troca de conhecimentos.

Aos amigos da equipe *Helicoverpa armigera*, Mariana Regina Durigan, Douglas Amado e Dyrson de Oliveira Abbade Neto, pela amizade, convívio, trabalho em grupo e por todo o suporte na condução deste trabalho.

Aos estagiários que foram e são do Laboratório de Resistência de Artrópodes (USP/ ESALQ), Pedro Vieira, Igor Pereira, Diogo Bittencourt, Bruna Pagotto, Stella Collegari, Murilo Basso, Thaini Gonçalves, Gustavo Zambon e Matheus Vitti, pela amizade, auxílios prestados e convivência.

A Dr. Eloisa Salmeron e a técnica Janice Soares por todo o suporte, organização e cuidados para prover todos os materiais necessários para o funcionamento das atividades do Laboratório de Resistência de Artrópodes (USP/ ESALQ).

Aos amigos de infância e da faculdade, Nara de Camargo, Amanda Frias, Clara Delagracia, Amanda Melo, Walkiria Olsen, Walter Canelheiro, Priscila Cavalcanti, Onésio Neto, Rodrigo Borges, Najara Lira, Henrique Vianna, Luciana Moraes, Larissa Silva, Gabriel Ceballos e Rafael Rodrigues, pela torcida de cada sucesso obtido durante o mestrado e pela amizade de todos esses anos.

Ao meu namorado Thiago Werneque, por todo amor, apoio e torcida para superar os desafios que surgiram ao longo dessa trajetória.

A todos os funcionários do Departamento de Entomologia e Acarologia (USP/ESALQ), pela dedicação e serviços prestados.

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

Por fim, a todos aqueles que, direta ou indiretamente, ajudaram para a realização deste trabalho, meus sinceros agradecimentos!

Muito obrigada!

SUMÁRIO

RESUMO	7
ABSTRACT.....	8
LISTA DE FIGURAS	9
LISTA DE TABELAS	10
1. INTRODUÇÃO.....	11
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	13
2.1. Fatores que afetam a evolução da resistência de <i>H. armigera</i> a inseticidas	13
2.1.1. Fatores bioecológicos	13
2.1.2. Fatores genéticos.....	14
2.1.3. Fatores operacionais.....	16
2.2. Espinosinas	17
2.3. Casos de resistência de <i>H. armigera</i> a inseticidas	19
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	21
3.1. Coletas de <i>Helicoverpa armigera</i>	21
3.2. Criação e manutenção das populações de <i>Helicoverpa armigera</i>	23
3.3. Monitoramento da suscetibilidade de <i>H. armigera</i> a espinosinas	24
3.4. Linhagem de <i>H. armigera</i> suscetível a spinosad	25
3.5. Seleção e caracterização da linhagem de <i>H. armigera</i> resistente à spinosad	26
3.6. Padrão de herança da resistência de <i>H. armigera</i> a spinosad	28
3.6.1. Dominância da resistência	28
3.6.2. Número de genes associadas com a resistência.....	29
3.7. Resistência cruzada com spinetoram.....	30
4. RESULTADOS.....	31
4.1. Monitoramento da suscetibilidade de <i>H. armigera</i> a espinosinas	31
4.2. Seleção e caracterização da linhagem de <i>H. armigera</i> resistente a spinosad	35
4.3. Padrão de herança da resistência de <i>H. armigera</i> a spinosad	35
4.3.1. Dominância da resistência	38
4.3.2. Número de genes associados com a resistência.....	39
4.4. Resistência cruzada com spinetoram.....	40
5. DISCUSSÃO.....	43
6. CONCLUSÕES.....	49
REFERÊNCIAS	50

RESUMO

Risco de evolução da resistência a espinosinas em *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) no Brasil

Após a detecção de *Helicoverpa armigera* (Hübner, 1808) (Lepidoptera: Noctuidae) no Brasil em 2013, estudos para compreender o risco de evolução da resistência de *H. armigera* aos principais inseticidas registrados para o seu controle são de suma importância. Dentre esses inseticidas, destaca-se o grupo das espinosinas que apresentam mecanismo de ação único, atuando como moduladores alostéricos aos receptores nicotínicos da acetilcolina. Assim, para subsidiar programas proativos de manejo da resistência de *H. armigera* a inseticidas espinosinas no Brasil, no presente trabalho foram conduzidos estudos para (i) avaliar a suscetibilidade de populações de *H. armigera* a spinosad e spinetoram e (ii) entender as bases genéticas da resistência e verificar resistência cruzada a spinetoram, a partir de uma linhagem de *H. armigera* resistente a spinosad selecionada em condições de laboratório. O monitoramento da suscetibilidade foi realizado com populações de campo coletadas em regiões de grande representatividade na produção de soja e algodão no Brasil ao longo das safras agrícolas de 2017 a 2019. Para o inseticida spinosad utilizou-se a dose diagnóstica (DL_{99}) de $3,03 \mu\text{g i.a./cm}^2$ e para spinetoram a DL_{99} de $0,97 \mu\text{g i.a./cm}^2$. Todas as 17 populações de *H. armigera* monitoradas apresentaram alta suscetibilidade tanto para spinosad quanto para spinetoram. Os valores de sobrevivência larval nas doses diagnósticas variaram de 0,0 a 3,9% para spinosad e de 0,0 a 2,0% para spinetoram. A linhagem resistente a spinosad (Spin-R) foi selecionada a partir de uma população de campo coletada em Juscimeira, Mato Grosso, na segunda safra de 2017. Após doze gerações sob pressão de seleção com spinosad, a linhagem resistente apresentou uma razão de resistência de 27 vezes, baseado na DL_{50} (95% IC) da linhagem Spin-R de $3,24$ ($2,80 - 3,74$) $\mu\text{g i.a./cm}^2$ e da linhagem suscetível (Sus) de $0,12$ ($0,08 - 0,16$) $\mu\text{g i.a./cm}^2$. Cruzamentos recíprocos entre as linhagens Sus e Spin-R mostrou que a resistência de *H. armigera* a spinosad é autossômica e incompletamente dominante. Por meio dos retrocruzamentos entre os indivíduos heterozigotos com a linhagem Sus revelou que a resistência é poligênica. Além disso, Spin-R apresentou resistência cruzada para o inseticida spinetoram ($RR = 12$ vezes). Neste contexto, apesar da alta suscetibilidade de *H. armigera* a inseticidas espinosinas em populações monitoradas nas safras de 2017 a 2019, o risco de evolução da resistência pode ser considerado alto em populações de *H. armigera* a estes inseticidas em condições de campo, pois confirmou-se a presença de alelos que conferem resistência com caráter dominante para spinosad. Portanto, estratégias de manejo da resistência devem ser implementadas para preservar a vida útil de inseticidas espinosinas no controle de *H. armigera* no Brasil.

Palavras-chave: Manejo da resistência de insetos, Bases genéticas, Resistência cruzada, Spinosad, Spinetoram

ABSTRACT

Risk of resistance evolution to spinosyns in *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) in Brazil

After the detection of *Helicoverpa armigera* (Hübner, 1808) (Lepidoptera: Noctuidae) in Brazil in 2013, studies to understand the risk of resistance evolution of *H. armigera* to major insecticides registered for its control are very important. Among these insecticides, the spinosyns have a unique mechanism of action, acting as allosteric modulators to nicotinic acetylcholine receptors. Thus, to support proactive management programs of *H. armigera* resistance to spinosyns in Brazil, we conducted studies (i) to monitor the susceptibility to spinosad and spinetoram in *H. armigera* populations and (ii) select a spinosad-resistant strain under laboratory conditions to understand the genetic bases of resistance and to verify cross-resistance to spinetoram. Susceptibility monitoring was performed with field-populations collected from a major soybean and cotton producing regions in Brazil from 2017 to 2019 cropping seasons. For the spinosad insecticide the diagnostic dose (LD₉₉) of 3.03 µg a.i/cm² and for spinetoram the LD₉₉ of 0.97 µg a.i/cm² were used. All 17 field-collected populations showed high susceptibility to both spinosad and spinetoram. The larval survival at diagnostic doses ranged from 0.0 to 3.9% for spinosad and 0.0 to 2.0% for spinetoram. The spinosad-resistant strain (Spin-R) was selected from a field-population collected in Juscimeira, Mato Grosso during the second cropping season of 2017. After twelve generations of selection pressure with spinosad, the spinosad-resistant strain showed resistance ratio of 27-fold, based on the LD₅₀ (95% CI) of Spin-R 3.24 (2.80 – 3.74) µg a.i/cm² and of the susceptible strain (Sus) of 0.12 (0.08 – 0.16) µg a.i/cm². Reciprocal crosses between the Sus and Spin-R strains revealed that resistance of *H. armigera* to spinosad is autosomal and incompletely dominant resistance. By performing the backcross of the heterozygous individuals with Sus strain showed that the resistance is polygenic. Moreover, Spin-R showed cross-resistance to spinetoram (RR= 12-fold). Although high susceptibility of *H. armigera* populations to spinosyns were found from 2017 to 2019 cropping season, the risk of resistance evolution of *H. armigera* to these insecticides may be high under field conditions because we confirmed the presence of dominant resistance alleles to spinosad. Thus, resistance management strategies should be implemented to preserve the lifetime of spynosins to control *H. armigera* in Brazil.

Keywords: Insect resistance management, Genetic basis, Cross-resistance, Spinosad, Spinetoram

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Distribuição das populações de *Helicoverpa armigera* coletadas nas safras dos anos de 2017 a 2019. 23
- Figura 2. Sobrevivência larval de populações de *Helicoverpa armigera* coletadas em diferentes regiões produtoras nas safras de 2017 a 2019, monitoradas com bioensaios de ingestão com o inseticida spinosad na concentração de 3,03 µg i.a./cm². médias (± erro padrão), n=240 lagartas; Sus = referencial de suscetibilidade. 33
- Figura 3. Sobrevivência larval de populações de *Helicoverpa armigera* coletadas em diferentes regiões produtoras nas safras de 2017 a 2019, monitoradas com bioensaios de ingestão com o inseticida spinetoram na concentração de 0,97 µg i.a./cm². médias (± erro padrão); n=240; Sus = referencial de suscetibilidade. 34
- Figura 4. Dose-mortalidade das linhagens de *H. armigera* suscetível (Sus), resistente (Spin-R) e heterozigotos (♂ Spin-R x ♀ Sus e ♀ Spin-R x ♂ Sus), ao inseticida spinosad em bioensaios de aplicação superficial da dieta artificial. 38
- Figura 5. Dominância da resistência de *Helicoverpa armigera* a spinosad em função da dose de spinosad testada (µg i.a./cm²), H1(♂ Spin-R x ♀ Sus) e H2 (♀ Spin-R x ♂ Sus)..... 39
- Figura 6. Mortalidade observada e esperada comparadas pelo teste de χ^2 ($p < 0,001$) entre os retrocruzamentos (progênie 1: ♀ H2 x ♂ Sus, progênie 2: ♂ H2 x ♀ Sus) provenientes da linhagem heterozigota H2 (♀ Spin-R x ♂ Sus) com o parental mais distinto (Sus) na dose de 0,884 µg. i.a./cm² de spinosad. 40

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Populações coletadas para o monitoramento da suscetibilidade de <i>Helicoverpa armigera</i> para os inseticidas spinosad e spinetoram.....	22
Tabela 2. Dose-mortalidade das linhagens de <i>Helicoverpa armigera</i> suscetível (Sus) e resistente (Spin-R), em diferentes gerações sob ausência e pressão de seleção ao inseticida spinosad, respectivamente, realizados em bioensaios de aplicação superficial da dieta artificial.	37
Tabela 3. Dose-mortalidade das linhagens de <i>Helicoverpa armigera</i> suscetível (Sus), resistente (Spin-R) e heterozigotos ao inseticida spinosad em bioensaios de aplicação superficial da dieta artificial.	37
Tabela 4. Dominância da resistência de <i>Helicoverpa armigera</i> a spinosad em função da dose de spinosad testada ($\mu\text{g i.a./cm}^2$).	41
Tabela 5. Dose-mortalidade das linhagens de <i>Helicoverpa armigera</i> suscetível (Sus) e resistente a spinosad (Spin-R) ao inseticida spinetoram em bioensaios de aplicação na superfície da dieta artificial.....	41

1. INTRODUÇÃO

Helicoverpa armigera (Hübner, 1808) (Lepidoptera: Noctuidae) é uma praga de ampla distribuição geográfica, presente em regiões temperadas e tropicais do mundo, como na Europa, Ásia, África e Oceania (FITT, 1989; ANDERSON et al., 2018). Em 2013, esta praga foi oficialmente relatada no Brasil (CZEPAK et al., 2013; SPECHT et al., 2013) ocasionando elevadas infestações em diversas culturas de importância econômica, tais como na soja, feijão e algodão, resultando em significativas perdas econômicas (TAY et al., 2013). Trata-se de uma espécie altamente polífaga com possibilidades de se alimentar em mais de 180 espécies de plantas cultivadas e silvestres (FITT, 1989; TAY et al., 2013). Possui alta capacidade de reprodução e de dispersão (FARROW; DALY, 1987; COAKER, 1959; FITT, 1989). Essas características bioecológicas fazem com que *H. armigera* seja uma espécie de grande relevância e de difícil controle no mundo (SRIVASTAVA; JOSHI; TRIVEDI, 2010).

A dificuldade de controle de *H. armigera* no Brasil se agrava devido ao complexo sistema agrícola com cultivos sucessivos, além da alta frequência de resistência a alguns inseticidas como piretroides em populações de *H. armigera* que colonizaram o Brasil (DURIGAN et al., 2017). Além disso, as múltiplas introduções de *H. armigera* no Brasil foram originárias do Paquistão, Índia, China e alguns países europeus (TAY et al., 2013; LEITE et al., 2014; ANDERSON et al., 2018), com histórico de diversos casos de resistência a inseticidas (ARMES et al., 1992; TONG et al., 2013; QAYYUM et al., 2015; AHMAD et al., 2019), resultando na busca pela utilização de novos inseticidas para o manejo da praga no país. Uma das opções tem sido o uso de inseticidas do grupo das espinosinas, devido ao mecanismo de ação distinto dos inseticidas tradicionais e à eficácia no controle de *H. armigera* (TARIQ; MALIK; IQBAL, 2005; GHOSH; CHATTERJEE; ROY, 2010).

As espinosinas são lactonas macrocíclicas isoladas de metabólitos secundários obtidos da fermentação de uma bactéria de solo *Saccharopolyspora spinosa* (Mertz and Yao) (SALGADO; SPARKS, 2005; SPARKS et al., 2012). Dentre as diferentes espinosinas isoladas e caracterizadas, apenas dois inseticidas foram comercializados até o presente momento. O primeiro inseticida foi o spinosad, que possui como ingrediente ativo uma mistura de ocorrência natural entre as espinosinas A (85%) e D (15%), lançado em 1997. O outro inseticida é o spinetoram,

composto por uma mistura de duas espinosinas semi-sintéticas, 3'-O-ethyl-5,6-dihydro-spynosin J (principal componente) e 3'-O-ethyl spynosin L, que foi registrado em 2007 e com um maior potencial de ação inseticida que spinosad (SALGADO; SPARKS, 2005; HUANG et al., 2009; SPARKS et al., 2012). Esses inseticidas apresentam grande importância no Manejo da Resistência a Inseticidas (MRI) por apresentarem modo de ação único, agindo como moduladores alostéricos aos receptores nicotínicos da acetilcolina e por apresentar características ambientais e toxicológicas favoráveis, que contribuem para sua utilização em programas de Manejo Integrado de Pragas (MIP) (THOMPSON; DUTTON; SPARKS, 2000; KIRST, 2010; PUINEAN et al., 2013).

Diversos casos de resistência de pragas a inseticidas espinosinas já foram reportados (ROE et al., 2010; MARKUSSEN; KRISTENSEN, 2012; ISHTIAQ; SALEEM; WRIGHT, 2012; REHAN; FREED, 2014; OKUMA et al., 2018; LIRA, 2018), incluindo a evolução da resistência de *H. armigera* a spinosad em condições de laboratório no Paquistão (AHMAD; ARIF; AHMAD, 2003; QAYYUM et al., 2015), Índia (KRANTHI; ALI; BANERJEE, 2000), na Austrália (GUNNING; BALFE, 2002) e na China (WANG et al., 2009), no entanto, apesar do uso frequente de espinosinas para o controle de *H. armigera* no Brasil, ainda não há relatos de casos de resistência.

Diante disso, para compreender o risco de evolução da resistência de *H. armigera* a espinosinas no Brasil visando a implementação de um programa proativo de MRI, foram realizados estudos para (i) acompanhar a suscetibilidade a espinosinas em populações de *H. armigera* coletadas em diferentes regiões e safras agrícolas de 2017 a 2019 do Brasil e (ii) selecionar uma linhagem resistente ao inseticida spinosad em condições de laboratório para compreender as bases genéticas associadas à resistência e a relação de resistência cruzada com spinetoram.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Fatores que afetam a evolução da resistência de *H. armigera* a inseticidas

A resistência é uma característica genética hereditária, intraespecífica, que possibilita o indivíduo e seus descendentes sobreviverem a doses de um inseticida que seriam letais para a maioria dos indivíduos na população (CROFT; VAN DE BAAN, 1988; FFRENCH-CONSTANT; ROUSH, 1990). A resistência de insetos a inseticidas é um problema permanente e em expansão no controle de pragas, em razão da resposta à pressão de seleção no ambiente, favorecendo o aumento da frequência dos indivíduos que apresentam esta característica genética (SPARKS; NAUEN, 2015; NAUEN et al., 2019; FFRENCH-CONSTANT; ROUSH, 1990). Para prevenir ou retardar o risco de evolução da resistência em condições de campo por meio da elaboração de estratégias de manejo, é essencial o conhecimento dos fatores que afetam a evolução da resistência, ou seja, os fatores genéticos e bioecológicos ligados a praga alvo e os fatores operacionais relativos ao produto químico e a sua utilização (GEORGHIOU; TAYLOR, 1977; ROUSH; MCKENZIE, 1987).

2.1.1. Fatores bioecológicos

Os fatores bioecológicos estão relacionados à biologia e à ecologia da praga alvo. No caso de *Helicoverpa armigera* (Hübner, 1808) (Lepidoptera: Noctuidae), trata-se de uma praga polífaga, sendo relatada em mais de 180 espécies de plantas cultivadas e silvestres (FITT, 1989; TAY et al., 2013), com destaque para elevadas infestações em culturas de importância econômica tais como soja, tomate e algodão. Possui ampla distribuição geográfica, presente na Europa, Ásia, África e Oceania (FITT, 1989; ANDERSON et al., 2018) e desde 2013 foi identificada em países do continente Americano, como Brasil (CZEPAK et al., 2013; SPECHT et al., 2013), Argentina (MURÚA et al., 2014), Porto Rico (NAPPO, 2014) e uma mariposa foi encontrada em armadilha de feromônio na Flórida, causando alerta nos Estados Unidos (NAPPO, 2015). Os adultos de *H. armigera* podem se dispersar com grande facilidade, pois apresentam movimento de longo alcance, podendo chegar de 1.000 a

2.000 km de distância auxiliado pelo vento (PEDGLEY, 1985; FARROW; DALY, 1987), permitindo a espécie se desenvolver em diferentes habitats, na busca por alimentação, acasalamento e oviposição, bem como ocasionar a disseminação de genes adaptativos, como aqueles para resistência a inseticidas (FARROW; DALY, 1987).

O sucesso de *H. armigera* como praga deve-se em parte ao seu ciclo de vida relativamente curto de 28-30 dias (COAKER, 1959; FITT, 1989), a rápida evolução da resistência a inseticidas e plantas *Bt* (BIRD; DOWNES, 2014; AHMAD et al., 2019) e a alta capacidade reprodutiva. A fecundidade dessa espécie é influenciada pela temperatura, umidade e nutrição no período larval, podendo ao longo de sua vida, a fêmea colocar de 1000 a 1500 ovos em um período de 12 a 15 dias, sempre de forma isolada, sobre talos, flores, frutos e folhas (EPPO, 1981; KARIM, 2000; RUAN; WU, 2001). Durante o período vegetativo da soja, as mariposas de *H. armigera* preferem ovipositar quase exclusivamente no terço superior do dossel das plantas, mas durante a fase reprodutiva da cultura, a oviposição ocorre próxima as flores e vagens (DUFFIELD; CHAPPLE, 2001), podendo influenciar na eficácia do inseticida.

O período larval é constituído por cinco a seis ínstarés e pode durar de duas a três semanas, dependendo das condições climáticas (ALI et al., 2009) e da qualidade da planta hospedeira, que pode refletir em um melhor desenvolvimento (SUZANA et al., 2015) e desempenho reprodutivo (RUAN; WU, 2001) como observado em soja e algodão. A fase de pupa ocorre no solo e geralmente em condições de baixa temperatura e clima seco, podem levar a espécie a entrar em diapausa por até 80 dias (FITT, 1989; KARIM, 2000). Todavia, devido a sua alta capacidade de sobrevivência, mesmo em condições ambientais adversas, pode completar várias gerações ao longo do ano e finalizar o seu ciclo de ovo a adulto no período de quatro a seis semanas (FITT, 1989).

2.1.2. Fatores genéticos

Os fatores genéticos que afetam a evolução da resistência estão relacionados a frequência inicial dos alelos de resistência, ao padrão de herança da resistência, ao valor adaptativo dos indivíduos resistentes e ao fluxo gênico (GEORGHIOU; TAYLOR, 1977). No início da evolução da resistência, devido ao custo adaptativo associado a resistência, estima-se que a frequência de alelos de resistência em uma população seja inicialmente baixa, na ordem de 10^{-13} a 10^{-2} (ROUSH; MCKENZIE,

1987), sendo recomendado o uso de concentrações diagnósticas ou discriminatórias para a detecção da resistência em programas de monitoramento, pois os indivíduos serão testados em uma dose informativa e nenhum indivíduo será desperdiçado em doses menores, onde a porcentagem de mortalidade não é relevante (ROUSH; MILLER, 1986; FFRENCH-CONSTANT; ROUSH, 1990).

O programa de monitoramento da suscetibilidade permite avaliar o risco de evolução da resistência ao longo do tempo, permitindo avaliar as alterações na suscetibilidade da praga ao inseticida antes que a frequência crítica de resistência seja atingida, assim como avaliar a eficácia de uma tática de manejo implementada e auxiliar no desenvolvimento de tomadas de decisões, visando retardar a evolução da resistência (ROUSH; MILLER, 1986; FFRENCH-CONSTANT; ROUSH, 1990; ANDOW, 2008).

Dentre os métodos utilizados no monitoramento da resistência de insetos a inseticidas destacam-se os métodos fenotípicos e os genotípicos. Os métodos fenotípicos podem detectar o genótipo, enquanto que os métodos genotípicos são capazes de detectar e quantificar o alelo da resistência (ANDOW, 2008). Os métodos fenotípicos são eficientes para o monitoramento da resistência de alelos aditivos ou dominantes em alta frequência na população, já os métodos genotípicos, como *F₁ Screen* ou *F₂ Screen* são capazes de estimar a frequência do alelo da resistência, mesmo quando ele se encontra em baixa frequência na população, tendo assim o alcance da detecção de alelos recessivos em populações de campo (GOULD et al., 1997; ANDOW; ALSTAD, 1998; ANDOW, 2008). O método de *F₁ Screen* consiste no uso de uma linhagem resistente já estabelecida, em contrapartida o método *F₂ Screen* apesar de ser mais laborioso, dispensa a utilização de uma linhagem resistente (ANDOW, 2008).

O padrão de herança da resistência refere-se ao modo de herança da resistência, se é autossômica ou não; ao grau da dominância, se é dominante ou recessiva, possibilitando compreender o fenótipo do heterozigoto em relação aos parentais homozigotos, podendo ser dominante se os heterozigotos se assemelharem fenotipicamente ao parental resistente ou recessivo se eles se assemelharem fenotipicamente ao parental suscetível. Diante disso, é extremamente importante conhecer a dominância da resistência para a elaboração e/ou refinamento das estratégias de manejo da resistência, pois no início do processo de evolução da resistência os heterozigotos são os principais carregadores dos alelos responsáveis

por conferir a resistência, uma vez que depois dos homozigotos suscetíveis são os indivíduos que ocorrem em maior número na população (GEORGHIOU; TAYLOR, 1977; ROUSH; MCKENZIE, 1987; ROUSH; DALY, 1990).

Além disso, o padrão de herança também fornece informações em relação ao número de genes associados à resistência, podendo ser monogênica quando conferida por um único gene, ou poligênica quando mais de um gene é responsável pelo fenótipo resistente (ROUSH; DALY, 1990; GEORGHIOU; TAYLOR, 1977). De modo geral, espera-se que a resistência poligênica desenvolva mais lentamente do que a resistência monogênica, devido a possibilidade de diluição dos genes durante os cruzamentos e os mecanismos envolvidos serem mais variados (ROUSH; MCKENZIE, 1987).

2.1.3. Fatores operacionais

Os fatores operacionais referem-se a todos os fatores que podem ser manipulados pelo homem, sendo dividido em dois grupos. O primeiro grupo consiste nas características do inseticida (grupo químico, persistência, seletividade e formulação) e o segundo grupo refere-se as características da aplicação (nível de controle, estágio de desenvolvimento da praga, dose, método de aplicação, grau de cobertura e dimensão da área tratada) (GEORGHIOU; TAYLOR, 1977).

Devido ao complexo sistema agrícola com cultivos sucessivos, a pressão de seleção com inseticidas tem sido alta para o controle de *H. armigera* no Brasil. Além disso, a frequência de resistência a alguns inseticidas como piretroides tem sido alta em populações de *H. armigera* que colonizaram o Brasil (DURIGAN et al., 2017). As múltiplas introduções de *H. armigera* no Brasil que foram originárias do Paquistão, Índia, China e alguns países europeus (TAY et al., 2013; LEITE et al., 2014; ANDERSON et al., 2018), com histórico de diversos casos de resistência a inseticidas (ARMES et al., 1992; TONG et al., 2013; QAYYUM et al., 2015; AHMAD et al., 2019), resultaram na busca pela utilização de novos inseticidas para o manejo da praga no país. Uma das opções tem sido o uso de inseticidas do grupo das espinosinas, devido ao mecanismo de ação distinto dos inseticidas tradicionais e à eficácia no controle de *H. armigera* (TARIQ; MALIK; IQBAL, 2005; GHOSH; CHATTERJEE; ROY, 2010).

2.2. Espinosinas

As espinosinas pertencem a uma classe de inseticida derivado inicialmente de compostos naturais, isolados de metabólitos secundários obtidos da fermentação de uma bactéria de solo *Saccharopolyspora spinosa* (Mertz and Yao) em meio de cultura (Actinomycetales: Pseudonocardiaceae) (SALGADO; SPARKS, 2005; SPARKS et al., 2012). Estruturalmente, esses compostos são lactonas macrocíclicas, formados por um anel tetracíclico ligado a duas moléculas de açúcares diferentes, sendo a forosamine e a rhammose (THOMPSON; DUTTON; SPARKS, 2000). Dentre as diferentes espinosinas isoladas e caracterizadas, além dos análogos sintéticos e semissintéticos produzidos em laboratório (SALGADO; SPARKS, 2005) apenas dois inseticidas a base de espinosinas foram comercializados até o presente momento. O primeiro inseticida, o spinosad, foi lançado em 1997 e possui como ingrediente ativo uma mistura de ocorrência natural entre as espinosinas A (85%) e D (15%). Por outro lado, o inseticida spinetoram, é composto por uma mistura de duas espinosinas semi-sintéticas, 3'-O-ethyl-5,6-dihydro-spynosin J (principal componente) e 3'-O-ethyl spynosin L, sendo registrado em 2007, apresentando um maior potencial de ação inseticida do que spinosad (HUANG et al., 2009; SPARKS et al., 2012). Estes compostos são utilizados na agricultura contra diversas espécies de insetos-praga, principalmente das Ordens Lepidoptera, Thysanoptera, Diptera e Coleoptera (SUBRAMANYAM et al., 2007; EL-AW et al., 2008; ALLAL-BENFEKIH et al., 2013).

Os inseticidas spinosad e spinetoram apresentam grande importância no manejo integrado de pragas (MIP) e no manejo da resistência de insetos (MRI), por possuírem características ambientais e toxicológicas favoráveis, apresentarem baixa toxicidade a insetos benéficos e modo de ação único (THOMPSON; DUTTON; SPARKS, 2000; KIRST, 2010). Essas moléculas atuam em segmentos específicos de receptores de acetilcolina, agindo como moduladores alostéricos de receptores nicotínicos da acetilcolina (nAChR) (PUINEAN et al., 2013). As espinosinas ativam os nAChR induzindo o impulso nervoso continuamente e por se ligarem em um sítio alostérico ao da acetilcolina, diferem do mecanismo de ação dos neonicotinoides (SPARKS et al., 2012). Como resultado, os insetos tratados com esses inseticidas, apresentam como sintomas iniciais contrações musculares involuntárias e tremores pela excitação de neurônios motores por efeito direto das espinosinas no sistema nervoso central. Contudo, após longos períodos de excitação induzidos pelo ativo, os

insetos ficam paralisados, aparentemente devido à fadiga muscular e consequentemente ocorre a morte do indivíduo (SALGADO, 1998; SALGADO et al., 1998).

Para as espinosinas atualmente existem relatos de resistência a spinosad para 27 espécies e de apenas 4 espécies para spinetoram (ARTHROPOD PESTICIDE RESISTANCE DATABASE, 2019), sendo alguns representados por: *Leptinotarsa decemlineata* (MOTA-SANCHEZ et al., 2006), *Chloridea virescens* (ROE et al., 2010), *Musca domestica* (MARKUSSEN; KRISTENSEN, 2012), *Spodoptera exigua* (ISHTIAQ; SALEEM; WRIGHT, 2012), *Spodoptera litura* (REHAN; FREED, 2014), *Tuta absoluta* (CAMPOS et al., 2014), *Frankliniella occidentalis* (WANG et al., 2016) e recentemente, estudos realizados no Brasil constataram a resistência de linhagens de *Spodoptera frugiperda*, selecionadas em laboratório, com razão de resistência de aproximadamente 890 vezes para spinosad e de 1844 vezes para spinetoram (OKUMA et al., 2018; LIRA, 2018).

Em relação aos casos de resistência a espinosinas, o mecanismo mais comum de resistência está associado à mutação no sítio de ação, seguido da detoxificação metabólica (SPARKS et al., 2012). De maneira geral, estudos mostram que a resistência a spinosad pode estar associada a subunidade $\alpha 6$ do receptor nicotínico de acetilcolina, (WANG; TSAI; CHEN, 2018; UREÑA et al., 2019), conforme verificado em estudos com *Drosophila melanogaster* (PERRY; MCKENZIE; BATTERHAM, 2007; WATSON et al., 2010), *P. xylostella* (BAXTER et al., 2010) e *T. absoluta* (SILVA et al., 2016) cujas linhagens resistentes não foram afetadas pelos sinergistas. No entanto, Scott (2008) e Okuma (2015) em estudos com *M. domestica* e *S. frugiperda* resistentes a spinosad, sugerem que outras regiões do sítio de ação podem estar envolvidas e que a subunidade $\alpha 6$ do nAChR não seria o único alvo relacionado à resistência. Outros estudos apontam para a presença de mecanismo de detoxificação metabólica (MARKUSSEN; KRISTENSEN, 2012; SPARKS et al., 2012; AHMAD et al., 2019) como verificado em *Spodoptera litura* resistente a spinosad (RR = 3.921vezes), após ser tratada com o sinergista butóxido de piperonila (PBO), aumentou a toxicidade de spinosad para 2,33 vezes (REHAN; FREED, 2014) e similarmente um estudo com *H. armigera* mostrou que a resistência a spinosad pode estar associada com o aumento das enzimas monooxigenases do grupo das P450 (WANG et al., 2009). Contudo, ambos mecanismos podem ocorrer concomitantemente, conforme demonstrado por Bao et al. (2014) em *Thrips palmi*, onde a resistência a spinosad é conferida pela

subunidade $\alpha 6$ do nAChR e pela detoxificação mediada por enzimas monooxigenases do grupo das P450.

Pelo fato de spinosad e spinetoram pertencerem ao mesmo grupo químico e apresentarem o mesmo mecanismo de ação, muitos estudos relatam que os insetos resistentes a spinosad possuem resistência cruzada ao spinetoram e a outras espinosinas, como foi observado em *T. absoluta* (CAMPOS et al., 2014) e *D. melanogaster* (WATSON et al., 2010). Entretanto, apesar de haver poucos relatos da existência de resistência cruzada entre espinosinas a outros grupos de inseticidas (SPARKS et al., 2012), recentemente um estudo com *P. xylostella* resistente a spinosad verificou resistência cruzada a chlorfenapyr além de spinetoram, possivelmente relacionado ao mesmo mecanismo de detoxificação metabólica (LIMA NETO et al., 2016).

2.3. Casos de resistência de *H. armigera* a inseticidas

De acordo com o banco de dados da Michigan State University, para *H. armigera* existem registros de 856 casos de resistência distribuídos em 421 locais e associados a 48 ingredientes ativos diferentes (ARTHROPOD PESTICIDE RESISTANCE DATABASE, 2019). Inúmeros casos de resistência de *H. armigera* a inseticidas têm sido reportados principalmente nos seguintes países: Austrália, China, Índia, Paquistão e Espanha (FORRESTER, 1993; GUNNING; BALFE, 2002; AHMAD et al., 2003; WU; GUO, 2005; BIRD, 2015; QAYYUM et al., 2015).

Na Austrália, *H. armigera* possui um longo histórico de resistência a DDT (WILSON, 1974; GOODYER et al., 1975; GOODYER; GREENUP, 1980), piretroides (GUNNING et al., 1984), carbamatos (GUNNING et al., 1992), organofosforados (GOODYER; GREENUP, 1980) e ciclodienos (GUNNING; EASTON, 1994). Além dos grupos inseticidas citados anteriormente, recentemente tem sido relatado resistência de *H. armigera* a novas moléculas inseticidas, como fipronil, indoxacarb e flubendiamide, dificultando ainda mais o controle químico dessa espécie (AHMAD et al., 2003; WU, 2007; ABBADE NETO et al., 2018). A resistência a spinosad já foi reportada no Paquistão (AHMAD; ARIF; AHMAD, 2003; ALVI et al., 2012; QAYYUM et al., 2015), Índia (KRANTHI; ALI; BANERJEE, 2000), Austrália (GUNNING; BALFE, 2002) e na China (WANG et al., 2009), com razões de resistência que variam de 5 a 25 vezes.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Coletas de *Helicoverpa armigera*

As populações de *H. armigera* foram coletadas em culturas de algodão e soja (não-Bt) das safras agrícolas de 2017 a 2019 cultivadas nas principais regiões produtoras dos estados da Bahia, Goiás, Mato Grosso do Sul, Mato Grosso e São Paulo (Tabela 1, Figura 1). Para cada população foram coletadas cerca de 800-1000 lagartas em campo e encaminhadas ao Laboratório de Resistência de Artrópodes da USP/Esalq para posterior triagem, criação e realização dos bioensaios toxicológicos de suscetibilidade. Com o intuito de confirmar se as populações provenientes do campo eram realmente *H. armigera*, foi conduzida a identificação molecular para distinguir *Helicoverpa armigera* de *Helicoverpa zea*, por meio da técnica de PCR-RFLP, descrita por Behere et al. (2007).

Tabela 1. Populações coletadas para o monitoramento da suscetibilidade de *Helicoverpa armigera* para os inseticidas spinosad e spinetoram.

Safras	Código da população	Município	Latitude	Longitude	Cultura	Data de coleta
<i>Safra</i> 2013/2014	SUS	Luís Eduardo Magalhães-BA	12° 05' 58"	45° 47' 54"	Feijão	jun/13
	BA-76	Barreiras-BA	12° 09' 10"	44° 59' 24"	Algodão	abr/17
	GO-09	Mineiros-GO	18° 37' 18"	52° 52' 57"	Algodão	mai/17
<i>2ª Safra</i> 2016/2017	MS-09	Chapadão do Sul-MS	18° 44' 54"	52° 35' 44"	Algodão	mai/17
	MT-28	Juscimeira-MT	16° 21' 10"	55° 02' 48"	Algodão	mai/17
	MT-29	Sapezal-MT	13° 08' 43"	58° 36' 24"	Algodão	mai/17
	SP-23	Pilar do Sul - SP	23° 49' 31"	47° 45' 38"	Soja	abr/17
<i>1ª Safra</i> 2017/2018	BA-77	Luís Eduardo Magalhães-BA	12° 07' 01"	45° 49' 56"	Soja	jan/18
	MT-30	Campo Verde - MT	17° 04' 24"	54° 14' 45"	Soja	jan/18
	SP-24	Leme - SP	22° 07' 41"	47° 20' 28"	Soja	jan/18
<i>2ª Safra</i> 2017/2018	BA-78	Luís Eduardo Magalhães-BA	11° 46' 34"	45° 43' 44"	Algodão	jun/18
	GO-11	Mineiros-GO	17° 53' 14"	53° 02' 35"	Algodão	jul/18
	MS-11	Chapadão do Sul-MS	18° 48' 01"	52° 40' 04"	Algodão	jul/18
	MT-32	Sapezal-MT	12° 09' 45"	58° 10' 48"	Algodão	jun/18
	MT-33	Primavera do Leste-MT	15° 45' 58"	54° 20' 19"	Algodão	jun/18
<i>1ª Safra</i> 2018/2019	BA-79	Roda Velha - BA	12° 45' 00"	46° 02' 25"	Soja	dez/18
	GO-12	Mineiros-GO	18° 14' 22"	53° 04' 15"	Soja	dez/18
	MT-34	Sapezal-MT	13° 27' 55"	58° 55' 13"	Soja	jan/19

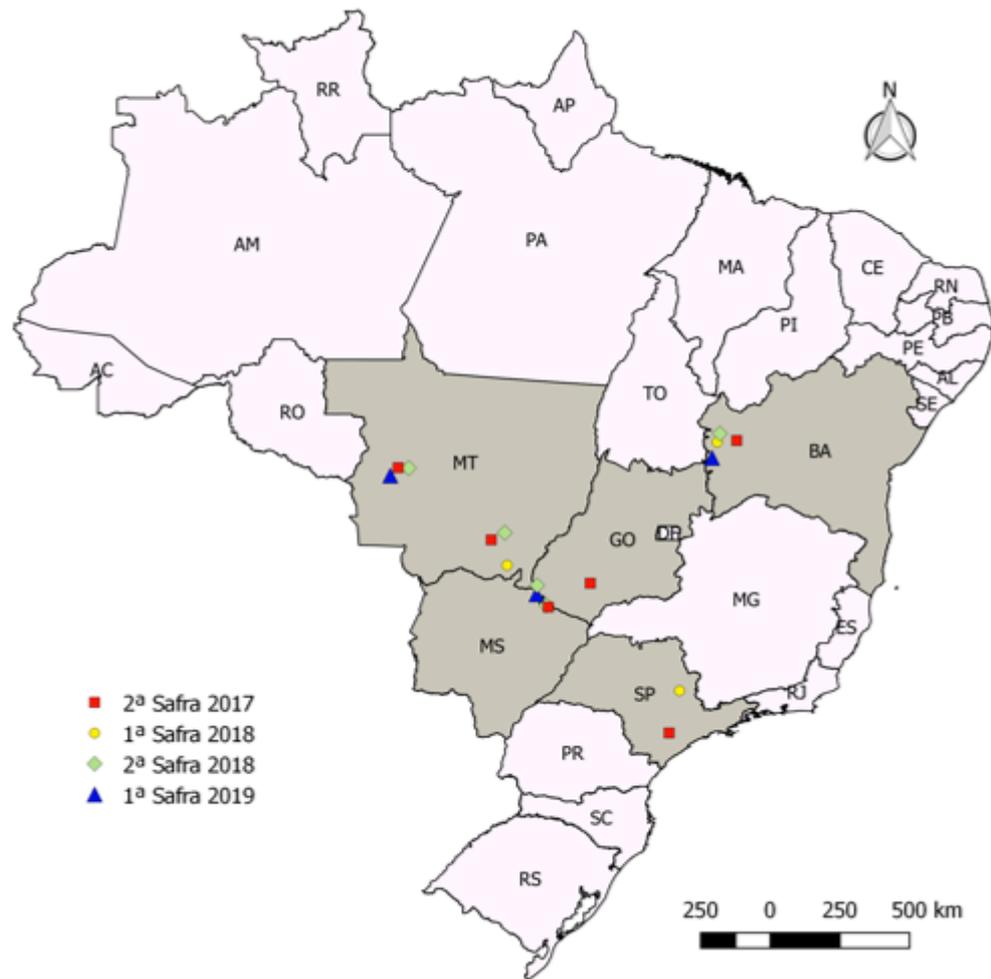


Figura 1. Distribuição das populações de *Helicoverpa armigera* coletadas nas safras dos anos de 2017 a 2019.

3.2. Criação e manutenção das populações de *Helicoverpa armigera*

No laboratório, as lagartas provenientes do campo foram inoculadas individualmente em copos plásticos (50 mL) contendo dieta artificial adaptada de Greene et al. (1976) e mantidas em sala de criação a temperatura de $25\pm 1^{\circ}\text{C}$, umidade relativa (UR) de $70\pm 10\%$ e fotofase de 14 horas até a fase de pupa. As pupas obtidas foram retiradas da dieta com auxílio de uma pinça, higienizadas com solução de sulfato de cobre a 6,5% e acondicionadas em gaiolas cilíndricas de PVC (30 cm altura \times 25 cm de diâmetro), revestidas internamente com papel jornal e fechadas na parte superior com tecido tipo tule, servindo como substrato de oviposição para os adultos.

Cada população foi constituída de no mínimo 40 casais por gaiola. Os adultos foram alimentados com uma solução aquosa de mel a 10% e as gaiolas mantidas nas mesmas condições laboratoriais citadas anteriormente. A cada dois dias as posturas foram retiradas e os materiais utilizados (tubo, papel jornal, tule e solução de mel) trocados. As posturas contidas no papel jornal e no tule foram recortadas e acondicionadas em copos plásticos transparentes (75 mL) com dieta artificial, sendo mantidos em sala climatizada regulada à temperatura de 25°C e fotofase 14h. As lagartas ao atingirem o terceiro ínstar foram utilizadas na realização dos bioensaios toxicológicos e o restante encaminhadas para a manutenção da criação.

3.3. Monitoramento da suscetibilidade de *H. armigera* a espinosinas

O monitoramento da suscetibilidade de populações de *H. armigera* ao inseticida spinosad (Tracer®, Dow AgroSciences) (480 g i.a./L) e ao inseticida spinetoram (Exalt®, Dow AgroSciences) (120 g i.a./L) foram realizados durante as safras agrícolas de 2017 a 2019, totalizando 17 populações monitoradas (Tabela 1), conforme descrito no item 3.1. Para cada inseticida utilizou-se a dose diagnóstica (DL₉₉) estimada através da análise conjunta dos dados de mortalidade obtidos a partir das linhas-básicas de suscetibilidade realizadas anteriormente por Pereira (2017), sendo para o inseticida spinosad a DL₉₉ de 3,03 (2,73 - 3,41) µg i.a./cm² e para o spinetoram a DL₉₉ de 0,97 (0,87 - 1,09) µg i.a./cm².

O método de bioensaio utilizado foi de ingestão, com tratamento superficial da dieta artificial com o inseticida. A unidade experimental foi constituída de placas de acrílico de 24 células (Costar®, Cambridge, Massachusetts, EUA) contendo 1,25 mL de dieta artificial por célula. Após a geleificação da dieta foram aplicados 30 µL da solução inseticida na dose testada (DL₉₉), utilizando uma pipeta eletrônica de repetição. Os inseticidas foram diluídos em água destilada com a adição de surfactante Triton® na concentração de 0,1%. O tratamento controle foi realizado apenas com água destilada e o surfactante Triton® na concentração de 0,1%. Para secagem da solução inseticida as placas foram mantidas em câmara de fluxo laminar. Posteriormente, lagartas de terceiro ínstar foram inoculadas individualmente em cada célula com o auxílio de uma pinça. Para o fechamento das placas foram utilizadas transparências plásticas perfuradas e as próprias tampas das placas, de

forma a evitar a condensação da mesma. Em seguida, foram mantidas dentro de câmaras climatizadas com temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$ e fotofase de 14h.

Cada população monitorada foi constituída de dez repetições com no mínimo 240 lagartas testadas por produto e após 48h realizou-se as avaliações para ambos os inseticidas, utilizando como critério de mortalidade os indivíduos mortos e sem movimento aparente ao serem tocados nos últimos segmentos abdominais com uma pinça. Os dados de sobrevivência do monitoramento foram submetidos ao modelo linear generalizado com a função GLM do pacote *stats* no programa R Studio (RStudio Team, 2015). Devido a inflação de zeros na avaliação dos dados, foi testado no modelo duas distribuições (Binomial e Quasi-Binomial), sendo que elas foram avaliadas com a função *hnp* do pacote *hnp* (MORAL; HINDE; DEMÉTRIO, 2017), para verificar o melhor envelopamento do ajuste do modelo. Após a identificação da melhor distribuição para o ajuste do modelo, foi utilizada a função *glht* do pacote *multcomp* (HOTHORN; BRETZ; WESTFALL, 2008), utilizando o teste de Tukey ($p \leq 0,05$) para a comparação das sobrevivências das diferentes regiões monitoradas. Todas as populações testadas foram comparadas com a suscetível de referência BA33 (Sus), com o propósito de avaliar a suscetibilidade aos inseticidas spinosad e spinetoram desde a detecção de *H. armigera* no Brasil. Esta população foi coletada no estado da Bahia (Tabela 1) na época do relato oficial de *H. armigera* no Brasil em 2013, sendo considerada nosso padrão de suscetibilidade a inseticidas, com mais de 45 gerações em laboratório na ausência de pressão de seleção.

3.4. Linhagem de *H. armigera* suscetível a spinosad

A linhagem suscetível de referência (Sus) foi a primeira população obtida quando *H. armigera* foi oficialmente detectada no Brasil, em 2013. Essa população foi coletada na cultura do feijão, no município de Luís Eduardo Magalhães, no estado da Bahia (Tabela 1) e desde então, vem sendo mantida no Laboratório de Resistência de Artrópodes (USP/ ESALQ) na ausência de pressão de seleção a inseticidas por mais de 45 gerações.

A manutenção da linhagem Sus de *H. armigera* em laboratório foi realizada com a utilização de dieta artificial adaptada de Greene et al. (1976) na fase larval. Ao atingirem a fase de pupa, foram retiradas da dieta com auxílio de uma pinça, higienizadas com solução de sulfato de cobre a 6,5% e acondicionadas em gaiolas

cilíndricas de PVC (30 cm altura x 25 cm de diâmetro), revestidas internamente com papel jornal e fechadas na parte superior com tecido tipo tule, servindo como substrato de oviposição para os adultos, os quais foram alimentados com uma solução aquosa de mel a 10%. As gaiolas foram mantidas em condições laboratoriais ($25\pm 1^\circ\text{C}$, UR $70\pm 10\%$ e fotofase de 14h), a cada dois dias as posturas foram retiradas e os materiais utilizados (papel jornal, tule e solução de mel) trocados. As posturas contidas no papel jornal e no tule foram recortadas e acondicionadas em copos plásticos transparentes (75 mL) com dieta artificial, sendo mantidos em sala climatizada regulada à temperatura de 25°C e fotofase de 14h. Ao atingirem o terceiro ínstar, as lagartas da linhagem Sus foram individualizadas em copos plásticos de 50 mL com dieta artificial até a fase de pupa, iniciando o processo novamente.

3.5. Seleção e caracterização da linhagem de *H. armigera* resistente à spinosad

Para a seleção da linhagem resistente de *H. armigera* a spinosad, visou-se algumas populações de campo que apresentaram sobrevivências no monitoramento durante a segunda safra de 2017 a este inseticida. Inicialmente, por meio do método de seleção massal, foi conduzida a seleção para cada população, com uma dose de $0,88 \mu\text{g i.a./cm}^2$ do inseticida spinosad, pois estudos preliminares de curva dose-resposta conduzidos em laboratório com a linhagem Sus resultou em 100% de mortalidade para esta dose. Sendo assim, apesar de ser menor que a dose diagnóstica (DL_{99}) de $3,03 \mu\text{g i.a./cm}^2$, a dose inicialmente testada, foi utilizada a princípio além de selecionar também para aumentar o número de indivíduos sobreviventes, possibilitando a manutenção da população em laboratório. No entanto, em resposta a pressão de seleção em condições de laboratório, apenas a população de campo (MT28), coletada na segunda safra de 2017 na cultura do algodão, no município de Juscimeira - Mato Grosso (Tabela 1) apresentou maior DL_{50} após três gerações sob pressão de seleção, desse modo, esta foi utilizada para fins de seleção ao inseticida spinosad. Logo após, realizou-se nas gerações seguintes sucessivamente o aumento das doses distribuídas logaritmicamente e a partir da sétima geração sob pressão de seleção, esta linhagem foi mantida na dose

diagnóstica (DL₉₉), até que todas as lagartas tratadas sobrevivessem, denominando essa linhagem resistente como Spin-R.

A manutenção da linhagem resistente de *H. armigera* a spinosad (Spin-R) foi realizada utilizando os mesmos procedimentos descritos no item 3.4., diferindo quando atingiam o terceiro ínstar, sendo submetidas aos bioensaios de ingestão com o inseticida spinosad, utilizando-se a dose definida da seleção. Após 48 horas, as lagartas sobreviventes foram resgatadas e inoculadas individualmente em copos plásticos de 50 mL com dieta artificial sem inseticida, sendo mantidas até a fase de pupa, e como mencionado anteriormente, as pupas foram retiradas e desifecadas, e os adultos acondicionados em gaiolas para o acasamento e oviposição.

Para verificar a evolução da resistência em resposta a pressão de seleção de *H. armigera* a spinosad em condições de laboratório, realizou-se a caracterização da resistência após três e doze gerações sob pressão de seleção. Após três gerações utilizou-se para a linhagem Sus e Spin-R de 6 a 8 doses distribuídas logaritmicamente de spinosad, variando de 0,028 a 1,570 µg i.a./cm². Após doze gerações sobre pressão de seleção, para a linhagem Sus foram utilizadas de 6 a 8 doses distribuídas logaritmicamente de spinosad, variando de 0,028 a 0,884 µg i.a./cm² e para a linhagem Spin-R utilizou-se de 6 a 8 doses variando de 0,884 a 28,421 µg i.a./cm². Em ambas as gerações, as diferentes doses foram realizadas a partir da diluição do inseticida spinosad (Tracer[®], Dow AgroSciences) (480 g a.i./L) em água destilada, com adição de surfactante Triton[®] na concentração de 0,1%, para facilitar a cobertura uniforme do ingrediente ativo sobre a superfície da dieta. O tratamento controle foi realizado apenas com água destilada e o surfactante Triton[®] na concentração de 0,1%. Os bioensaios foram realizados em placas de acrílico de 24 células (Costar[®], Cambridge, Massachusetts, EUA) contendo 1,25 mL de dieta artificial por célula. Após a geleificação da dieta, em cada célula foram aplicados 30 µL da solução inseticida sobre a superfície da dieta, referente a dose do inseticida a ser testada. Posteriormente a secagem das placas, lagartas de terceiro ínstar foram inoculadas individualmente em cada célula com o auxílio de uma pinça, totalizando no mínimo 48 lagartas testadas em cada dose. Para o fechamento das placas foram utilizadas transparências plásticas perfuradas e as próprias tampas das placas, de forma a evitar a condensação da mesma. Em seguida, foram acondicionadas em câmara climatizada com temperatura de 25± 2°C e fotofase de 14h. A mortalidade foi avaliada após 48 h, utilizando como critério os indivíduos mortos e sem

movimento aparente ao serem tocados nos últimos segmentos abdominais com uma pinça. Os dados de mortalidade foram submetidos à análise de Probit no programa Polo-Plus (LeOra-Software, 2002) para a estimativa das doses letais (DL₅₀ e DL₉₀), intervalo de confiança (IC% 95) e o coeficiente angular para ambas as linhagens. A razão de resistência foi estimada por meio da divisão da DL₅₀ da linhagem resistente (Spin-R) pela DL₅₀ da linhagem suscetível (Sus).

3.6. Padrão de herança da resistência de *H. armigera* a spinosad

Para a determinação do padrão de herança da resistência de *H. armigera* a spinosad, foram realizados os cruzamentos recíprocos entre as linhagens Sus e Spin-R para a obtenção dos heterozigotos, sendo H1 (♂ Spin-R × ♀ Sus) e H2 (♀ Spin-R × ♂ Sus). Para isso, as pupas das linhagens Sus e Spin-R foram separadas por sexo, higienizadas com solução a 0,5% de sulfato de cobre e individualizadas em copos plásticos (50 mL) sobre bandejas (30 x 40 cm), contendo papel filtro umedecido com água destilada até a emergência dos adultos. Após a emergência, quarenta casais de cada cruzamento foram transferidos para gaiolas de PVC (30 cm altura x 25 cm de diâmetro) permitindo o acasalamento e oviposição. As progênes dos cruzamentos recíprocos (geração F1) foram submetidas a bioensaios de curvas dose-resposta a spinosad para a estimativa da DL₅₀, seguindo a mesma metodologia descrita no item 3.5. A possibilidade de a resistência ser autossômica ou não, foi verificada mediante a análise dos resultados obtidos nos cruzamentos recíprocos.

3.6.1. Dominância da resistência

O grau de dominância foi estimado com base nos bioensaios dose-resposta da geração F₁ e linhagens parentais (Spin-R e Sus), de acordo com o método descrito por Stone (1968).

$$D = \frac{(2X_F - X_R - X_S)}{(X_R - X_S)}$$

Onde: os coeficientes X_F , X_R e X_S são os logaritmos das DL₅₀ estimadas a partir das linhagens heterozigotas F1 (♂ Spin-R × ♀ Sus e ♀ Spin-R × ♂ Sus), linhagem resistente (Spin-R) e linhagem suscetível (Sus), respectivamente. Nesta

análise, os valores de D podem variar de -1 a 1, sendo: (D = -1) completamente recessiva, (-1 < D < 0) incompletamente recessiva, (0 < D < 1) incompletamente dominante e (D =1) completamente dominante.

Os dados também foram analisados pelo método proposto por Bourguet et al. (2000):

$$D = \frac{M_{RS} - M_{SS}}{M_{RR} - M_{SS}}$$

Sendo: M_{RR} , M_{SS} e M_{RS} as mortalidades da linhagem resistente, suscetível e heterozigoto, respectivamente. Nesta análise, os valores de D podem variar de 0 a 1, sendo que valores próximos a 0 considera-se como completamente recessiva e para valores próximos a 1 como completamente dominante.

3.6.2. Número de genes associados com a resistência

Para a estimativa do número de genes associados com a resistência de *H. armigera* a spinosad, foram realizados retrocruzamentos da progênie F₁ (heterozigotos) com o parental fenotipicamente mais distinto de F₁, neste caso com indivíduos da linhagem Sus, formando os seguintes retrocruzamentos (♂ Sus × ♀ H1; ♀ Sus × ♂ H1; ♂ Sus × ♀ H2; ♀ Sus × ♂ H2) (TSUKAMOTO, 1983; ROUSH; DALY, 1990).

Para isso, pupas dos heterozigotos e da linhagem suscetível foram separadas por sexo e individualizadas. Após a emergência, quarenta casais de cada retrocruzamento foram transferidos para gaiolas de PVC (30 cm altura × 25 cm de diâmetro) permitindo o acasalamento e oviposição. As progênies dos retrocruzamentos foram submetidas a bioensaios utilizando uma dose suficiente para matar todos indivíduos da linhagem Sus (0,884 µg i.a./cm²), parental fenotipicamente mais distinto, seguindo a mesma metodologia descrita no item 3.5. Após os dados obtidos, a possibilidade de a herança ser monogênica foi avaliada a partir do teste de qui-quadrado (SOKAL; ROHLF, 1995), dado pela seguinte equação:

$$\chi^2 = \frac{(Ni - pni)^2}{pqni}$$

A variável N_i representa a mortalidade observada na dose i , p a mortalidade esperada, calculada a partir do modelo mendeliano (GEORGHIU, 1969), ni o número de indivíduos testados, $q = 1 - p$ e $p = (a+b)/2$. Sendo: a = porcentagem de mortalidade da linhagem heterozigota e b = porcentagem de mortalidade da linhagem parental (Sus) determinada na dose testada.

A hipótese de herança monogênica foi rejeitada quando o χ^2 calculado $\geq \chi^2$ tabelado a 1 grau de liberdade, aceitando a hipótese de herança poligênica.

Para estimar o número de *loci* relacionados a resistência de *H. armigera* a spinosad foi utilizado o método proposto por Lande (1981), seguindo a equação abaixo, que estima o número mínimo de fatores genéticos (n_e) que contribuem em caráter quantitativo para a diferenciação de duas populações por algum tipo de seleção.

$$n_e = \frac{(X_{RR} - X_{SS})^2}{8\sigma_S^2}$$

X_{RR} e X_{SS} correspondem ao \log_{10} da DL_{50} da Res e Sus, respectivamente. E σ_S^2 correspondem as variações fenotípicas dos retrocruzamentos 1 e 2, da linhagem heterozigota F_1 e das linhagens Res e Sus, estimados de acordo com Lande (1981) pelo inverso do coeficiente angular ao quadrado: $\sigma_S^2 = \sigma_{B1}^2 + \sigma_{B2}^2 - [\sigma_{B1}^2 - 0,5 \sigma_{RR}^2 + 0,5 \sigma_{SS}^2] - \sigma_{B1}^2, \sigma_{B2}^2, \sigma_{RR}^2$ e σ_{SS}^2

3.7. Resistência cruzada com spinetoram

Para avaliar o potencial da linhagem de *H. armigera* resistente a spinosad (Spin-R) apresentar resistência cruzada a spinetoram (Exalt[®], Dow AgroSciences) (120g i.a./L) foram conduzidos bioensaios de curvas dose-resposta para a caracterização da suscetibilidade das linhagens Sus e Spin-R a este inseticida, utilizando o método de bioensaio descrito no item 3.5. Para o inseticida spinetoram, na linhagem Sus foram testadas de 8 a 10 doses, variando de 0,005 a 0,284 μg i.a./ cm^2 e para a linhagem Spin-R foram testadas de 6 a 8 doses, variando de 0,015 a 2,842 μg i.a./ cm^2 . As razões de resistência para cada inseticida foram calculadas pela divisão da DL_{50} da linhagem Spin-R pela DL_{50} da linhagem Sus.

4. RESULTADOS

4.1. Monitoramento da suscetibilidade de *H. armigera* a espinosinas

O monitoramento da suscetibilidade realizado de 2017 a 2019 com o inseticida spinosad demonstrou que as populações de campo de *H. armigera* apresentaram alta suscetibilidade, com pequenas variações ao longo das safras agrícolas. Foi utilizada a dose diagnóstica ($3,03 \mu\text{g i.a./cm}^2$). Como referencial de suscetibilidade, utilizou-se a população BA33 (Sus), pois foi a primeira população coletada em 2013, ano da detecção oficial de *H. armigera* no Brasil, apresentando $1,25 \pm 0,68\%$ de sobrevivência para o inseticida (PEREIRA, 2017) e vem sendo mantida em laboratório por mais de 45 gerações, sem pressão de seleção. As populações monitoradas a partir da segunda safra de 2017 apresentaram alta suscetibilidade, com sobrevivências entre 0,0% para as populações do estado de Goiás (GO09) e São Paulo (SP23); $1,55 \pm 0,23\%$ para a população do Mato Grosso do Sul (MS09); $1,81 \pm 0,18\%$ e $3,23 \pm 0,54\%$ para a população de Mato Grosso (MT28 e MT29) a $3,88 \pm 0,45\%$ para a população da Bahia (BA76). Na primeira e segunda safra de 2018 novamente a população coletada no estado de Goiás (GO11) foi a mais suscetível, com 0,0% de sobrevivência e a população da Bahia (BA77) foi a menos suscetível, com $1,3 \pm 0,23\%$ em relação as demais populações monitoradas, que apresentaram média de sobrevivência de 1%, sendo esta a mesma média observada nas populações monitoradas na primeira safra de 2019. De acordo com teste de Tukey ($p > 0,05$) nenhuma população testada diferiu significativamente da população suscetível de referência (Sus) (Figura 2).

Para o inseticida spinetoram, as populações de *H. armigera* monitoradas apresentaram alta suscetibilidade ao longo das safras agrícolas de 2017 a 2019. Foi utilizada a dose diagnóstica ($0,97 \mu\text{g i.a./cm}^2$), e a população suscetível de referência (Sus) apresentou $0,83 \pm 0,58\%$ de sobrevivência para o inseticida em 2013 (PEREIRA, 2017). A partir da segunda safra de 2017, apenas a população monitorada no estado da Bahia (BA76) apresentou sobrevivência da praga ($0,52 \pm 0,12\%$) e na primeira e segunda safra de 2018, a sobrevivência variou entre as regiões testadas de 0,0% para BA78, GO11, MT32 e SP24 a $0,8 \pm 0,13\%$ para populações do estado do Mato Grosso (MT30 e MT33). Na primeira safra de 2019

a maior sobrevivência ($\approx 2\%$) também foi verificada na região do Mato Grosso (MT34). Desta forma, nenhuma população testada diferiu significativamente da Sus, de acordo com teste de Tukey ($p > 0,05$) (Figura 3).

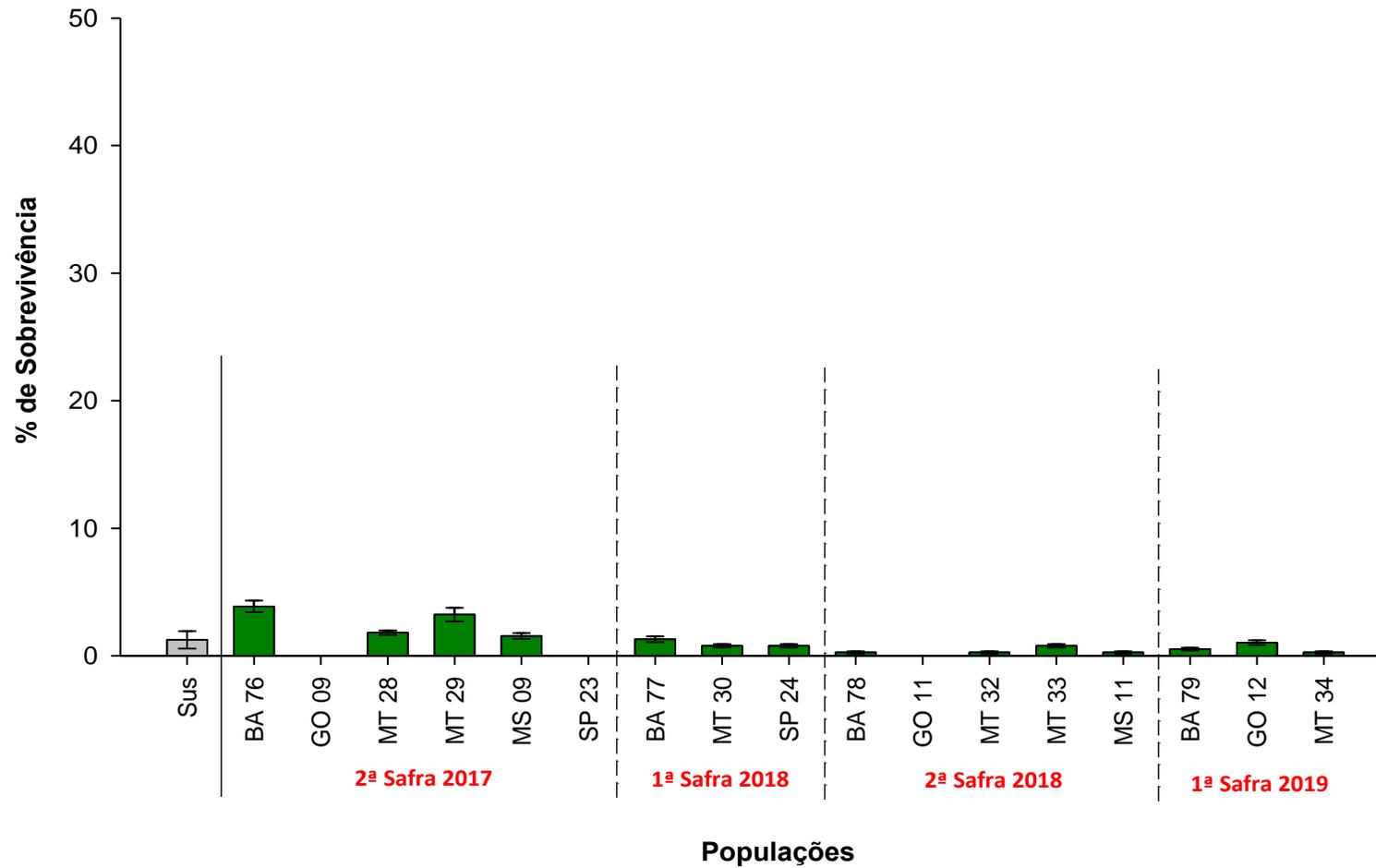


Figura 2. Sobrevivência larval de populações de *Helicoverpa armigera* coletadas em diferentes regiões produtoras nas safras de 2017 a 2019, monitoradas com bioensaios de ingestão com o inseticida spinosad na concentração de 3,03 µg i.a./cm². Médias (± erro padrão), n=240 lagartas; Sus = Referencial de Suscetibilidade.

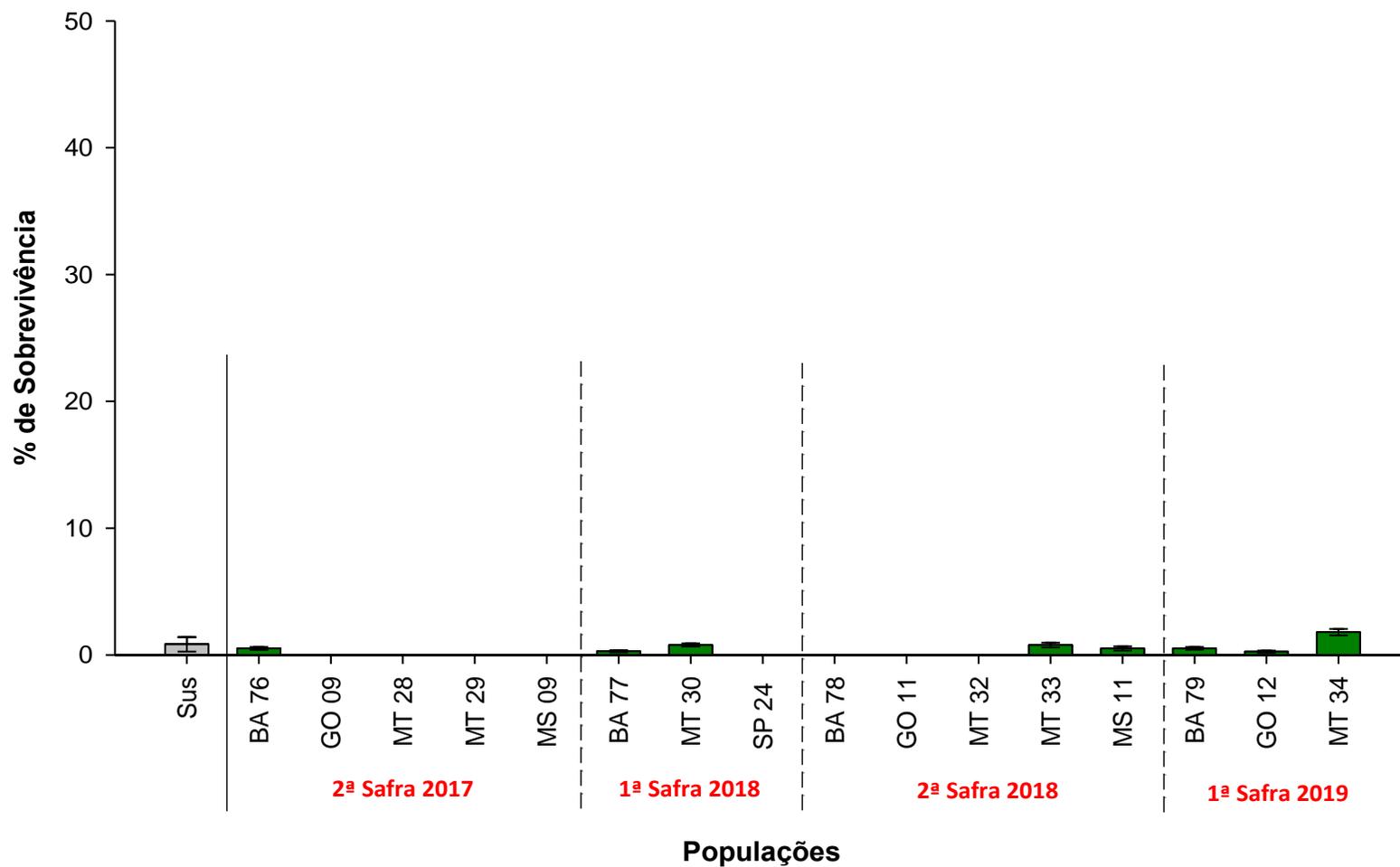


Figura 3. Sobrevivência larval de populações de *Helicoverpa armigera* coletadas em diferentes regiões produtoras nas safras de 2017 a 2019, monitoradas com bioensaios de ingestão com o inseticida spinetoram na concentração de 0,97 μg i.a./ cm^2 . Médias (\pm erro padrão); n=240; Sus = Referencial de Suscetibilidade.

4.2. Seleção e caracterização da linhagem de *H. armigera* resistente a spinosad

Em resposta a pressão de seleção em condições de laboratório, a linhagem resistente a spinosad (Spin-R) apresentou após três gerações (F3) sob pressão de seleção a 0,88 µg i.a./cm², uma DL₅₀ de 0,43 (0,27 – 0,73) µg i.a./cm², enquanto que a DL₅₀ (IC 95%) para a linhagem Sus foi de 0,16 (0,13 - 0,18) µg i.a./cm² após 34 gerações na ausência de pressão de seleção (Tabela 2), resultando em uma razão de resistência de aproximadamente 3 vezes e não havendo sobreposição dos intervalos de confiança. No entanto, após gerações consecutivas com o aumento das doses de forma a serem distribuídas logaritmicamente, e a partir da sétima geração a pressão de seleção ter sido mantida na dose diagnóstica (DL₉₉), observou-se que a linhagem Spin-R apresentou na geração F12 uma DL₅₀ de 3,24 (2,80 - 3,74) µg i.a./cm², enquanto que após 45 gerações sem pressão de seleção a DL₅₀ (IC 95%) para a linhagem Sus foi de 0,12 (0,08 - 0,16) µg i.a./cm², resultando em uma razão de resistência de 27 vezes. Desse modo, ao passo de sucessivas gerações sob pressão de seleção, pode-se notar que a linhagem Spin-R mostrou-se uma maior homogeneidade, devido ao aumento do valor do coeficiente angular e da maior razão de resistência obtida após doze gerações (Tabela 2).

4.3. Padrão de herança da resistência de *H. armigera* a spinosad

A progênie F1 dos cruzamentos recíprocos tiveram similar suscetibilidade para spinosad e não apresentaram diferenças significativas entre os valores de DL₅₀ (IC 95%), variando de 1,25 (0,91 - 1,68) µg i.a./cm² para o H1 (♂ Spin-R x ♀ Sus) e de 0,79 (0,64 - 0,99) µg i.a./cm² para o H2 (♀ Spin-R x ♂ Sus), com sobreposição dos intervalos de confiança. A razão de resistência dos cruzamentos recíprocos variou de 6 a 10 vezes comparado com a linhagem Sus (Tabela 3). A linhagem Spin-R apresentou um valor de coeficiente angular de 2,98 (±0,28), indicando a homogeneidade dos indivíduos e devido à sobreposição dos intervalos de confiança da DL₅₀ dos cruzamentos recíprocos, pode-se afirmar que os genes relacionados à resistência de *H. armigera* a spinosad estão situados em regiões autossômicas do

cariótipo e não em cromossomos determinantes do sexo e/ou herança maternal (Tabela 3 e Figura 4).

Tabela 2. Dose-mortalidade das linhagens de *Helicoverpa armigera* suscetível (Sus) e resistente (Spin-R), em diferentes gerações sob ausência e pressão de seleção ao inseticida spinosad, respectivamente, realizados em bioensaios de aplicação superficial da dieta artificial.

Linhagem	Geração	n^1	Coefficiente angular \pm EMP ²	DL ₅₀ (IC 95%) ³	DL ₉₀ (IC 95%) ⁴	χ^2 (5) ⁵	g.l. ⁶	RR ⁷
Sus	F34	647	2,74 \pm 0,19	0,16 (0,13 - 0,18)	0,46 (0,37 - 0,61)	6,56	6	-
Spin-R	F03	566	1,60 \pm 0,13	0,43 (0,27 - 0,73)	2,67 (1,34 - 10,34)	15,98	5	2,67
Sus	F45	384	2,29 \pm 0,21	0,12 (0,08 - 0,16)	0,42 (0,28 - 0,89)	10,93	5	-
Spin-R	F12	431	2,98 \pm 0,28	3,24 (2,80 - 3,74)	8,75 (7,18 - 11,33)	1,02	5	27,0

¹Número de insetos testados; ²Erro padrão da média; ³Dose letal que mata 50% das lagartas ($\mu\text{g i.a./cm}^2$) e intervalo de confiança a 95%; ⁴ Dose letal que mata 90% das lagartas ($\mu\text{g i.a./cm}^2$) e intervalo de confiança a 95%; ⁵Valor do qui-quadrado calculado; ⁶Valor do grau de liberdade (g.l.); ⁷Razão da Resistência = DL₅₀ da linhagem resistente/DL₅₀ da suscetível.

Tabela 3. Dose-mortalidade das linhagens de *Helicoverpa armigera* suscetível (Sus), resistente (Spin-R) e heterozigotos ao inseticida spinosad em bioensaios de aplicação superficial da dieta artificial.

Linhagem	n^1	Coefficiente angular \pm EPM ²	DL ₅₀ (IC 95%) ³	DL ₉₀ (IC 95%) ⁴	χ^2 (5) ⁵	g.l. ⁶	RR ⁷
Sus	384	2,29 \pm 0,21	0,12 (0,08 - 0,16)	0,42 (0,28 - 0,89)	10,93	5	-
Spin-R	431	2,98 \pm 0,28	3,24 (2,80 - 3,74)	8,75 (7,18 - 11,33)	1,02	5	27,0
♀ Spin-R x ♂ Sus	336	2,63 \pm 0,30	0,79 (0,64 - 0,99)	2,44 (1,83 - 3,67)	2,95	4	6,58
♂ Spin-R x ♀ Sus	384	2,41 \pm 0,25	1,25 (0,92 - 1,68)	4,24 (2,87 - 8,54)	8,13	5	10,4

¹Número de insetos testados; ²Erro padrão da média; ³Dose letal que mata 50% das lagartas ($\mu\text{g i.a./cm}^2$) e intervalo de confiança a 95%; ⁴ Dose letal que mata 90% das lagartas ($\mu\text{g i.a./cm}^2$) e intervalo de confiança a 95%; ⁵Valor do qui-quadrado calculado; ⁶Valor do grau de liberdade (g.l.); ⁷Razão da Resistência = DL₅₀ da linhagem resistente/DL₅₀ da suscetível.

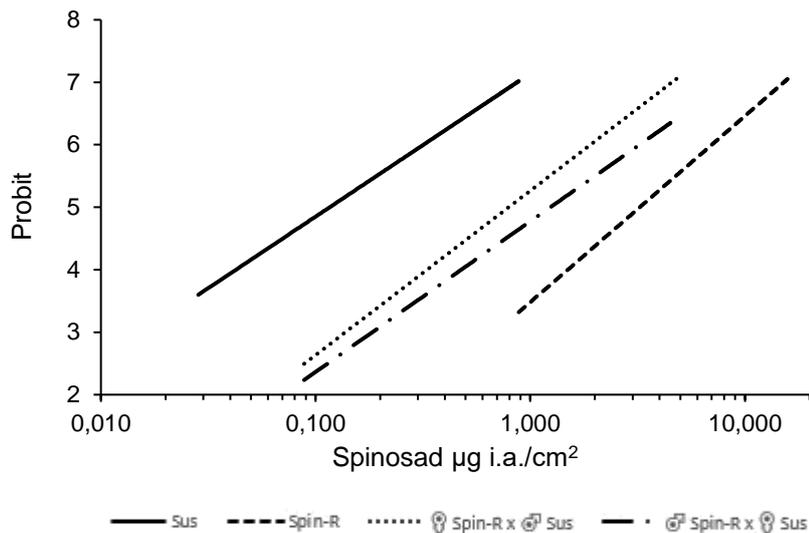


Figura 4. Dose-mortalidade das linhagens de *H. armigera* suscetível (Sus), resistente (Spin-R) e heterozigotos (♂ Spin-R × ♀ Sus e ♀ Spin-R × ♂ Sus), ao inseticida spinosad em bioensaios de aplicação superficial da dieta artificial.

4.3.1. Dominância da resistência

A resistência de *H. armigera* a spinosad assumiu caracter incompletamente dominante, pois o grau de dominância estimado pelo método proposto por Stone (1968), variou entre 0,15 e 0,42 para os cruzamentos recíprocos de ♀ Spin-R × ♂ Sus e ♂ Spin-R × ♀ Sus, respectivamente. Contudo, ao analisarmos os dados de acordo com o método proposto por Bourguet et al. (2000) a dominância funcional é verificada em relação a dose testada de spinosad. Observou-se que o grau da dominância foi funcionalmente dominante ($D=1$) e incompletamente dominante na maioria das doses testadas, mostrando que apenas na dose mais alta ($5,053 \mu\text{g i.a./cm}^2$) a resistência foi funcionalmente recessiva ($D=0$). A dose de campo de spinosad, recomendada para o controle de *H. armigera* em cultivos de algodão no Brasil é de $0,600 \mu\text{g i.a./cm}^2$ e encontra-se entre as doses intermediárias, apresentando, dessa maneira, uma herança incompletamente dominante, podendo indicar que existe a sobrevivência de indivíduos heterozigotos e homozigotos resistentes após aplicação da dose recomendada no campo para a cultura do algodão (Tabela 4 e Figura 5).

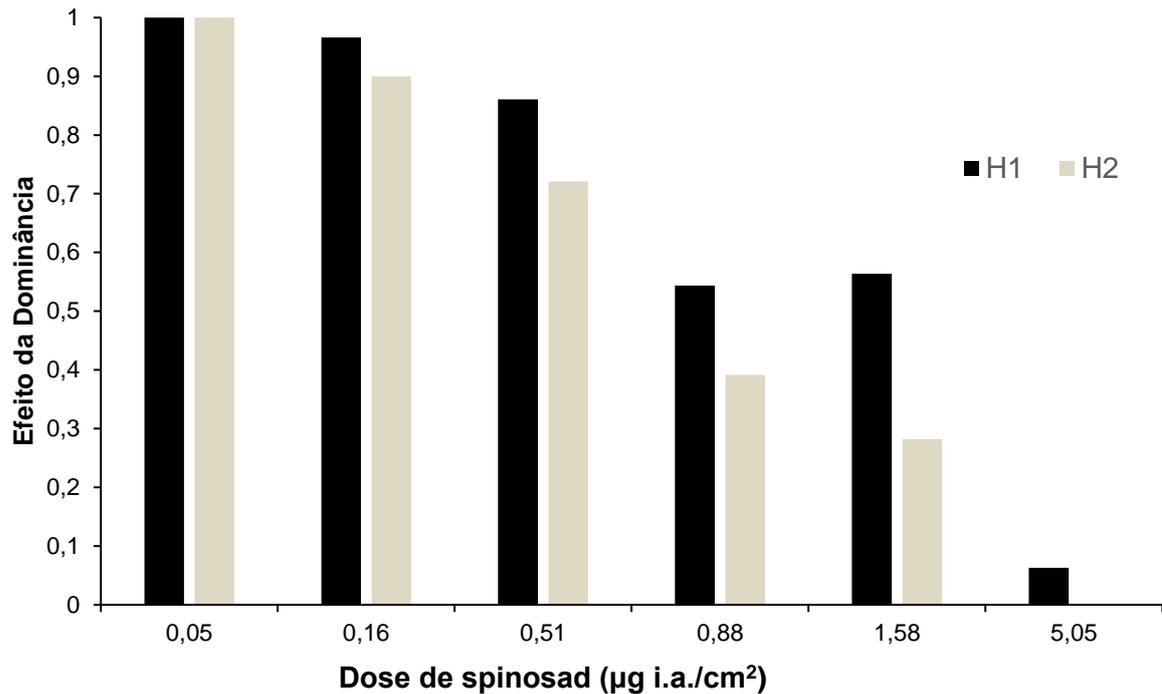


Figura 5. Dominância da resistência de *Helicoverpa armigera* a spinosad em função da dose de spinosad testada (µg i.a./cm²), H1(♂ Spin-R x ♀ Sus) e H2 (♀ Spin-R x ♂ Sus).

4.3.2. Número de genes associados com a resistência

Para a estimativa do número de genes associados com a resistência de *H. armigera* a spinosad, utilizou-se a dose de 0,884 µg i.a./cm² em lagartas de terceiro ínstar provenientes do retrocruzamento, entre a linhagem heterozigota com o parental que apresentou o fenótipo mais distinto (Sus). A mortalidade observada e esperada comparadas pelo teste de Qui-quadrado (χ^2) foram significativas ($p < 0,001$) rejeitando hipótese de a herança da resistência possuir efeito monogênico, permitindo assumir que a resistência de *H. armigera* a spinosad está associada a mais de um gene, sendo então, poligênica (Figura 6). A estimativa do número mínimo de segregações independentes foram de 1,52 a 1,64, sugerindo que a resistência de *H. armigera* a spinosad esta associada a poucos *loci*.

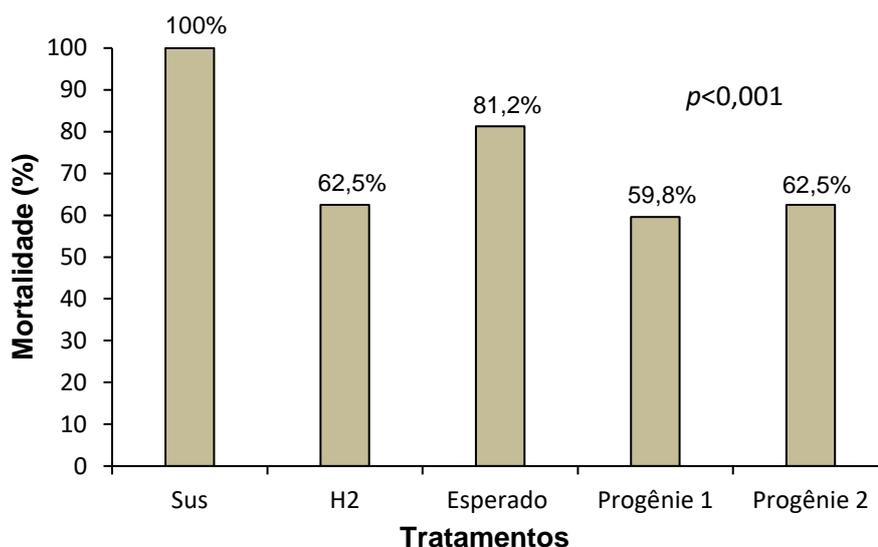


Figura 6. Mortalidade observada e esperada comparadas pelo teste de χ^2 ($p < 0,001$) entre os retrocruzamentos (progênie 1: ♀ H2 x ♂ Sus, progênie 2: ♂ H2 x ♀ Sus) provenientes da linhagem heterozigota H2 (♀ Spin-R x ♂ Sus) com o parental mais distinto (Sus) na dose de 0,884 μg . i.a./ cm^2 de spinosad.

4.4. Resistência cruzada com spinetoram

Como esperado para inseticidas pertencentes ao mesmo grupo químico, a linhagem Spin-R apresentou resistência cruzada a spinetoram. O valor estimado de DL_{50} (IC 95%) para a linhagem Spin-R foi de 0,48 (0,40 - 0,57) μg i.a./ cm^2 , enquanto que a DL_{50} (IC 95%) para a linhagem Sus foi de 0,04 (0,03 - 0,04) μg i.a./ cm^2 , resultando em uma razão de resistência de 12 vezes (Tabela 5). Este resultado sugere que há resistência cruzada entre as espinosinas e que a linhagem de *H. armigera* resistente ao spinosad apresenta maior suscetibilidade ao inseticida spinetoram, possivelmente devido seu maior potencial inseticida.

Tabela 4. Dominância da resistência de *Helicoverpa armigera* a spinosad em função da dose de spinosad testada ($\mu\text{g i.a./cm}^2$).

Dose $\mu\text{g i.a./cm}^2$	Sus	Spin-R	H1 (σ^1 Spin-R x σ^2 Sus)		H2 (σ^2 Spin-R x σ^1 Sus)	
	Mortalidade (%)	Mortalidade (%)	Mortalidade (%)	Dominância (D)	Mortalidade (%)	Dominância (D)
0,051	12,5	0,0	0,0	1,0	0,0	1,0
0,158	62,5	0,0	2,1	1,0	6,3	0,9
0,505	89,6	0,0	12,5	0,9	25,0	0,7
0,884	100,0	4,2	47,9	0,5	62,5	0,4
1,579	100,0	18,8	54,2	0,6	77,1	0,3
5,053	100,0	66,7	97,9	0,1	100,0	0,0

Tabela 5. Dose-mortalidade das linhagens de *Helicoverpa armigera* suscetível (Sus) e resistente a spinosad (Spin-R) ao inseticida spinetoram em bioensaios de aplicação na superfície da dieta artificial.

Inseticidas	Linhagem	Geração	n^1	Coefficiente angular $\pm \text{EPM}^2$	DL_{50} (IC 95%) ³	DL_{90} (IC 95%) ⁴	χ^2 (5)	g.l. ⁶	RR ⁷
Spinosad	Sus	F45	432	2,32 \pm 0,20	0,12 (0,08 - 0,17)	0,42 (0,27 - 0,88)	11,28	5	-
	Spin-R	F12	431	2,98 \pm 0,28	3,24 (2,80 - 3,74)	8,75 (7,18 - 11,33)	1,02	5	27,0
Spinetoram	Sus	F45	648	2,83 \pm 0,19	0,04 (0,03 - 0,04)	0,11 (0,09 - 0,13)	5,65	6	-
	Spin-R	F12	432	2,35 \pm 0,24	0,48 (0,40 - 0,57)	1,67 (1,27 - 2,44)	1,81	5	12,0

¹Número de insetos testados; ²Erro padrão da média; ³Dose letal que mata 50% das lagartas ($\mu\text{g i.a./cm}^2$) e intervalo de confiança a 95%; ⁴Dose letal que mata 90% das lagartas ($\mu\text{g i.a./cm}^2$) e intervalo de confiança a 95%; ⁵ Valor do qui-quadrado calculado; ⁶ Valor do grau de liberdade (g.l.); ⁷Razão da Resistência = DL_{50} da linhagem resistente/ DL_{50} da suscetível.

5. DISCUSSÃO

O monitoramento fenotípico com o uso da dose diagnóstica (DL₉₉), permitiu verificar alta suscetibilidade de *H. armigera* a spinosad (DL₉₉ = 3,03 µg i.a./cm²) e spinetoram (DL₉₉ = 0,97 µg i.a./cm²) em populações de campo coletadas durante as safras agrícolas de 2017 a 2019 nas principais regiões produtoras de soja e algodão do Brasil nos estados da Bahia, Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul e São Paulo.

Os dados do presente estudo complementam-se aos dados de monitoramento da suscetibilidade de *H. armigera* a espinosinas no Brasil, apresentados anteriormente por Pereira (2017), o qual iniciou o monitoramento após a invasão de *H. armigera* no país, e já era possível verificar alta suscetibilidade para spinetoram, enquanto que para spinosad demonstrou uma tendência na redução da suscetibilidade durante as safras de 2014 até a primeira safra de 2017, encontrando frequências de sobrevivências de aproximadamente 20%, para o inseticida spinosad.

No entanto, nas safras de 2017 a 2019 notou-se pequenas variações na suscetibilidade entre populações de regiões distintas ao longo do tempo, sendo observado para spinosad as maiores sobrevivências na segunda safra de 2017, nas populações da Bahia e Mato Grosso, variando de $3,88 \pm 0,45\%$ a $3,23 \pm 0,54\%$ de sobrevivência, respectivamente. Nesta mesma safra, para o inseticida spinetoram a suscetibilidade foi mais alta e apenas a população da Bahia apresentou sobrevivência da praga ($0,52 \pm 0,12\%$). Contudo, nas safras seguintes, após o posicionamento de mercado do inseticida spinosad ser destinado para culturas perenes, como para a cultura do café, verificou-se uma tendência de aumento da suscetibilidade para spinosad, igualando a apresentada por spinetoram, uma vez que spinetoram permaneceu no mercado de culturas anuais, e por pertencerem ao mesmo grupo químico, existe grandes chances de apresentarem resistência cruzada. Da mesma forma, essa diferença na resposta da suscetibilidade entre as espinosinas também foi reportada em populações de *P. xylostella* durante o monitoramento no Brasil, apresentando maior suscetibilidade ao spinetoram do que ao spinosad (LIMA NETO et al., 2016), isso possivelmente pode estar relacionado ao fato deste produto ser composto por moléculas com maior ação inseticida do que spinosad (SPARKS et al., 2012). Diante disso, todas as populações de campo

testadas para ambos os inseticidas ao longo das safras agrícolas de 2017 a 2019, apresentaram alta suscetibilidade a espinosinas com pequenas variações, sendo que nenhuma população amostrada apresentou sobrevivência maior que 5% e não diferiram significativamente da linhagem suscetível de referência.

Contudo, a alta suscetibilidade observada no monitoramento ao longo das safras agrícolas pode estar relacionada com o aumento da adoção de plantas *Bt*, principalmente devido ao incremento do cultivo da soja *Bt* desde sua liberação comercial na safra de 2013/2014, representando na safra 2017/2018 mais de 60% da área plantada de soja no país (CELERES, 2013; ISAAA, 2017; CONAB, 2018). Além disso, este evento apresenta alta dose para *H. armigera* contribuindo para o seu controle no campo (DOURADO et al., 2016). Desta forma, ao utilizar essa tática de manejo, possibilita a redução das aplicações de inseticidas na área, e uma vez que ocasiona menor pressão de seleção as espinosinas, pode auxiliar no restabelecimento da suscetibilidade, conforme ocorreu na China com a resistência de *H. armigera* a inseticidas após a introdução do algodão *Bt* (WU et al., 2005; YANG; LI; WU, 2013).

Outra tática de manejo, que pode estar diminuindo a pressão de seleção exercida pelos inseticidas spinosad e spinetoram, é a rotação entre espinosinas e outras moléculas inseticidas no campo. Desse modo, os indivíduos resistentes as espinosinas possivelmente são controlados por inseticidas com outros modos de ação, devido à baixa resistência cruzada reportada entre spinosad e spinetoram com outros grupos químicos (SPARKS et al., 2012). Além disso, ações no posicionamento dos inseticidas podem gerar resultados efetivos, como foi observado no Hawaí para *P. xylostella*, onde após spinosad ter sido suspenso, a suscetibilidade para o inseticida aumentou significativamente, em apenas dois anos a razão de resistência de populações de campo foram de 1.000 vezes para 2 vezes (ZHAO et al., 2006). Outro fator possível, é a contribuição de inimigos naturais presentes nas áreas de cultivo, que podem auxiliar na manutenção da suscetibilidade por meio do controle dos indivíduos resistentes sobreviventes após a aplicação do inseticida, uma vez que insetos benéficos apresentam baixa suscetibilidade as espinosinas (GHOSH; CHATTERJEE; ROY, 2010).

Portanto, em um ambiente que não exista pressão de seleção as espinosinas, possibilita o restabelecimento da suscetibilidade no campo, pois indivíduos suscetíveis se sobressairão em relação a indivíduos resistentes, devido ao custo

adaptativo associado a resistência (ROUSH; MCKENZIE, 1987), conforme observado em uma linhagem de *H. armigera* resistente a spinosad na China, apresentando menor desempenho no desenvolvimento e menor potencial reprodutivo na ausência de pressão de seleção (WANG et al., 2010). Aliás, mesmo na ausência de um custo adaptativo, pode ocorrer a ação da deriva genética, atuando de forma aleatória alterando a frequência de alelos presentes na população, podendo agir naqueles que conferem a resistência (ROUSH; DALY, 1990). Outro aspecto a ser considerado é a ausência de estruturação genética entre populações de *H. armigera* para culturas hospedeiras e a regiões geográficas no Brasil (LEITE et al., 2014), o que pode favorecer tanto a dispersão de alelos suscetíveis quanto a dispersão dos alelos que conferem resistência entre as populações desse inseto-praga, acelerando ou não o processo de evolução da resistência. Dessa forma, o programa de monitoramento da suscetibilidade de *H. armigera* a espinosinas é de extrema importância para a avaliação do risco de evolução da resistência, visando buscar a detecção dos fenótipos resistentes nas populações (ROUSH; MILLER, 1986; ANDOW, 2008). Apesar da alta suscetibilidade apresentada pela praga as espinosinas nas safras monitoradas, a coleta e análise contínua do monitoramento da suscetibilidade são fundamentais para o desenvolvimento de estratégias em programas de manejo da resistência, permitindo retardar a evolução da resistência em condições de campo.

Desde a invasão de *H. armigera* no Brasil em 2013, ainda não havia sido relatado casos de populações resistentes a spinosad, sendo este estudo o primeiro a reportar uma linhagem resistente em condições de laboratório desse inseto-praga no país. A linhagem resistente de *H. armigera* a spinosad (Spin-R) foi selecionada a partir de uma população de campo e após doze gerações sob pressão de seleção em laboratório, observou uma razão de resistência (RR) de 27 vezes. De modo semelhante, nos países onde existem registros da resistência de *H. armigera* a spinosad e que possivelmente deram origem as populações no Brasil (TAY et al., 2013; LEITE et al., 2014; TAY et al., 2017), apresentam na maioria RR que variam de 5 a 25 vezes, como no Paquistão (AHMAD; ARIF; AHMAD, 2003; ALVI et al., 2012; QAYYUM et al., 2015), Índia (KRANTHI; ALI; BANERJEE, 2000), Austrália (GUNNING; BALFE, 2002) e na China, cujo estudo demonstrou a evolução da resistência de *H. armigera* ao inseticida spinosad reportando o aumento das DL₅₀ a cada geração, obtendo uma RR de 24 vezes após quinze gerações sob pressão de

seleção (WANG et al., 2009b). Para outras espécies também há registros de resistência ao inseticida spinosad, como *Plutella xylostella*, com RR = 1.983 vezes, após doze gerações de pressão de seleção (SAYYED et al., 2008), *Spodoptera litura*, com RR = 3.921 vezes, após onze gerações (REHAN; FREED, 2014) e no Brasil têm-se relatos para *Frankliniella occidentalis* com RR de \approx 280 vezes, após sete gerações (RAIS; SATO; DA SILVA, 2013), *Tuta absoluta* com RR > 180.000 vezes, após sete gerações (CAMPOS et al., 2014) e *Spodoptera frugiperda* com RR de \approx 890 vezes, após três gerações de seleção em laboratório (OKUMA et al., 2018).

Apesar de haver casos de resistência de *H. armigera* a spinosad reportados, alguns aspectos da resistência permanecem desconhecidos, principalmente em relação ao padrão de herança, sendo este trabalho o primeiro a elucidar as bases genéticas dessa resistência. O padrão de herança auxilia na compreensão do risco de evolução da resistência, uma vez que possibilita conhecer o grau de dominância da resistência e a relação do número de genes associados à resistência. Além disso, com o padrão de herança é possível conhecer o comportamento dos heterozigotos, pois no início do processo de evolução da resistência os heterozigotos são os principais carregadores dos alelos responsáveis por conferir a resistência, sendo depois dos homozigotos suscetíveis os indivíduos que ocorrem em maior número na população (GEORGHIOU; TAYLOR, 1977; ROUSH; MCKENZIE, 1987; ROUSH; DALY, 1990).

Em relação ao padrão de herança conduzido, os cruzamentos recíprocos entre a linhagem Spin-R com a linhagem Sus confirmaram que a resistência de *H. armigera* a spinosad é autossômica, ou seja, os *loci* relacionados à resistência estão situados em cromossomos autossômicos e desse modo pode-se desconsiderar uma herança ligada ao sexo ou mitocondrial. Os resultados da dominância da resistência de *H. armigera* a spinosad mostraram ser incompletamente dominante pelo método de Stone (1968) e poligênica pelo teste de χ^2 ($p < 0,001$), confirmando que mais de um gene é responsável pela resistência, porém associados a poucos *loci*. Ao aplicar o método de Bourguet et al. (2000), os resultados também indicaram que a dominância foi variável em função da dose, pois quando os indivíduos heterozigotos foram expostos as doses intermediárias apresentaram herança incompletamente dominante, similar resposta para a dose de campo recomendada para o controle de *H. armigera* em algodão, mas nas doses mais baixas a resistência foi funcionalmente dominante e quando expostos a dose mais alta (5,053 μg i.a./ cm^2),

a resistência foi funcionalmente recessiva. Estes resultados sugerem que existe a possibilidade de indivíduos heterozigotos e homozigotos resistentes sobreviverem a dose de campo, favorecendo a rápida evolução da resistência. No entanto a dominância da resistência em condições de campo pode ser influenciada por outros fatores além dos parâmetros genéticos, como a queda da atividade biológica do inseticida, o estágio de desenvolvimento do inseto e pelas condições ambientais (STONE, 1968; ROUSH; DALY, 1990; BOURGUET; PROUT; RAYMOND, 1996).

Padrões de herança semelhantes ao de *H. armigera* a spinosad também foram caracterizados para esta praga a outros inseticidas e plantas *Bt*, sendo apresentado como herança autossômica e incompletamente dominante, para piretroides (ACHALEKE; BRÉVAULT, 2009), para proteína Cry1Ac expressa em algodão *Bt* (KRANTHI et al., 2006), para indoxacarb (BIRD, 2017), para flubendiamide (ABBADE NETO et al., 2018) e também observado em *Musca domestica* resistente a spinosad. Assim como, a caracterização da herança poligênica também foi consistente com resultados de resistência à spinosad em outros insetos (ZHANG et al., 2008; SHI; ZHANG; GAO, 2011; KHAN; AKRAM; SHAD, 2014; OKUMA et al., 2018). No entanto, há outros casos, conforme observado em *T. absoluta* onde a herança da resistência à spinosad foi autossômica, incompletamente recessiva e monogênica (SPARKS et al., 2012; CAMPOS et al., 2014). De modo geral, espera-se que a resistência poligênica desenvolva mais lentamente do que a resistência monogênica, devido a possibilidade de diluição dos genes durante os cruzamentos e os mecanismos envolvidos serem mais variados, no entanto quando estabelecida pode dificultar o manejo (ROUSH; MCKENZIE, 1987). Estudos mostram que a resistência à spinosad pode estar associada a diferentes mecanismos, sendo o mais comum em insetos a mutação no sítio de ação, especialmente na subunidade $\alpha 6$ do receptor nicotínico de acetilcolina (WANG; TSAI; CHEN, 2018; UREÑA et al., 2019), seguido da detoxificação metabólica (SPARKS et al., 2012). Especificamente, para *H. armigera* poucos trabalhos foram desenvolvidos para desvendar os mecanismos da resistência à spinosad. Estudos realizados na China com sinergistas verificaram que a resistência da praga a spinosad pode estar associada com o aumento das enzimas monooxigenases do grupo das P450, no entanto apontam que outros mecanismos possam estar envolvidos (WANG et al., 2009a, 2009b).

Além disso, a linhagem Spin-R apresentou resistência cruzada a spinetoram (RR = 12 vezes), bem como observado em outras espécies resistentes a spinosad, como em *T. absoluta* (CAMPOS et al., 2014) e *D. melanogaster* (WATSON et al., 2010), pois devido essas moléculas pertencerem ao mesmo grupo químico e terem o mesmo mecanismo de ação, há um alto potencial dos insetos resistentes a spinosad possuírem resistência cruzada ao spinetoram e outras espinosinas (SPARKS et al., 2012). Desse modo, uma das estratégias no campo que podem ser adotadas para retardar a evolução da resistência e preservar a vida-útil das espinosinas, é o manejo por ataque múltiplo, através da rotação de dois ou mais produtos com diferentes modos de ação e com ausência de resistência cruzada entre os inseticidas utilizados (GEORGHIOU; TAYLOR, 1977; GEORGHIOU, 1983).

Diante dos resultados da avaliação de risco da evolução da resistência em condições de laboratório, da presença da resistência cruzada entre as espinosinas e da análise da herança da resistência de *H. armigera* a spinosad, pode-se inferir que em condições de campo em que haja pressão de seleção, possivelmente ocorrerá a rápida seleção de alelos da resistência ao longo do tempo, influenciada pelo caráter dominante, com a sobrevivência dos indivíduos heterozigotos e homozigotos resistentes na dose de campo. Contudo, alguns estudos mostram que na ausência da pressão de seleção, *H. armigera* apresenta um custo adaptativo associado à resistência a spinosad (WANG et al., 2010), contribuindo para a diminuição da frequência do alelo da resistência na área. Aliado a isso, outros fatores como a rotação de produtos, uma vez que espinosinas apresentam baixa resistência cruzada a outros grupos químicos (SPARKS et al., 2012) e a possível migração de indivíduos suscetíveis no local associado ao seu hábito polífago, favoreceriam para o restabelecimento da suscetibilidade (GEORGHIOU; TAYLOR, 1977), conforme foi observado nos dados de monitoramento da resistência de *H. armigera* a espinosinas no Brasil. Portanto, este estudo fornece dados para elaboração de estratégias, que poderão ser aplicadas em programas de MRI em conjunto com as outras ferramentas do manejo integrado de pragas (MIP), visando retardar a evolução da resistência de *H. armigera* a spinosad e preservar a eficiência das moléculas desse grupo químico no controle desta praga.

6. CONCLUSÕES

- A suscetibilidade aos inseticidas spinosad e spinetoram em populações de *H. armigera* foi alta durante as safras agrícolas de 2017 a 2019 no Brasil.
- A linhagem de *H. armigera* resistente a spinosad selecionada em condições de laboratório apresentou razão de resistência de 27 vezes.
- O padrão de herança da resistência de *H. armigera* a spinosad é autossômica, incompletamente dominante e poligênica.
- Há resistência cruzada entre spinosad e spinetoram em *H. armigera*.

REFERÊNCIAS

- ABBADE NETO, D. O.; PEREIRA, R. M.; PEREIRA, I. M.; AMADO, D.; SPINELI SILVA, S.; DURIGAN, M. R.; OMOTO, C. Genetic basis of flubendiamide resistance in *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). In: 2018 ESA, ESC, and ESBC Joint Annual Meeting (Entomology 2018), Vancouver. **Annals of the 2018 ESA, ESC, and ESBC Joint Annual Meeting (Entomology 2018)**, 2018.
- ACHALEKE, J.; BRÉVAULT, T. Inheritance and stability of pyrethroid resistance in the cotton bollworm *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) in Central Africa. **Pest Management Science**, v. 66, n. 2, p. 137–141, 2009.
- AHMAD, M.; ARIF, M. I.; AHMAD, Z. Susceptibility of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) to new chemistries in Pakistan. **Crop Protection**, v. 22, n. 3, p. 539–544, 2003.
- AHMAD, M.; RASOOL, B.; AHMAD, M.; RUSSELL, D. A. Resistance and Synergism of Novel Insecticides in Field Populations of Cotton Bollworm *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) in Pakistan. **Journal of Economic Entomology**, p. 1–13, 2019.
- ALI, A.; CHOUDHURY, R. A.; AHMAD, Z.; RAHMAN, F.; KHAN, F. R.; AHMAD, S. K. Some Biological Characteristics of *Helicoverpa armigera* on Chickpea. **Tunisian Journal of Plant Protection**, v. 4, n. 1, p. 99–106, 2009.
- ALLAL-BENFEKIH, L.; AOUDIA, B.; MOSTEFAOUI, H.; BELGUENDOZ, R. Comparative evaluation of the toxicity of lambda cyhalothrin and spinosad on the insect pests and auxiliary fauna in an orange orchard of the central Mitidja (Blidean Atlas, Algeria). **American-Eurasian Journal of Sustainable Agriculture**, v. 7, p. 21-26, 2013.
- ALVI, A. H. K.; SAYYED, A. H.; NAEEM, M.; ALI, M. Field Evolved Resistance in *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) to *Bacillus thuringiensis* Toxin Cry1Ac in Pakistan. **Plos One**, v. 7, n. 10, p. 9, 2012.
- ANDERSON, C. J.; OAKESHOTT, J. G.; TAY, W. T.; GORDON, K. H. J.; ZWICK, A.; WALSH, T. K. Hybridization and gene flow in the mega-pest lineage of moth, *Helicoverpa*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 115, n.19, p. 5034-5039, 2018.
- ANDOW, D. A. The risk of resistance evolution in insects to transgenic insecticidal crops. **Collection of Biosafety Reviews**, v. 4, p. 142–199, 2008.
- ANDOW, D. A.; ALSTAD, A. D. N. F2 Screen for Rare Resistance Alleles. **J. Econ. Entomol**, v. 91, n. 3, p. 572–578, 1998.
- ARMES, N. J.; JADHAV, D. R.; BOND, G. S.; KING, A. B. S. Insecticide resistance in *Helicoverpa armigera* in South India. **Pesticide Science**, v. 34, n. 4, p. 355–364, 1992.

- ARTHROPOD PESTICIDE RESISTANCE DATABASE. **Michigan State University**.
Disponível: <<http://www.pesticideresistance.com>>. Acesso em: junho, 2019.
- BAO, W. X.; NARAI, Y.; NAKANO, A.; KANEDA, T.; MURAI, T.; SONODA, S. Spinosad resistance of melon thrips, *Thrips palmi*, is conferred by G275E mutation in $\alpha 6$ subunit of nicotinic acetylcholine receptor and cytochrome P450 detoxification. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 112, p.51-55, 2014.
- BAXTER, S. W.; CHEN, M.; DAWSON, A.; ZHAO, J. Z.; VOGEL, H.; SHELTON, A. M.; HECKEL, D. G.; JIGGINS, C. D. Mis-Spliced Transcripts of Nicotinic Acetylcholine Receptor $\alpha 6$ Are Associated with Field Evolved Spinosad Resistance in *Plutella xylostella* (L.). **Plos Genetics**, v. 6, n.1, 2010.
- BEHERE, G. T.; TAY, W. T.; RUSSEL, D. A.; HECKEL, D. G.; APPLETON, B. R.; KRANTHI, K. R.; BATTERHAM, P. Mitochondrial DNA analysis of field populations of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) and of its relationship to *H. zea*. **BMC Evolutionary Biology**, v. 7, n. 1, p. 117, 2007.
- BIRD, L. J. Genetics, cross-resistance and synergism of indoxacarb resistance in *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). **Pest Management Science**, v. 73, p. 575–581, 2017.
- BIRD, L. J.; DOWNES, S. J. Toxicity and Cross-Resistance of Insecticides to Cry2Ab-Resistant and Cry2Ab-Susceptible *Helicoverpa armigera* and *Helicoverpa punctigera* (Lepidoptera: Noctuidae). **Journal of Economic Entomology**, v. 107, p. 1923-1930, 2014.
- BOURGUET, D.; GENISSEL, A.; RAYMOND, M. Insecticide Resistance and Dominance Levels. **Journal of Economic Entomology**, v. 93, p.1588-1595, 2000.
- BOURGUET, D.; PROUT, M.; RAYMOND, M. Dominance of Insecticide Resistance Presents a Plastic Response. **Genetics**, p. 407–416, 1996.
- CAMPOS, M. R.; RODRIGUES, A. R. S.; SILVA, W. M.; SILVA, T. B. M.; SILVA, V. R. F.; GUEDES, R. N. C.; SIQUEIRA, H. A. A. Spinosad and the Tomato Borer *Tuta absoluta*: A Bioinsecticide, an Invasive Pest Threat, and High Insecticide Resistance. **Plos One**, v. 9, n. 8, 2014.
- CELERES, **Informativo Biotecnologia**. Uberlândia, MG, 2013.
- COAKER, T. H. Investigations on *Heliothis armigera* (HB.) in Uganda. **Bulletin of Entomological Research**, v. 50, n. 03, p. 487–506, 1959.
- CONAB. **Acompanhamento da Safra Brasileira – Grãos**, v. 6, SAFRA 2018/19, n. 3 - Terceiro levantamento. Brasília, DF, 2018.
- CROFT, B. A.; VAN DE BAAN, H. E. Ecological and genetic factors influencing evolution of pesticide resistance in tetranychid and phytoseiid mites. **Experimental & Applied Acarology**, v. 4, n. 3, p. 277–300, 1988.

- CZEPAK, C.; ALBERNAZ, K. C.; VIVAN, L. M.; GUIMARÃES, H. O.; CARVALHAIS, T. Primeiro registro de ocorrência de *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) no Brasil. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v.43, p.110-113, 2013.
- DOURADO, P. M.; BACALHAU, F. B.; AMADO, D.; CARVALHO, R. A.; MARTINELLI, S.; HEAD, G. P.; OMOTO, C. High Susceptibility to Cry1Ac and Low Resistance Allele Frequency Reduce the Risk of Resistance of *Helicoverpa armigera* to Bt Soybean in Brazil. **Plos One**, v. 11, n. 8, p. e0161388, 2016.
- DUFFIELD, S. J.; CHAPPLE, D. G. Within-plant distribution of *Helicoverpa armigera* (Hübner) and *Helicoverpa punctigera* (Wallengren) (Lepidoptera: Noctuidae) eggs on irrigated soybean. **Australian Journal of Entomology**, v. 40, n. 2, p. 151–157, 2001.
- DURIGAN, M. R.; CORRÊA, A. S.; PEREIRA, R. M.; LEITE, N. A.; AMADO, D.; SOUSA, D. R.; OMOTO, C. High frequency of CYP337B3 gene associated with control failures of *Helicoverpa armigera* with pyrethroid insecticides in Brazil. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 143, p. 73–80, 2017.
- EL-AW, M. A. M.; DRAZ, K. A. A.; HASHEM, A. G.; EL-GENDY, I. R. Mortality comparison among spinosad-, actara-, malathion-, and methomyl-containing baits against peach fruit fly, *Bactrocera zonata saunders* (Diptera: Tephritidae) under laboratory conditions. **Journal of Applied Sciences Research**, v. 4, p. 216-223, 2008.
- European and Mediterranean Plant Protection Organization (EPPO). Data sheets on quarantine organisms nº 110: *Helicoverpa armigera*. Paris: **EPPO**, 1981. (Bulletin, 11).
- FARROW, R. A.; DALY, J. C. Long-Range Movements as an Adaptive Strategy in the Genus *Heliothis* (Lepidoptera, Noctuidae) - a Review of Its Occurrence and Detection in 4 Pest Species. **Australian Journal of Zoology**, v. 35, n. 1, p. 1–24, 1987.
- FFRENCH-CONSTANT, R.H.; ROUSH, R.T. Resistance detection and documentation: the relative role of pesticidal and biochemical assays. In: Roush, R.T.; Tabashnik, B.E. (ed). **Pesticide Resistance in Arthropods**. Boston, MA: Springer US, p. 4-37, 1990.
- FITT, G. P. The ecology of *Heliothis* species in relation to agroecosystems. **Annual Review of Entomology**, v. 34, p. 17-52. 1989.
- FORRESTER, N. W.; CAHILL, M.; BIRD, L.; LAYLAND, J. K. Management of pyrethroid and endosulfan resistance in *Helicoverpa armigera*. **Bulletin of Entomological Research Spec. Suppl.** v. 1, p. 1-132. 1993.
- GEORGHIOU, G. P. Genetics of resistance to insecticides in houseflies and mosquitoes. **Experimental Parasitology**, 1969.
- GEORGHIOU, G. P.; TAYLOR, C. E. Genetic and biological influences in the evolution of insecticide resistance. **Journal of economic entomology**, 1977.

- GHOSH, A.; CHATTERJEE, M.; ROY, A. Bio-efficacy of spinosad against tomato fruit borer (*Helicoverpa armigera* Hub.) (Lepidoptera: Noctuidae) and its natural enemies. **Journal of Horticulture and Forestry**, v. 2, n. 5, p. 108–111, 2010.
- GOODYER, G. J.; GREENUP, L. R. A survey of insecticide resistance in the cotton bollworm *Heliothis armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) in New South Wales. **General and Applied Entomology**, v. 12, p. 37. 1980.
- GOODYER, G. J.; WILSON, A. G. L.; ATTIA, F. I.; CLIFT, A. D. Insecticide resistance in the cotton boll worm *Heliothis armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) in the Namoi Valley of New South Wales, Australia. **Journal of the Australian Entomological Society**, v. 14, p. 171. 1975.
- GOULD, F.; ANDERSON, A.; JONES, A.; SUMERFORD, D.; HECKEL, D. G.; LOPEZ, J.; MICINSKI, S.; LEONARD, 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**, v. 94, n. 8, p. 3519–3523, 1997.
- GREENE, G. L.; LEPLA, N. C.; DICKERSON, W. A. Velvetbean caterpillar: A Rearing Procedure and Artificial Medium. **Journal of Economic Entomology**, v. 69, n. 4, p. 487–488, 1976.
- GUNNING, R. V.; BALFE, M. E.; EASTON, C. S. Carbamate resistance in *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) in Australia. **Journal of the Australian Entomological Society**, v. 31, p. 97. 1992.
- GUNNING, R. V.; BALFE, M. E. Spinosad resistance in Australian *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae). **Proceedings of 10th IUPAC International Congress on the Chemistry of Crop Protection (Japan)**, p. 290. 2002.
- GUNNING, R. V.; EASTON, C. S. Endosulfan resistance in *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) in Australia. **Journal of the Australian Entomological Society**, v. 33, p. 9. 1994.
- GUNNING, R. V.; EASTON, C. S.; GREENUP, L. R.; EDGE, V. E. Pyrethroid resistance in *Heliothis armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) in Australia. **Journal of Economic Entomology**, v. 77, p. 1283. 1984.
- HOTHORN, T.; BRETZ, F.; WESTFALL, P. Simultaneous Inference in General Parametric Models. **Biometrical Journal**, v. 50, n. 3, p. 346–363, 2008.
- HUANG, K. X.; XIA, L.; ZHANG, Y.; DING, X.; ZAHN, J. A. Recent advances in the biochemistry of spinosyns. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 82, n. 1, p. 13–23, 2009.

- ISAAA. **Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops in 2017: Biotech Crop Adoption Surges as Economic Benefits Accumulate in 22 Years**. ISAAA Brief No. 53. ISAAA: Ithaca, NY, 2017.
- ISHTIAQ, M.; SALEEM, M. A.; WRIGHT, D. J. Stability, cross-resistance and effect of synergists, PBO and def, on deltamethrin resistant strain of *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae) from Pakistan. **Pakistan Journal of Zoology**, v. 44, n. 6, p. 1677–1682, 2012.
- KARIM, S. Management of *Helicoverpa armigera*: a review and prospectus for Pakistan. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, Faisalabad, v. 3, n. 8, p. 1213-1222, 2000.
- KHAN, H. A. A.; AKRAM, W.; SHAD, S. A. Genetics, cross-resistance and mechanism of resistance to spinosad in a field strain of *Musca domestica* L. (Diptera: Muscidae). **Acta Tropica**, 2014.
- KIRST, H. A. The spinosyn family of insecticides: realizing the potential of natural products research. **The Journal of Antibiotics**, v. 63, n. 3, p. 101–111, 2010.
- KRANTHI, K. R.; ALI, S. S.; BANERJEE, S. K. Baseline toxicity of spinosad on the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera* (Hub.), in India. **Resistant Pest Management**, v. 11, n. 1, p. 9–12, 2000.
- KRANTHI, K. R.; DHAWAD, C. S.; NAIDU, S. R.; MATE, K.; BEHERE, G. T.; WADASKAR, R. M.; KRANTHI, S. Inheritance of resistance in Indian *Helicoverpa armigera* (Hübner) to Cry1Ac toxin of *Bacillus thuringiensis*. **Crop Protection**, v. 25, n. 2, p. 119–124, 2006.
- LANDE, R. The minimum number of genes contributing to quantitative variation between and within populations. **Genetics**, v. 99, n. 3–4, p. 541–553, 1981.
- LEITE, N. A.; ALVES-PEREIRA, A.; CORRÊA, A. S.; ZUCCHI, M. I.; OMOTO, C. Demographics and genetic variability of the new world bollworm (*Helicoverpa zea*) and the old-world bollworm (*Helicoverpa armigera*) in Brazil. **Plos One**, doi: 10.1371/journal.pone.0113286, v. 9, n. 11, 2014.
- LIMA NETO, J. E.; AMARAL, M. H. P.; SIQUEIRA, H. A. A.; BARROS, R.; SILVA, P. A. F. Resistance monitoring of *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Plutellidae) to risk-reduced insecticides and cross resistance to spinetoram. **Phytoparasitica**, v. 44, n. 5, p. 631–640, 2016.
- LIRA, E. C. **Monitoramento e padrão de herança de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) a spinetoram**. Dissertação. Universidade de São Paulo Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, 2018.
- MARKUSSEN, M. D.; KRISTENSEN, M. Spinosad resistance in female *Musca domestica* L. from a field-derived population. **Pest Management Science**, v. 68, n. 1, p. 75–82, 2012.
- MORAL GARCIA, F. J. Analysis of the Spatio-temporal Distribution of *Helicoverpa armigera* Hb. in a Tomato Field using a Stochastic Approach. **Biosystems engineering**, 2006.

- MORAL, R. A.; HINDE, J.; DEMÉTRIO, C. G. B. Half-Normal Plots and Overdispersed Models in R: The hnp Package. **Journal of Statistical Software**, v. 81, n. 10, p. 1–23, 2017.
- MOTA-SANCHEZ, D.; HOLLINGWORTH, R. H.; GRAFIUS, E. J.; MOYER, D. D. Resistance and cross-resistance to neonicotinoid insecticides and spinosad in the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata* (Say) (Coleoptera: Chrysomelidae). **Pest Management Science**, v. 62, n. 1, p. 30–37, 2006.
- MURÚA, A. M. G.; SCALORA, F. S.; NAVARRO, F. R.; CAZADO, L. E.; CASMUZ, A.; VILLAGRAN, M. E.; LOBOS, E.; GASTAMINZA, G. First Record of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) in Argentina. *Florida Entomologist*, v. 97, n. 2, p. 854–856, 2014.
- NAPPO. *Helicoverpa armigera* (Old World Bollworm) - Detection in Florida. **NAPPO**. disponível em: <pestalert.org/oprDetail.cfm?oprID=629>, 2015.
- NAPPO. Phytosanitary Alert System: Old world bollworm, *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae), detected in Puerto Rico. **NAPPO**. Disponível em: <pestalert.org/oprDetail.cfm?opr ID= 600&keyword=helicoverpa%20armigera>, 2014.
- NAUEN, R.; SLATER, R.; SPARKS, T. C.; ELBERT, A.; MCCAFFERY, A. IRAC: Insecticide Resistance and Mode-of-action Classification of Insecticides. **Modern Crop Protection Compounds**, v. 3, p. 995–1012, 2019.
- OKUMA, D. M. **Bases genéticas e moleculares da resistência de *Spodoptera frugiperda* a spinosad**. Dissertação. Universidade de São Paulo Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, 2015.
- OKUMA, D. M.; BERNARDI, D.; HORIKOSHI, R. J.; BERNARDI, O.; SILVA, A. P.; OMOTO, C. Inheritance and fitness costs of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) resistance to spinosad in Brazil. **Pest Management Science**, v. 74, n. 6, p. 1441–1448, 2018.
- PEDGLE, D. E. Windborne migration of *Heliothis armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) to the British Isles. **Entomologist's Gazette**, v. 36, n. 1, p. 15–20, 1985.
- PEREIRA, R. M. **Caracterização da suscetibilidade a inseticidas diamidas e espinosinas em populações de *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) do Brasil**. Tese. Universidade de São Paulo Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, 2017.
- PERRY, T.; MCKENZIE, J. A.; BATTERHAM, P. A Dα6 knockout strain of *Drosophila melanogaster* confers a high level of resistance to spinosad. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 37, n. 2, p. 184–188, 2007.

- PUINEAN, A. M.; LANDSDELL, S. J.; COLLINS, T.; BIELZA, P.; MILLAR, N. S. A nicotinic acetylcholine receptor transmembrane point mutation (G275e) associated with resistance to spinosad in *Frankliniella occidentalis*. **Journal of Neurochemistry**, Malden, v. 124, n. 5, p. 590-601, 2013.
- QAYYUM, M. A.; WAKIL, W.; ARIF, M. J.; SAHI, S. T.; SAEED, N. A.; RUSSELL, D. A. Multiple resistances against formulated organophosphates, pyrethroids and newer-chemistry insecticides in populations of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) from Pakistan. **Journal of Economic Entomology**, p. 1-8, 2015.
- RAIS, D. S.; EIDI SATO, M.; DA SILVA, M. Z. Detecção e monitoramento da resistência do trips *Frankliniella occidentalis* ao inseticida espinosade. **Bragantia**, v. 72, n. 1, p. 35–40, 2013.
- REED, W. *Heliothis armigera* (Hb.) (Noctuidae) in Western Tanganyika. II.—Ecology and natural and chemical control. **Bulletin of Entomological Research**, v. 56, n. 1, p. 127–140, 1965.
- REHAN, A.; FREED, S. Selection, mechanism, cross resistance and stability of spinosad resistance in *Spodoptera litura* (Fabricius) (Lepidoptera: Noctuidae). **Crop Protection**, 2014.
- ROE, R. M.; YOUNG, H. P.; IWASA, T.; WYSS, C. F.; STUMPF, C. F.; SPARKS, T. C.; WATSON, G. B.; SHEETS, J. J.; THOMPSON, G. D. Mechanism of resistance to spinosyn in the tobacco budworm, *Heliothis virescens*. **Pestic. Biochem. Physiol**, v. 96, p. 8–13, 2010.
- 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**. Boston, MA: Springer US, p. 97–152, 1990.
- ROUSH, R. T.; MCKENZIE, J. A. Ecological Genetics of Insecticide and Acaricide Resistance. **Annual Review of Entomology**, v. 32, n. 1, p. 361–380, 1987.
- ROUSH, R. T.; MILLER, G. L. Considerations for Design of Insecticide Resistance Monitoring Programs. **Journal of Economic Entomology**, 1986.
- RUAN, Y. M.; WU, K. J. Performances of the cotton boll worm, *Helicoverpa armigera* on different food plants. **Acta Entomology**, v. 44, n. 2, p. 205–212, 2001.
- SALEEM, M. A.; AHMAD, M.; AHMAD, M.; ASLAM, M.; SAYYED, A. H. Resistance to Selected Organochlorin, Organophosphate, Carbamate and Pyrethroid, in *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae) from Pakistan. **Source: Journal of Economic Entomology**, v. 101, n. 5, p. 1667–1675, 2008.

- SALGADO, V. L. Studies on the mode of action of spinosad: Insect symptoms and physiological correlates. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, San Diego, v. 60, n. 2, p. 91-102, 1998.
- SALGADO, V. L.; SHEETS, J. J.; WATSON, G. B.; SCHMIDT, A. L. Studies on the mode of action of spinosad: the internal effective concentration and the concentration dependence of neural excitation. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, San Diego, v. 60, n. 2, p. 103-110, 1998.
- SALGADO, V. L.; SPARKS, T. C. The Spinosyns: Chemistry, Biochemistry, Mode of Action, and Resistance. **Comprehensive Molecular Insect Science**, p. 137–173, 2005.
- SAYYED, A. H.; SAEED, S.; NOOR-UL-ANE, M.; CRICKMORE, N. Genetic, Biochemical, and Physiological Characterization of Spinosad Resistance in *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae). **Journal of Economic Entomology**, v. 101, n. 5, p. 1658–1666, 2008.
- SCOTT, J. G. Investigating mechanisms of insecticide resistance: methods, strategies and pitfalls. In: ROUSH, R. T.; TABASHNIK, B. E. (Ed.). **Pesticide Resistance in Arthropods**. Boston, MA: Springer US, p. 97–152, 1990.
- SCOTT, J. G. Unraveling the mystery of spinosad resistance in insects. **J. Pestic. Sci**, v. 33, n. 3, p. 221–227, 2008.
- SHI, J.; ZHANG, L.; GAO, X. Characterisation of spinosad resistance in the housefly *Musca domestica* (Diptera: Muscidae). **Pest Management Science**, v. 67, n. 3, p. 335–340, 2011.
- SILVA, W. M.; BERGER, M.; BASS, C.; WILLIAMSON, M.; MOURA, D. M.; RIBEIRO, L. M.; SIQUEIRA, H. A. Mutation (G275E) of the nicotinic acetylcholine receptor $\alpha 6$ subunit is associated with high levels of resistance to spinosyns in *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, 2016.
- SOKAL, R. R., ROHLF, F. **Biometry: the principles and practice of statistics in biological research**, 1995.
- SPARKS, T. C.; NAUEN, R. IRAC: Mode of action classification and insecticide resistance management. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 121, p. 122–128, 2015.
- SPARKS, T.C., DRIPPS, J.E., WATSON, G.B., PAROONAGIAN, D. Resistance and cross-resistance to the spinosyns – A review and analysis. **Pestic. Biochem. Physiol**, v. 102, p. 1–10. doi: 10.1016/j.pestbp.2011.11.004, 2012.
- SPECHT, A.; SOSA-GOMEZ, D. R.; PAULA-MORAES, S. V.; YANO, S. A. C. Morphological and molecular identification of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) and expansion of its occurrence record in Brazil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 48, p. 689–692, 2013.

- SRIVASTAVA, C. P.; JOSHI, N.; TRIVEDI, T. P. Forecasting of *Helicoverpa armigera* populations and impact of climate change. **Indian Journal of Agricultural Sciences**, v. 80, n. 1, p. 3–10, 2010.
- STACKE, R. F.; ARNEMANNA, J. A.; ROGERSB, J.; STACKEA, R. S.; STRAHLA, T. T.; PERINIA, C. R.; DOSSINA, M. F.; POZEBONA, H.; CAVALLINA, L. A.; GUEDES, J. V. C. Damage assessment of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) in soybean reproductive stages. **Crop Protection**, v. 112, p. 10–17, 2018.
- STONE, B. F. A formula for determining degree of dominance in cases of monofactorial inheritance of resistance to chemicals. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 38, n. 2, p. 325–6, 1968.
- SUBRAMANYAM, B.; TOEWS, M. D.; ILELEJI, K. E.; MAIER, D. E.; THOMPSON, G. D.; PITTS, T. J. Evaluation of spinosad as a grain protectant on three Kansas farms. **Crop Protection**, v. 26, p. 1021-1030, 2007.
- SUZANA, C. S.; DAMIANI, R.; FORTUNA, L. S.; SALVADORI, J. R. Performance of *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) larvae in different food sources. **Pesq. Agropec. Trop**, v. 45, n. 4, p. 480–485, 2015.
- TABASHNIK, B. E. Determining the Mode of Inheritance of Pesticide Resistance with Backcross Experiments. **Journal of Economic Entomology**, v. 84, n. 3, p. 703–712, 1 jun. 1991.
- TARIQ, M. C.; MALIK, M. A.; IQBAL, N. Management of *Helicoverpa armigera* with different insecticides. **Pak. J. Agri**, v. 42, p. 75-77, 2005.
- TAY, W. T.; SORIA, M. F.; WALSH, T.; THOMAZONI, D.; SILVIE, P.; BEHERE, G. T.; ANDERSON, C.; DOWNES, S. A Brave New World for an Old-World Pest: *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) in Brazil. **Plos One**, v. 8, n. 11, 2013.
- TAY, W. T.; WALSH, T. K.; DOWNES, S.; ANDERSON, C.; JERMIIN, L. S.; WONG, T. K. F.; PIPER, M. C.; CHANG, E. S., MACEDO, I. B.; CZEPAK, C.; BEHERE, G. T.; SILVIE, P.; SORIA, M. F.; FRAYSSINET, M.; GORDON, K. H. J. Mitochondrial DNA and trade data support multiple origins of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera, Noctuidae) in Brazil. **Scientific Reports**, doi: 10.1038/srep45302, 2017.
- THOMPSON, G. D.; DUTTON, R.; SPARKS, T. C. Spinosad: a case study; an example from a natural products discovery programme. **Pest Management Science**, Sussex, v. 56, n. 8, p. 696-702, 2000.
- TONG, H.; QI, S.; ZHOU, X.; BAI, L. Field resistance of *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae) to organophosphates, pyrethroids, carbamates and four newer chemistry insecticides in Hunan, China. **Journal of Pest Science**, 2013.
- TSUKAMOTO, M. Methods of genetic analysis of insecticide resistance. In: **Pest Resistance to Pesticides**. Boston, MA: Springer US, p. 71–98, 1983.

- UREÑA, E.; GUILLEM-AMAT, A.; COUSO-FERRER, F.; BEROIZ, B.; PEREIRA, N.; LOPEZ-ERRASQUIN, E.; CASTANERA, P.; ORTEGO, F.; HERNANDEZ-CRESPO, P. Multiple mutations in the nicotinic acetylcholine receptor Ccα6 gene associated with resistance to spinosad in medfly. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 2961, 2019.
- WANG, D.; QIU, X.; REN, X.; NIU, F.; WANG, K. Resistance selection and biochemical characterization of spinosad resistance in *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 95, p. 90-94, 2009b.
- WANG, D.; QIU, X.; REN, X.; ZHANG, W.; WANG, K. Effects of spinosad on *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) from China: Tolerance status, synergism and enzymatic responses. **Pest Management Science**, 2009a.
- WANG, D.; QIU, X.; WANG, H.; QIAO, K.; WANG, K. Reduced fitness associated with spinosad resistance in *Helicoverpa armigera*. **Phytoparasitica**, v. 38, n. 2, p. 103–110, 2010.
- WANG, H.T.; TSAI, C. L.; CHEN, M. E. Nicotinic acetylcholine receptor subunit α6 associated with spinosad resistance in *Rhyzopertha dominica* (Coleoptera: Bostrichidae). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 148, p. 68–73, 2018.
- WANG, Z. H.; GONG, Y. J.; LI, B. Y.; CHEN, J. C.; KANG, Z. J.; ZHU, L.; GAO, Y. L.; REITZ, S.; WEI, S. J. Field-evolved resistance to insecticides in the invasive western flower thrips *Frankliniella occidentalis* (Pergande) (Thysanoptera: Thripidae) in China. **Pest Management Science**, v. 72, n. 7, p. 1440–1444, 2016.
- WATSON, G. B.; CHOUINARD S, W.; COOK, K, R.; GENG, C.; GIFFORD, J. M.; GUSTAFSON, G. D.; HASLER J. M.; LARRINUA, I. M.; LETHERER, T. J.; MITCHELL, J. C.; PAK, W. L.; SALGADO V. L.; SPARKS, T. C.; STILWELL, G. E. A spinosyn-sensitive *Drosophila melanogaster* nicotinic acetylcholine receptor identified through chemically induced target site resistance, resistance gene identification, and heterologous expression. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 40, n. 5, p. 376–384, 2010.
- WILSON, A. G. L. Resistance of *Heliothis armigera* to insecticides in the Ord irrigation area, north western Australia. **Journal of Economic Entomology**, v. 67, p. 256. 1974.
- WU, K.; MU, W.; LIANG, G.; GUO, Y. Regional reversion of insecticide resistance in *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) is associated with the use of *Bt* cotton in northern China. **Pest Management Science**, v. 61, n. 5, p. 491–498, 2005.
- WU, K. M. Regional management strategy for cotton bollworm *Helicoverpa armigera* in China. **Area-Wide Control of Insect Pests**, v. 7, p. 559-565. 2007.
- WU, K. M.; GUO, Y. Y. The evolution of cotton pest management in China. **Annual Review of Entomology**, v. 50, p. 31-52. 2005.

- YANG, Y.; LI, Y.; WU, Y. Current status of insecticide resistance in *Helicoverpa armigera* after 15 years of *Bt* cotton planting in China. **Journal of Economic Entomology**, v. 106, n. 1, p. 375–381, 2013.
- ZHANG, S. Y.; KONO, S.; TAMOTSU, M.; TADASHI, M. Mechanisms of resistance to spinosad in the western flower thrip, *Frankliniella occidentalis* (Pergande) (Thysanoptera: Thripidae). **Insect Science**, v. 15, n. 2, p. 125–132, 2008.
- ZHAO, J. Z.; COLLINS, H. L.; LI, Y. X.; MAU, R. F.; THOMPSON, G. D.; HERTLEIN, M.; ANDALORO, J. T.; BOYKIN, R.; SHELTON, A. M. Monitoring of diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae) resistance to spinosad, indoxacarb, and emamectin benzoate. **Journal of Economic Entomology**, v. 99, n. 1, p. 176–181, 2006.