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

Monitoramento e padrão de herança da resistência de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) a spinetoram

Ewerton da Costa Lira

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

Piracicaba
2018

Ewerton da Costa Lira
Engenheiro Agrônomo

Monitoramento e padrão de herança da resistência de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) a spinetoram

versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

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

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

Piracicaba
2018

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

Lira, Ewerton da Costa

Monitoramento e padrão de herança da resistência de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) a spinetoram / Ewerton da Costa Lira. - - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2018.

78 p.

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

1. Espinosinas 2. Monitoramento 3. Bases genéticas da resistência 4. Frequência alélica 5. Manejo de resistência I. Título

A Deus, pelo dom da vida e proteção em todos os momentos.

Agradeço

Aos meus pais José Lira Filho e Roseli Pereira da Costa Lira, e irmãos Fabio Gustavo Ramos Lira, Evandro da Costa Lira e Tiago da Costa Lira por todo amor, carinho, dedicação e insentivo incondicional;

Aos meus avós José Lira de Sousa (in memoriam), Expedita Pereira de Sousa, Maria de Lourdes Silva e Adonias Pereira da Costa por todos os ensinamentos, amor e insentivo em minha formação;

À Annellyse da Cunha Pereira Tonan, pelo amor, carinho, insentivo incondicional e palavras de ânimo e coragem nos momentos mais dificieis;

À Fabricia Zimermann Vilela Torres e José Raul Valério pela amizade, ensinamentos e insentivo em minha formação;

Dedico e Agradeço

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Celso Omoto pela orientação, ensinamentos, confiança e oportunidade para realização deste estudo.

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

Ao Comitê Brasileiro de Ação à Resistência a Inseticidas (IRAC-BR) pelo apoio logístico e financeiro para a realização desta pesquisa.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de estudo.

A Dow AgroSciences pelo fornecimento de amostras de inseticidas utilizados na presente pesquisa.

A todos os amigos do Programa de Pós-Graduação em Entomologia (USP/ESALQ) pelo agradável convívio.

Aos amigos, Fernando Semmelroth de Assunção e Amaral, Anderson Bolzan, António Rogério Bezerra do Nascimento, Rubens Hideo Kanno, Ingrid Schimidt Kaiser, Fernando Padovez e Aline Sartori Guidolin, pelo trabalho em grupo e suporte na condução deste estudo.

Aos amigos e colegas que são ou foram do Laboratório de Resistência de Artrópodes (USP/ESALQ): Fernando Semmelroth de Assunção e Amaral, Anderson Bolzan, António Rogério Bezerra do Nascimento, Rubens Hideo Kanno, Ingrid Schimidt Kaiser, Douglas Amado, Mariana Durigan, Dyrson Abbade Neto, Sandy Spineli Silva e Aline Sartori Guidolin, Oderlei Bernardi, Rogério Machado Pereira, Osmar Arias e Daniela Miyuki Okuma pela amizade, pelo convívio, companheirismo, auxílios prestados e troca de conhecimentos.

A Dr. Eloisa Salmeron, pesquisadora assistente do Laboratório de Resistência de Artrópodes (USP/ESALQ), pela amizade, ensinamentos e suporte durante todo o estudo.

A todos os estagiários com quem convivi no Laboratório de Resistência de Artrópodes (USP/ESALQ).

Aos amigos com quem morei em Piracicaba, Oderlei Bernardi, Lucas Silva Barrros, João Boa Vida da Cruz, pelos ótimos momentos, orientações e incentivos.

A todos os funcionários do Departamento de Entomologia e Acarologia (USP/ESALQ) por todo o empenho e dedicação nos serviços prestados.

Às bibliotecárias Eliana Maria Garcia e Silvia Maria Zinsly da Biblioteca Central da USP/ESALQ pela formatação deste trabalho.

A todos aqueles, que direta ou indiretamente, tiveram participação na realização deste trabalho, meu sincero agradecimento.

SUMÁRIO

RESUMO 8
ABSTRACT 9
1. INTRODUÇÃO 11
REFERÊNCIAS 13
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 17
2.1. ASPECTOS BIOECOLÓGICOS DE *S. FRUGIPERDA* 17
2.2. RESISTÊNCIA DE *S. FRUGIPERDA* A INSETICIDAS 18
2.3. ESPINOSINAS 19
2.4. DETECÇÃO E MONITORAMENTO DA RESISTÊNCIA 21
2.5. BASES GENÉTICAS DA RESISTÊNCIA 22
REFERÊNCIAS 23
3. MONITORAMENTO DA SUSCETIBILIDADE A SPINETORAM EM POPULAÇÕES DE *Spodoptera frugiperda* (J. E. SMITH) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE) NO BRASIL. 33
RESUMO 33
ABSTRACT 33
3.1. INTRODUÇÃO 34
3.2. MATERIAL E MÉTODOS 35
3.2.1. Populações de S. frugiperda 35
3.2.2. Bioensaios 38
3.2.3. Linhas-básica da suscetibilidade de S. frugiperda a spinetoram 38
3.2.4. Monitoramento da suscetibilidade de S. frugiperda a spinetoram 39
3.2.5. Estimativa da frequência do alelo que confere resistência de S. frugiperda a spinetoram 42
3.3. RESULTADOS 44
3.3.1. Linhas-básica da suscetibilidade de S. frugiperda a spinetoram 44
3.3.2. Monitoramento da suscetibilidade de S. frugiperda a spinetoram 46
3.3.3. Estimativa da frequência do alelo que confere resistência de S. frugiperda a spinetoram 51
3.4. DISCUSSÃO 54
3.5. CONCLUSÕES 56

REFERÊNCIAS 56
4. PADRÃO DE HERANÇA DA RESISTÊNCIA DE *Spodoptera frugiperda* (J. E. SMITH) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE) A SPINETORAM.....59
RESUMO 59
ABSTRACT.....59
4.1. INTRODUÇÃO.....60
4.2. MATERIAL E MÉTODOS.....61
4.2.1. Linhagem suscetível de referência.....61
4.2.2. Seleção da linhagem resistente de S. frugiperda a spinetoram 61
4.2.3. Caracterização da resistência de S. frugiperda a spinetoram 62
4.2.3.1. Razão de resistência 62
4.2.3.2. Resistência cruzada com spinosad 62
4.2.4. Padrão de herança da resistência de S. frugiperda a spinetoram.....63
4.2.4.1. Dominância.....63
4.2.4.2. Número de genes 64
4.3. RESULTADOS 66
4.3.1. Caracterização da resistência de S. frugiperda a spinetoram 66
4.3.1.1. Razão de resistência 66
4.3.1.2. Resistência cruzada com spinosad 66
4.3.2. Padrão de herança da resistência de S. frugiperda a spinetoram.....67
4.3.2.1. Dominância.....69
4.3.2.2. Número de genes 70
4.4. DISCUSSÃO.....71
4.5. CONCLUSÕES.....73
REFERÊNCIAS 74

RESUMO

Monitoramento e padrão de herança da resistência de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) a spinetoram

O uso de inseticidas do grupo das espinosinas tem sido crescente no manejo de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) no Brasil. Sendo assim, o objetivo do presente trabalho foi fornecer subsídios para a implementação de estratégias de Manejo da Resistência de Insetos (MRI), mediante a condução de estudos de monitoramento e de padrão de herança da resistência de *S. frugiperda* a spinetoram. Inicialmente foram realizadas linhas-básica de suscetibilidade para definições de concentrações diagnósticas para o monitoramento da resistência, e posteriormente foram conduzidos estudos para estimar a frequência do alelo que confere resistência a este inseticida de *S. frugiperda* a spinetoram. A caracterização da suscetibilidade foi realizada por meio bioensaio de ingestão mediante tratamento superficial da dieta com o inseticida. Os valores de CL_{50} estimadas variaram de 0,97 a 2,98 µg de spinetoram /mL (variação de 3 vezes) entre as populações de *S. frugiperda* testadas. A concentração diagnóstica baseada na CL_{99} foi de 5,6 µg de spinetoram /mL. Foram verificadas diferenças significativas nas suscetibilidades das populações de *S. frugiperda* nas safras 2016/17 e 2017/18, com sobrevivência variando de 0 a 30,2% na concentração diagnóstica. Os resultados obtidos evidenciam o aumento da sobrevivência de *S. frugiperda* a spinetoram ao longo das safras, com maiores sobrevivências registradas em populações coletadas na região Oeste do estado da Bahia. As frequências do alelo que confere resistência a spinetoram, estimadas pelo método de F_2 screen, variaram de 0,0107 a 0,1688 nas populações testadas. A linhagem de *S. frugiperda* resistente a spinetoram foi isolada a partir do método de F_2 screen realizado em uma população proveniente da cultura do milho da região Oeste da Bahia coletada na safra de 2016. Os valores de CL_{50} (95% IC) obtidos pelos bioensaios de concentração-resposta foram de 0,635 (0,555 – 0,730) µg de spinetoram /mL para a linhagem suscetível (SUS) e de 1170,96 (1041,61 – 1323,89) µg de spinetoram/mL para a linhagem resistente a spinetoram (SPT-R), resultando em uma razão de resistência de 1844 vezes. A população SPT-R apresentou alta resistência cruzada com spinosad. Os cruzamentos recíprocos entre as linhagens SUS e SPT-R revelaram que a resistência de *S. frugiperda* a spinetoram é autossômica e incompletamente recessiva. Os retrocruzamentos da progênie F_1 com a linhagem SPT-R evidenciaram que a resistência possui efeito poligênico. A estimativa do número efetivo de loci com contribuições iguais de efeito para a resistência foi de 1,18 a 1,76, sugerindo que a resistência de *S. frugiperda* a spinetoram está associada a poucos genes. Os resultados apresentados nesse estudo fornecem subsídios para elaboração de programas de MRI para preservar a vida útil de spinetoram para o manejo de *S. frugiperda* no Brasil.

Palavras-chave: Lagarta-do-cartucho; Espinosinas; Padrão de herança; Manejo de resistência de insetos

ABSTRACT

Monitoring and inheritance of the resistance of *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) to spinetoram

The use of spynosin insecticides has increased to manage *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) in Brazil. Then, the objective of this study was to provide information to implement Insect Resistance Management (IRM) by conducting studies to characterize the baseline susceptibility to spinetoram in Brazilian populations of *S. frugiperda*, to conduct resistance monitoring and to understand the inheritance of the resistance. Initially, baseline susceptibility studies were conducted to define diagnostic concentration for resistance monitoring, and then we conducted to estimate the frequency of alleles conferring resistance to this insecticide in *S. frugiperda*. The baseline susceptibility was performed by feeding bioassays using diet-overly treatment with the insecticide. The LC_{50} values ranged from 0.97 to 2.98 µg spinetoram / mL (3-fold variation). The diagnostic concentration based on LC_{99} was 5.6 µg spinetoram / mL. There were significant differences in the susceptibilities of *S. frugiperda* populations in the 2016/17 and 2017/18 growing seasons, with survival rates varying from 0 to 30.2%. These results showed the increase in survival of *S. frugiperda* to spinetoram across the growing seasons, with highest survival rates in populations of *S. frugiperda* collected in the Western region of Bahia state. The frequency of alleles conferring resistance to spinetoram, estimated by F_2 screen, varied from 0.0107 to 0.1688 in tested *S. frugiperda* populations. The spinetoram-resistant strain was selected using F2 screen method in a maize field-collected population from Western Bahia region during 2016 growing season. LC_{50} values (95% CI) obtained from concentration-response bioassays were 0.63 (0.55-0.73) µg spinetoram/mL for the susceptible strain (SUS) and 1170.96 (1041,61 - 1323.89) µg spinetoram/mL for the SPT-R strain, resulting in a resistance ratio of 1,844-fold. The SPT-R strain showed high cross-resistance to spinosad. The reciprocal crosses between SUS and SPT-R showed that the *S. frugiperda* resistance to spinetoram is autosomal and incompletely recessive. The backcrossing of the progeny F_1 with the SPT-R strain showed that the resistance has a polygenic effect. The estimation of the effective number of *loci* with equal resistance effect contributions was from 1.18 to 1.76, suggesting that the resistance of *S. frugiperda* to spinetoram is associated to few genes. The results obtained in this study provide information to implement IRM strategies to preserve the lifetime of spinetoram for managing S*. frugiperda* in Brazil.

Keywords: Fall armyworm; Spinosyns; Inheritance pattern; Management of insect resistance

1. INTRODUÇÃO

A lagarta-do-cartucho-do-milho, *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae), é a principal praga da cultura do milho e tem como possível centro de origem as regiões tropical e subtropical do hemisfério ocidental (LUGINBILL, 1928; SPARKS, 1979). Recentemente, foi relatada como espécie invasora na África Ocidental e Central, com os primeiros surtos registrados no início de 2016. Em amostras coletadas em cultivos de milho na Nigéria e em São Tomé, foram encontrados pelo menos dois haplótipos distintos (GOERGEN et al., 2016). A partir de amostras coletadas na região de Togo, foi confirmada a presença de haplótipos da região do Caribe e da costa leste dos Estados Unidos da Amérida (NAGOSHI et al., 2017). Trata-se de uma praga polífaga, com elevada capacidade de dispersão e amplamente distribuída no território brasileiro (CRUZ, 1995).

No Brasil, a presença de *S. frugiperda* no campo é constatada em praticamente todos os estados e durante o ano todo em regiões com condições edafoclimáticas favoráveis (CRUZ; FIGUEIREDO; SILVA, 2010). Além disso, a elevada capacidade de dispersão dos adultos e a grande oferta de hospedeiros ao longo do ano com sucessão de culturas hospedeiras tornam mais difícil o manejo desta praga em condições tropicais (BARROS; TORRES; BUENO, 2010; CRUZ, 1995; SPARKS, 1979).

O controle químico tem sido uma das principais táticas de manejo de *S. frugiperda*, mesmo após a liberação comercial de milho geneticamente modificado. O uso intensivo de inseticidas contribuiu para a evolução da resistência de *S. frugiperda* a diferentes grupos químicos. De acordo com os registros do Arthropod Pesticide Resistance Database, Michigan State University ("Arthropod Pesticide Resistance Database, Michigan State University", 2018), há 125 casos reportados de resistência de *S. frugiperda* a diversos grupos químicos de inseticidas, tais como piretroides, organofosforados, carbamatos e benzoilureias (DIEZ-RODRÍGUEZ; OMOTO, 2001; NASCIMENTO et al., 2016; YOUNG; MCMILLIAN, 1979; YU, 1991; YU; NGUYEN; ABO-ELGHAR, 2003).

A utilização de grupos químicos com diferentes mecanismos de ação é de fundamental importância para a implantação de um programa de Manejo de Resistência de Insetos (MRI). Um dos grupos relativamente recentes de inseticidas utilizados no manejo de *S. frugiperda* tem sido as espinosinas. As espinosinas foram

isoladas a partir da fermentação de uma actinobactéria de solo *Saccharopolyspora spinosa* Mertz and Yao (MERTZ; YAO, 1990; THOMPSON; DUTTON; SPARKS, 2000). Atualmente, existem dois ingredientes ativos no grupo das espinosinas, o spinosad que foi lançado em 1997 e o spinetoram lançado em 2007.

O inseticida spinetoram é uma molécula semi-sintética com maior atividade inseticida, maior eficácia, maior controle residual e atributos toxicológicos positivos que seu antecessor, spinosad (DRIPPS et al., 2008). No entanto, casos de resistência já foram relatados para *Drosophila melanogaster* (Meigen) (Diptera: Drosophilidae) (WATSON et al., 2010), *Choristoneura rosaceana* (Harris) (Lepitoptera: Tortricidae) (SIAL; BRUNNER; GARCZYNSKI, 2011), *Diaphorina citri* (Kuwayama) (Hemiptera: Liviidae) (TIWARI et al., 2011), *Plutella xylostella* (Linnaeus) (Lepidoptera: Plutellidae) (LIMA NETO et al., 2016) e *Frankliniella occidentalis* (Pergande) (Thysanoptera: Thripidae) (WANG et al., 2016). Recentemente, foi registrado um caso de resistência de *S. frugiperda* a spinosad no Brasil (OKUMA et al. 2017).

Para a implementação de estratégias de MRI é imprescindível alguns conhecimentos básicos para fornecer subsídios na tomada de decisões, obtidos a partir de alguns estudos como; caracterização e monitoramento da suscetibilidade em populações de campo da praga alvo, estimativa da frequência do alelo de resistência que fornece informações sobre o risco de evolução da resistência e estudos para compreensão das bases genéticas envolvidas na resistência. Na literatura existem diversos métodos de monitoramento de acordo com a realidade do estudo, divididos em métodos fenotípicos e genotípicos. Dentre os métodos fenotípicos o mais recomendado é com a utilização de concentrações diagnósticas, onde são testados maior número de indivíduos em apenas uma concentração (ROUSH; MILLER, 1986). Para estimativa da frequência de alelos de resistência em uma população são recomendados os métodos genotípicos de F_1 e F_2 screen, onde no F_1 screen é necessária a utilização de uma população resistente e no F_2 screen apenas populações de campo (ANDOW; ALSTAD, 1998; GOULD et al., 1997). O conhecimento das bases genéticas associadas à resistência, como o grau de dominância e o número de genes envolvidos são extremamente necessários para compreensão da evolução da resistência no campo e no estabelecimento de estratégias de manejo da resistência de insetos (ROUSH; MCKENZIE, 1987).

Portanto, com o registro de spinetoram para o controle de *S. frugiperda* no Brasil, o objetivo do presente trabalho foi fornecer subsídios para a implementação de estratégias de MRI, mediante a condução de estudos de monitoramento da frequência de resistência e de padrão de herança da resistência de *S. frugiperda* a spinetoram.

Referências

ANDOW, D. A.; ALSTAD, D. N. F_2 screen for rare resistance alleles. **Journal of Economic Entomology**, v. 91, n. 3, p. 572–578, 1 jun. 1998.

Arthropod Pesticide Resistance Database, Michigan State University. Disponível em: <http://www.pesticideresistance.org/index.php>. Acesso em: 17 ago. 2017.

BARROS, E. M.; TORRES, J. B.; BUENO, A. F. Oviposição, desenvolvimento e reprodução de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) em diferentes hospedeiros de importância econômica. **Neotropical Entomology**, v. 39, n. 6, p. 996–1001, dez. 2010.

CRUZ, I. **A lagarta-do-cartucho na cultura do milho.** Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo. Circular Técnica 21, p. 45, 1995. Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/handle/doc/475779>. Acesso em: 17 ago. 2017.

CRUZ, I.; FIGUEIREDO, M. DE L. C.; SILVA, R. B. **Monitoramento de adultos de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) e *Diatraea saccharalis* (Fabricius) (Lepidoptera: Pyralidae) em algumas regiões produtoras de milho no Brasil**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, Documentos 93, p. 42, 2010.

DIEZ-RODRÍGUEZ, G. I.; OMOTO, C. Herança da resistência de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) a lambda-cialotrina. **Neotropical Entomology**, v. 30, n. 2, p. 311–316, jun. 2001.

DRIPPS, J. et al. Spinetoram: how artificial intelligence combined natural fermentation with synthetic chemistry to produce a new spinosyn insecticide. **Plant Health Progress**, 2008.

GOERGEN, G. et al. First report of outbreaks of the fall armyworm *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae), a new alien invasive pest in west and Central Africa. **Plos One**, v. 11, n. 10, p. e0165632, 27 out. 2016.

GOULD, F. et al. 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. 3519–23, 15 abr. 1997.

LIMA NETO, J. E. et al. 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, 16 nov. 2016.

LUGINBILL, P. The fall armyworm. **USDA Technical Bulletin**, v. 34, p. 91, 1928.

MERTZ, F. P.; YAO, R. C. *Saccharopolyspora spinosa* sp. nov. Isolated from soil collected in a sugar mill rum still. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 40, n. 1, p. 34–39, 1 jan. 1990.

NAGOSHI, R. N. et al. Comparative molecular analyses of invasive fall armyworm in Togo reveal strong similarities to populations from the eastern United States and the Greater Antilles. **Plos One**, v. 12, n. 7, p. e0181982, 24 jul. 2017.

NASCIMENTO, A. R. B. DO et al. Genetic basis of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) resistance to the chitin synthesis inhibitor lufenuron. **Pest Management Science**, v. 72, n. 4, p. 810–815, abr. 2016.

OKUMA, D. M. et al. Inheritance and fitness costs of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) resistance to spinosad in Brazil. **Pest Management Science**, 14 dez. 2017.

ROUSH, R. T.; MCKENZIE, J. A. Ecological genetics of insecticide and acaricide resistance. **Annual Review of Entomology**, v. 32, n. 1, p. 361–380, jan. 1987.

SIAL, A. A.; BRUNNER, J. F.; GARCZYNSKI, S. F. Biochemical characterization of chlorantraniliprole and spinetoram resistance in laboratory-selected obliquebanded leafroller, *Choristoneura rosaceana* (Harris) (Lepidoptera: Tortricidae). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 99, n. 3, p. 274–279, mar. 2011.

SPARKS, A. N. A review of the biology of the fall armyworm. **The Florida Entomologist**, v. 62, n. 2, p. 82, jun. 1979.

THOMPSON, G. D.; DUTTON, R.; SPARKS, T. C. Spinosad - a case study: an example from a natural products discovery programme. **Pest Management Science**, v. 56, n. 8, p. 696–702, ago. 2000.

TIWARI, S. et al. Insecticide resistance in field populations of Asian citrus psyllid in Florida. **Pest Management Science**, v. 67, n. 10, p. 1258–1268, out. 2011.

WANG, Z.-H. et al. 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, 1 jul. 2016.

WATSON, G. B. et al. 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, maio 2010.

YOUNG, J. R.; MCMILLIAN, W. W. Differential feeding by two strains of sall armyworm larvae on carbaryl treated surfaces123. **Journal of Economic Entomology**, v. 72, n. 2, p. 202–203, 1 abr. 1979.

YU, S. J. Insecticide resistance in the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 39, n. 1, p. 84–91, jan. 1991.

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

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Aspectos bioecológicos de *S. frugiperda*

Spodoptera frugiperda (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) popularmente conhecida no Brasil como “lagarta-do-cartucho-do-milho” ou “lagarta militar”, é de origem tropical e subtropical do hemisfério ocidental (LUGINBILL, 1928; SPARKS, 1979). Recentemente, foi relatada como praga invasora nas regiões oeste e central da África, onde tem se espalhando rapidamente no continente (GOERGEN et al., 2016). Por ser uma espécie polífaga, existem relatos de ataque de *S. frugiperda* em cultivos de algodão, milho, sorgo, soja, amendoim, arroz (LUGINBILL, 1928; MARTINS et al., 2000; SALVADORI, 2000; SALVADORI; RUMIATTO, 1982; SANTOS, 2011; SILVA, 2000), além de algumas frutíferas e hortaliças (LUGINBILL, 1928; SARMENTO et al., 2002). Essa elevada polifagia ocasionou mudanças dentro da espécie, com alterações comportamentais e também fisiológicas que contribuíram para o aparecimento de raças ou biótipos milho e arroz, os quais apresentam um certo isolamento reprodutivo (NAGOSHI; MEAGHER, 2008; PASHLEY; MARTIN, 1987).

No Brasil, *S. frugiperda* é a principal e mais destrutiva praga da cultura do milho, causando danos em praticamente toda sua fase vegetativa e em alguns casos na fase reprodutiva, comprometendo a produção (CRUZ, 1995; FARINELLI; FORNASIERI FILHO, 2006; SILVA, 2000). A presença de *S. frugiperda* no campo é constatada em praticamente todos os estados durante todo o ano, favorecida pelas condições climáticas, elevada capacidade de dispersão do adultos e grande oferta de alimento ao longo do ano pela sucessão de culturas hospedeiras em algumas localidades (BARROS; TORRES; BUENO, 2010; CRUZ, 1995; SPARKS, 1979).

Os adultos de *S. frugiperda* medem cerca de 35 mm. Os machos têm coloração mais escura com manchas brancas características no ápice e entre as manchas orbicular e reniforme, já as fêmeas apresentam asas anteriores com coloração uniforme marrom acinzentado com manchas sutis (CRUZ, 1995). A capacidade reprodutiva de *S. frugiperda* é elevada, cerca de cinco a seis posturas por fêmea, com média de 215 ovos cada postura e viabilidade entre 60 e 70 % (SANTOS et al., 2004; SPARKS, 1979). A oviposição ocorre preferencialmente na parte abaxial da folha, podendo também ser encontrada em toda a planta quando a

densidade populacional é elevada (SPARKS, 1979). O período de incubação dos ovos pode durar dois dias quando em temperatura média de 26,7°C, já a 20°C esse período pode exceder 4 dias (CRUZ, 1995).

A fase jovem (estágio larval) de *S. frugiperda* pode durar de 14 a 19 dias, dividido em ínstares, podendo variar de 6 a 7 dependendo da planta hospedeira e/ou fatores climáticos (LUGINBILL, 1928; BUSATO et al., 2005). Na cultua do milho, as lagartas recém eclodidas primeiramente raspam as folhas novas e, posteriormente colonizam o cartucho da planta (SILVA, 1998, 2000), além da possiblidade de atacar também as espigas do milho. A lagarta deixa o cartucho do milho e penetra no solo quando completa seu desenvolvimento, isso para iniciar a fase de pupa, onde permanece de 10 a 12 dias (SARMENTO et al., 2002). Após esse período ocorre a emergência do adulto, seguido do acasalamento, que inicia com o pôr do sol e atinge o pico entre duas e quatro horas depois. A duração da fase adulta é de aproximadamente 12 dias. O ciclo completo de *S. frugiperda* dura entorno de 30 dias, com possibilidade de 10 a 12 gerações por ano em algumas localidades do Brasil (CRUZ, 1995).

2.2. Resistência de *S. frugiperda* a inseticidas

Existem inúmeras definições para resistência, Tabashnik et. al. (2014) a define de forma sucinta como sendo uma redução na suscetibilidade do inseto a um pesticida, com base genética. Definição semelhante foi dada por Brent (1986) que trata a resistência como qualquer diminuição hereditária na suscetibilidade a um produto químico em indivíduos de uma população de inseto-praga.

A exposição excessiva das populações de insetos-praga a inseticidas exerce forte pressão de seleção, o que contribui para o aumento nos casos de resistência, já amplamente distribuídos pelo mundo (GEORGHIOU, 1969). A contínua pressão de seleção é o processo determinante para que ocorra a evolução de resistência, pois a constante pressão de seleção aumenta a frequência relativa de indivíduos resistentes em uma população (BERNARDI et al., 2011).

De acordo com os registros do Arthropod Pesticide Resistance Database, Michigan State University (2018) já foram relatados 125 casos de resistência de *S. frugiperda* a diversos grupos químicos de inseticidas, como piretroides,

organofosforados, carbamatos, benzoilureias e spinosinas (DIEZ-RODRÍGUEZ; OMOTO, 2001; NASCIMENTO et al., 2016; OKUMA et al., 2017; YOUNG; MCMILLIAN, 1979; YU, 1991; YU; NGUYEN; ABO-ELGHAR, 2003).

2.3. Espinosinas

As espinosinas foram isoladas a partir da fermentação de uma actinobactéria de solo denominada *Saccharopolyspora spinosa* (MERTZ; YAO, 1990). Sua descoberta foi a partir da intenção de selecionar produtos naturais com potencial de utilização na agricultura e/ou na indústria farmacêutica, através de testes com extratos de solo fermentados (THOMPSON; DUTTON; SPARKS, 2000). Atualmente existem dois produtos comerciais destinados ao controle de pragas pertencentes ao grupo químico das espinosinas: o spinosad foi o primeiro inseticida comercial deste novo grupo, composto pelos ingredientes ativos espinosina A (componente primário – 85%) e espinosina D (composto secundário – 15%). O sucesso do spinosad, levou ao interesse de encontrar novos produtos naturais e/ou semissintéticos mais eficientes. Posterior ao spinosad, em 2007 foi lançado o inseticida denominado spinetoram, com maior atividade inseticida que seu antecessor, composto por duas espinosinas semissintéticas, 3´-O-ethyl-5,6-dihydro-spynosin J (principal componente) e 3´-O-ethyl spynosin L, obtidas através de exposição da linhagem normal *S. spinosa* com um composto mutagênico (HUANG et al., 2009).

Atualmente, as espinosinas são utilizadas no controle de inúmeras pragas, principalmente para as ordens Lepidoptera, Diptera e Thysanoptera, porém também é eficiente no controle de insetos-praga pertencentes a outras ordens (ORR et al., 2009; SALGADO, 1998). O grupo das espinosinas é de grande importância no manejo integrado de pragas, isso se deve ao mecanismo de ação exclusivo, baixa toxicidade a insetos benéficos, elevada eficiência e características toxicológicas favoráveis (SPARKS; CROUSE; DURST, 2001).

O Insecticide Resistance Action Committee (IRAC) classificou as espinosinas como um novo grupo de inseticidas (grupo 5), e quanto ao seu modo de ação, como moduladores alostéricos de receptores nicotínicos da acetilcolina (IRAC, 2017). Essas moléculas atuam em segmentos específicos de receptores de acetilcolina, agindo como um modulador alostérico ao receptor nicotínico da

acetilcolina, levando à hiperexcitação do sistema nervoso central (ORR et al., 2009; PUINEAN et al., 2013; SALGADO, 1998; SALGADO; SAAR, 2004). Os insetos intoxicados por espinosinas apresentam tremores e contrações musculares involuntárias, devido a excitação de neurônios motores, seguido de paralisia por conta da fadiga muscular causada pelo longo período de excitação (SALGADO, 1998). Existe a possibilidade das espinosinas exercerem atividade nos receptores do ácido aminobutírico (GABA), devido a alterações na amplitude da condutância de cloro, que ocasiona perda de função dos receptores de GABA em insetos intoxicados com spinosad (SALGADO, 1998). No entanto, elas não estabelecem relação direta com nenhum dos receptores de GABA conhecidos. Diante disso, pode-se dizer que as espinosinas possuem efeito tanto nos receptores nicotínicos da acetilcolina, quanto nos receptores de GABA, isso se deve a sua ligação em sítios alostéricos que ativam os respectivos receptores via transmembrana (ORR et al., 2009; SPARKS; CROUSE; DURST, 2001).

A detoxificação metabólica e a insensibilidade do sitio de ação são os mecanismos de resistência de insetos já caracterizados para os inseticidas do grupo das espinosinas (MARKUSSEN; KRISTENSEN, 2012; ROE et al., 2010; SIAL; BRUNNER; GARCZYNSKI, 2011). Em estudo realizado com *Drosophila melanogaster* Meigen resistente a spinosad, foi observado que a linhagem de *D. melanogaster* apresentava alta resistência a spinosad com a deleção do gene Dα6, responsável pela expressão de uma das subunidades que formam os receptores nicotínicos da acetilcolina (PERRY; MCKENZIE; BATTERHAM, 2007). Outros estudos realizados com *Plutella xylostella* também apontam que a resistência a espinosinas está ligada a mutações na subunidade α6 dos receptores nicotínicos da acetilcolina (BAXTER et al., 2010; RINKEVICH et al., 2010).

Diante disso, diversos casos de resistência a espinosinas exclusivamente o spinosad foram relatados em diversas espécies de insetos, como *Drosophila melonagaster* (Meigen) (PERRY; MCKENZIE; BATTERHAM, 2007), *Musca domestica* L. (MARKUSSEN; KRISTENSEN, 2012), *Spodoptera litura* F. (REHAN; FREED, 2014; SALEEM et al., 2016), *Spodoptera exigua* (Hübner) (CHE et al., 2013; ISHTIAQ; SALEEM, 2011; ZHANG et al., 2014) e *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (OKUMA et al., 2017). De acordo com o Arthropod Pesticide Resistance Database, Michigan State University (2018) existem 257 casos de resistência de insetos ao grupo químico das espinosinas, dos quais 83 são para o gênero *Spodoptera*. Os

casos de resistência citados anteriormente são exclusivamente para o spinosad, pois se tratando do spinetoram ainda não foram relatados casos de resistência. No entanto, a resistência cruzada entre espinosinas já foi constatada em algumas espécies e ordens de insetos (SPARKS et al., 2012).

2.4. Detecção e monitoramento da resistência

O monitoramento das populações de inseto-praga é de grande importância para o manejo de resistência, pois permite identificar alterações na suscetibilidade das populações e assim orientar na tomada de decisão para o controle, gerenciar estratégias para manter a suscetibilidade das populações e garantir o retardamento da evolução de resistência (ROUSH; MILLER, 1986).

Dentre os métodos utilizados para o monitoramento da resistência de insetos a inseticidas, podemos destacar os métodos fenotípicos e genotípicos. A caracterização da suscetibilidade (linhas-básica) em populações de campo mediante estimativa da concentração letal que mata 50% da população (CL_{50}) pela análise de Probit é um método que tem sido utilizado para a detecção e monitoramento da resistência a inseticidas. Este método permite comparar as CL_{50} entre as populações juntamente com os coeficientes angulares (FFRENCH-CONSTANT; ROUSH, 1990). No entanto, este método só permite distinguir indivíduos resistentes em populações de campo quando a frequência de resistência é elevada (ROUSH; MILLER, 1986; VENETTE; HUTCHISON; ANDOW, 2000). A frequência de alelos que conferem resistência a uma população no início da evolução da resistência é baixa, da ordem de 10^{-2} a 10^{-3} (ROUSH; MCKENZIE, 1987). Diante disso, fica evidenciado que este método não é o mais indicado para detectar indivíduos resistentes quando a frequência de resistência é baixa, devido à necessidade de um número muito maior de indivíduos testados (ROUSH; MILLER, 1986). No entanto, a caracterização das linha- básica permite estimar a concentração diagnostica, que é uma concentração do inseticida capaz de matar todos ou quase todos os indivíduos suscetíveis, mas poucos ou nenhum indivíduo resistente (TABASHNIK et al., 2014). Para o monitoramento da resistência é recomendado o uso de concentrações diagnósticas, onde são testados um maior número de indivíduos em concentrações que

evidenciam alterações nos fenótipos resistentes em populações de campo (ROUSH; MILLER, 1986).

Os métodos fenotípicos são mais eficientes para o monitoramento da resistência de alelos aditivos ou dominantes com frequência elevada em populações de campo (ANDOW, 2008; ANDOW; ALSTAD, 1998). Porém, para adoção de um programa de manejo de resistência eficiente é preciso implementar antes do problema de resistência, ou seja, no início da sua evolução (ROUSH; MCKENZIE, 1987).

Sendo assim, os métodos genotípicos que são capazes de estimar a frequência inicial de alelos de conferem resistência em populações de campo são mais indicados, como o método do F_1 screen (GOULD et al., 1997) e do F_2 screen (ANDOW; ALSTAD, 1998). Ambos os métodos são eficientes para a estimativa da frequência alélica inicial, no entanto, fazendo uma comparação, o método F_2 screen é mais trabalhoso e apresenta alto custo, porém não é necessário ter uma linhagem resistente e é o único método que possibilita em menor tempo detectar alelos raros em populações de campo, assim, sendo mais eficiente que o método F_1 screen que exige a utilização de uma linhagem resistente e necessita de um maior número de isofamílias e lagartas (BERNARDI et al., 2011).

O método do "F_2 Screen" baseia-se na coleta ao acaso de fêmeas acasaladas em campo, seguida de criação da progênie de cada fêmea separadamente (isofêmea) para a obtenção de lagartas da geração F_1, que serão criadas até a fase adulta para acasalamento e obtenção da geração F_2 que serão submetidas a ensaios toxicológicos através de bioensaios (ANDOW; ALSTAD, 1998).

2.5. Bases genéticas da resistência

Diante da magnitude do problema de resistência de insetos a inseticidas e proteínas *Bt* nos dias de hoje, têm aumentado a necessidade de estudos básicos para compreensão da evolução da resistência. Partindo da teoria que a resistência não pode ser totalmente compreendida sem informações genéticas, estudos sobre os fatores genéticos envolvido na resistência são importantes ferramentas para o manejo da resistência (ROUSH; DALY, 1990).

Dentre os fatores genéticos envolvidos na resistência de insetos, são mencionadas a frequência dos alelos de resistência e a herança da resistência, que leva em consideração o número e a dominância dos alelos de resistência (GEORGHIOU; TAYLOR, 1977a; ROUSH; DALY, 1990). A completa descrição do padrão de herança da resistência fornece conhecimento do número de genes envolvidos, as relações de dominância entre os genótipos, e as relações de resistência cruzada (ROUSH; DALY, 1990). A caracterização da resistência juntamente com o conhecimento das bases genéticas associadas à resistência (grau de dominância e o número de genes envolvidos) são extremamente necessários para compreensão da evolução da resistência no campo e para o estabelecimento de estratégias de manejo da resistência de insetos (ROUSH; DALY, 1990; ROUSH; MCKENZIE, 1987).

Referências

AHMAD, M.; ARIF, I. M.; AHMAD, Z. Monitoring Insecticide Resistance of Helicoverpa armigera (Lepidoptera: Noctuidae) in Pakistan. **Journal of Economic Entomology**, v. 88, n. 4, p. 771–776, 1 ago. 1995.

ANDOW, D. A. The risk of resistance evolution in insects to transgenic insecticidal crops. **Collection of Biosafety Reviews, International Centre for Genetic Engineering and Biotechnology**, v. 4, p. 142–199, 2008.

ANDOW, D. A.; ALSTAD, D. N. F2 screen for rare resistance alleles. **Journal of Economic Entomology**, v. 91, n. 3, p. 572–578, 1 jun. 1998.

ANDOW, D. A.; IVES, A. R. Monitoring and Adaptive Resistance Management. v. 12, n. 5, p. 1378–1390, 2002.

Arthropod Pesticide Resistance Database, Michigan State University. Disponível em: <http://www.pesticideresistance.org/index.php>. Acesso em: 17 ago. 2017.

BARROS, E. M.; TORRES, J. B.; BUENO, A. F. Oviposição, desenvolvimento e reprodução de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) em diferentes hospedeiros de importância econômica. **Neotropical Entomology**, v. 39, n. 6, p. 996–1001, dez. 2010.

BAXTER, S. W. et al. Mis-spliced transcripts of nicotinic acetylcholine receptor α6 are associated with field evolved spinosad resistance in *Plutella xylostella* (L.). **PLoS Genetics**, v. 6, n. 1, p. e1000802, 8 jan. 2010.

BERNARDI, O. et al. Resistência de insetos-praga a plantas geneticamente modificadas. In: [s.l: s.n.]. p. 181–208.

BOURGUET, D.; GENISSEL, A.; RAYMOND, M. Insecticide resistance and dominance levels. **Journal of Economic Entomology**, v. 93, n. 6, p. 1588–95, dez. 2000.

BRENT, K. J. Detection and monitoring of resistant forms: an overview. In: **Pesticide resistance: strategies and tactics for management**. Washington, DC: National Academy Press, p. 298–312, 1986.

BURTET, L. M. et al. Managing fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae), with Bt maize and insecticides in southern Brazil. **Pest Management Science**, v. 73, n. 12, p. 2569–2577, 1 dez. 2017.

CARVALHO, R. A. et al. Investigating the molecular mechanisms of organophosphate and pyrethroid resistance in the fall armyworm *Spodoptera frugiperda*. **Plos One**, v. 8, n. 4, 2013.

CHE, W. et al. Insecticide resistance status of field populations of *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae) from China. **Journal of Economic Entomology**, v. 106, n. 4, p. 1855–1862, 1 ago. 2013.

CONAB. **Acompanhamento da safra brasileira:** grãos, nono levantamento, julho 2018. Brasília: Companhia Nacional de Abastecimento, 2018. Disponível em: <file:///C:/Users/LIRAEC/Downloads/BoletimZGraosZjunhoZ2018.pdf>. Acesso em: 17 jul. 2018.

CROUSE, G. D. et al. Recent advances in the chemistry of spinosyns. **Pest Management Science**, v. 57, n. 2, p. 177–185, 1 fev. 2001.

CROW, J. F.; KIMURA, M. **An introduction to population genetics theory**. New York: Evanston and London: Harper & Row, 1970.

CRUZ, I. **A lagarta-do-cartucho na cultura do milho.** Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo. Circular técnica 21, p.45, 1995. Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/handle/doc/475779>. Acesso em: 17 ago. 2017.

CRUZ, I.; FIGUEIREDO, M. DE L. C.; SILVA, R. B. **Monitoramento de adultos de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) e *Diatraea saccharalis* (Fabricius) (Lepidoptera: Pyralidae) em algumas regiões produtoras de milho no Brasil**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, Documentos 93, p. 42, 2010.

DIEZ-RODRÍGUEZ, G. I.; OMOTO, C. Herança da resistência de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) a lambda-cialotrina. **Neotropical Entomology**, v. 30, n. 2, p. 311–316, jun. 2001.

DRIPPS, J. et al. Spinetoram: how artificial intelligence combined natural fermentation with synthetic chemistry to produce a new spinosyn insecticide. **Plant Health Progress**, 2008.

ENGELS, H. et al. Evaluating resistance to Bt toxin Cry1Ab by F2 screen in European populations of Ostrinia nubilalis (Lepidoptera: Crambidae). **Journal of economic entomology**, v. 103, n. 5, p. 1803–9, out. 2010.

FARIAS, J. R. et al. Field-evolved resistance to Cry1F maize by *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in Brazil. **Crop Protection**, v. 64, p. 150–158, out. 2014.

FARINELLI, R.; FORNASIERI FILHO, D. Avaliação de dano de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) em cultivares de milho. **Científica**, v. 34, n. 2, p. 197–202, 2006.

FFRENCH-CONSTANT, R. H.; ROUSH, R. T. Resistance detection and documentation: the relative roles of pesticidal and biochemical assays. In: ROUSH, R. T.; TABASHNIK, B. E. (Eds.). . **Pesticide Resistance in Arthropods**. Boston, MA: Springer US, p. 4–38, 1990.

FINNEY, D. J. **Probit Analysis: a statistical treatment of the sigmoid response curve**. 2. ed. New York: Cambridge University Press, 1952.

GEORGHIOU, G. P. Genetics of resistance to insecticides in houseflies and mosquitoes. **Experimental Parasitology**, v. 26, n. 2, p. 224–255, out. 1969.

GEORGHIOU, G. P.; TAYLOR, C. E. Genetic and biological influences in the evolution of insecticide resistance. **Journal of Economic Entomology**, v. 70, n. 3, p. 319–323, 1 jun. 1977a.

GEORGHIOU, G. P.; TAYLOR, C. E. Operational influences in the evolution of insecticide resistance. **Journal of Economic Entomology**, v. 70, n. 5, p. 653–658, 1 out. 1977b.

GOERGEN, G. et al. First report of outbreaks of the fall armyworm *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae), a new alien invasive pest in west and Central Africa. **PLOS ONE**, v. 11, n. 10, p. e0165632, 27 out. 2016.

GOULD, F. et al. 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. 3519–23, 15 abr. 1997.

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

HUANG, K. et al. Recent advances in the biochemistry of spinosyns. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 82, n. 1, p. 13–23, 10 fev. 2009.

ILARIO, C. G. **A região agrícola competitiva do Oeste Baiano**. Boletim Campineiro de Geografia, v.3, n.1, p. 117–137, out. 2013.

IRAC. **Modes of Action (MoA) Classification**. Disponível em: <http://www.irac-online.org/modes-of-action/>. Acesso em: 17 ago. 2017.

ISHTIAQ, M.; SALEEM, M. A. Generating susceptible strain and resistance status of field populations of *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae) against some conventional and new chemistry insecticides in Pakistan. **Journal of economic entomology**, v. 104, n. 4, p. 1343–8, ago. 2011.

KASTEN JR, P.; PRECETTI, A. A. C. M.; PARRA, J. R. P. Dados biologicos comparativos de Spodoptera frugiperds (JE Smith, 1797) em duas dietas artificiais e substrato natural. **Revista de Agricultura**, v. 53, p. 69–78, 1978.

KASTEN, P. J.; PRECETTI, A. A. C. M.; PARRA, J. R. P. Comparative biologic data on *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) on two artificial diets and natural substrate. **Revista de agricultura**, v. v. 53, 1978.

LANDE, R. The minimum number of genes contributing to quantitative variation between and within populations. **Genetics**, v. 99, n. 3–4, p. 541–53, 1981.

LEORA SOFTWARE. **POLO-Plus 1.0 Probit and Logit analysis**PetalumaLeOra Software, 2003.

LIMA NETO, J. E. et al. 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, 16 nov. 2016.

LUGINBILL, P. **The fall army worm**. USDA Technical Bulletin, v.34, p. 92, 1928.

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, jan. 2012.

MARTINS, J. F. S. . et al. Controle de insetos na cultura do arroz irrigado. In: GUEDES, J. C. .; COSTA, I. D. .; CASTIGLIONI, E. (Eds.). . **Bases e técnicas do manejo de insetos**. Santa Maria, UFSM: UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA. Centro de Ciências Rurais. Departamento de Defesa Fitossanitária, p. 137–154, 2000.

MCDOUGALL, P. **The Cost of New Agrochemical Product Discovery, Development and Registration in 1995, 2000, 2005-8 and 2010 to 2014**. R&D expenditure in 2014 and expectations for 2019. p. 41, 2016.

MERTZ, F. P.; YAO, R. C. *Saccharopolyspora spinosa* sp. nov. Isolated from soil collected in a sugar mill rum still. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 40, n. 1, p. 34–39, 1 jan. 1990.

NAGOSHI, R. N.; MEAGHER, R. L. Review of fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) genetic complexity and migration. **Florida Entomologist**, v. 91, n. 4, p. 546–554, 2008.

NASCIMENTO, A. R. B. DO et al. Genetic basis of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) resistance to the chitin synthesis inhibitor lufenuron. **Pest Management Science**, v. 72, n. 4, p. 810–815, abr. 2016.

OKUMA, D. M. et al. Inheritance and fitness costs of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) resistance to spinosad in Brazil. **Pest Management Science**, 14 dez. 2017.

OMOTO, C. et al. Field-evolved resistance to Cry1Ab maize by *Spodoptera frugiperda* in Brazil. **Pest Management Science**, v. 72, n. 9, p. 1727–1736, set. 2016.

ORR, N. et al. Novel mode of action of spinosad: Receptor binding studies demonstrating lack of interaction with known insecticidal target sites. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 95, n. 1, p. 1–5, set. 2009.

OSORIO, A. et al. Monitoring of beet armyworm resistance to spinosad and methoxyfenozide in Mexico. **Pest Management Science**, v. 64, n. 10, p. 1001–1007, out. 2008.

PASHLEY, D. P.; MARTIN, J. A. Reproductive incompatibility between host strains of the fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae). **Annals of the Entomological Society of America**, v. 80, n. 6, p. 731–733, 1987.

PERRY, T.; MCKENZIE, J. A.; BATTERHAM, P. A Dα6Dα6 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, fev. 2007.

PUINEAN, A. M. et al. A nicotinic acetylcholine receptor transmembrane point mutation (G275E) associated with resistance to spinosad in Frankliniella occidentalis. **Journal of Neurochemistry**, v. 124, n. 5, p. 590–601, mar. 2013.

R CORE TEAM. **R: A Language and Environment for Statistical Computing.** Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing, 2017.

REHAN, A.; FREED, S. Selection, mechanism, cross resistance and stability of spinosad resistance in *Spodoptera litura* (Fabricius) (Lepidoptera: Noctuidae). **Crop Protection**, v. 56, p. 10–15, 1 fev. 2014.

RINKEVICH, F. D. et al. Transcripts of the nicotinic acetylcholine receptor subunit gene Pxylα6 with premature stop codons are associated with spinosad resistance in diamondback moth, *Plutella xylostella*. **Invertebrate neuroscience : IN**, v. 10, n. 1, p. 25—33, 2010.

ROBERTSON, J. L. et al. **Bioassays with Arthropods**. 2. ed. [s.l.] CRC press, 2007.

ROE, R. M. et al. Mechanism of resistance to spinosyn in the tobacco budworm, *Heliothis virescens*. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 96, n. 1, p. 8–13, jan. 2010.

ROUSH, R. T.; DALY, J. C. The role of population genetics in resistance research and management. In: ROUSH, R. T.; TABASHNIK, B. E. (Eds.). . **Pesticide Resistance in Arthropods**. New York, NY: Chapman and Hall, 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, jan. 1987.

ROUSH, R. T.; MILLER, G. L. Considerations for design of insecticide resistance monitoring programs. **Journal of Economic Entomology**, v. 79, n. 2, p. 293–298, 1 abr. 1986.

SALEEM, M. et al. Monitoring of insecticide resistance in *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae) from four districts of Punjab, Pakistan to conventional and new chemistry insecticides. **Crop Protection**, v. 79, p. 177–184, 1 jan. 2016.

SALGADO, V. L. Studies on the mode of action of spinosad: insect symptoms and physiological correlates. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 60, n. 2, p. 91–102, jul. 1998.

SALGADO, V. L.; SAAR, R. Desensitizing and non-desensitizing subtypes of alpha-bungarotoxin-sensitive nicotinic acetylcholine receptors in cockroach neurons. **Journal of Insect Physiology**, v. 50, n. 10, p. 867–879, out. 2004.

SALVADORI, J. R. Pragas de trigo no Brasil. In: GUEDES, J. C.; DA COSTA, I. D.; CASTIGLIONI, E. (Eds.). **Bases e técnicas do manejo de insetos**. Santa Maria, UFSM: UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA. Centro de Ciências Rurais. Departamento de Defesa Fitossanitária, p. 155–167, 2000.

SALVADORI, J. R.; RUMIATTO, M. Observações sobre a biologia de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) em trigo. Embrapa Agropecuária Oeste, Comunicado Técnico 8, p. 1-6, 1982.

SANO, E. E. et al. Fronteira agrícola do oeste baiano: considerações sobre os aspectos temporais e ambientais. **Geociências**, v. 30, n. 3, p. 479–489, 2011.

SANTOS, L. M. DOS et al. Fertilidade e longevidade de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) em genótipos de milho. **Ciência Rural**, v. 34, n. 2, p. 345–350, abr. 2004.

SANTOS, W. J. Manejo das pragas do algodão com destaque para o cerrado brasileiro. In: FREIRE, E. C. (Ed.). . **Algodão – No Cerrado do Brasil**. Aparecida de Goiânia: Associação Brasileira dos Produtores de Algodão, p. 495–566, 2011.

SARMENTO, R. A. et al. Revisão da biologia, ocorrência e controle de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera, Noctuidae) em milho no Brasil. **Bioscience Journal**, v. 18, n. 2, p. 41–48, 2002.

SAS INSTITUTE INC. **SAS® OnDemand for Academics: User's Guide.**Cary, NC, SAS Institute Inc., 2015.

SIAL, A. A.; BRUNNER, J. F.; GARCZYNSKI, S. F. Biochemical characterization of chlorantraniliprole and spinetoram resistance in laboratory-selected obliquebanded leafroller, *Choristoneura rosaceana* (Harris) (Lepidoptera: Tortricidae). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 99, n. 3, p. 274–279, mar. 2011.

SILVA, M. T. B. Insetos-pragas: aspectos ecológicos, danos e controle. **A cultura do milho no plantio direto**, p. 95–123, 1998.

SILVA, M. T. B. Manejo de insetos nas culturas de milho e soja. In: GUEDES, J. C.; COSTA, I. D.; CASTIGLIONI, E. (Eds.). **Bases e técnicas do manejo de insetos**. Santa Maria, UFSM: Pallotti, p. 169–200, 2000.

SIMS, S. B. et al. Monitoring Strategies for Early Detection of Lepidoptera Resistance to *Bacillus thuringiensis* Insecticidal Proteins. In: BROWN, T. M. (Ed.). **Molecular Genetics and Evolution of Pesticide Resistance**. p. 229–242, 1996.

SOKAL, R. R.; ROHLF, F. **Biometry: the Principles and Practice of Statistics in Biological Research**. 4. ed. New York, NY: W.H. Freeman and Company, 1995.

SPARKS, A. N. A review of the biology of the fall armyworm. **The Florida Entomologist**, v. 62, n. 2, p. 82, jun. 1979.

SPARKS, T. C. et al. Resistance and cross-resistance to the spinosyns – A review and analysis. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 102, n. 1, p. 1–10, jan. 2012.

SPARKS, T. C. Insecticide discovery: An evaluation and analysis. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v.107, p. 8-17, 2013.

SPARKS, T. C.; CROUSE, G. D.; DURST, G. Natural products as insecticides: the biology, biochemistry and quantitative structure-activity relationships of spinosyns and spinosoids. **Pest Management Science**, v. 57, n. 10, p. 896–905, out. 2001.

SPARKS, T. C.; LORSBACH, B. A. Perspectives on the agrochemical industry and agrochemical discovery. **Pest Management Science**, v. 73, n. 4, p. 672–677, 1 abr. 2017.

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.

TABASHNIK, B. E. et al. Defining terms for proactive management of resistance to Bt crops and pesticides. **Journal of Economic Entomology**, v. 107, n. 2, p. 496–507, 1 abr. 2014.

THOMPSON, G. D.; DUTTON, R.; SPARKS, T. C. Spinosad - a case study: an example from a natural products discovery programme. **Pest Management Science**, v. 56, n. 8, p. 696–702, ago. 2000.

TIWARI, S. et al. Insecticide resistance in field populations of Asian citrus psyllid in Florida. **Pest Management Science**, v. 67, n. 10, p. 1258–1268, out. 2011.

TSUKAMOTO, M. Methods of genetic analysis of insecticide resistance. In: GEORGHIOU, G. P.; SAITO, T. (Eds.). **Pest Resistance to Pesticides**. New York, NY: Plenum, p. 71–98, 1983.

VENETTE, R. C.; HUTCHISON, W. D.; ANDOW, D. A. An in-field screen for early detection and monitoring of insect resistance to Bacillus thuringiensis in transgenic crops. **Journal of Economic Entomology**, v. 93, n. 4, p. 1055–1064, 1 ago. 2000.

WANG, D. et al. Resistance selection and biochemical characterization of spinosad resistance in Helicoverpa armigera (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 95, n. 2, p. 90–94, 1 out. 2009.

WANG, Z.-H. et al. 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, 1 jul. 2016.

WATSON, G. B. et al. 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, maio 2010.

YOUNG, J. R.; MCMILLIAN, W. W. Differential feeding by two strains of sall armyworm larvae on carbaryl treated surfaces123. **Journal of Economic Entomology**, v. 72, n. 2, p. 202–203, 1 abr. 1979.

YU, S. J. Insecticide resistance in the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 39, n. 1, p. 84–91, jan. 1991.

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

ZHANG, P. et al. Resistant levels of *Spodoptera exigua* to eight various insecticides in Shandong, China. **Journal of Pesticide Science**, v. 39, n. 1, p. 7–13, 2014.

3. MONITORAMENTO DA SUSCETIBILIDADE A SPINETORAM EM POPULAÇÕES DE *Spodoptera frugiperda* (J. E. SMITH) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE) NO BRASIL.

RESUMO

O monitoramento da suscetibilidade de insetos a inseticidas é uma das etapas fundamentais em programas de Manejo da Resistência de Insetos (MRI). O uso de inseticidas do grupo das espinosinas tem sido crescente no manejo de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) no Brasil. Sendo assim, o objetivo do presente estudo foi entender a suscetibilidade de populações brasileiras de *S. frugiperda* ao inseticida spinetoram. Inicialmente foram construídas linhas-básica de suscetibilidade para definições de concentrações diagnósticas para o monitoramento da resistência, e posteriormente foram conduzidos estudos para estimar a frequência do alelo que confere resistência a este inseticida de *S. frugiperda* a spinetoram. A caracterização da suscetibilidade foi realizada por meio de bioensaios de ingestão mediante tratamento superficial da dieta com o inseticida. Os valores de CL_{50} estimadas variaram de 0,97 a 2,98 µg de spinetoram /mL (variação de 3 vezes) entre as populações de *S. frugiperda* testadas. A concentração diagnóstica baseada na CL_{99} foi de 5,6 µg de spinetoram /mL. Foram verificadas diferenças significativas nas suscetibilidades das populações de *S. frugiperda* nas safras 2016/17 e 2017/18, com sobrevivência variando de 0 a 30,2% na concentração diagnóstica. Os resultados obtidos evidenciam o aumento da sobrevivência de *S. frugiperda* a spinetoram ao longo das safras, com maiores sobrevivências registradas em populações coletadas na região Oeste do estado da Bahia. As frequências do alelo que confere resistência a spinetoram, estimadas pelo método de F_2 screen, variaram de 0,0107 a 0,1688 nas populações testadas. Os resultados obtidos neste estudo indicam um elevado risco de evolução da resistência de *S. frugiperda* a spinetoram e evidenciam a necessidade de implementação de estratégias de MRI para preservar a vida útil deste inseticida.

Palavras-chave: Lagarta-do-cartucho; Espinosinas; Linha básica; F_2 screen

ABSTRACT

Monitoring the insect susceptibility to insecticides is one the crucial steps in Insect Resistance Management (IRM) programs. The use of spinosyns insecticides has increased to manage *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) in Brazil. Then, the objective of this study was to understand the susceptibility to spinetoram in Brazilian populations of *S. frugiperda*. Initially, baseline susceptibility studies were conducted to define diagnostic concentration for resistance monitoring, and then we conducted to estimate the frequency of alleles conferring resistance to this insecticide in *S. frugiperda*. The baseline susceptibility was performed by feeding bioassays using diet-overly treatment with the insecticide. The LC_{50} values ranged from 0.97 to 2.98 µg spinetoram / mL (3-fold variation). The diagnostic concentration based on LC_{99} was 5.6 µg spinetoram / mL. There were significant differences in the susceptibilities of *S. frugiperda* populations in the 2016/17 and 2017/18 growing seasons, with survival rates varying from 0 to 30.2%. These results showed the increase in survival of *S. frugiperda* to spinetoram across the growing seasons, with highest survival rates in populations of *S. frugiperda* collected in the Western region of Bahia state. The frequency of alleles conferring resistance to spinetoram, estimated by F_2 screen, varied from 0.0107 to 0.1688 in tested *S. frugiperda* populations. The results obtained in this study indicate a high risk of resistance evolution of *S. frugiperda* to the insecticide spinetoram and the need to implement IRM strategies to preserve the lifetime of this insecticide.

Keywords: Fall armyworm; Spinosyns, Baseline susceptibility; F_2 screen

3.1. Introdução

No Brasil, o controle químico tem sido amplamente empregado para o manejo de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae), até mesmo com a exploração de cultivos de milho transgênico que expressam proteínas inseticidas de *Bacillus thuringiensis* Berliner (Milho *Bt*) devido à evolução da resistência a essas tecnologias (FARIAS et al., 2014; OMOTO et al., 2016) e, principalmente nas áreas de refúgio. A utilização de inseticidas de forma indiscriminada tem contribuído para a evolução da resistência de *S. frugiperda* a inseticidas de diferentes grupos químicos, tais como piretroides, organofosforados e inibidores de biossíntese de quitina (CARVALHO et al., 2013; DIEZ-RODRÍGUEZ; OMOTO, 2001; NASCIMENTO et al. 2016), comprometendo a sua utilização. Com isso, o uso de inseticidas de grupos químicos com diferentes mecanismos de ação, tais como as espinosinas, tem sido explorado em programas de Manejo da Resistência de Insetos (MRI) (SPARKS et al., 2012)

Spinetoram é uma molécula semissintética do grupo químico das espinosinas (moduladores alostéricos dos receptores nicotínicos da acetilcolina), lançado no mercado em 2007. Apresenta maior atividade inseticida, maior eficácia, maior controle residual e atributos toxicológicos mais favoráveis que seu antecessor spinosad (DRIPPS et al., 2008). Por ser um inseticida com alta eficiência contra insetos da ordem Lepidoptera, incluindo *S. frugiperda* (BURTET et al., 2017), spinetoram tem sido usado com frequência no controle de *S. frugiperda* em cultivos de milho convencional e milho *Bt* no Brasil.

Os estudos de monitoramento da suscetibilidade de *S. frugiperda* a inseticidas são de grande importância para a implementação de um programa de MRI, pois permitem identificar alterações na suscetibilidade e frequência alélica de resistência das populações, e assim orientar o gerenciamento de estratégias para manter a suscetibilidade e retardar a evolução da resistência (ANDOW; ALSTAD, 1998; FFRENCH-CONSTANT; ROUSH, 1990; ROUSH; MCKENZIE, 1987; ROUSH; MILLER, 1986). Diante disso, o objetivo do presente estudo foi entender a suscetibilidade de populações brasileiras de *S. frugiperda* ao inseticida spinetoram para um programa de MRI. Foram realizados estudos para a caracterização de linhas-básica de suscetibilidade para definições de concentrações diagnósticas para

o monitoramento fenotípico da resistência e de estimativas da frequência do alelo que confere resistência a este inseticida de *S. frugiperda* a spinetoram.

3.2. Material e Métodos

O presente estudo foi desenvolvido no Laboratório de Resistência de Artrópodes do Departamento de Entomologia e Acarologia da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" (ESALQ), Universidade de São Paulo (USP), Piracicaba - SP.

3.2.1. Populações de *S. frugiperda*

A linhagem de *S. frugiperda* suscetível de referência (SUS) foi proveniente do Laboratório de Resistência de Artrópodes da USP/ESALQ, mantida por mais de 15 anos em dieta artificial (KASTEN; PRECETTI; PARRA, 1978) sem pressão de seleção por inseticidas. Para o monitoramento da suscetibilidade de populações de *S. frugiperda,* lagartas foram coletadas em áreas de milho comerciais de principais regiões agrícolas do Brasil na segunda safra de 2016, entressafra 2016, primeira e segunda safra de 2017, entressafra 2017 e primeira safra 2018 (Tabela 1).

Tabela 1. Código de identificação, local e data de coleta das populações de *S. frugiperda* coletadas em diferentes regiões brasileiras produtoras de milho na segunda safra de 2016, entressafra 2016, safras 2017 e primeira safra 2018.

Código	Cidade, estado	Latitude	Longitude	Coleta
Segunda safra 2016				
GO-38	Rio Verde, GO	17º35'24"	50º56'45"	3/2016
MS-22	Rio Brilhante, MS	21º44'26"	54º29'17"	3/2016
MT-35	Sapezal, MT	13º25'35,9"	58º38'17,84"	3/2016
MS-23	Chapadão do Sul, MS	18º45'43"	52º36'41"	3/2016
MT-36	Lucas do Rio Verde, MT	12º46'1,2"	56º07'17,51"	3/2016
MT-37	Campo Verde, MT	15º33'3,78"	55º12'71"	3/2016
PR-64	Cornélio Procópio, PR	23º12'42"	50º42'19"	3/2016
PR-65	Peabiru, PR	23º51'58"	52º23'43"	4/2016
PR-66	Palotina, PR	24º09'50"	53º32'15"	4/2016

Código	Cidade, estado	Latitude	Longitude	Coleta
SP-22	Casa Branca, SP	21º50’18,78”	47º11’3,13”	4/2016
BA-44	Roda Velha, BA	-	-	4/2016
MT-LRV	Lucas do Rio Verde, MT	12°58’10”	55°56’41”	5/2016
BA-BAR	Barreiras, BA	11°45’42”	45°46’31”	5/2016
Entressafra 2016/2017				
GO-39	Rio Verde, GO	17º24’25,74”	50º49’50,20”	7/2016
SP-23	S. João da Boa Vista, SP	22º0’57,57”	46º50’21,56”	8/2016
BA-45	São Desidério, BA	12º8’25,41”	45º26’58,26”	9/2016
MT-38	Lucas do Rio Verde, MT	13º00’05”	55º58’14”	10/2016
Primeira safra 2017				
PR-69	Tibagi, PR	24º27’1,12”	50º11’22,16”	11/2016
PR-70	Cascavel, PR	25º0’6,19”	53º30’24,05”	11/2016
RS-22	Sto. Ant. do Planalto, RS	28º21’13,72”	52º43’1,52”	11/2016
RS-23	Santo Ângelo, RS	28º10’56,14”	54º18’16,27”	11/2016
MG-25	Tupaciguara, MG	18º37’49,15”	48º42’11,92”	11/2016
SC-6	Guatambu, SC	27º07’52,79”	52º45’33,01”	11/2016
GO-41	Rio Verde, GO	17º42’58”	51º10’46”	12/2016
GO-42	Cristalina, GO	16º55’27,23”	47º38’14,10”	12/2016
BA-47	Luís E. Magalhães, BA	11º57’34,60”	46º05’54,06”	12/2016
SP-24	Casa Branca, SP	21º34’49,87”	47º05’20,51”	12/2016
Segunda safra 2017				
MT-40	Lucas do Rio Verde, MT	12º33’41,04”	56º09’41,65”	3/2017
MT-41	Sapezal, MT	13º30’8,64”	58º45’33,37”	3/2017
MT-42	Campo Verde, MT	15º29’27,89”	55º20’52,33”	3/2017
GO-43	Montividiu, GO	17º29’58,92”	51º07’23,41”	3/2017
SP-25	Pirassununga, SP	21º53’9,42”	47º20’57,60”	4/2017
PR-71	Toledo, PR	24º40’14,01”	53º48’48,99”	3/2017
PR-72	Luiziana, PR	24º15’5,004”	52º21’19,00”	3/2017
PR-73	Sertanópolis, PR	23º01’17,00”	50º59’21,01”	3/2017
MS-24	Chapadão do Sul, MS	18º46’42,45”	52º38’50,44”	3/2017
MS-25	Laguna Carapã, MS	22º42’33,98”	55º02’54,99”	3/2017
Entressafra 2017/18				
SP-26	Casa Branca, SP	18º46’47,60”	52º38’50,14”	7/2017
MS-26	Chapadão do Sul, MS	18º46’47,60”	52º38’50,14”	7/2017

Código	Cidade, estado	Latitude	Longitude	Coleta
MT-44	Sorriso, MT	21º40’10,95”	47º03’19,69”	8/2017
GO-44	Rio Verde, GO	17º47’45,27”	50º58’20,21”	7/2017
BA-48	Roda Velha, BA	12º51’12,096”	45º28’12,72”	7/2017
Primeira safra 2018				
BA-49	São Desidério, BA	13º 15’ 51,70”	46º 08’ 45,82”	12/2017
GO-45	Cristalina, GO	16º 19’ 8,11”	47º 35’ 36,02”	12/2017
GO-46	Rio Verde, GO	17º 44’ 38,87”	50º 51’ 13,82”	12/2017
MG-26	Araguari, MG	18º 32’ 5,64”	48º 23’ 34,87”	12/2017
PR-75	Castro, PR	24º 46’ 13,30”	49º 53’ 50”	11/2017
PR-76	Toledo, PR	24º 51’ 9,47”	53º 50’ 44,01”	12/2017
RS-24	Santo Ângelo	28º 12’ 0,36”	54º 16’ 15,20”	10/2017
RS-26	Não Me Toque, RS	28º 15’ 35,67”	52º 51’ 24,12”	11/2017
SC-7	Chapecó, SC	27º 05’ 4,38”	52º 38’ 6,47”	11/2017
SP-27	Casa Branca, SP	21º 50’ 14,67”	47º 0’ 26,21”	11/2017

No laboratório, as lagartas permaneceram nas placas de coleta contendo dieta artificial até atingirem a fase de pupa, quando foram retiradas da dieta e higienizadas com sulfato de cobre a 5%. As pupas de cada população de campo foram acondicionadas em tubos de PVC (10 cm × 20 cm) utilizados como “gaiola”, revestida no seu interior com papel jornal (substrato para oviposição), formando um ambiente favorável para o acasalamento e oviposição após a emergência dos adultos. Cada gaiola continha um recipiente plástico (3 cm × 1 cm) com solução de mel a 10% para alimentação dos adultos. As gaiolas foram mantidas em ambiente controlado (25 ± 2°C, 60 ± 10% UR e fotofase de 14h). O papel jornal e a solução de mel foram trocadas a cada dois dias, e as posturas existentes no papel foram recortadas e acondicionadas em copos plásticos (100 ml) contendo um pequeno pedaço de papel filtro umedecido com água destilada (manter a umidade). Os copos foram mantidos em câmaras climatizadas (20 ± 1°C, 60 ± 10% UR e fotofase de 14h) até a eclosão das lagartas. As lagartas neonatas (lagartas com menos de 24h de vida) foram inoculadas em copos plásticos (100 ml) contendo dieta artificial, onde permaneceram até atingirem o 3° ínstar. Ao atingirem o 3° ínstar, maior parte das lagartas foram utilizadas para a realização dos bioensaios de concentração-mortalidade e o restante para a manutenção da população.

3.2.2. Bioensaios

Os bioensaios de concentração-mortalidade foram realizados por meio do método de ingestão, com tratamento superficial da dieta artificial com inseticida. Foram utilizadas placas de plástico com 24 células (Corning® Costar®, Sigma-Aldrich Brasil Ltda., São Paulo, Brasil), onde cada célula continha aproximadamente 1,25 mL de dieta artificial.

Para a realização dos bioensaios com o ingrediente ativo spinetoram foi utilizado o produto comercial Exalt® (suspensão concentrada com 120 g de spinetoram/L; Dow AgroSciences Industrial Ltda., São Paulo, Brasil). As concentrações de spinetoram utilizadas nos bioensaios foram preparadas mediante a diluição do produto Exalt® em água destilada, com a adição de 0,1% do volume final da solução de surfactante Triton™ X-100 (Labsynth, Diadema, SP, Brasil). Como tratamento controle (sem inseticida) foi utilizada apenas uma solução de água destilada acrescida de surfactante.

A aplicação do inseticida ocorreu após a geleificação da dieta artificial nas placas de 24 células, seguida da esterilização em luz ultravioleta. Com a utilização de uma micropipeta cada célula da placa recebeu superficialmente sob a dieta 30 µL da solução inseticida nas concentrações necessárias. Após a secagem do inseticida em câmara de fluxo com exaustão, foram colocadas uma lagarta de 3º ínstar por célula, seguida da vedação das células com transparências plásticas perfuradas e fechamento com a tampa da placa. Os bioensaios foram mantidos até a avaliação em câmaras climatizadas (25±2°C, 60±10% UR e fotofase de 14h).

A mortalidade foi avaliada 48h após a infestação, considerando mortas as lagartas sem movimento algum, e as que quando tocadas com um pincel não apresentem movimentos coordenados.

3.2.3. Linhas-básica da suscetibilidade de *S. frugiperda* a spinetoram

Para caracterizar as linhas-básica de suscetibilidade foram avaliadas a população suscetível de referência (SUS) e seis populações de campo provenientes dos estados do Mato Grosso do Sul, Mato Grosso, Paraná, São Paulo e Bahia, coletadas na segunda safra de 2016 (Tabela 2).

As avaliações foram por meio de bioensaios de concentração-mortalidade com o produto comercial Exalt®, como descrito no tópico anterior (3.2.2). O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, testando oito concentrações entre 0,1 e 5,6 µg de spinetoram/mL espaçadas de forma logarítmica proporcionando mortalidades entre 5 e 95 %, com cinco repetições por concentração (24 lagartas/repetição).

Para a estimativa da concentrações letal que mata 50% dos indivíduos (CL_{50}) de cada população e os respectivos intervalos de confiança (I.C. 95%), os dados de mortalidade de cada população foram submetidos à análise de Probit (PROC PROBIT) (SAS INSTITUTE INC, 2015). Baseado nas respostas de concentração-mortalidade de todas as populações analisadas em conjunto, método proposto por Sims et al. (1996), foi possível estimar a concentração diagnóstica (CL_{99}). Na análise conjunta, a estimativa da CL_{99} e seu intervalo de confiança (IC 95%) foram estabelecidos mediante modelo binomial utilizando a função de ligação do complemento log-log (gompit; PROC PROBIT) (SAS INSTITUTE INC, 2015).

Tabela 2. Identificação e origem das populações de *S. frugiperda* coletadas em diferentes regiões produtoras de milho no Brasil (segunda safra 2016) utilizadas para o estabelecimento da linha básica de suscetibilidade *S. frugiperda* a spinetoram.

Código	Cidade, estado	Latitude	Longitude
MS-22	Rio Brilhante, MS	21º44’26”	54º29’17”
MT-35	Sapezal, MT	13º25’35,9”	58º38’17,84”
MT-LRV	Lucas do Rio Verde, MT	12°58’10”	55°56’41”
BA-BAR	Barreiras, BA	11°45’42”	45°46’31”
PR-65	Peabiru, PR	23º51’58”	52º23’43”
SP-22	Casa Branca, SP	21º50’18,78”	47º11’3,13”

3.2.4. Monitoramento da suscetibilidade de *S. frugiperda* a spinetoram

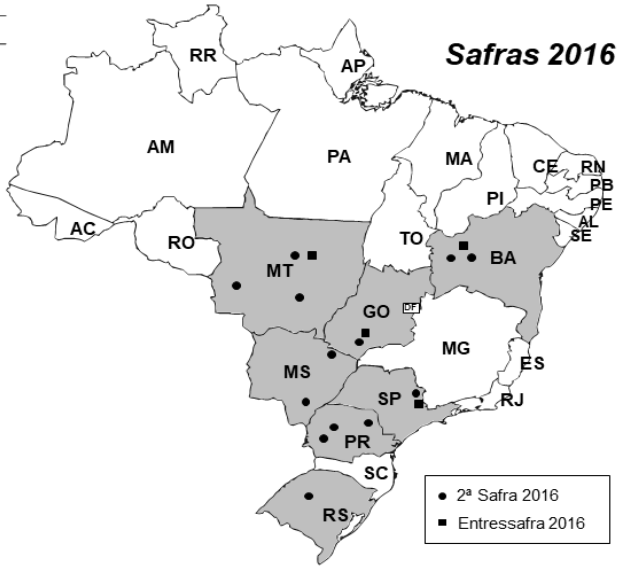
As populações de campo utilizadas para o monitoramento da suscetibilidade de *S. frugiperda* a spinetoram foram coletadas em cultivos de milho nas safras 2016, 2017 e 2018 em nove estados brasileiros, sendo eles, Mato Grosso do Sul, Mato Grosso, Bahia, Minas Gerais, Paraná, Goiás, São Paulo, Santa Catarina e Rio

Grande do Sul (Figura 1). As populações foram coletadas e mantidas em laboratório até a realização dos bioensaios, conforme descrito nos tópicos 3.2.1. e 3.2.2.

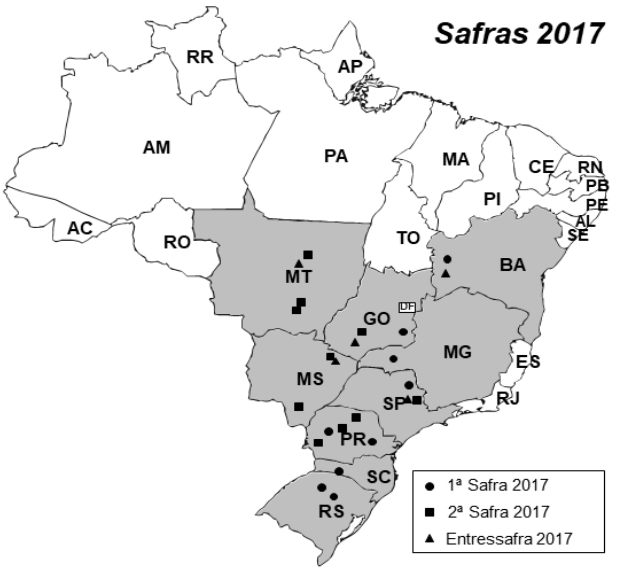
O método de bioensaio utilizado para o monitoramento da suscetibilidade foi o de ingestão (tópico 3.2.2), mediante o uso da concentração diagnóstica estabelecida a partir da linha básica de suscetibilidade, descrita no tópico anterior. Os bioensaios seguiram o delineamento inteiramente casualizado, com 20 repetições por população, considerando cada repetição uma placa (Costar®) composta por 24 lagartas de 3° ínstar. Os dados de sobrevivência obtidos por contagem para cada população, foram analisados mediante Modelos Lineares Generalizados (GLM) com distribuição binomial negativa, utilizando o software R 3.3.2.(R CORE TEAM, 2017).

A avaliação temporal da sobrevivência ao longo das safras, foi realizada mediante comparação das demais safras com a primeira safra em avaliação neste estudo (GLM; α=0,05). O mesmo modelo GLM foi utilizado para análise dos dados de sobrevivência agrupados por estado.

Código	Cidade, estado
Segunda safra 2016	
GO-38	Rio Verde, GO
MS-22	Rio Brilhante, MS
MT-35	Sapezal, MT
MS-23	Chapadão do Sul, MS
MT-36	Lucas do Rio Verde, MT
MT-37	Campo Verde, MT
PR-64	Cornélio Procópio, PR
PR-65	Peabiru, PR
PR-66	Palotina, PR
SP-22	Casa Branca, SP
BA-44	Roda Velha, BA
MT-LRV	Lucas do Rio Verde, MT
BA-BAR	Barreiras, BA
Entressafra 2016	
GO-39	Rio Verde, GO
SP-23	São João da Boa Vista, SP
BA-45	São Desidério, BA
MT-38	Lucas do Rio Verde, MT



Primeira safra 2017	
PR-69	Tibagi, PR
PR-70	Cascavel, PR
RS-22	Sto. Antônio do Planalto, RS
RS-23	Santo Ângelo, RS
MG-25	Tupaciguara, MG
SC-6	Guatambu, SC
GO-41	Rio Verde, GO
GO-42	Cristalina, GO
BA-47	Luis Eduardo Magalhães, BA
SP-24	Casa Branca, SP
Segunda safra 2017	
MT-40	Campo Verde, MT
MT-41	Sapezal, MT
MT-42	Campo Verde, MT
GO-43	Montividiu, GO
SP-25	Pirassununga, SP
PR-71	Toledo, PR
PR-72	Luiziana, PR
PR-73	Sertanópolis, PR
MS-24	Chapadão do Sul, MS
MS-25	Laguna Carapã, MS
Entressafra 2017	
SP-26	Casa Branca, MS
MS-26	Chapadão do Sul, MS
MT-44	Sorriso, MT
GO-44	Rio Verde, GO
BA-48	Roda Velha, BA



Primeira safra 2018	
BA-49	São Desidério, BA
GO-45	Cristalina, GO
GO-46	Rio Verde, GO
MG-26	Araguari, MG
PR-75	Castro, PR
PR-76	Toledo, PR
RS-24	Santo Ângelo
RS-26	Não Me Toque, RS
SC-7	Chapecó, SC
SP-27	Casa Branca, SP

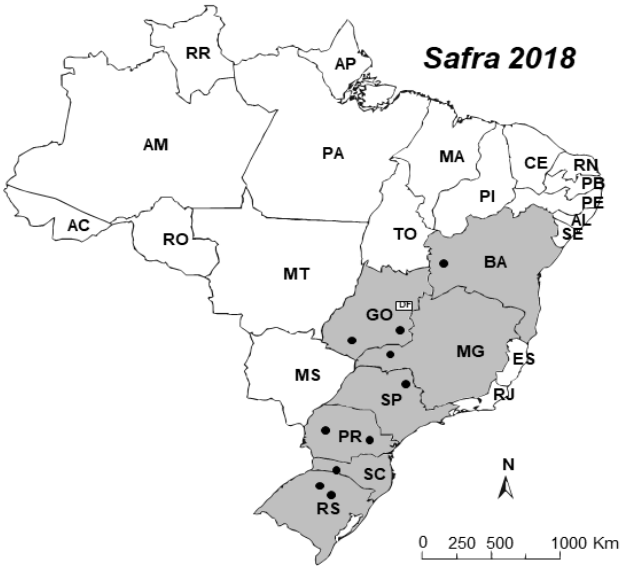


Figura 1. Populações de campo utilizadas no monitoramento da suscetibilidade de *S. frugiperda* a spinetoram.

3.2.5. Estimativa da frequência do alelo que confere resistência de *S. frugiperda* a spinetoram

A estimativa da frequência do alelo que confere resistência de *S. frugiperda* a spinetoram foi realizada com o método de F_2 screen descrito por Andow e Alstad (ANDOW; ALSTAD, 1998), a partir de populações coletadas nas principais regiões brasileiras produtoras de milho na segunda safra de 2016 (7 populações), entressafra 2016 (4 populações), primeira safra 2017 (4 populações) e uma população na segunda safra 2017 (Figura 2).

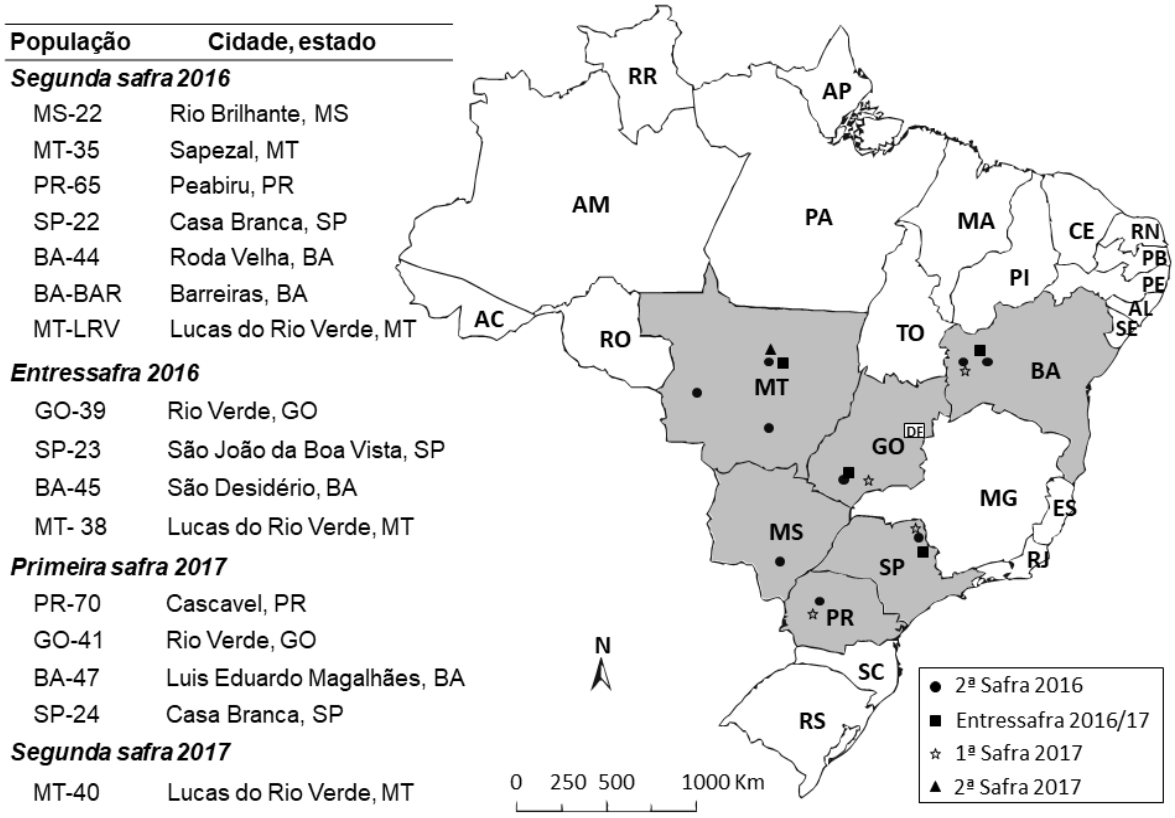


Figura 2. Populações de campo de *S. frugiperda* utilizadas para estimativa da frequência do alelo que confere resistência a spinetoram.

As populações foram coletadas e enviadas ao laboratório conforme descrito no tópico 3.2.1. As pupas de cada população destinada ao F_2 screen foram individualizadas sobre bandeja (30×40 cm) forrada com papel filtro umedecido, onde cada pupa foi coberta com copo plástico transparente (50 ml) até a emergência dos adultos. Após a emergência dos adultos, foram formados casais (F_1) alocando-os em copos plásticos (500 ml) com abertura para baixo sobre um prato de plástico forrado

com disco de papel jornal, formando uma gaiola. Cada casal representou uma isolinha. As gaiolas continham um recipiente plástico (3 cm × 1 cm) com solução de mel a 10% para alimentação dos adultos e foram mantidas em ambiente controlado (25 ± 2°C, 60 ± 10% UR e fotofase de 14h). O copo e o disco de papel jornal que servem de substrato para oviposição foram trocados a cada dois dias e as posturas existentes colocadas dentro do copo plástico (500ml) respectivo da isolinha, juntamente com um pedaço de papel filtro umedecido. Os copos foram mantidos em temperatura de 25 ± 2°C, 60 ± 10% UR e fotofase de 14 h até a eclosão das lagartas (geração F_1). Posteriormente, as lagartas neonatas F_1 foram inoculadas em copos plásticos (100 ml) contendo dieta artificial. Quando as lagartas atingiram o 3º ínstar, foram inoculadas uma lagarta por célula em três placas de 32 células (Advento do Brasil, São Paulo, Brasil) contendo dieta artificial, totalizando 96 lagartas para cada isolinha. As lagartas permaneceram nas placas até a fase de pupa, quando foram transferidas para gaiolas de PVC (10 x 25cm), revestidas internamente com papel jornal, até a emergência dos adultos da geração F_2. Os adultos foram alimentados com solução de mel 10%. O papel jornal foi trocado a cada três dias e as posturas recortadas e colocadas em copos plásticos (100ml), juntamente com um pedaço de papel filtro umedecido. Os copos com posturas foram mantidos em sala de criação em temperatura de 25 ± 2°C, 60 ± 10% UR e fotofase de 14 h até a eclosão das lagartas correspondentes à progênie F_2. Lagartas neonatas F_2 foram inoculadas em copos plásticos (100ml) contendo dieta artificial, onde foram mantidas até atingirem o 3º ínstar, quando foram realizados os bioensaios.

Os bioensaios com a progênie F_2 de cada isolinha formada foram realizados utilizando a concentração diagnóstica de 5,6 µg de spinetoram/mL (descrita no item 3.2.3). Para cada isolinha foram testadas 120 lagartas utilizando cinco placas de 24 células (Corning® Costar®, Sigma-Aldrich Brasil Ltda., São Paulo, Brasil).

As isolinhas que apresentaram sobreviventes após as 48h, as lagartas foram resgatadas em copos plásticos (50mL) contendo dieta artificial e mantidas até atingirem a fase adulta, critério adotado para considerar uma isolinha positiva.

Para estimar a frequência do alelo que confere resistência ($E[p]$) de *S. frugiperda* a spinetoram, os números de isolinhas testadas (N) e positivas (s) foram analisados pela equação [1] descrita por Andow; Alstad (1998).

$$[1] \qquad E[p] = \frac{s+1}{4(N+2)}$$

As frequências do alelo que confere resistência e os respectivos intervalos de confiança (95% IC) foram estimados utilizando a função *binom.bayes* do pacote *binom* no software R 3.3.2 (R CORE TEAM, 2017).

Com o intuito de verificar possíveis diferenças na frequência do alelo que confere resistência em populações de *S. frugiperda* a spinetoram entre os estados brasileiros avaliados, as frequências de resistência foram agrupadas por estados, exceto o estado do Mato Grosso do Sul por falta de repetição. Os seis grupos formados (BA, GO, MT, SP e PR) foram comparados em pares, utilizando a função *pairwise.t.test* (nível α = 0.05) do pacote *pairwise* no software R 3.3.2 (R CORE TEAM, 2017).

3.3. Resultados

3.3.1. Linhas-básica da suscetibilidade de *S. frugiperda* a spinetoram

Foram observadas baixas variações naturais nas respostas de populações de *S. frugiperda* ao inseticida spinetoram (Tabela 3; Figura 3). De acordo com as curvas de concentração-resposta, as CL_{50} das populações variaram de 0,97 a 2,98 µg de spinetoram/mL de água (Tabela 3). Essa variação explica a diferença na suscetibilidade das populações brasileiras de *S. frugiperda* a spinetoram. Essas diferenças significativas foram observadas em cinco das seis populações em comparação à suscetibilidade da linhagem suscetível (SUS), mediante a análise da sobreposição dos intervalos de confiança das CL_{50}. Apenas a população SP-22 com CL_{50}(IC 95%) de 1,19 µg/mL (1,06-1,34) não diferiu de forma significativa da população SUS com CL_{50} de 0,97 µg/mL (0,86-1,08). Os coeficientes angulares (± desvio padrão) que representam as inclinações das retas de respostas das populações utilizadas variaram de 2,62 (± 0,49) para a população MS-22 e 3,86 (± 0,36) para SP-22 (Tabela 3; Figura 3).

Tabela 3. Concentração-resposta de lagartas de *S. frugiperda* expostas a spinetoram por meio de bioensaio de ingestão, tratamento superficial da dieta.

População	n[1]	Coef. Ang. (±EPM[2])	CL_{50} (IC 95%)[3]	χ^{2}[4]	gl[5]	h[6]
SUS	784	3,82 (±0,35)	0,97 (0,86-1,08)	1,04	4	0,26
MT-35	782	3,31 (±0,21)	1,85 (1,66-2,05)	5,68	4	1,42
MS-22	589	2,63 (±0,45)	1,98 (1,12-2,72)	14,36	6	2,39
PR-65	790	3,18 (±0,21)	1,72 (1,54-1,92)	5	4	1,25
SP-22	788	3,86 (±0,36)	1,19 (1,06-1,34)	4,83	4	1,21
BA-BAR	812	3,06 (±0,54)	2,98 (1,88-3,77)	10,6	5	2,11
MT-LRV	788	2,99 (±0,21)	1,78 (1,58-2,00)	2,49	4	0,62

[1] número de insetos testados; [2] Erro padrão da média; [3] Concentração letal 50 (µg/mL i.a.) e intervalo de confiança a 95%; [4] Valor do qui-quadrado calculado; [5] graus de liberdade (g.l.); [6] Heterogeneidade.

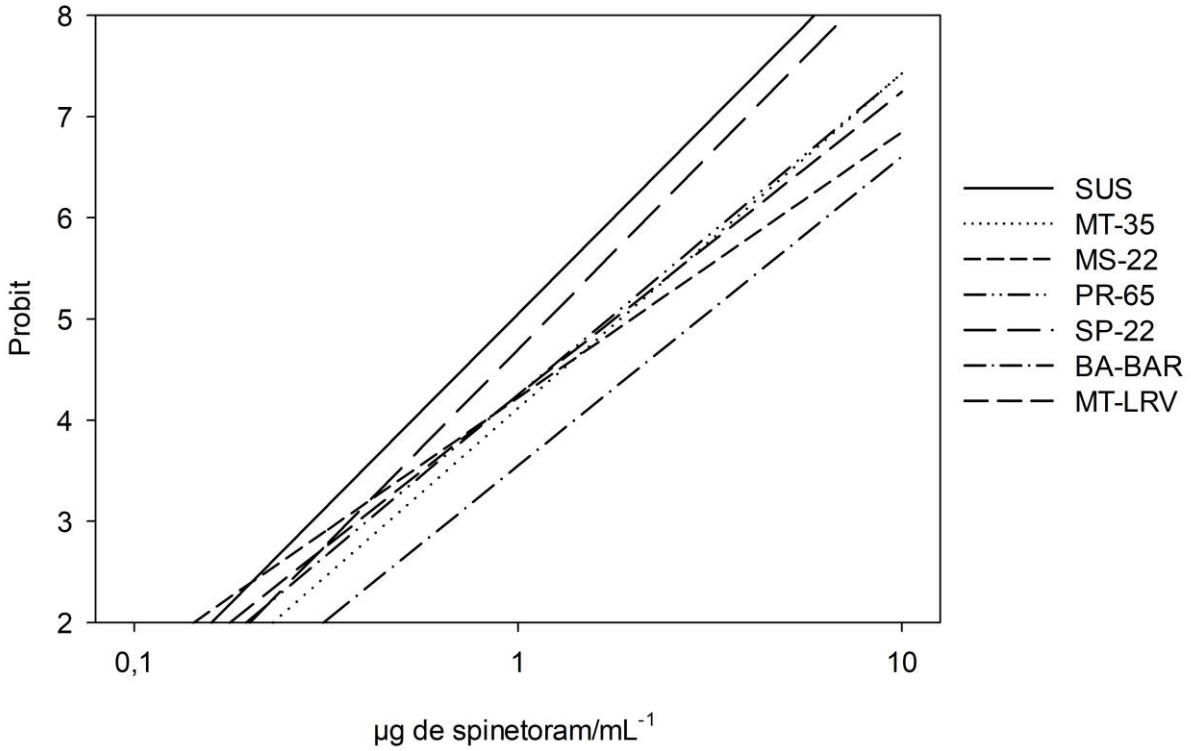


Figura 3. Curvas de concentração-resposta das populações de *S. frugiperda* expostas ao inseticida spinetoram por meio de bioensaio de ingestão.

Com base na análise conjunta das curvas de concentração-mortalidade das populações foi possível estimar a CL_{99} (IC 95%) de 6,7 (5,43-8,94) µg de i.a./mL. A concentração diagnóstica (CD) definida foi de 5,6 µg de spinetoram/mL (concentração logarítmica mais próxima da CL_{99}, dentro do intervalo de confiança; visto que a próxima concentração espaçada de forma logarítmica é de 10 µg de

i.a./mL e não está dentro do intervalo de confiança). A concentração diagnóstica de 5,6 µg de spinetoram/mL que proporciona mortalidade próxima de 99 % será utilizada para o monitoramento da suscetibilidade e estimativa da frequência do alelo que confere resistência de *S. frugiperda* a spinetoram.

3.3.2. Monitoramento da suscetibilidade de *S. frugiperda* a spinetoram

Foram verificadas diferenças significativas nas suscetibilidades das populações de campo de *S. frugiperda* submetidas ao monitoramento com o inseticida spinetoram (C.D. = 5,6 µg de spinetoram/mL) (df = 50,941; P<0,001). As sobrevivências das populações monitoradas neste estudo variaram de 0 a 30,2%, com as menores sobrevivências registradas nos municípios de Luiziana, PR (PR-72) e Laguna Carapã, MS (MS-25), já a maior sobrevivência foi registrada em Roda Velha, BA (BA-48) (Tabela 4).

Tabela 4. Sobrevivência das populações de *S. frugiperda* submetidas ao monitoramento da suscetibilidade a spinetoram pela exposição à concentração diagnóstica (5,6 µg de spinetoram/mL).

Código	Cidade, estado	N°[1]	% Sobrevivência ± EPM[2]
SUS	Sete Lagoas, MG	480	0,0 ± 0,0
Segunda safra 2016			
GO-38	Rio Verde, GO	312	0,64 ± 0,49
MS-22	Rio Brilhante, MS	480	1,04 ± 0,60
MS-23	Chapadão do Sul, MS	480	5,21 ± 2,09
MT-35	Sapezal, MT	480	4,37 ± 1,30
MT-36	Lucas do Rio Verde, MT	504	1,19 ± 0,51
MT-37	Campo Verde, MT	480	1,46 ± 0,55
MT-LRV	Lucas do Rio Verde, MT	480	7,29 ± 1,72
PR-64	Cornélio Procópio, PR	480	0,63 ± 0,34
PR-65	Peabiru, PR	480	0,42 ± 0,29
PR-66	Palotina, PR	480	0,42 ± 0,29
SP-22	Casa Branca, SP	528	2,08 ± 0,86
BA-44	Roda Velha, BA	240	9,17 ± 3,15

Código	Cidade, estado	N°[1]	% Sobrevivência ± EPM[2]
BA-BAR	Barreiras, BA	473	5,29 ± 1,11
Entressafra 2016			
GO-39	Rio Verde, GO	360	0,83 ± 0,44
SP-23	São João da Boa Vista, SP	480	2,5 ± 0,76
BA-45	São Desidério, BA	480	4,58 ± 1,24
MT-38	Lucas do Rio Verde, MT	480	4,37 ± 1,33
Primeira safra 2017			
PR-69	Tibagi, PR	501	0,65 ± 0,48
RS-22	Sto. Antonio do Planalto, RS	480	1,67 ± 0,76
RS-23	Santo Ângelo, RS	480	1,46 ± 0,87
MG-25	Tupaciguara, MG	480	7,92 ± 2,42
SC-6	Guatambu, SC	480	0,42 ± 0,29
GO-41	Rio Verde, GO	480	5,21 ± 1,76
GO-42	Cristalina, GO	456	0,88 ± 0,51
BA-47	Luís Eduardo Magalhães, BA	480	3,54 ± 0,92
SP-24	Casa Branca, SP	480	2,71 ± 1,39
Segunda safra 2017			
MT-40	Campo Verde, MT	456	0,88 ± 0,40
MT-41	Sapezal, MT	480	0,63 ± 0,63
MT-42	Campo Verde, MT	480	0,83 ± 0,38
GO-43	Montividiu, GO	504	2,78 ± 0,97
SP-25	Pirassununga, SP	528	1,89 ± 0,85
PR-71	Toledo, PR	480	4,37 ± 1,15
PR-72	Luiziana, PR	288	0,0 ± 0,0
PR-73	Sertanópolis, PR	480	1,46 ± 0,87
MS-24	Chapadão do Sul, MS	264	0,38 ± 0,38
MS-25	Laguna Carapã, MS	480	0,0 ± 0,0
Entressafra 2017			
SP-26	Casa Branca, SP	480	2,92 ± 0,61
MS-26	Chapadão do Sul, MS	480	1,25 ± 0,61
MT-44	Sorriso, MT	480	6,25 ± 1,15
GO-44	Rio Verde, GO	504	0,59 ± 0,33

Código	Cidade, estado	N°[1]	% Sobrevivência ± EPM[2]
BA-48	Roda Velha, BA	480	30,21 ± 3,56
Primeira safra 2018			
BA-49	São Desidério, BA	480	19,17 ± 3,06
GO-45	Cristalina, GO	480	7,71 ± 1,61
GO-46	Rio Verde, GO	480	6,67 ± 2,01
MG-26	Araguari, MG	480	5,83 ± 1,64
PR-75	Castro, PR	480	2,5 ± 0,88
PR-76	Toledo, PR	480	6,67 ± 1,94
RS-24	Santo Ângelo	624	0,32 ± 0,22
RS-26	Não Me Toque, RS	480	1,25 ± 0,44
SC-7	Chapecó, SC	480	0,83 ± 0,38
SP-27	Casa Branca, SP	504	0,99 ± 0,57

[1]Número de insetos testados na concentração diagnóstica.
[2]Médias de sobrevivência ± erro padrão médio.

A sobrevivência das populações de *S. frugiperda* na segunda safra 2016 variaram de 0,42% a 9,17%, com média de 2,82%. As menores sobrevivências foram registradas em Peabiru, PR (PR-65) e Palotina, PR (PR-66), e a maior na Bahia (BA-44). Na entressafra 2016 a sobrevivência média foi de 3,17%, com populações que variaram de 0,83% a 4,58%, onde, a população de Rio Verde, GO (GO-39) foi a mais suscetível com 0,83% de sobrevivência e a população de São Desidério, BA (BA-45) foi a que registrou a maior sobrevivência (Tabela 4; Figura 4).

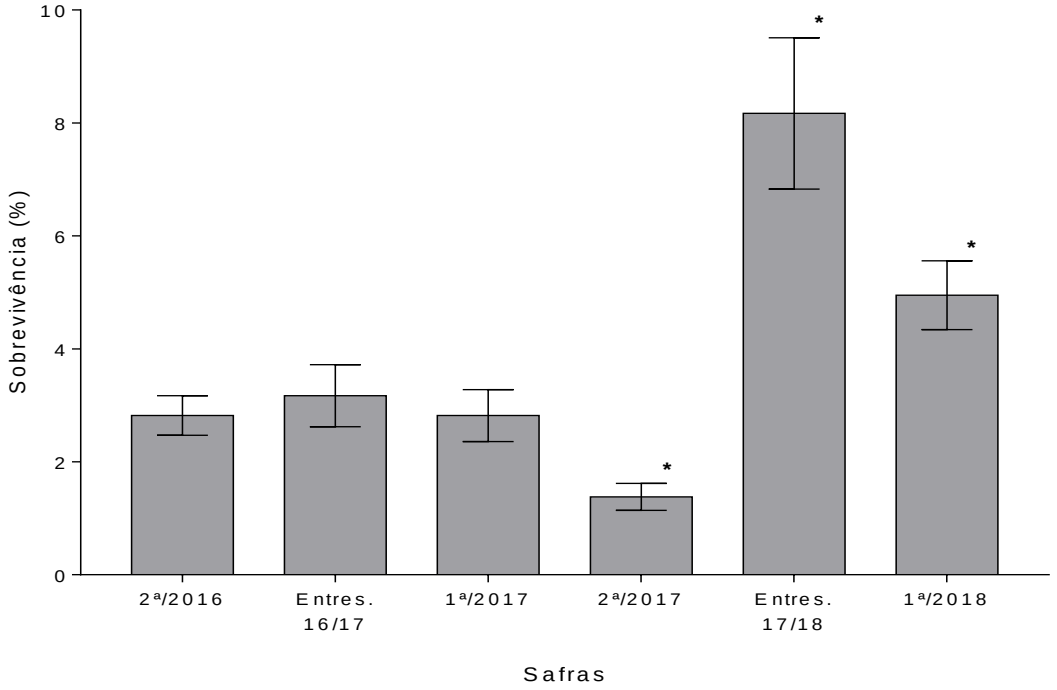


Figura 4. Sobrevivência média de *S. frugiperda* a spinetoram ao longo das safras. *Safras que diferiram da safra de referência (2ª/2016) (P<0,05).

Na primeira safra 2017 a variação na sobrevivência foi de 0,42% a 7,92%, com sobrevivência média de 2,82%. A menor sobrevivência foi observada na população de Guatambu, SC (SC-6) e a maior no município de Rio Verde, GO (GO-41). Na segunda safra 2017 com média de 1,38% de sobrevivência, duas populações não registraram sobreviventes, uma de município de Luiziana, PR (PR-73) e outra no município de Laguna Carapã, MS (MS-25). A população do município de Toledo, PA (PR-71) foi a população com maior sobrevivência na safra (4,37%) (Tabela 4; Figura 4)

Na entressafra 2017 foi registrada no distrito de Roda Velha, BA (BA-48) sobrevivência de 30,2%, maior sobrevivência obtida neste monitoramento. A média de sobrevivência da entressafra 2017 foi de 8,17%, com menor sobrevivência (0,59%) registrada no município de Rio Verde, GO (GO-44). Para a primeira safra 2018, última safra monitorada neste estudo, a sobrevivência das populações variou de 0,32% a 19,17%, com média de 5%. A menor sobrevivência foi registrada no município de Santo Ângelo, RS (RS-24) e a maior no município de São Desidério, BA (BA-49) (Tabela 4; Figura 4).

Quando avaliada a sobrevivência de *S. frugiperda* a spinetoram ao longo das safras, o efeito foi significativo (df = 5,986; P=2,57e^{-14}). Diante disso, tomando como ponto de comparação a segunda safra 2016 (primeira safra monitorada neste estudo), foi observado o aumento da sobrevivência de *S. frugiperda* ao longo das safras. Nas duas safras subsequentes, entressafra 2016 e primeira safra 2017 o aumento foi de apenas 14% e 0,24%, respectivamente, não diferenciando de forma significativa. Já na segunda safra 2017 houve diminuição significativa de 50% na sobrevivência. No entanto, na entressafra 2017 houve um aumento de 190%, sendo a maior sobrevivência registrada neste estudo. Na primeira safra de 2018 a sobrevivência se manteve significativamente elevada, 78 vezes maior que a primeira safra monitorada neste estudo (2ª/2016) (Tabela 4; Figura 4).

Quando avaliada a sobrevivência de *S. frugiperda* a spinetoram por estado, o efeito foi significativo (df = 8, 983; P<0,001). A maior sobrevivência (12,25%) foi observada para as populações coletadas no estado da Bahia (BA), diferindo de forma significativa das populações dos demais estados avaliados (Tabela 5).

Tabela 5. Sobrevivência média de *S. frugiperda* a spinetoram por estado.

Estado - UF	%Sobrevivência ± EPM[1]
Bahia - BA	12,25 ± 1,35
Minas Gerais - MG	6,88 ± 1,47 *
Goiás - GO	3,36 ± 0,49 *
Mato Grosso - MT	3,03 ± 0,37 *
São Paulo	2,13 ± 0,36 *
Paraná - PR	1,95 ± 0,34 *
Mato Grosso do Sul - MS	1,69 ± 0,53 *
Rio Grande do Sul - RS	1,11 ± 0,29 *
Santa Catarina - SC	0,63 ± 0,24 *

*Médias que diferiram do estado da Bahia (P<0,05).

Ao avaliar o fator safra na sobrevivência de *S. frugiperda* no estado da Bahia, o efeito foi significativo (df= 4, 105; P<0,001), uma vez que houveram aumentos de 362% e 193% na entressafra 2017 e primeira safra 2018, respectivamente, comparada a primeira safra avaliada (2ª/2016). As populações BA-48 (Roda Velha, BA) e BA-49 (São Desidério, BA) são responsáveis por esse grande

aumento, ambas da região oeste da Bahia. Para o estado de Minas Gerais, avaliado apenas na primeira safra dos anos agrícolas de 2017 e 2018, foi observada diminuição de 26% na sobrevivência, não diferindo de forma significativa (P=0,538) (Figura 5).

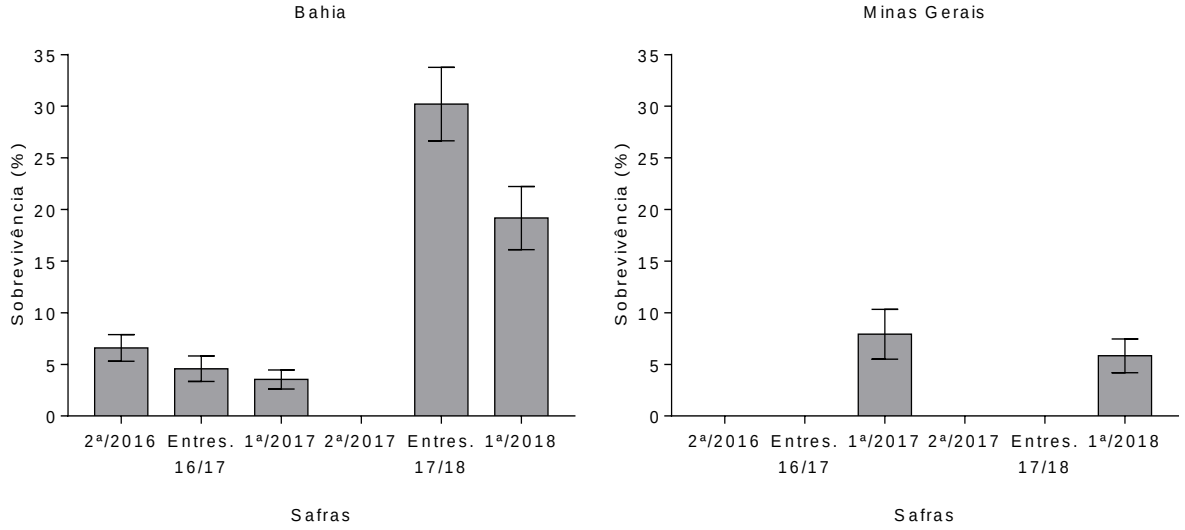


Figura 5. Sobrevivencia média de *S. frugiperda* a spinetoram nos estados da Bahia e Minas Gerais.

3.3.3. Estimativa da frequência do alelo que confere resistência de *S. frugiperda* a spinetoram

O alelo de resistência foi encontrado em todas as populações testadas pela técnica do F_2 screen, com frequências alélicas (IC 95%) de 0.0107 (0.0035 – 0.0218) (MT-40 – Lucas do Rio Verde, MT) a 0.1688 (0.1298 – 0.2116) (BA-BAR – Barreiras, BA) (Tabela 6).

Na segunda safra 2016 foram testadas 385 isolinhas, sendo 83 delas positivas, a frequência do alelo de resistência (IC 95%) foi de 0.056 (0.0453 – 0.0679), com maior frequência estimada para a população BA-BAR (Barreiras, BA) e menor para MS-22 (Rio Brilhante, MS) com frequências de 0.1688 (0.1298 – 0.2116) e 0.0167 (0.0046 – 0.03693) respectivamente (Tabela 6).

Na entressafra 2016/17 com 293 isolinhas testadas e 89 positivas para a presença do alelo de resistência, a frequência alélica (IC 95%) foi de 0.0772 (0.0628 – 0.093). Semelhante a safra anterior o estado da Bahia foi responsável pela maior frequência 0.1493 (0.1106 – 0.1926) (São Desidério, BA) e o estado de São Paulo

pela menor frequência 0.0216 (0.0071 – 0.0438) (São João da Boa Vista, SP) (Tabela 6).

Na primeira safra 2017 novamente o estado da Bahia foi responsável pela maior frequência do alelo de resistência (IC 95%) 0.118 (0.0866 – 0.1534) (BA-47 – Luís Eduardo Magalhães, BA) e o estado do Paraná pela menor frequência 0.0119 (0.0039 – 0.0243) (PR-70 – Cascavel, PR). Com 299 isolinhas testadas e 56 positivas a frequência estimada para a safra foi de 0.0489 (0.0375 – 0.0616).

Na segunda safra de 2017 foi estimado a frequência do alelo de resistência apenas para uma população do Mato Grosso (MT-40 – Lucas do Rio Verde, MT), com 115 isolinhas testadas e 4 positivas a frequência estimada de 0.0107 (0.0035 – 0.0218) foi a menor observada em todas as populações avaliadas no experimento (Tabela 6).

Em síntese, foram testadas 1092 isolinhas em três safras e uma entressafra de milho em dois anos, onde, 232 isolinhas foram positivas para a presença do alelo de resistência, fornecendo uma frequência estimada de resistência (IC 95%) de 0.055 (0.0485 – 0.0619) ao inseticida spinetoram em populações brasileiras de *S. frugiperda* (Tabela 6).

Tabela 6. Estimativa da frequência do alelo que confere resistência a spinetoram em diferentes populações brasileiras de *S. frugiperda*.

Código	Cidade, estado	Iso. F_0	Iso. F_1	Isolinhas F_2 Testada	Isolinhas F_2 Positiva	Frequência do alelo R (IC 95%)[1]
Segunda safra 2016						
MS-22	Rio Brilhante, MS	120	80	58	3	0.0167 (0.0046 - 0.0363)
MT-35	Sapezal, MT	62	41	38	4	0.0313 (0.0103 - 0.0632)
PR-65	Peabiru, PR	144	103	77	9	0.0317 (0.0153 - 0.0535)
SP-22	Casa Branca, SP	125	95	69	8	0.0317 (0.0147 - 0.0550)
MT-LRV	Lucas do Rio Verde, MT	143	95	65	6	0.0261 (0.0106 - 0.0483)
BA-BAR	Barreiras, BA	136	86	78	53	0.1688 (0.1298 - 0.2116)
Entressafra 2016						
GO-39	Rio Verde, GO	127	94	83	26	0.0794 (0.0532 – 0.1104)
SP-23	S. João da Boa Vista, SP	94	62	56	4	0.0216 (0.0071 - 0.0438)
BA-45	São Desidério, BA	150	98	70	42	0.1493 (0.1106 - 0.1926)
MT- 38	Lucas do Rio Verde, MT	150	97	84	17	0.0523 (0.0314 - 0.0782)

Código	Cidade, estado	Iso. F_0	Iso. F_1	Isolinhas F_2 Testada	Positiva	Frequência do alelo R (IC 95%)[1]
Primeira safra 2017						
PR-70	Cascavel, PR	113	72	103	4	0.0119 (0.0039 - 0.0243)
GO-41	Rio Verde, GO	88	54	43	6	0.0389 (0.0159 - 0.0716)
BA-47	Luís E. Magalhães, BA	151	101	87	41	0.1180 (0.0866 - 0.1534)
SP-24	Casa Branca, SP	150	114	66	5	0.0221 (0.0082 - 0.0426)
Segunda safra 2017						
MT-40	Lucas do Rio Verde, MT	152	122	115	4	0.0107 (0.0035 - 0.0218)
	TOTAL	1905	1314	1092	232	0.0550 (0.0485 - 0.0619)

[1] Intervalo de confiança a 95%.

O agrupamento dos dados de frequência do alelo de resistência por estado, possibilitou observar maior frequência de resistência (IC 95%) para o estado da Bahia 0.1445 (0.1228 – 0.1676) e menor para o estado do Mato Grosso do Sul 0.0167 (0.0046 – 0.0363) (Tabela 7).

A comparação em pares “pairwise” permitiu observar que a frequência de resistência do estado da Bahia diferiu significativamente dos estados de Goiás, Mato Grosso, Paraná e São Paulo ($p = 0.0055$; $p = 0.0002$; $p = 0.00046$; $p = 0.00027$), respectivamente, e as frequências de Goiás, Mato Grosso, Paraná e São Paulo não diferiram entre si ($p > 0.05$), mesmo Mato Grosso do Sul não estando incluído na análise, ele apresenta a menor frequência alélica, assumindo assim sua similaridade com os demais estados, exceto Bahia (Tabela 7).

Tabela 7. Estimativa da frequência do alelo que confere resistência de *S. frugiperda* a spinetoram nos estados brasileiros avaliados.

Cidade, estado	Isolinhas F_0	Isolinhas F_1	Isolinhas F_2 Testadas	Positivas	Frequência do alelo R (IC 95%)[1, *]
Bahia, BA	437	285	235	136	0,1445 (0,1228 - 0,1676) *
Goiás, GO	215	148	126	32	0,0645 (0,0449 - 0,0873)
Mato Grosso, MT	507	355	302	31	0,0263 (0,0181 - 0,0360)
São Paulo, SP	369	271	191	17	0,0233 (0,0139 - 0,0351)
Paraná, PR	257	175	180	13	0,0192 (0,0106 - 0,0304)
Mato Grosso do Sul, MS	120	80	58	3	0,0167 (0,0046 - 0,0363)

[1] Intervalo de confiança a 95%.
[*] Frequências que diferiram significativamente pela comparação em pares “pairwise” (*pairwise.t.test*, nível $\alpha = 0.05$).

3.4. Discussão

As respostas das populações de *S. frugiperda* utilizadas para caracterização das linhas-básica de suscetibilidade foram bastante próximas, com coeficientes angulares elevados (>2,5) e variação de apenas quatro vezes nos valores de CL_{50} (0,97 a 2,98 µg i.a./mL) com sobreposição dos intervalos de confiança. De acordo com Hoskins e Gordon (1956) os coeficientes angulares obtidos com as curvas de concentração-mortalidade medem a heterogeneidade da população. Coeficientes angulares elevados (>2) são característicos de populações homogêneas, enquanto coeficientes baixos (<2) caracteriza heterogeneidade (AHMAD; ARIF; AHMAD, 1995). Diante desses resultados podemos dizer que as populações utilizadas para construção da linha básica são homogêneas, assim como a suscetibilidade entre elas, uma vez que existe pequena variação nas CL_{50} entre as populações de campo.

A realização do monitoramento da suscetibilidade de *S. frugiperda* a spinetoram permitiu observar a existência de diferenças nas suscetibilidades das populações de campo em todas as safras avaliadas, bem como o aumento significativo da sobrevivência ao longo das safras. As maiores sobrevivências na concentração diagnóstica foram observadas nos estados da Bahia, Minas Gerais, Goiás e Mato Grosso, que de acordo com a Companhia Nacional de Abastecimento, juntos correspondem aproximadamente 46% de toda a área cultivada de milho na safra 2017/18 (CONAB, 2018). A grande área cultivada de milho, aliada ao aumento na utilização de spinetoram devido sua alta eficiência no controle de *S. frugiperda* em milho *Bt* e não *Bt* (BURTET et al., 2017), tem contribuído para o aumento da sobrevivência (justificativa embasada na ficha de coleta das populações de campo, que relatam com maior frequência a utilização do produto comercial Exalt®).

No estado da Bahia, o município de São Desidério e Roda Velha (distrito de São Desidério), foram os responsáveis pelas maiores sobrevivências obtidas neste estudo. Nos últimos anos, a microrregião de Barreiras, no oeste baiano, que abrange sete municípios entre eles São Desidério, se tornaram uma das principais fronteiras agrícolas brasileiras (ILARIO, 2013; SANO et al., 2011), com condições climáticas favoráveis e emprego de tecnologia adequada para produção durante todo o ano agrícola, assim, favorecendo a sobrevivência e seleção de pragas como *S. frugiperda*. O monitoramento da sobrevivência de *S. frugiperda* a spinetoram no estado de Minas Gerais merece atenção nas próximas safras, mesmo que tenha

apresentado uma pequena diminuição na suscetibilidade neste monitoramento. Isso porque Minas Gerais é o estado com maior área cultivada de milho primeira safra no país (safras 2016/17 e 2017/18) (CONAB, 2018).

Partindo do proposto por Roush e McKenzie (1987) de que em uma população sem pressão de seleção, a frequência inicial de alelos de resistência varia de 10^{-2} a 10^{-13}. A frequência estimada (IC 95%) do alelo que confere a resistência de *S. frugiperda* a spinetoram pela técnica do F_2 screen de 0.055 (0.0485 – 0.0619) foi elevada, indicando um alto risco de evolução da resistência, principalmente devido à utilização prévia de spinosad para o controle de *S. frugiperda* conferindo resistência cruzada com spinetoram. Esse resultado evidencia a necessidade de implantação de um manejo de resistência eficiente a espinosinas no Brasil. O estado da Bahia, representado por populações da microrregião de Barreiras foi o que apresentou maior frequência do alelo de resistência (0,1445), que sob pressão de seleção refletiu em aumentos na sobrevivência nas safras subsequentes de até 362% para populações da mesma microrregião (resultado obtido com o monitoramento da suscetibilidade).

Neste estudo ficou evidenciado o alto risco de evolução da resistência de *S. frugiperda* a spinetoram, devido a presença do alelo de resistência em todos os estados avaliados, com frequência elevada. Isso por que, a frequência de resistência elevada atrelada a constante pressão de seleção, são alguns dos principais fatores responsáveis pela evolução da resistência, por favorecer a sobrevivência de indivíduos resistentes no campo (GEORGHIOU; TAYLOR, 1977a, 1977b). O risco de evolução da resistência pode ser diagnosticada com a realização de monitoramento seja ele fenotípico ou genotípico, afim de identificar alterações na suscetibilidade e frequência de resistência das populações e assim orientar na tomada de decisão para retardar a evolução de resistência (ANDOW; ALSTAD, 1998; ANDOW; IVES, 2002; ENGELS et al., 2010; ROUSH; MILLER, 1986). Como observado neste estudo, onde, na primeira safra avaliada (segunda safra 2016) a população BA-BAR (Barreiras, BA) apresentou uma frequência de resistência de 0,1688 (mais elevada que a média geral) com sobrevivência no monitoramento fenotípico de 5,29%, e com o decorrer de cinco safras/entressafra essa sobrevivência saltou para 19,17% e 30,21%, para populações da mesma microrregião (Barreiras, Bahia).

Diante da magnitude do problema de resistência de *S. frugiperda* aos inseticidas disponíveis no mercado, associado ao alto custo e dificuldade de descoberta, desenvolvimento, registro e lançamento de novos inseticidas, é de grande importância a implementação de programas de manejo de resistência com o objetivo de retardar a evolução de resistência (MCDOUGALL, 2016; SPARKS, 2013; SPARKS; LORSBACH, 2017), principalmente aos grupos químicos mais recentes como é o caso das espinosinas, que ainda apresentam eficiência no controle. Bem como, a implementação eficiente do Manejo Integrado de Pragas (MIP), tendo em mente que o controle químico é uma ferramenta dentro do MIP, e que existem outras táticas de controle.

3.5. Conclusões

- Houve diminuição na suscetibilidade ao inseticida spinetoram nas populações brasileiras de *S. frugiperda* no decorrer das safras de 2016 a 2018;

- O alelo da resistência de *S. frugiperda* ao inseticida spinetoram foi encontrado em altas frequências nas principais regiões produtoras de milho do Brasil.

Referências

AHMAD, M.; ARIF, I. M.; AHMAD, Z. Monitoring insecticide resistance of Helicoverpa armigera (Lepidoptera: Noctuidae) in Pakistan. ***Journal of Economic Entomology****, v. 88, n. 4, p. 771–776, 1 ago. 1995.*

ANDOW, D. A.; ALSTAD, D. N. F2 screen for rare resistance alleles. ***Journal of Economic Entomology****, v. 91, n. 3, p. 572–578, 1 jun. 1998.*

ANDOW, D. A.; IVES, A. R. Monitoring and adaptive resistance management. ***Ecological Applications****, v. 12, n. 5, p. 1378–1390, 2002.*

BURTET, L. M. et al. Managing fall armyworm, Spodoptera frugiperda (Lepidoptera: Noctuidae), with Bt maize and insecticides in southern Brazil. ***Pest Management Science****, v. 73, n. 12, p. 2569–2577, 1 dez. 2017.*

CARVALHO, R. A. et al. Investigating the molecular mechanisms of organophosphate and pyrethroid resistance in the fall armyworm Spodoptera frugiperda. ***PLoS ONE****, v. 8, n. 4, 2013.*

CONAB. ***Acompanhamento da safra brasileira:*** *grãos, nono levantamento, julho 2018. Brasília: Companhia Nacional de Abastecimento, 2018. Disponível em: <file:///C:/Users/LIRAEC/Downloads/BoletimZGraosZjunhoZ2018.pdf>. Acesso em: 17 jul. 2018.*

DIEZ-RODRÍGUEZ, G. I.; OMOTO, C. Herança da resistência de Spodoptera frugiperda (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) a lambda-cialotrina. ***Neotropical Entomology****, v. 30, n. 2, p. 311–316, jun. 2001.*

DRIPPS, J. et al. Spinetoram: how artificial intelligence combined natural fermentation with synthetic chemistry to produce a new spinosyn insecticide. ***Plant Health Progress****, 2008.*

FARIAS, J. R. et al. Field-evolved resistance to Cry1F maize by Spodoptera frugiperda (Lepidoptera: Noctuidae) in Brazil. ***Crop Protection****, v. 64, p. 150–158, out. 2014.*

FFRENCH-CONSTANT, R. H.; ROUSH, R. T. Resistance detection and documentation: the relative roles of pesticidal and biochemical assays. In: ROUSH, R. T.; TABASHNIK, B. E. (Eds.). ***Pesticide Resistance in Arthropods****. Boston, MA: Springer US, p. 4–38, 1990.*

GEORGHIOU, G. P.; TAYLOR, C. E. Genetic and biological influences in the evolution of insecticide resistance. ***Journal of Economic Entomology****, v. 70, n. 3, p. 319–323, 1 jun. 1977a.*

GEORGHIOU, G. P.; TAYLOR, C. E. Operational influences in the evolution of insecticide resistance. ***Journal of Economic Entomology****, v. 70, n. 5, p. 653–658, 1 out. 1977b.*

HOSKINS, W. M.; GORDON, H. T. Arthropod Resistance to Chemicals. ***Annual Review of Entomology****, v. 1, n. 1, p. 89–122, jan. 1956.*

ILARIO, C. G. ***A região agrícola competitiva do Oeste Baiano****. Boletim Campineiro de Geografia, v.3, n.1, p. 117–137, out. 2013.*

KASTEN JR, P.; PRECETTI, A. A. C. M.; PARRA, J. R. P. Dados biologicos comparativos de Spodoptera frugiperds (JE Smith, 1797) em duas dietas artificiais e substrato natural. ***Revista de Agricultura****, v. 53, p. 69–78, 1978.*

KASTEN, P. J.; PRECETTI, A. A. C. M.; PARRA, J. R. P. Comparative biologic data on Spodoptera frugiperda (J. E. Smith, 1797) on two artificial diets and natural substrate. ***Revista de agricultura****, v. v. 53, 1978.*

MCDOUGALL, P. The cost of new agrochemical product discovery, development and registration in 1995, 2000, 2005-8 and 2010 to 2014. R&D expenditure in 2014 and expectations for 2019. . 2016, p. 41.

NASCIMENTO, A. R. B. DO et al. Genetic basis of Spodoptera frugiperda (Lepidoptera: Noctuidae) resistance to the chitin synthesis inhibitor lufenuron. ***Pest Management Science****, v. 72, n. 4, p. 810–815, abr. 2016.*

OMOTO, C. et al. Field-evolved resistance to Cry1Ab maize by Spodoptera frugiperda in Brazil. ***Pest Management Science****, v. 72, n. 9, p. 1727–1736, set. 2016.*

R CORE TEAM. ***R: A Language and Environment for Statistical Computing.*** *R Foundation for Statistical Computing, 2017.*

ROUSH, R. T.; MCKENZIE, J. A. Ecological genetics of insecticide and acaricide resistance. ***Annual Review of Entomology****, v. 32, n. 1, p. 361–380, jan. 1987.*

ROUSH, R. T.; MILLER, G. L. Considerations for design of insecticide resistance monitoring programs. ***Journal of Economic Entomology****, v. 79, n. 2, p. 293–298, 1 abr. 1986.*

SANO, E. E. et al. Fronteira agrícola do oeste baiano: considerações sobre os aspectos temporais e ambientais. ***Geociências****, v. 30, n. 3, p. 479–489, 2011.*

SAS INSTITUTE INC. ***SAS® OnDemand for Academics:*** *User's Guide.* *Cary, NC, SAS Institute Inc., 2015.*

SIMS, S. B. et al. Monitoring Strategies for Early Detection of Lepidoptera Resistance to Bacillus thuringiensis Insecticidal Proteins. In: BROWN, T. M. (Ed.). ***Molecular Genetics and Evolution of Pesticide Resistance****. p. 229–242, 1996.*

SPARKS, T. C. et al. Resistance and cross-resistance to the spinosyns – A review and analysis. ***Pesticide Biochemistry and Physiology****, v. 102, n. 1, p. 1–10, jan. 2012.*

SPARKS, T. C. Insecticide discovery: An evaluation and analysis. ***Pesticide Biochemistry and Physiology****, v. 107, n. 1, 2013.*

SPARKS, T. C.; LORSBACH, B. A. Perspectives on the agrochemical industry and agrochemical discovery. ***Pest Management Science****, v. 73, n. 4, p. 672–677, 1 abr. 2017.*

4. PADRÃO DE HERANÇA DA RESISTÊNCIA DE *Spodoptera frugiperda* (J. E. SMITH) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE) A SPINETORAM

RESUMO

O conhecimento de bases genéticas da resistência é de fundamental importância para programas de Manejo da Resistência de Insetos (MRI). Com o aumento de uso de espinosinas para o controle de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) no Brasil, o objetivo deste estudo foi selecionar uma linhagem resistente a spinetoram em condições de laboratório para caracterizar o padrão de herança da resistência a este inseticida em *S. frugiperda*. A linhagem de *S. frugiperda* resistente a spinetoram foi isolada a partir do método de F_2 screen realizado em uma população proveniente da cultura do milho da região Oeste da Bahia coletada na safra de 2016. Os valores de CL_{50} (95% IC) obtidos pelos bioensaios de concentração-resposta foram de 0,635 (0,555 – 0,730) µg de spinetoram /mL para a linhagem suscetível (SUS) e de 1170,96 (1041,61 – 1323,89) µg de spinetoram/mL para a linhagem resistente a spinetoram (SPT-R), resultando em uma razão de resistência de 1844 vezes. A população SPT-R apresentou alta resistência cruzada com spinosad. Os cruzamentos recíprocos entre as linhagens SUS e SPT-R revelaram que a resistência de *S. frugiperda* a spinetoram é autossômica e incompletamente recessiva. Os retrocruzamentos da progênie F_1 com a linhagem SPT-R evidenciaram que a resistência possui efeito poligênico. A estimativa do número efetivo de loci com contribuições iguais de efeito para a resistência foi de 1,18 a 1,76, sugerindo que a resistência de *S. frugiperda* a spinetoram está associada a poucos genes. O padrão de herança da resistência de *S. frugiperda* a spinetoram foi caracterizado como autossômico, incompletamente recessivo e poligênico. Os resultados apresentados nesse estudo fornecem subsídios para elaboração de programas proativos para o manejo da resistência de *S. frugiperda* no Brasil.

Palavras-chave: Lagarta-do-cartucho; Espinosinas; Herdabilidade; Manejo de resistência de insetos

ABSTRACT

The knowledge of genetic bases of resistance is of great importance in Insect Resistance Management (IRM) programs. With the increase in the use of spinosyns to control *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith), the objective of this research was to select a spinetoram-resistant strain under laboratory conditions to characterize the inheritance of resistance to this insecticide in *S. frugiperda*. The spinetoram-resistant strain was selected using F2 screen method in a maize field-collected population from Western Bahia region during 2016 growing season. LC_{50} values (95% CI) obtained from concentration-response bioassays were 0.63 (0.55-0.73) µg spinetoram/mL for the susceptible strain (SUS) and 1170.96 (1041,61 - 1323.89) µg spinetoram/mL for the SPT-R strain, resulting in a resistance ratio of 1,844-fold. The SPT-R strain showed high cross-resistance to spinosad. The reciprocal crosses between SUS and SPT-R showed that the *S. frugiperda* resistance to spinetoram is autosomal and incompletely recessive. The backcrossing of the progeny F_1 with the SPT-R strain showed that the resistance has a polygenic effect. The estimation of the effective number of *loci* with equal resistance effect contributions was from 1.18 to 1.76, suggesting that the resistance of *S. frugiperda* to spinetoram is associated to few genes. The inheritance pattern of *S. frugiperda* resistance to spinetoram was characterized as autosomal, incompletely recessive and polygenic. The results presented in this study provide information for implementing a proactive IRM program of *S. frugiperda* in Brazil.

Keywords: Fall armyworm; Spinosyns; Heritability; Insect resistance management

4.1. Introdução

O uso de inseticidas foi por muitos anos a principal tática empregada para o controle de *S. frugiperda*, o que contribuiu para a evolução da resistência a diferentes grupos químicos (CARVALHO et al., 2013; DIEZ-RODRÍGUEZ; OMOTO, 2001; NASCIMENTO et al., 2016). A utilização de grupos químicos com diferentes mecanismos de ação é de fundamental importância para a implantação de um programa de manejo de resistência. Diante disso, os inseticidas do grupo químico das espinosinas (moduladores alostéricos dos receptores nicotínicos da acetilcolina) introduzidos no mercado em 1997 com o inseticida spinosad e posteriormente em 2007 com o spinetoram, são importantes ferramentas no controle de lepidópteros praga (CROUSE et al., 2001), devido ao mecanismo de ação único, elevada eficiência e baixa toxidade a insetos benéficos (SPARKS; CROUSE; DURST, 2001).

Spinetoram é uma molécula semissintética com maior atividade inseticida, maior eficácia, maior controle residual e atributos toxicológicos positivos que seu antecessor, spinosad (DRIPPS et al., 2008). Casos de resistência a spinetoram já foram relatados para *Drosophila melanogaster* (Meigen) (Diptera: Drosophilidae) (WATSON et al., 2010), *Choristoneura rosaceana* (Harris) (Lepitoptera: Tortricidae) (SIAL; BRUNNER; GARCZYNSKI, 2011), *Diaphorina citri* (Kuwayama) (Hemiptera: Liviidae) (TIWARI et al., 2011), *Plutella xylostella* (Linnaeus) (Lepidoptera: Plutellidae) e *Frankliniella occidentalis* (Pergande) (Thysanoptera: Thripidae) (LIMA NETO et al., 2016; WANG et al., 2016). Recentemente, foi relatado o primeiro caso de resistência a spinosad em populações de *S. frugiperda* (OKUMA et al., 2017). Porém, ainda não foi registrado nenhum caso de resistência de *S. frugiperda* a spinetoram.

Por ser um inseticida com alta eficiência contra insetos da ordem Lepidoptera, incluindo *S. frugiperda*, spinetoram tem sido usado com frequência no controle desta praga em cultivos de milho convencional e milho que expressam proteínas de *Bacillus thuringiensis* Berliner (milho *Bt*) no Brasil, demonstrando grande eficácia (BURTET et al., 2017). Retardar a evolução da resistência de *S. frugiperda* a este inseticida se torna fundamental a medida que são relatadas falhas no controle e casos de resistência em cultivos *Bt* (FARIAS et al., 2014; OMOTO et al., 2016). Diante disso, se faz necessária a realização de estudos para compreensão das bases genéticas associadas a resistência de *S. frugiperda* a

spinetoram. A caracterização da resistência juntamente com o conhecimento das bases genéticas associadas à resistência, como o grau de dominância e o número de genes envolvidos são extremamente necessários para compreensão da evolução da resistência no campo e no estabelecimento de estratégias de manejo da resistência de insetos (ROUSH; MCKENZIE, 1987).

Este trabalho reporta o primeiro caso de resistência de *S. frugiperda* a spinetoram em uma linhagem selecionada em laboratório, bem como expõe as bases genéticas associadas a essa resistência, fornecendo subsídios para a elaboração de programas que visam o manejo da resistência de *S. frugiperda* a spinetoram.

4.2. Material e Métodos

4.2.1. Linhagem suscetível de referência

A linhagem suscetível de referência (SUS) foi proveniente do Laboratório de Resistência de Artrópodes USP/ESALQ mantida por mais de 15 anos em dieta artificial de Greene modificada por Kasten *et al* (1978) em condições controladas (25±1°C, 60±10% UR e fotofase de 14 h).

4.2.2. Seleção da linhagem resistente de *S. frugiperda* a spinetoram

A linhagem resistente de *S. frugiperda* (SPT-R) foi selecionada de uma população de campo coletada na segunda safra 2016 no município de Barreiras, Bahia, Brasil (11°45’42’’ S, 45°46’31’’ W) pelo método de F_2 screen (ANDOW; ALSTAD, 1998). Esse método consistiu na formação de isolinhas (casais) com indivíduos da população de campo (Barreiras, Bahia) seguido de cruzamentos endogâmicos até a obtenção da progênie F_2 de cada isolinha, quando foram realizados bioensaios (tópico 3.3.2) com a concentração diagnóstica de 5,6 µg de spinetoram/mL. Após a avaliação (48h) as lagartas sobreviventes de cada isolinha foram transferidas para recipientes plásticos com tampas de acrílico (50 mL) contendo dieta artificial e mantidos até a emergência dos adultos. Foram testadas 78 isolinhas (Barreiras, BA) com 120 lagartas por isolinha. As isolinhas que tiveram lagartas sobreviventes, e estas alcançaram a fase adulta, foram consideradas

positivas e utilizadas para seleção da linhagem resistente. Os adultos sobreviventes foram agrupados e selecionados em concentrações crescentes de 5,6 até 3000 µg de spinetoram/mL por seis gerações de cruzamentos endogâmicos para a obtenção da linhagem de *S. frugiperda* resistente a spinetoram (SPT-R).

4.2.3. Caracterização da resistência de *S. frugiperda* a spinetoram

4.2.3.1. Razão de resistência

As linhagens SPT-R e SUS foram submetidas a bioensaios de concentração-resposta (tópico 3.3.2) para estimativa das CL_{50} (concentrações letais que matam 50% dos indivíduos) e seus intervalos de confiança (IC 95%). Ambas as linhagens foram expostas a sete concentrações em escala logarítmica do inseticida, de 100 a 5600 µg de spinetoram/mL para a linhagem SPT-R e de 0,1 a 5,6 µg de spinetoram/mL para a linhagem SUS. Os dados de concentração-mortalidade de ambas foram analisados por meio da análise de Probit (FINNEY, 1952), com o uso do software Polo Plus (LEORA SOFTWARE, 2003). Testes de paralelismo e igualdade ($P<0,05$) foram realizados para comparação dos coeficientes angulares obtidos para as retas de regressão de cada linhagem na análise de Probit (ROBERTSON et al., 2007). A razão de resistência da população SPT-R foi obtida pela divisão da CL_{50} da linhagem SPT-R pela CL_{50} da linhagem SUS (CL_{50} SPT-R / CL_{50} SUS).

4.2.3.2. Resistência cruzada com spinosad

Da mesma forma, bioensaios de concentração-resposta foram realizados com as linhagens SPT-R e SUS para o produto comercial Tracer® (suspensão concentrada com 480 g de spinosad/L; Dow AgroSciences Industrial Ltda., São Paulo, Brasil). A linhagem SPT-R foi exposta a sete concentrações em escala logarítmica de 100 a 3200 µg de spinosad/mL e a linhagem SUS foram seis concentrações de 0,1 a 5,6 µg de spinosad/mL. Os dados de concentração-mortalidade de ambas foram analisados por meio da análise de Probit (FINNEY, 1952), com o uso do software Polo Plus (LEORA SOFTWARE, 2003). Testes de paralelismo e igualdade foram realizados para comparação dos coeficientes

angulares (ROBERTSON et al., 2007). A existência de resistência cruzada foi verificada mediante observação da razão de resistência da população SPT-R obtida para o inseticida spinosad.

4.2.4. Padrão de herança da resistência de *S. frugiperda* a spinetoram

4.2.4.1. Dominância

Para determinar a dominância da resistência de *S. frugiperda* a spinetoram, pupas das linhagens SPT-R e SUS foram higienizadas (sulfato de cobre 5%), separadas por sexo e mantidas individualizadas sob copos plásticos (50 ml) dispostos em bandejas (30x40 cm) forradas com papel filtro diariamente umedecidos. As bandejas foram mantidas em câmaras climatizadas (25±1 °C, 60±10% UR e fotofase de 14 h) até a emergência dos adultos. Após emergência dos adultos foram realizados cruzamentos recíprocos (Figura 6).

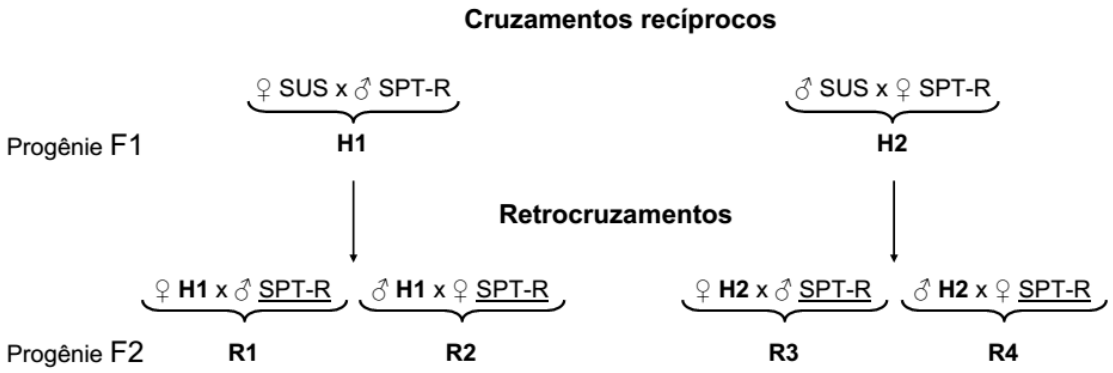


Figura 6. Cruzamentos recíprocos e retrocruzamentos da progênie F_1 e a linhagem resistente SPT-R (linhagem de fenótipo mais distinto da progênie F_1).

Foram utilizados 20 casais para cada cruzamento recíproco, acondicionados em gaiolas cilíndricas de PVC (10 cm × 20 cm) forradas interiormente com papel jornal (substrato de oviposição) para acasalamento e oviposição. Cada gaiola continha um recipiente com solução de mel a 10% para alimentação dos adultos. A cada dois dias foram retiradas as posturas presentes no papel jornal e mantidas em câmara climatizada (25 ± 1 °C e fotofase de 14 h) até a eclosão das lagartas (progênie F_1, heterozigotos H1 e H2). As lagartas foram mantidas em dieta artificial até atingirem o terceiro ínstar. Foram realizados bioensaios de concentração-

resposta (tópico 3.3.2) com lagartas da progênie F_1. As lagartas foram expostas a 7 concentrações de spinetoram em escala logarítmica, entre 1 e 32 µg de spinetoram/mL.

Com os dados de concentração-resposta das populações SPT-R, SUS e heterozigotos (F_1) foi possível estimar o grau de dominância (D), com base nos métodos de Stone (1968) e Bourguet et al. (2000)

De acordo com Stone (1968) o grau médio de dominância é dado pela equação [1].

$$[1] \quad D = (2X_F - X_R - X_S) / (X_R - X_S)$$

Onde; os coeficientes XF; XR e XS são os logaritmos das CL_{50} estimadas para as linhagens heterozigotas (F_1), SPT-R e SUS, respectivamente. Para valores de grau de dominância (D) próximos a -1 ($D \cong -1$) a herança da resistência foi admitida como incompletamente recessiva, e para valores de D próximos a 1 ($D \cong 1$) como uma resistência incompletamente dominante.

Os dados também foram analisados pela equação [2] proposta por Bourguet et al. (2000).

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

Onde; MRR, MSS e MRS representam as mortalidades das linhagens SPT-R, SUS e heterozigoto (F_1), respectivamente. Para valores de grau de dominância (D) próximos a 0 ($D \cong 0$) a herança foi admitida como incompletamente recessiva, e para valores próximos a 1 ($D \cong 1$) como uma resistência incompletamente dominante.

4.2.4.2. Número de genes

Para a estimativa do número de genes associados a resistência, foram realizados retrocruzamentos entre a progênie F_1 (heterozigotos H1 e H2) e a linhagem SPT-R (parental fenotipicamente mais distinto de F_1), como proposto por Tsukamoto (1983) e Roush & Daly (1990) (Figura 6). Foram formados quatro

retrocruzamentos cada um com 20 casais, acondicionados em gaiolas e criados como descrito no tópico anterior. Sendo assim realizados bioensaios de concentração-resposta com a progênie F_2 (R1, R2, R3 e R4) com quatro concentrações entre 3,2 e 18 µg de spinetoram/mL. Os dados de mortalidade foram utilizados para avaliação da hipótese de herança monogênica pelo teste de qui-quadrado, dado pela equação [3] (SOKAL; ROHLF, 1995).

$$[3] \quad \chi 2 = (Ni - pni)\ ^\wedge 2 / pqni$$

Onde, a variável Ni representa a mortalidade observada na concentração i, p a mortalidade esperada, calculada a partir do modelo mendeliano [4] (GEORGHIOU, 1969), ni número de indivíduos testados e q = 1-p.

$$[4] \quad p= (a+b) / 2$$

A hipótese de herança monogênica foi rejeitada quando o qui-quadrado calculado foi maior que o tabelado (χ^2 calculado ≥ χ^2 tabelado) a um grau de liberdade ($P < 0,05$), aceitando a hipótese de herança poligênica.

Para estimar o número de *loci* relacionados a resistência de *S. frugiperda* a spinetoram foi utilizada a equação [5], 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 (LANDE, 1981).

$$[5] \quad n_E = \frac{\left(\mu_{p_2} - \mu_{p_1}\right)^{\alpha}}{\left(8\sigma_s^2\right)} \leq n$$

Onde; μ_{p_2} e μ_{p_1} correspondem ao $\log_{10}$ da CL_{50} das linhagens SPT-R e SUS respectivamente, e σ_s^2 corresponde as variações fenotípicas estimadas pelo inverso do coeficiente angular ao quadrado mediante equação [6] proposta por Lande (1981).

$$[6] \quad \sigma_s^2 = \sigma_{B_1}^2 + \sigma_{B_2}^2 - \left[\sigma_{F_1}^2 + \frac{1}{2}\sigma_{p_2}^2 + \frac{1}{2}\sigma_{p_1}^{\alpha}\right]$$

Onde, $\sigma^2_{B_1}$, $\sigma^2_{B_2}$, $\sigma^2_{F_1}$, $\sigma^2_{p_2}$ e $\sigma^{\alpha}_{p_1}$ correspondem as variações fenotípicas dos retrocruzamentos R1 e R2/ R3 e R4, cruzamento heterozigoto (F_1), linhagens SPT-R e SUS respectivamente.

4.3. Resultados

4.3.1. Caracterização da resistência de *S. frugiperda* a spinetoram

4.3.1.1. Razão de resistência

Foram obtidas 53 isolinhas positivas para a seleção da linhagem resistente. Após seis gerações de seleção, com concentrações crescentes de spinetoram a partir da concentração diagnóstica de 5,6 µg de spinetoram/mL até 3000 µg de spinetoram/Ml, foi obtida a população de *S. frugiperda* resistente a spinetoram (SPT-R).

Os valores de CL_{50} (IC 95%) foram de 0,635 (0,555 – 0,730) µg de spinetoram /mL para a linhagem SUS e de 1170,96 (1041,61 – 1323,89) µg de spinetoram/mL para a linhagem SPT-R. A razão de resistência obtida para a linhagem SPT-R foi de 1844 vezes, com rejeição da hipótese de igualdade (χ^2 = 868, G.L. = 2, P<0.05) e paralelismo (χ^2 = 20.25, G.L. = 1, P<0.05) entre as populações (Tabela 8).

4.3.1.2. Resistência cruzada com spinosad

Para o inseticida spinosad, a linhagem SPT-R apresentou CL_{50} (IC 95%) de 1949,74 (1601,24 – 2470,51) µg de spinosad/mL e a linhagem SUS de 1,63 (1,05 – 2,51) µg de spinosad/mL. Assim, a razão de resistência obtida foi de 1196 vezes, com rejeição das hipóteses de igualdade (χ^2 = 524, G.L. = 2, P<0.05) e de paralelismo (χ^2 = 16,06, G.L. = 1, P<0.05) (Tabela 8). Diante da elevada razão de resistência da linhagem SPT-R para o inseticida spinosad podemos admitir a existência de resistência cruzada entre spinetoram e spinosad.

Tabela 8. Concentração-resposta das linhagens de *S. frugiperda* suscetível (SUS), resistente a spinetoram (SPT-R) aos inseticidas spinetoram e spinosad em bioensaios de ingestão.

Pop.	Inseticida	n[1]	Coef. Ang. (±EPM[2])	CL_{50} (IC 95%)[3]	χ^{2}[4]	gl[5]	h[6]	RR[7]
SUS	Spinetoram	641	5,405 (±0,522)	0,635 (0,555-0,730)	6,75	5	1,35	-
SPT-R		575	3,043 (±0,245)	1170,96 (1041,61-1323,89)	2,3	5	0,46	1844
SUS	Spinosad	645	2,12 (±0,191)	1,63 (1,05-2,51)	11,97	4	2,99	-
SPT-R		611	3,69 (±0,375)	1949,74 (1601,23-2470,5)	9,18	5	1,83	1196

[1] número de insetos testados; [2] Erro padrão da média; [3] Concentração letal 50 (µg i.a./mL) e intervalo de confiança a 95%; [4] Valor do qui-quadrado calculado; [5] graus de liberdade (g.l.); [6] Heterogeneidade; [7]Razão de resistência = CL_{50} da linhagem resistente/ CL_{50} da linhagem suscetível.

4.3.2. Padrão de herança da resistência de *S. frugiperda* a spinetoram

Com valores de CL_{50} (IC 95%) de 3,906 (2,972 – 5,845) µg spinetoram/mL para o heterozigoto H1 (♀ SUS × ♂ SPT-R) e 5,366 (4,517 – 6,519) µg spinetoram/mL para o heterozigoto H2 (♂ SUS × ♀ SPT-R) foi possível observar a proximidade de resposta dos heterozigotos a resposta da linhagem SUS com CL_{50} de 0,635 (0,555 – 0,730) µg spinetoram/mL (Figura 7). No entanto, a razão de resistência dos heterozigotos foi de 6,15 a 8,45 vezes, diferindo da linhagem SUS com rejeição da hipótese de igualdade ($\chi2$ = 550, G.L. = 4, P<0.0001) e paralelismo (χ^2 = 57,64, G.L. = 2, P<0.0001). (Figura 7; Tabela 9).

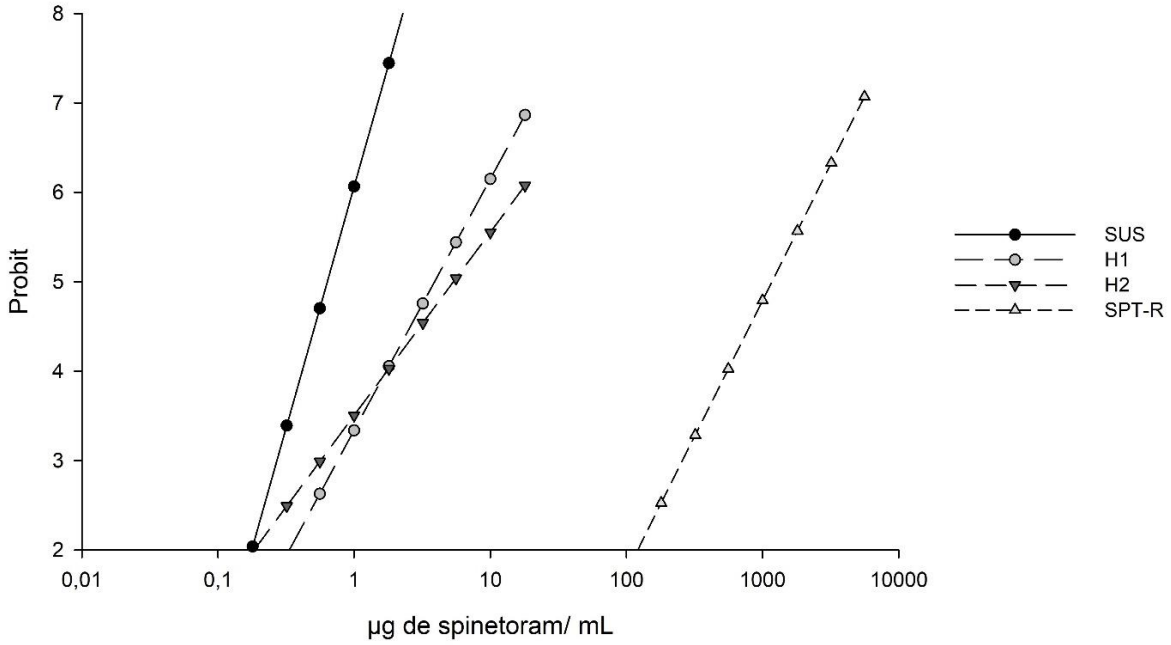


Figura 7. Concentração-resposta em escala logarítmica para linhagens de *S. frugiperda* suscetível (SUS), resistente (SPT-R) e heterozigotos H1 (♀ SUS × ♂ SPT-R) e H2 (♂ SUS × ♀ SPT-R) oriundos dos cruzamentos recíprocos entre SUS e SPT-R.

Foram verificadas diferenças significativas entre os intervalos de confiança das linhagens SUS, SPT-R e heterozigotas. Entretanto, as CL_{50} dos heterozigotos independentemente da ordem de cruzamento não diferiram por sobreposição dos intervalos de confiança. Essa sobreposição dos intervalos de confiança dos heterozigotos permite afirmar que os genes relacionados à resistência de *S. frugiperda* a spinetoram estão situados em cromossomos autossômicos (Tabela 9).

Tabela 9. Concentração-resposta das linhagens de *S. frugiperda* suscetível (SUS), resistente (SPT-R) e heterozigotos **H1** (♀ SUS × ♂ SPT-R) e **H2** (♂ SUS × ♀ SPT-R) oriundos dos cruzamentos recíprocos entre as linhagens SUS e SPT-R.

População	n[1]	Coef. Ang. (±EPM[2])	CL_{50} (IC 95%)[3]*	χ^2[4]	gl[5]	h[6]	RR[7]
SPT-R	575	3,043 (±0,245)	1170,96 (1041,61-1323,89) a	2,3	5	0,46	1844,03
SUS	641	5,405 (±0,522)	0,635 (0,555-0,730) b	6,75	5	1,35	-
H1	835	2,811 (±0,290)	3,906 (2,972-5,845) c	13,42	6	2,24	6,15
H2	770	2,048 (±0,163)	5,366 (4,517-6,519) c	6,02	8	0,75	8,45

[1] número de insetos testados; [2] Erro padrão da média; [3] Concentração letal 50 (µg i.a. /mL) e intervalo de confiança a 95%; [4] Valor do qui-quadrado calculado; [5] graus de liberdade (g.l.); [6] Heterogeneidade; [7]Razão de resistência = CL_{50} da linhagem resistente/ CL_{50} da linhagem suscetível. *Valores de CL_{50} seguidos de mesma letra não diferiram significativamente entre os intervalos de confiança (95%).

4.3.2.1. Dominância

O grau de dominância obtido pelo método proposto por Stone (1968) foi de -0,516 e -0,432 para os cruzamentos recíprocos H1 e H2 respectivamente, determinando a resistência de *S. frugiperda* a spinetoram como incompletamente recessiva. No entanto, pelo método de Bourguet et al. (2000) o grau de dominância variou de acordo com a concentração, sendo incompletamente dominante nas concentrações mais baixas (1 a 3,2 µg spinetoram/mL), incompletamente recessiva nas concentrações intermediarias (5,6 a 32 µg spinetoram/mL) e completamente recessiva nas concentrações maiores que 56 µg spinetoram/mL. Na concentração de 7,6 µg spinetoram/mL equivalente a dose de spinetoram recomendada para o controle de *S. frugiperda* no campo, a herança é incompletamente recessiva (Figura 8).

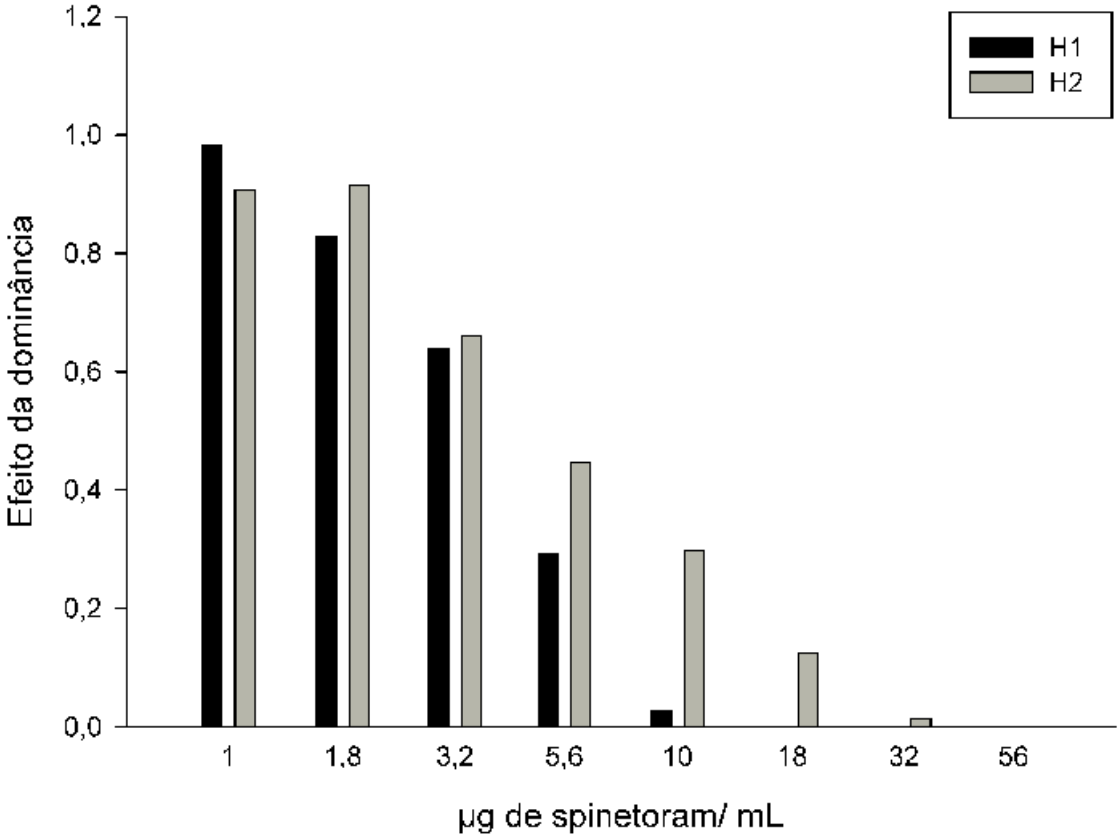


Figura 8. Efeito da dominância da resistência de *S. frugiperda* a spinetoram em função da concentração de spinetoram. (**H1** =♀ SUS × ♂ SPT-R; **H2** =♂ SUS × ♀ SPT-R).

4.3.2.2. Número de genes

Com o teste de qui-quadrado foram comparadas as mortalidades observadas e esperadas dos retrocruzamentos R1, R2, R3 e R4. Foram encontrados valores de qui-quadrado significativos (P<0,05) na maioria das concentrações testadas, rejeitando a hipótese de herança monogênica (Tabela 10). Assim, podemos concluir que a resistência de *S. frugiperda* a spinetoram tem caráter poligênico, ou seja, ligada a mais de um gene. Entretanto, de acordo com a equação proposta por Lande (1981), o número efetivo de *loci* com contribuições iguais de efeito para a resistência foi de 1,18 a 1,76, sugerindo que a resistência de *S. frugiperda* a spinetoram mesmo com caráter poligênico está associada a poucos *loci*.

Tabela 10. Análise de chi-quadrado (χ2) baseada na mortalidade observada e esperada dos retrocruzamentos oriundos dos heterozigotos H1 (♀ SUS × ♂ SPT-R) e H2 (♂ SUS × ♀ SPT-R) com a linhagem resistente SPT-R de *S. frugiperda* em quatro concentrações de spinetoram.

Concentração (µg. mL)	N° de testados	Mortalidade nos retrocruzamentos		χ^2	ρ
		Obs. [a]	Esp. [b]		
		R1 = ♂ SPT-R x ♀ (♀SUS x ♂SPT-R)			
3,2	96	9 (9,4)	17.4 (18,1)	4,27 *	0,039
5,6	95	18 (18,9)	33.6 (35,4)	9,19 *	0,002
10	96	25 (26)	46.7 (48,6)	16,41 *	0,0001
18	91	40 (44)	45.5 (50)	0,09	0,767
		R2 = ♀ SPT-R x ♂ (♀SUS x ♂SPT-R)			
3,2	72	6 (8,3)	13 (18,1)	4,62 *	0,032
5,6	96	17 (17,7)	34 (35,4)	13,16 *	0,0003
10	72	18 (25)	35 (48,6)	16,07 *	0,0001
18	72	31 (43,1)	36 (50)	1,39	0,239
		R3 = ♂ SPT-R x ♀ (♂SUS x ♀SPT-R)			
3,2	96	5 (5,2)	16.3 (16,9)	9,4 *	0,002
5,6	96	12 (12,5)	26.6 (27,7)	11,03 *	0,001
10	96	20 (20,8)	33.7 (35,1)	8,58 *	0,003
18	96	31 (32,3)	42 (43,8)	5,12 *	0,024
		R4 = ♀ SPT-R x ♂ (♂SUS x ♀SPT-R)			
3,2	96	10 (10,4)	16.3 (16,9)	2,91	0,088
5,6	91	17 (18,7)	25.2 (27,7)	3,67	0,056
10	94	26 (27,7)	33 (35,1)	2,29	0,130
18	93	29 (31,2)	40.7 (43,8)	5,97 *	0,015

[a] Mortalidade observada expressa em número de indivíduos mortos e entre parênteses em porcentagem, n° (%).
[b] Mortalidade esperada determinada pela herança mendeliana, expressa em número de indivíduos que deveriam morrer de acordo com número de indivíduos testados e entre parênteses em porcentagem, n° (%).
[*] Valores de qui-quadrado que diferiram significativamente (P<0,05, graus de liberdade = 1).

4.4. Discussão

Este estudo reporta o primeiro caso de resistência de *S. frugiperda* a spinetoram em uma linhagem selecionada em laboratório (SPT-R), com elevada razão de resistência (1844 vezes). A seleção da linhagem resistente em laboratório, não significa que essa resistência está ocorrendo no campo com falhas de controle (TABASHNIK et al., 2014). No entanto é um alerta para a evolução da resistência, uma vez que os alelos de resistência a spinetoram ocorrem em populações brasileiras de *S. frugiperda* das principais regiões produtoras de milho, principalmente no estado da Bahia, onde, esses alelos estão em maior frequência (conclusão do capítulo anterior). Além disso, o fato da linhagem SPT-R ter sido obtida no mesmo estado onde Okuma et al. (2017) selecionou a linhagem de *S. frugiperda* resistente a spinosad, evidencia o intenso uso deste grupo de inseticidas no controle de *S. frugiperda.* A seleção destas linhagens resistentes a espinosinas no estado da Bahia evidenciam a necessidade de implementação de um programa proativo de manejo da resistência a espinosinas nesta região, com o objetivo de retardar a evolução da frequência dos alelos que conferem resistência no campo e evitar possíveis falhas de controle.

A existência de resistência cruzada entre spinetoram (SPT-R) e spinosad constatada com alta razão de resistência (1196 vezes) favorece a evolução da resistência de *S. frugiperda* a espinosinas, devido à pressão de seleção de ambos os inseticidas sobre os alelos que conferem resistência. A resistência cruzada entre espinosinas é relatada para outras espécies e ordens de insetos (SPARKS et al., 2012). Porém, a resistência cruzada com outros grupos químicos de inseticidas não é constatada na maioria dos casos, e quando ocorre, os níveis são muito baixos (3 – 20 vezes) (SPARKS et al., 2012). O fato de *S. frugiperda* resistente a spinetoram apresentar resistência cruzada com spinosad, inviabiliza o uso destes inseticidas em conjunto no manejo da resistência. Embora a resistência cruzada entre spinetoram e outros grupos químicos de inseticidas é verificada em níveis baixos em outras espécies ou na maioria das vezes não verificada, ainda deve ser averiguada em *S. frugiperda.*

A análise da sobreposição dos intervalos de confiança das CL_{50} dos heterozigotos (H1 e H2) provenientes dos cruzamentos recíprocos, propõe que a resistência de *S. frugiperda* a spinetoram é determinada por genes localizados nos

cromossomos autossômicos, ou seja, os genes de resistência são igualmente compartilhados por machos e fêmeas.

O grau de dominância obtido pelo método de Stone (1968) sugere uma resistência incompletamente recessiva, onde, o fenótipo só será resistente quando o alelo de resistência estiver em homozigose. No entanto, a dominância efetiva no campo é diferente da observada em laboratório, isso porque a dominância é caracterizada como a relação entre fenótipos e três genótipos distintos (homozigotos resistentes, homozigotos suscetíveis e heterozigotos) que podem variar de acordo com as condições ambientais e doses/concentrações utilizadas (BOURGUET; GENISSEL; RAYMOND, 2000; ROUSH; DALY, 1990). Utilizando o método proposto por Bourguet *et al.* (2000) que leva em consideração os três genótipos distintos e a concentração aplicada, foi observado que o grau de dominância da linhagem SPT-R foi incompletamente dominante nas concentrações mais baixas (1 a 3,2 µg spinetoram/mL), e com o aumento das concentrações vai evoluindo para dominância recessiva (>56 µg spinetoram/mL). Na concentração equivalente a dose de campo (≈7,6 µg spinetoram/mL) para controle de *S. frugiperda* a herança é incompletamente recessiva, ou seja, a dose recomendada para o controle de *S. frugiperda* não é discriminatória (ainda há sobrevivência de heterozigotos). A sobrevivência dos heterozigotos no campo contribuem fortemente para a evolução da resistência, uma vez que são os principais responsáveis pela evolução da resistência no campo (GEORGHIOU; TAYLOR, 1977a).

Os retrocruzamentos demonstraram que a resistência de *S. frugiperda* a spinetoram tem efeito poligênico, ou seja, está associada a múltiplos genes. Entretanto, o resultado obtido pela equação de Lande (1981) sugere que mesmo com efeito poligênico a resistência de *S. frugiperda* a spinetoram está associada a poucos genes. Uma possível relação entre essas informações pode estar nos mecanismos de resistência a spinetoram. O principal mecanismos de resistência relatado para espinosinas é o de alteração do sítio de ação (SPARKS et al., 2012), no entanto, alguns estudos relatam mecanismos metabólicos com ação de monooxigenases (OSORIO et al., 2008; SIAL; BRUNNER; GARCZYNSKI, 2011; WANG et al., 2009). Diante da diversidade de genes envolvido em processos metabólicos nos insetos, alguns desses genes podem estar relacionados a resistência de *S. frugiperda* a spinetoram em conjunto com alteração do sítio de ação, produzindo efeito poligênico. Mais estudos relacionados a mecanismos

moleculares associados a resistência de *S. frugiperda* a spinetoram são necessários para maior compreensão dos genes relacionados a resistência.

O padrão de herança para a resistência de *S. frugiperda* a spinetoram obtido neste trabalho como autossômico, incompletamente recessivo e poligênico fornece informações muito importantes para o Manejo da Resistência de Insetos (MRI). Um padrão de herança autossômico e incompletamente recessivo, significa que o fenótipo resistente só se expressa em homozigose, ou seja, os heterozigotos são fenotipicamente suscetíveis, facilitando o seu controle. Isso é algo muito favorável para o manejo de resistência, pois os indivíduos heterozigotos estão em maior proporção do campo do que os homozigotos resistentes, sendo os principais carregadores dos alelos de resistência (ROUSH; DALY, 1990). Assim, a utilização no campo de doses elevadas de spinetoram que garantam a mortalidade dos heterozigotos promove o retardamento da evolução da resistência. Quando a resistência possui um efeito poligênico, sua evolução no campo é muito menos eficiente, isso porque, quando um indivíduo com resistência poligênica emigra para uma população suscetível os alelos de resistência são diluídos por hibridização (ROUSH; MCKENZIE, 1987), ainda mais em uma herança recessiva.

Neste estudo a herança da resistência de *S. frugiperda* a spinetoram foi caracterizada como incompletamente recessiva e poligênica, o que diminui o potencial de evolução da resistência, porém quando a frequência do alelo de resistência no campo já está elevada, como observada no capítulo anterior, a resposta de seleção para um alelo recessivo se torna mais rápida (CROW; KIMURA, 1970). Sendo assim, é necessária a adoção de programas proativos para manejo da resistência de *S. frugiperda* a spinetoram com o objetivo de impedir o aumento da frequência de resistência, e assim, retardar a evolução da resistência, prolongando a vida útil deste inseticida.

4.5. Conclusões

- A razão de resistência a spinetoram em linhagem de *S. frugiperda* selecionada em condições de laboratório foi elevada;

- O padrão de herança da resistência de *S. frugiperda* a spinetoram é autossômico e incompletamente recessivo;

- A resistência de *S. frugiperda* a spinetoram possui caráter poligênico, porém associado a poucos *loci*;

- Há resistência cruzada entre spinetoram e spinosad em *S. frugiperda*.

Referências

ANDOW, D. A.; ALSTAD, D. N. F2 screen for rare resistance alleles. **Journal of Economic Entomology**, v. 91, n. 3, p. 572–578, 1 jun. 1998.

BARROS, E. M.; TORRES, J. B.; BUENO, A. F. Oviposição, desenvolvimento e reprodução de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) em diferentes hospedeiros de importância econômica. **Neotropical Entomology**, v. 39, n. 6, p. 996–1001, dez. 2010.

BERNARDI, D. et al. Cross-resistance between Cry1 proteins in fall armyworm (*Spodoptera frugiperda*) may affect the durability of current pyramided *Bt* maize hybrids in Brazil. **Plos One**, v. 10, n. 10, p. e0140130, 16 out. 2015.

BOURGUET, D.; GENISSEL, A.; RAYMOND, M. Insecticide resistance and dominance levels. **Journal of Economic Entomology**, v. 93, n. 6, p. 1588–95, dez. 2000.

BURTET, L. M. et al. Managing fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae), with Bt maize and insecticides in southern Brazil. **Pest Management Science**, v. 73, n. 12, p. 2569–2577, 1 dez. 2017.

CARVALHO, R. A. et al. Investigating the molecular mechanisms of organophosphate and pyrethroid resistance in the fall armyworm *Spodoptera frugiperda*. **PLoS ONE**, v. 8, n. 4, 2013.

CROUSE, G. D. et al. Recent advances in the chemistry of spinosyns. **Pest Management Science**, v. 57, n. 2, p. 177–185, 1 fev. 2001.

CROW, J. F.; KIMURA, M. **An introduction to population genetics theory**. New York: Evanston and London: Harper & Row, 1970.

CRUZ, I. **A lagarta-do-cartucho na cultura do milho.** Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo. Circular técnica 21, p.45, 1995. Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/handle/doc/475779>. Acesso em: 17 ago. 2017.

CRUZ, I.; FIGUEIREDO, M. DE L. C.; SILVA, R. B. **Monitoramento de adultos de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) e *Diatraea saccharalis* (Fabricius) (Lepidoptera: Pyralidae) em algumas regiões produtoras de milho no Brasil**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, Documentos 93, p. 42, 2010.

DIEZ-RODRÍGUEZ, G. I.; OMOTO, C. Herança da resistência de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) a lambda-cialotrina. **Neotropical Entomology**, v. 30, n. 2, p. 311–316, jun. 2001.

DRIPPS, J. et al. Spinetoram: how artificial intelligence combined natural fermentation with synthetic chemistry to produce a new spinosyn insecticide. **Plant Health Progress**, 2008.

FARIAS, J. R. et al. Field-evolved resistance to Cry1F maize by *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in Brazil. **Crop Protection**, v. 64, p. 150–158, out. 2014.

FIGUEIREDO, M. DE L. C.; PENTEADO-DIAS, A. M.; CRUZ, I. **Danos provocados por *Spodoptera frugiperda* na produção de matéria seca e nos rendimentos de grãos na cultura do milho**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, Comunicado Técnico 130, p. 1-6, 2005.

FINNEY, D. J. **Probit Analysis: a statistical treatment of the sigmoid response curve**. 2. ed. New York: Cambridge University Press, 1952.

GEORGHIOU, G. P. Genetics of resistance to insecticides in houseflies and mosquitoes. **Experimental Parasitology**, v. 26, n. 2, p. 224–255, out. 1969.

GEORGHIOU, G. P.; TAYLOR, C. E. Genetic and biological influences in the evolution of insecticide resistance. **Journal of Economic Entomology**, v. 70, n. 3, p. 319–323, 1 jun. 1977.

GOERGEN, G. et al. First report of outbreaks of the fall armyworm *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae), a new alien invasive pest in west and Central Africa. **PLOS ONE**, v. 11, n. 10, p. e0165632, 27 out. 2016.

KASTEN, P. J.; PRECETTI, A. A. C. M.; PARRA, J. R. P. Comparative biologic data on *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) on two artificial diets and natural substrate. **Revista de agricultura**, v. v. 53, 1978.

LANDE, R. The minimum number of genes contributing to quantitative variation between and within populations. **Genetics**, v. 99, n. 3–4, p. 541–53, 1981.

LEORA SOFTWARE. **POLO-Plus 1.0 Probit and Logit analysis**PetalumaLeOra Software, , 2003.

LIMA NETO, J. E. et al. 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, 16 nov. 2016.

LUGINBILL, P. The fall armyworm. **USDA Technical Bulletin**, v. 34, p. 92, 1928.

OKUMA, D. M. et al. Inheritance and fitness costs of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) resistance to spinosad in Brazil. **Pest Management Science**, 14 dez. 2017.

OMOTO, C. et al. Field-evolved resistance to Cry1Ab maize by *Spodoptera frugiperda* in Brazil. **Pest Management Science**, v. 72, n. 9, p. 1727–1736, set. 2016.

OSORIO, A. et al. Monitoring of beet armyworm resistance to spinosad and methoxyfenozide in Mexico. **Pest Management Science**, v. 64, n. 10, p. 1001–1007, out. 2008.

POGUE, M. G. A world revision of the genus *Spodoptera Guenée* (Lepidoptera: Noctuidae). **Memoirs of the American Entomological Society**, v. 43, n. 28, p. 117–124, 2002.

ROBERTSON, J. L. et al. **Bioassays with Arthropods**. 2. ed. [s.l.] CRC press, 2007.

ROUSH, R. T.; DALY, J. C. The role of population genetics in resistance research and management. In: ROUSH, R. T.; TABASHNIK, B. E. (Eds.). . **Pesticide Resistance in Arthropods**. New York, NY: Chapman and Hall, 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, jan. 1987.

SIAL, A. A.; BRUNNER, J. F.; GARCZYNSKI, S. F. Biochemical characterization of chlorantraniliprole and spinetoram resistance in laboratory-selected obliquebanded leafroller, *Choristoneura rosaceana* (Harris) (Lepidoptera: Tortricidae). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 99, n. 3, p. 274–279, mar. 2011.

SOKAL, R. R.; ROHLF, F. **Biometry: the principles and practice of statistics in biological research**. 4. ed. New York, NY: W.H. Freeman and Company, 1995.

SPARKS, A. N. A review of the biology of the fall armyworm. **The Florida Entomologist**, v. 62, n. 2, p. 82, jun. 1979.

SPARKS, T. C. et al. Resistance and cross-resistance to the spinosyns – A review and analysis. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 102, n. 1, p. 1–10, jan. 2012.

SPARKS, T. C.; CROUSE, G. D.; DURST, G. Natural products as insecticides: the biology, biochemistry and quantitative structure-activity relationships of spinosyns and spinosoids. **Pest Management Science**, v. 57, n. 10, p. 896–905, out. 2001.

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.

TABASHNIK, B. E. et al. Defining terms for proactive management of resistance to Bt crops and pesticides. **Journal of Economic Entomology**, v. 107, n. 2, p. 496–507, 1 abr. 2014.

TIWARI, S. et al. Insecticide resistance in field populations of Asian citrus psyllid in Florida. **Pest Management Science**, v. 67, n. 10, p. 1258–1268, out. 2011.

TSUKAMOTO, M. Methods of genetic analysis of insecticide resistance. In: GEORGHIOU, G. P.; SAITO, T. (Eds.). **Pest Resistance to Pesticides**. New York, NY: Plenum, p. 71–98, 1983.

WANG, D. et al. Resistance selection and biochemical characterization of spinosad resistance in *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 95, n. 2, p. 90–94, 1 out. 2009.

WANG, Z.-H. et al. 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, 1 jul. 2016.

WATSON, G. B. et al. 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, maio 2010.