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

**Caracterização da suscetibilidade a inseticidas diamidas e
espinosinas em populações de *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera:
Noctuidae) do Brasil**

Rogério Machado Pereira

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

**Piracicaba
2017**

Rogério Machado Pereira
Engenheiro Agrônomo

**Caracterização da suscetibilidade a inseticidas diamidas e espinosinas
em populações de *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) do
Brasil**

versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

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

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

Piracicaba
2017

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

Pereira, Rogério Machado

Caracterização da suscetibilidade a inseticidas diamidas e espinosinas em populações de *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) do Brasil / Rogério Machado Pereira. - - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2017.

93 p.

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

1. Monitoramento 2. Padrão de herança 3. Frequência alélica 4. Manejo de resistência I. Título

A Deus

Aos meus pais, Pedro Rodrigues Pereira, Maria Jordelina Machado Pereira, pelo
amor, dedicação e incentivos;

Ao meu irmão, Ruitter Machado Pereira, pela amizade;

À Cleane de Souza Silva, pelo carinho e incentivo incondicionais.

Dedico e agradeço

AGRADECIMENTOS

À Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”/Universidade de São Paulo (ESALQ/USP) pela oportunidade.

Ao professor Celso Omoto, pela orientação e amizade ao longo desses anos de convívio.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Entomologia pelos ensinamentos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudo.

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

À Associação Baiana dos Produtores de Algodão (ABAPA), aos consultores técnicos, Celito Breda, Pedro Matana Junior, as empresas SGS Gravena (Licença SISBIO 18018-1) e PROMIP (Licença SISBIO 40380-5) pelas coletas das populações de *Helicoverpa armigera* para a realização desta pesquisa.

Aos colegas do Laboratório de Resistência de Artropódes a Táticas de Controle (ESALQ/USP) Douglas Amado e Mariana Regina Durigan, pelo trabalho em grupo e suporte na condução deste trabalho.

Aos estagiários do Laboratório de Resistência de Artropódes a Táticas de Controle (ESALQ/USP): Rodrigo Andrade Franciscatti, Marcelo Mocheti, Alessandra Tokarski, Pedro Henrique Campos, Alexandre Colli, Mariana Colli e Natasha Umezu pela amizade e valiosa ajuda durante a execução deste trabalho.

Às funcionárias do Laboratório de Resistência de Artropódes a Táticas de Controle (ESALQ/USP), Dra Eloisa Salmeron e Gislaine Aparecida Amâncio de Oliveira Campos, pela amizade, ensinamentos e suporte durante todo o projeto.

Aos colegas do Laboratório de Resistência de Artropódes a Táticas de Controle (ESALQ/USP): Aline Sartori Guidolin, Anderson Bolzan, Antônio Rogério Bezerra do Nascimento, Dayana Rosalina de Souza, Daniel Bernardi, Daniela Miyuki Okuma, Dyrson Abbade Neto, Ewerton Lira, Felipe Antônio Domingues, Fernando Semmelroth, Ingrid Schimidt Kaiser, Natália Alves Leite, Oderlei Bernardi, Osmar Arias, Patrick Marques Dourado, Rebeca Ribeiro, Renato Jun Horikoshi, Rubens Kanno, Sandy Spineli pelo convívio e troca de conhecimentos.

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

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

A toda a minha família pelo apoio.

Por fim, a todos aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram para a execução deste trabalho, meus sinceros agradecimentos.

SUMÁRIO

RESUMO	9
ABSTRACT	10
LISTA DE FIGURAS	11
LISTA DE TABELAS	12
1. INTRODUÇÃO	15
Referências	21
2 CARACTERIZAÇÃO DA SUSCETIBILIDADE E ESTIMATIVA DA FREQUÊNCIA ALÉLICA DE RESISTÊNCIA A INSETICIDAS DIAMIDAS EM POPULAÇÕES DE <i>Helicoverpa armigera</i> (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE) DO BRASIL	29
Resumo	29
Abstract	29
2.1 Introdução	30
2.2 Material e métodos	32
2.2.1 Coleta de populações de <i>H. armigera</i>	32
2.2.2 Criação e manutenção das populações de <i>H. armigera</i> em laboratório	35
2.2.3 Caracterização das linhas-básicas de suscetibilidade de <i>H. armigera</i> a diamidas	35
2.2.4 Estimativa da frequência do alelo de resistência de <i>H. armigera</i> a chlorantraniliprole	36
2.2.5 Monitoramento da suscetibilidade em populações de <i>H. armigera</i> a diamidas	38
2.3 Resultados	38
2.3.1 Caracterização das linhas-básicas de suscetibilidade de <i>H. armigera</i> a diamidas	38
2.3.2 Estimativa da frequência do alelo de resistência de <i>H. armigera</i> a chlorantraniliprole	42

2.3.3 Monitoramento da suscetibilidade em populações de <i>H. armigera</i> a diamidas	44
2.4 Discussão	47
2.5 Conclusões	49
Referências	49
3 CARACTERIZAÇÃO DA SUSCETIBILIDADE E ESTIMATIVA DA FREQUÊNCIA ALÉLICA DE RESISTÊNCIA A INSETICIDAS ESPINOSINAS EM POPULAÇÕES DE <i>Helicoverpa armigera</i> (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE) DO BRASIL.....	55
Resumo	55
Abstract	55
3.1 Introdução	56
3.2 Material e métodos	57
3.2.1 Coleta de populações de <i>H. armigera</i>	57
3.2.2 Criação e manutenção das populações de <i>H. armigera</i> em laboratório	57
3.2.3 Caracterização das linhas-básicas suscetibilidade de <i>H. armigera</i> a espinosinas	58
3.2.4 Estimativa da frequência do alelo de resistência de <i>H. armigera</i> a spinosad .	59
3.2.5 Monitoramento da suscetibilidade em populações de <i>H. armigera</i> a espinosinas	61
3.3 Resultados	61
3.3.1 Caracterização das linhas-básicas de suscetibilidade de <i>H. armigera</i> a espinosinas	61
3.3.2 Estimativa da frequência do alelo de resistência de <i>H. armigera</i> a spinosad .	64
3.3.3 Monitoramento da suscetibilidade em populações de <i>H. armigera</i> a espinosinas	66
3.4 Discussão	68
3.5 Conclusões	69
Referências	70

4 CARACTERIZAÇÃO DO PADRÃO DE HERANÇA DA RESISTÊNCIA <i>Helicoverpa armigera</i> (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE) A FLUBENDIAMIDE E DA RESISTÊNCIA CRUZADA A OUTRAS DIAMIDAS	75
Resumo	75
Abstract.....	75
4.1 Introdução	76
4.2 Material e métodos	77
4.2.1 Linhagens de <i>H. armigera</i> suscetível e resistente a flubendiamide	77
4.2.2 Caracterização da resistência de <i>H. armigera</i> a flubendiamide	78
4.2.3 Resistencia cruzada de flubendiamide a outras diamidas.....	79
4.2.4 Padrão de herança da resistência de <i>H. armigera</i> a flubendiamide.....	79
4.2.5 Grau de dominância (D) e dominância (D_{ML}) da resistência	79
4.2.6 Número de genes relacionados à resistência a flubendiamide	80
4.3 Resultados	81
4.3.1 Caracterização da resistência de <i>H. armigera</i> a flubendiamide	81
4.3.2 Resistencia cruzada de flubendiamide a outras diamidas.....	82
4.3.3 Grau de dominância (D) e dominância (D_{ML}) da resistência	85
4.3.4 Número genes relacionados à resistência a flubendiamide	86
4.4 Discussão	88
4.5 Conclusões.....	90
Referências.....	90

RESUMO

Caracterização da suscetibilidade a inseticidas diamidas e espinosinas em populações de *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) do Brasil

O manejo de *Helicoverpa armigera* (Hübner) no Brasil tem sido baseado principalmente no controle químico. O uso de inseticidas de grupos químicos mais recentes, tais como diamidas e espinosinas, tem sido crescente no controle de *H. armigera* e de outros lepidópteros-praga que ocorrem em diferentes sistemas de produção de cultivos. Para a implementação de estratégias proativas de manejo da resistência de insetos, os objetivos da presente pesquisa foram (i) caracterizar as linhas-básicas de suscetibilidade a inseticidas diamidas (chlorantraniliprole, cyantraniliprole e flubendiamide) e espinosinas (spinosad e spinetoram) em populações de *H. armigera* do Brasil; (ii) estimar a frequência inicial de alelo que confere resistência a chlorantraniliprole e spinosad; e (iii) caracterizar o padrão de herança da resistência de *H. armigera* a flubendiamide e a resistência cruzada com outras diamidas. Inicialmente foram realizadas a caracterização das linhas-básicas de suscetibilidade a inseticidas diamidas e espinosinas em sete populações de *H. armigera* coletadas na safra 2013/2014. Foram verificadas baixas variações na suscetibilidade a inseticidas diamidas (< 4 vezes) e espinosinas ($\approx$ 2 vezes) entre as populações testadas, baseada na DL_{50} . A frequência inicial do alelo que confere resistência de *H. armigera* a chlorantraniliprole, estimada pelo método F_2 screen, foi de 0,00694 (IC95%, 0,00018 – 0,02561) em 2014 a 0,04348 (IC95%, 0,01216 – 0,09347) em 2015. Para spinosad, a frequência foi de 0,02632 (IC95% 0,01149 - 0,04706) em populações de *H. armigera* coletadas na safra 2014/2015. Posteriormente, foram conduzidos o monitoramento da suscetibilidade com bioensaios de doses diagnósticas (DL_{99}) de cada inseticida em populações de *H. armigera* coletadas no período de 2013 a 2017. Foram observadas reduções significativas na suscetibilidade a inseticidas diamidas em populações de *H. armigera* no decorrer das safras agrícolas, com sobrevivências de lagartas de 0% (em 2013) até 22% (em 2017). Não foram observadas diferenças significativas na suscetibilidade a inseticidas espinosinas em populações de *H. armigera* no decorrer das safras agrícolas de 2013 a 2016. Contudo, foram verificadas reduções significativas na suscetibilidade das populações avaliadas na safra 2016/2017, com sobrevivência de até 20% na dose diagnóstica de spinosad. A razão de resistência da linhagem de *H. armigera* resistente a flubendiamide foi $\approx$ 1770 vezes. Foram verificadas a presença de baixa resistência cruzada entre flubendiamide e outras diamidas (chlorantraniliprole e cyantraniliprole). Baseado nos cruzamentos recíprocos entre as linhagens suscetível e resistente a flubendiamide, o padrão de herança da resistência de *H. armigera* a flubendiamide é autossômico e incompletamente dominante. Retrocruzamentos da progênie dos cruzamentos recíprocos com a linhagem suscetível revelou que a resistência de *H. armigera* a flubendiamide é monogênica. Os resultados obtidos neste trabalho evidenciam o alto risco de evolução da resistência e a necessidade de implementação de estratégias de manejo da resistência a inseticidas diamidas e espinosinas em *H. armigera* no Brasil.

Palavras-chave: *Helicoverpa armigera*; Suscetibilidade; Diamidas; Espinosinas; Manejo da resistência de insetos

ABSTRACT

Characterization of the susceptibility to diamide and spinosyn insecticides in *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) populations from Brazil

The management of *Helicoverpa armigera* (Hübner) in Brazil has been based mainly on chemical control. The use of insecticides from relatively new chemical groups, such as diamides and spinosyns, has increased to control *H. armigera* and other lepidopteran-pests occurring in different cropping production systems. For implementing a proactive insect resistance management, the objectives of this research were: (i) to characterize the baseline susceptibility to diamide (chlorantraniliprole, cyantraniliprole and flubendiamide) and spinosyn (spinosad and spinetoram) insecticides in *H. armigera* populations from Brazil; (ii) to estimate the initial frequency of resistance allele to chlorantraniliprole and spinosad; and (iii) to characterize the inheritance of resistance of *H. armigera* to flubendiamide and the cross-resistance to other diamides. Initially, the baseline susceptibility to diamide and spinosyn insecticides was characterized in seven *H. armigera* populations collected in 2013/2014 growing season. Low variability in the susceptibility to diamide (< 4-fold) and spinosyn ($\approx$ 2-fold) insecticides was detected among *H. armigera* populations, based on LD₅₀. The initial frequency of resistance allele of *H. armigera* to chlorantraniliprole, estimated by F₂ screen method, was 0.00694 (CI95%, 0.00018 – 0.02561) in 2014 to 0.04348 (CI95%, 0.01216 – 0.09347) in 2015. To spinosad, the frequency was 0.02632 (CI95% 0.01149 – 0.04706) in *H. armigera* populations collected in 2014/2015. Then, insecticide susceptibility monitoring was conducted with diagnostic dose (LD₉₉) bioassays of each insecticide in *H. armigera* populations collected from 2013 to 2017. A significant reduction in the susceptibility to diamide insecticides was detected throughout growing seasons, with larval survival from 0% (in 2013) up to 22% (in 2017). There were no significant differences in the susceptibility to spinosyn insecticides in *H. armigera* populations collected from 2013 to 2016. However, a significant reduction in the susceptibility was detected in populations from 2016/2017 growing season, with larval survival up to 20% at the diagnostic dose of spinosad. The resistance ratio of flubendiamide-resistant strain of *H. armigera* was $\approx$ 1,770-fold. A low cross-resistance was detected between flubendiamide and other diamides (chlorantraniliprole and cyantraniliprole). Based on reciprocal crosses between susceptible and flubendiamide-resistant strains, the inheritance of *H. armigera* resistance to flubendiamide is autosomal and incompletely dominant. Backcrosses of the progenies from reciprocal crosses to the susceptible strain revealed that the resistance of *H. armigera* to flubendiamide is monogenic. The results obtained herein showed the high risk of resistance evolution and the need of implementation of resistance management strategies to diamide and spinosyn insecticides in *H. armigera* in Brazil.

Keywords: *Helicoverpa armigera*; Susceptibility; Diamides; Spinosyns; Insect resistance management

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1 Monitoramento da suscetibilidade de populações de <i>Helicoverpa armigera</i> a chlorantraniliprole nos anos de 2013 até 2017.....	45
Figura 2.2 Monitoramento da suscetibilidade de populações de <i>Helicoverpa armigera</i> a cyantraniliprole nos anos de 2013 até 2017.	46
Figura 2.3 Monitoramento da suscetibilidade de populações de <i>Helicoverpa armigera</i> a flubendiamide nos anos de 2013 até 2017.....	46
Figura 3.1 Monitoramento da suscetibilidade de populações de <i>Helicoverpa armigera</i> a spinosad.	67
Figura 3.2 Monitoramento da suscetibilidade de populações de <i>Helicoverpa armigera</i> a spinetoram.....	67
Figura 4.1 Dose-mortalidade das linhagens de <i>Helicoverpa armigera</i> suscetível (SUS), resistente a flubendiamide (FBD-R) e heterozigotos ao inseticida flubendiamide em bioensaio de aplicação na superfície da dieta artificial.	83
Figura 4.2 Efeito da dominância da resistência de <i>Helicoverpa armigera</i> a flubendiamide em função da dose testada.	86

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1 Populações utilizadas para a caracterização da suscetibilidade de <i>Helicoverpa armigera</i> a inseticidas.	32
Tabela 2.2 Populações de <i>Helicoverpa armigera</i> utilizadas para os ensaios de F ₂ screen.	33
Tabela 2.3 Populações utilizadas para o monitoramento da suscetibilidade de <i>Helicoverpa armigera</i> a inseticidas.	34
Tabela 2.4 Mortalidade de lagartas (terceiro instar) de <i>Helicoverpa armigera</i> a inseticidas diamidas pelo método de bioensaio de ingestão em populações coletadas na safra de 2013/2014.	40
Tabela 2.5 Doses diagnósticas estimadas pela análise conjunta dos dados de mortalidade ocasionada pelos inseticidas diamidas em populações de <i>Helicoverpa armigera</i> coletadas na safra 2013/2014.	41
Tabela 2.6 Frequência do alelo que confere resistência em populações de <i>Helicoverpa armigera</i> a chlorantraniliprole coletadas na safra 2013/2014 e 2014/2015.	43
Tabela 3.1 Mortalidade de lagartas (terceiro instar) de populações de <i>Helicoverpa armigera</i> a inseticidas espinosinas pelo método de bioensaio de ingestão na safra 2013/2014.	63
Tabela 3.2 Doses diagnósticas estimadas pela análise conjunta dos dados de mortalidade ocasionada pelos inseticidas espinosinas nas populações de <i>Helicoverpa armigera</i> coletadas na safra 2013/2014.	63
Tabela 3.3 Frequência do alelo que confere resistência em populações de <i>Helicoverpa armigera</i> a spinosad nas safras 2013/2014 e 2014/2015.	65
Tabela 4.1 Dose-mortalidade das linhagens de <i>Helicoverpa armigera</i> suscetível (SUS), resistente a flubendiamide (FBD-R) e heterozigotos ao inseticida flubendiamide em bioensaio de aplicação na superfície da dieta artificial. ..	84
Tabela 4.2 Dose-mortalidade das linhagens de <i>Helicoverpa armigera</i> suscetível (SUS) e resistente a flubendiamide (FBD-R) aos inseticidas chlorantraniliprole e cyantraniliprole em bioensaio de aplicação na superfície da dieta artificial.	84
Tabela 4.3 Efeito da dominância da resistência de <i>Helicoverpa armigera</i> a flubendiamide em função da dose testada.	85

Tabela 4.4 Análise de χ^2 da mortalidade de retrocruzamentos entre a linhagem SUS e a progênie F ₁ (cruzamentos recíprocos entre as linhagens SUS e FBD-R) de <i>Helicoverpa armigera</i> para três doses de flubendiamide.....	87
---	----

1. INTRODUÇÃO

A ocorrência de *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) foi reportada no Brasil em 2013 (Czepak et al. 2013, Specht et al. 2013). Até então, esta espécie era conhecida somente em países do Velho Mundo. No Brasil, o registro de ocorrência dessa praga foi inicialmente na região oeste da Bahia e, posteriormente, em outros estados brasileiros como Goiás, Mato Grosso e Mato Grosso do Sul, ocasionando sérios prejuízos às principais culturas como soja, algodão e feijão (Czepak et al., 2013; Degrande and Omoto, 2013; Mastrangelo et al., 2014; Sosa-Gómez et al., 2016; Specht et al., 2013; Tay et al., 2017, 2013). *H. armigera* já foi constatada em outros países americanos como Paraguai, Uruguai, Argentina e até mesmo nos Estados Unidos da América (Arnemann et al., 2016; Kriticos et al., 2015; Murúa et al., 2014).

Helicoverpa armigera é uma praga polífaga com mais de 170 plantas hospedeiras incluindo algodão, milho, soja, tomate e outros vegetais. Apresenta várias gerações por ano, alta capacidade de dispersão, de sobrevivência a condições adversas, podendo alimentar-se tanto das partes vegetativas quanto reprodutivas das plantas hospedeiras (Fitt, 1989; King and Coleman, 1989; Zalucki et al., 1986). Além dessas características bioecológicas, esta espécie é relatada como uma praga de difícil controle nos países do Velho Mundo, principalmente em virtude da existência de vários casos de resistência a inseticidas de grupos tradicionais como piretroides, carbamatos, organofosforados e a algumas proteínas da bactéria *Bacillus thuringiensis* (Bt) expressas em plantas transgênicas em diversos países, tais como Austrália, China, Índia e Paquistão (Ahmad et al., 2001; Armes et al., 1992; Gunning et al., 2005, 1998, 1996, 1984; Kranthi et al., 2002).

As características bioecológicas de *H. armigera* aliadas aos cenários de produção agrícola do Brasil com cultivos o ano todo são as condições ideais para a rápida distribuição e adaptação dessa praga no país. Dentre as medidas de controle adotadas com a detecção de *H. armigera* no Brasil, destaca-se o registro emergencial de inseticidas para o controle dessa praga (Embrapa, 2013). A ausência de informações sobre a suscetibilidade das populações brasileiras de *H. armigera* a inseticidas no Brasil fez com que alguns inseticidas liberados emergencialmente não fossem eficientes no seu controle. Isto pode ser atribuído à presença de

variabilidade genética que confere resistência a alguns inseticidas em populações que colonizaram o país e que foram provenientes possivelmente da China, Paquistão, Austrália e países do continente europeu (Leite et al., 2014; Mastrangelo et al., 2014; Tay et al., 2013). Dessa forma, os inseticidas de grupos mais recentes como diamidas e espinosinas se destacaram como os mais promissores a serem utilizados no controle desta praga no Brasil.

Os inseticidas do grupo das diamidas possuem características desejáveis como a alta eficácia no controle de insetos pragas em diversas culturas, principalmente o complexo de lagartas que ocorre em soja e algodão, e a elevada margem de segurança aos mamíferos (Lahm et al., 2009). As diamidas agem ligando aos receptores de rianodina dos insetos nas células musculares, fazendo com que o canal se abra e promova uma saída descontrolada de Cálcio (Ca^{+2}) do estoque interno da célula, isto provoca paralisia muscular e a morte do inseto. A mortalidade ocasionada pelas diamidas ocorre após 1-3 dias, sendo altamente ativas principalmente contra larvas de Lepidoptera (Cordova et al., 2006).

O grupo das diamidas se divide em duas classes. A classe das diamidas do ácido ftálico foi a primeira classe de descoberta pelo pesquisador da empresa Nihon Nohyaku por meio do trabalho em torno do herbicida pirazinedicarboxamide, o qual levou a elaboração do flubendiamide, uma molécula de alta atividade inseticida sobre lepidópteros pragas. Posteriormente a empresa DuPont otimizou as diamidas com o desenvolvimento das diamidas antranílicas, contendo o ftálico 2-metil-4-trifluorometil, formando o princípio ativo chlorantraniliprole, que além de maior atividade inseticida possui maior segurança ambiental do que flubendiamide. Assim, chlorantraniliprole constituiu a primeira geração das diamidas antranílicas e tem se apresentado como alternativa promissora no manejo de pragas das ordens Lepidoptera, Hemiptera e Coleoptera (Hannig et al., 2009; Lahm et al., 2007). Além de chlorantraniliprole, cyantraniliprole constitui a segunda geração das diamidas antranílicas descoberta pela empresa DuPont e tem apresentado alto potencial de uso contra insetos sugadores e mastigadores (Hardke et al., 2011). Assim como as diamidas do ácido ftálico, as diamidas antranílicas se ligam a um local distinto da rianodina e não há relatos de resistência cruzada com outros inseticidas de outros grupos químicos (Lahm et al., 2007).

Casos de resistência de insetos a estes inseticidas já foram descritos, como *Spodoptera exigua* a chlorantraniliprole na China (Lai et al., 2011); *Plutella xylostella*

(L.) a chlorantraniliprole e flubendiamide nas Filipinas, Tailândia (Trocza et al., 2012) e Brasil (Ribeiro et al., 2014); de *Adoxophyes honmai* a chlorantraniliprole e flubendiamide no Japão (Uchiyama and Ozawa, 2014); *Chilo suppressalis* a flubendiamide na China (Wu et al., 2014); e *Tuta absoluta* a chlorantraniliprole e flubendiamide na Itália (Roditakis et al., 2015). Além desses casos de resistência para chlorantraniliprole e flubendiamide, existem estudos de seleção de linhagens resistentes de *P. xylostella* em laboratório a cyantraniliprole na China, com aumento da razão de resistência de 30,6 vezes a 326 vezes após 26 gerações de seleção (Liu et al., 2015). Essa linhagem apresentou resistência cruzada a flubendiamide e chlorantraniliprole com razões de resistência de 14,1 e 24,3 vezes, respectivamente (Liu et al., 2015). Sobre os possíveis mecanismos de resistência a inseticidas diamidas em lepidópteros-pragas há poucos estudos, sendo a maioria relacionado à resistência metabólica (Lai et al., 2011; Sial et al., 2011).

Já os inseticidas do grupo das espinosinas são lactonas macrocíclicas derivadas da fermentação de um actinomiceto de solo, *Saccharopolyspora spinosa*. Estas foram descobertas a partir de um programa de seleção de produtos naturais, testando extratos de solo fermentados com potencial de utilização na agricultura e/ou na indústria farmacêutica (Thompson et al., 2000). Até o presente momento, existem dois produtos comerciais deste grupo utilizados no controle de pragas agrícolas: o spinosad, que possui como ingrediente ativo spinosyn A (componente primário) e spinosyn D (componente secundário), registrado em 1997, e o spinetoram, é uma mistura de duas espinosinas derivadas semi sintéticas (spinosyn J e L), foi registrado em 2007 com um maior potencial de ação inseticida do que spinosad (Kirst, 2010; Sparks et al., 2008).

Os inseticidas do grupo espinosinas têm apresentado alta eficiência no controle de pragas, principalmente das ordens Lepidoptera, Thysanoptera e Diptera, e possuem um modo de ação novo em relação aos grupos tradicionais, o que é desejável para o manejo da resistência de insetos a inseticidas, e poucos efeitos indesejáveis ao homem, a vida selvagem e ao meio ambiente (Kirst, 2010; Thompson et al., 2000). Essas moléculas atuam em segmentos específicos de receptores de acetilcolina, agindo como modulador alostérico ao receptor nicotínico da acetilcolina (Puinean et al., 2013). A intoxicação de insetos por spinosad ou spinetoram está associada à excitação do sistema nervoso. Os sintomas iniciais são de contrações musculares involuntárias e tremores pela excitação de neurônios

motores por efeito direto das espinosinas no sistema nervoso central (Salgado, 1998). Além disso, causam hiperexcitação diretamente no sistema nervoso central, uma vez que foram aplicadas concentrações muito baixas em gânglios isolados, e causaram excitação dos mesmos (Salgado, 1998). Após longos períodos de excitação induzidos pelo ativo, os insetos ficam paralisados, aparentemente devido à fadiga muscular causada por uso excessivo dos músculos (Salgado, 1998; Salgado et al., 1998).

A detecção de insetos resistentes a espinosinas tem ameaçado o uso dessas moléculas no controle de insetos-praga. Estudos realizados no Paquistão constataram a resistência de *Spodoptera exigua* a várias moléculas inseticidas, incluindo a espinosinas, com razão de resistência de 29 vezes para spinosad (Ishtiaq et al., 2012). Casos de resistência a spinosad foram reportados para várias espécies de insetos, tais como *Leptinotarsa decemlineata* (Mota-Sanchez et al., 2006), *Musca domestica* (Markussen and Kristensen, 2012), *Chloridea virescens* (Roe et al., 2010), *Tuta absoluta* (Campos et al., 2015). Para *H. armigera* também existem registros de casos de resistência a espinosinas no Paquistão (Ahmad et al., 2003) e na China (D. Wang et al., 2009), tanto em laboratório quanto em campo (Sparks et al., 2012).

Linhagens de insetos resistentes a spinosad, como *Drosophila melanogaster*, *Plutella xylostella* e *C. virescens* resistentes a spinosad podem exibir resistência cruzada a spinetoram e a outras espinosinas (Sparks et al., 2012). Contudo, não há relatos de resistência cruzada entre espinosinas e outros grupos de inseticidas. Por exemplo, *D. melanogaster* resistente a spinosad e a spinetoram não apresentou resistência cruzada a neonicotinoides, avermectinas, piretroides e oxadiazinas. *M. domestica* resistente a espinosinas também tem um padrão similar e não apresentou resistência cruzada a organofosforados (dimethoate), carbamatos (methomyl), piretroides (cyfluthrin), avermectinas (abamectin), oxadiazinas (indoxacarb) e pirazol (fipronil). Para outras espécies como *H. armigera*, *C. virescens*, *P. xylostella* e *S. exigua* esse padrão de ausência de resistência cruzada a outros grupos de inseticidas também foi observado (Sparks et al., 2012).

Apesar de haver vários casos de resistência de insetos aos inseticidas dos grupos das diamidas e espinosinas, esses dois grupos de inseticidas se destacam como opções viáveis no controle de *H. armigera* no Brasil. Contudo é necessário que se adotem medidas de manejo de resistência *H. armigera* a estes produtos visando assim prolongar a vida útil de cada produto em questão e retardar a evolução de

resistência de *H. armigera* a estes produtos como já reportado a spinosad na China (D. Wang et al., 2009).

O manejo da resistência de pragas a inseticidas, independente de qual organismo ou das estratégias a serem adotadas, requer um monitoramento efetivo da resistência. O monitoramento de pragas permite detectar as alterações na suscetibilidade de populações praga antes que a frequência crítica de resistência seja atingida, orientar a tomada de decisão de controle e, principalmente, retardar a evolução da resistência (Roush and Miller, 1986).

A resistência a inseticidas tem sido detectada e monitorada mediante as caracterizações de linhas-básicas de suscetibilidade de populações de campo obtidas por meio da regressão de Probit (French-Constant and Roush, 1990). A caracterização das curvas de concentração-resposta permite estimar a razão de resistência e comparar as CL_{50} (concentração letal que mata 50% da população) e os coeficientes angulares obtidos. No entanto, caracterizar linhas-básicas de suscetibilidade permite distinguir fenótipos resistentes em populações naturais quando estes já estão em alta frequência, logo esta abordagem não é sensível para detectar indivíduos resistentes quando são raros na população. Considerando que no início da evolução da resistência, estima-se que a frequência de alelos de resistência em uma população seja baixa, na ordem de 10^{-13} a 10^{-2} (Roush and McKenzie, 1987), recomendam-se a determinação e o uso de concentrações diagnósticas ou discriminatórias, as quais são testadas um número maior de insetos somente nas concentrações mais informativas sobre as alterações dos fenótipos resistentes em populações naturais.

Os métodos fenotípicos e genotípicos se destacam entre os vários métodos que são utilizados para o monitoramento da resistência de insetos a inseticidas. Os métodos fenotípicos são eficientes para o monitoramento da resistência de alelos aditivos ou dominantes em alta frequência na população natural (Andow and Alstad, 1998). Contudo, programas de manejo da resistência são mais efetivos quando implementados de modo preventivo, ou seja, no início da evolução da resistência (Roush and McKenzie, 1987), sendo assim, se o objetivo é estimar a frequência inicial de alelos resistentes em populações de campo, os métodos genotípicos tais como o “F₁ Screen” ou “F₂ Screen” (Andow and Alstad, 1998; Gould et al., 1997) são mais apropriados. O método “F₂ Screen” comparado ao “F₁ Screen” é mais trabalhoso, mais caro, dispensa o uso de linhagem resistente, utiliza um número

reduzido de insetos amostrados, é considerado o único método sensível e capaz de em pouco tempo estimar variações na frequência de um alelo recessivo ou parcialmente recessivo mesmo quando sua frequência inicial é baixa (Andow and Alstad, 1998).

Em síntese a triagem da progênie “F₂ Screen” constitui as seguintes etapas: a) inicialmente fêmeas adultas e fecundadas devem ser coletadas no campo; b) no laboratório devem ser estabelecidas diferentes linhagens a partir de uma mesma fêmea trazida do campo; c) em seguida, os indivíduos resultantes da geração F₁ devem ser criados e reproduzidos dentro de sua respectiva linhagem; d) as larvas neonatas da geração F₂ devem ser utilizadas em bioensaios discriminatórios para se verificar a suscetibilidade dos indivíduos e (e) os dados são analisados pelos métodos de estatística Bayesiana, a frequência dos alelos de resistência na população fundadora é estimada com um intervalo de confiança. Dessa forma, o “F₂ Screen” pode com eficiência refinar estratégias de manejo, aumentar assim a longevidade dos inseticidas e evitar falhas de controle no campo (Andow and Alstad, 1998).

Com a realização dos ensaios de monitoramento é possível constatar a evolução da resistência e possibilita a obtenção de linhagens resistentes em laboratório. Linhagens resistentes a um determinado inseticida possibilitam a realização de estudos que determinem o padrão de herança da resistência e ocorrência de resistência cruzada ou múltipla com outros inseticidas. Estudos desta natureza fornecem subsídios para a adoção de estratégias proativas no manejo da resistência de insetos a inseticidas (Nascimento et al., 2016; Roush and Croft, 1986; Y. H. Wang et al., 2009).

Diante da falta de informações sobre a suscetibilidade de *H. armigera* a inseticidas no Brasil para subsidiar estratégias de manejo da resistência, os objetivos do presente trabalho foram: (i) caracterizar as linhas-básicas de suscetibilidade a inseticidas diamidas e espinosinas em populações de *H. armigera* no Brasil; (ii) estimar a frequência inicial de alelo que confere resistência a inseticidas diamidas e espinosinas; e (iii) caracterizar o padrão de herança da resistência de *H. armigera* a flubendiamide e as relações de resistência cruzada com outras diamidas.

Referências

- Ahmad, M., Arif, M.I., Ahmad, Z., 2003. Susceptibility of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) to new chemistries in Pakistan. *Crop Prot.* 22, 539–544. doi:10.1016/S0261-2194(02)00219-3
- Ahmad, M., Iqbal Arif, M., Ahmad, Z., 2001. Resistance to carbamate insecticides in *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) in Pakistan. *Crop Prot.* 20, 427–432. doi:10.1016/S0261-2194(00)00168-X
- Andow, D.A., Alstad, D.N., 1998. F2 Screen for Rare Resistance Alleles. *J. Econ. Entomol.* 91, 572–578. doi:10.1093/jee/91.3.572
- Armes, N.J., Jadhav, D.R., Bond, G.S., King, A.B.S., 1992. Insecticide resistance in *Helicoverpa armigera* in South India. *Pestic. Sci.* 34, 355–364. doi:10.1002/ps.2780340409
- Arnemann, J.A., James, W.J., Walsh, T.K., Guedes, J.V.C., Smagghe, G., Castiglioni, E., Tay, W.T., 2016. Mitochondrial DNA COI characterization of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) from Paraguay and Uruguay. *Genet. Mol. Res.* 15, 1–8. doi:10.4238/gmr.15028292
- Campos, M.R., Silva, T.B.M., Silva, W.M., Silva, J.E., Siqueira, H.A.A., 2015. Spinosyn resistance in the tomato borer *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae). *J. Pest Sci.* (2004). 88, 405–412. doi:10.1007/s10340-014-0618-y
- Cordova, D., Benner, E.A., Sacher, M.D., Rauh, J.J., Sopa, J.S., Lahm, G.P., Selby, T.P., Stevenson, T.M., Flexner, L., Gutteridge, S., Rhoades, D.F., Wu, L., Smith, R.M., Tao, Y., 2006. Anthranilic diamides: A new class of insecticides with a novel mode of action, ryanodine receptor activation. *Pestic. Biochem. Physiol.* 84, 196–214. doi:10.1016/j.pestbp.2005.07.005
- Czepak, C., Albernaz, K.C., Vivan, L.M., Guimarães, H.O., Carvalhais, T., 2013. Primeiro registro de ocorrência de *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) no Brasil. *Pesqui. Agropecuária Trop.* 43, 110–113. doi:10.1590/S1983-40632013000100015
- Degrande, P.E., Omoto, C., 2013. Estancar prejuízos. *Cultivar* 32–35.
- Embrapa, 2013. Ações emergenciais propostas pela embrapa para o manejo integrado de *Helicoverpa* spp. em áreas agrícolas. pp. <https://www.google.com.br/search?biw=1280&bih=656&>.

- Ffrench-Constant, R.H., Roush, R.T., 1990. Resistance Detection and Documentation: The relative roles of pesticidal and biochemical assays, in: Pesticide resistance in arthropods. Springer US, Boston, MA, pp. 4–38. doi:10.1007/978-1-4684-6429-0_2
- Fitt, G.P., 1989. The ecology of *Heliothis* species in relation to agroecosystems. Annu. Rev. Entomol. 34, 17–53. doi:10.1146/annurev.en.34.010189.000313
- Gould, F., Anderson, A., Jones, A., Sumerford, D., Heckel, D.G., Lopez, J., Micinski, S., Leonard, R., Laster, M., 1997. Initial frequency of alleles for resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins in field populations of *Heliothis virescens*. Proc. Natl. Acad. Sci. 94, 3519–3523. doi:10.1073/pnas.94.8.3519
- Gunning, R. V., Dang, H.T., Kemp, F.C., Nicholson, I.C., Moores, G.D., 2005. New resistance mechanism in *Helicoverpa armigera* threatens transgenic crops expressing *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin. Appl. Environ. Microbiol. 71, 2558–2563. doi:10.1128/AEM.71.5.2558-2563.2005
- Gunning, R. V., Easton, C.S., Greenup, L.R., Edge, V.E., 1984. Pyrethroid resistance in *Heliothis armigera* (Hubner) (Lepidoptera: Noctuidae) in Australia. J. Econ. Entomol. 77, 1283–1287. doi:10.1093/jee/77.5.1283
- Gunning, R. V., Moores, G.D., Devonshire, A.L., 1998. Insensitive acetylcholinesterase and resistance to organophosphates in Australian *Helicoverpa armigera*. Pestic. Biochem. Physiol. 62, 147–151. doi:10.1006/pest.1998.2380
- Gunning, R. V., Moores, G.D., Devonshire, A.L., 1996. Insensitive acetylcholinesterase and resistance to thiodicarb in Australian *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae). Pestic. Biochem. Physiol. 55, 21–28. doi:10.1006/pest.1996.0031
- Hannig, G.T., Ziegler, M., Marçon, P.G., 2009. Feeding cessation effects of chlorantraniliprole, a new anthranilic diamide insecticide, in comparison with several insecticides in distinct chemical classes and mode-of-action groups. Pest Manag. Sci. 65, 969–974. doi:10.1002/ps.1781
- Hardke, J.T., Temple, J.H., Leonard, B.R., Jackson, R.E., 2011. Laboratory toxicity and field efficacy of selected insecticides against fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) 1. Florida Entomol. 94, 272–278. doi:10.1653/024.094.0221

- Ishtiaq, M., Saleem, M.A., Wright, D.J., 2012. Stability, cross-resistance and effect of synergists, PBO and def, on deltamethrin resistant strain of *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae) from Pakistan. Pak. J. Zool. 44, 1677–1682.
- King, E.G., Coleman, R.J., 1989. Potential for biological control of *Heliothis* species. Annu. Rev. Entomol. 34, 53–75. doi:10.1146/annurev.en.34.010189.000413
- Kirst, H.A., 2010. The spinosyn family of insecticides: realizing the potential of natural products research. J. Antibiot. (Tokyo). 63, 101–111. doi:10.1038/ja.2010.5
- Kranthi, K.R., Jadhav, D.R., Kranthi, S., Wanjar, R.R., Ali, S.S., Russell, D.A., 2002. Insecticide resistance in five major insect pests of cotton in India. Crop Prot. 21, 449–460. doi:10.1016/S0261-2194(01)00131-4
- Kriticos, D.J., Ota, N., Hutchison, W.D., Beddow, J., Walsh, T., Tay, W.T., Borchert, D.M., Paula-Moreas, S. V., Czapak, C., Zalucki, M.P., 2015. The Potential Distribution of Invading *Helicoverpa armigera* in North America: Is It Just a Matter of Time? PLoS One 10, e0119618. doi:10.1371/journal.pone.0119618
- Lahm, G.P., Cordova, D., Barry, J.D., 2009. New and selective ryanodine receptor activators for insect control. Bioorg. Med. Chem. 17, 4127–4133. doi:10.1016/j.bmc.2009.01.018
- Lahm, G.P., Stevenson, T.M., Selby, T.P., Freudenberger, J.H., Cordova, D., Flexner, L., Bellin, C.A., Dubas, C.M., Smith, B.K., Hughes, K.A., Hollingshaus, J.G., Clark, C.E., Benner, E.A., 2007. Rynaxypyr™: A new insecticidal anthranilic diamide that acts as a potent and selective ryanodine receptor activator. Bioorg. Med. Chem. Lett. 17, 6274–6279. doi:10.1016/j.bmcl.2007.09.012
- Lai, T., Li, J., Su, J., 2011. Monitoring of beet armyworm *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae) resistance to chlorantraniliprole in China. Pestic. Biochem. Physiol. 101, 198–205. doi:10.1016/j.pestbp.2011.09.006
- Leite, N.A., Alves-Pereira, A., Corrêa, A.S., Zucchi, M.I., Omoto, C., 2014. Demographics and genetic variability of the new world bollworm (*Helicoverpa zea*) and the old world bollworm (*Helicoverpa armigera*) in Brazil. PLoS One 9, e113286. doi:10.1371/journal.pone.0113286
- Liu, X., Ning, Y., Wang, H., Wang, K., 2015. Cross-resistance, mode of inheritance, synergism, and fitness effects of cyantraniliprole resistance in *Plutella xylostella*. Entomol. Exp. Appl. 157, 271–278. doi:10.1111/eea.12361

- Markussen, M.D., Kristensen, M., 2012. Spinosad resistance in female *Musca domestica* L. from a field-derived population. *Pest Manag. Sci.* 68, 75–82. doi:10.1002/ps.2223
- Mastrangelo, T., Paulo, D.F., Bergamo, L.W., Morais, E.G.F., Silva, M., Bezerra-Silva, G., Azeredo-Espin, A.M.L., 2014. Detection and genetic diversity of a Heliothine invader (Lepidoptera: Noctuidae) from North and Northeast of Brazil. *J. Econ. Entomol.* 107, 970–980. doi:10.1603/EC13403
- Mota-Sanchez, D., Hollingworth, R.M., Grafius, E.J., Moyer, D.D., 2006. Resistance and cross-resistance to neonicotinoid insecticides and spinosad in the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata* (Say) (Coleoptera: Chrysomelidae). *Pest Manag. Sci.* 62, 30–37. doi:10.1002/ps.1120
- Murúa, M.G., Scalora, F.S., Navarro, F.R., Cazado, L.E., Casmuz, A., Villagrán, M.E., Lobos, E., Gastaminza, G., 2014. First record of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) in Argentina. *Florida Entomol.* 97, 854–856. doi:10.1653/024.097.0279
- Nascimento, A.R.B. do, Farias, J.R., Bernardi, D., Horikoshi, R.J., Omoto, C., 2016. Genetic basis of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) resistance to the chitin synthesis inhibitor lufenuron. *Pest Manag. Sci.* 72, 810–815. doi:10.1002/ps.4057
- Puinean, A.M., Lansdell, S.J., Collins, T., Bielza, P., Millar, N.S., 2013. A nicotinic acetylcholine receptor transmembrane point mutation (G275E) associated with resistance to spinosad in *Frankliniella occidentalis*. *J. Neurochem.* 124, 590–601. doi:10.1111/jnc.12029
- Ribeiro, L.M.S., Wanderley-Teixeira, V., Ferreira, H.N., Teixeira, Á.A.C., Siqueira, H.A.A., 2014. Fitness costs associated with field-evolved resistance to chlorantraniliprole in *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae). *Bull. Entomol. Res.* 104, 88–96. doi:10.1017/S0007485313000576
- Roditakis, E., Vasakis, E., Grispou, M., Stavrakaki, M., Nauen, R., Gravouil, M., Bassi, A., 2015. First report of *Tuta absoluta* resistance to diamide insecticides. *J. Pest Sci.* (2004). 88, 9–16. doi:10.1007/s10340-015-0643-5
- Roe, R.M., Young, H.P., Iwasa, T., Wyss, C.F., Stumpf, C.F., Sparks, T.C., Watson, G.B., Sheets, J.J., Thompson, G.D., 2010. Mechanism of resistance to spinosyn in the tobacco budworm, *Heliothis virescens*. *Pestic. Biochem. Physiol.* 96, 8–13. doi:10.1016/j.pestbp.2009.08.009

- Roush, R.T., McKenzie, J.A., 1987. Ecological genetics of insecticide and acaricide resistance. *Annu. Rev. Entomol.* 361–380.
- Roush, R.T., Miller, G.L., 1986. Considerations for design of insecticide resistance monitoring programs. *J. Econ. Entomol.* 79, 293–298. doi:10.1093/jee/79.2.293
- Roush, R.T., Croft, B.A., 1986. Experimental population genetics and ecological studies of pesticide resistance in insects and mites., in: *Pesticide Resistance: Strategies and Tactics for Management*. pp. 257–270.
- Salgado, V.L., 1998. Studies on the mode of action of spinosad: insect symptoms and physiological correlates. *Pestic. Biochem. Physiol.* 60, 91–102. doi:10.1006/pest.1998.2332
- Salgado, V.L., Sheets, J.J., Watson, G.B., Schmidt, A.L., 1998. Studies on the Mode of Action of Spinosad: The internal effective concentration and the concentration dependence of neural excitation. *Pestic. Biochem. Physiol.* 60, 103–110. doi:10.1006/pest.1998.2333
- Sial, A.A., Brunner, J.F., Garczynski, S.F., 2011. Biochemical characterization of chlorantraniliprole and spinetoram resistance in laboratory-selected obliquebanded leafroller, *Choristoneura rosaceana* (Harris) (Lepidoptera: Tortricidae). *Pestic. Biochem. Physiol.* 99, 274–279. doi:10.1016/j.pestbp.2011.01.006
- Sosa-Gómez, D.R., Specht, A., Paula-Moraes, S. V., Lopes-Lima, A., Yano, S.A.C., Micheli, A., Morais, E.G.F., Gallo, P., Pereira, P.R.V.S., Salvadori, J.R., Botton, M., Zenker, M.M., Azevedo-Filho, W.S., 2016. Timeline and geographical distribution of *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera, Noctuidae: Heliethinae) in Brazil. *Rev. Bras. Entomol.* 60, 101–104. doi:10.1016/j.rbe.2015.09.008
- Sparks, T.C., Crouse, G.D., Dripps, J.E., Anzeveno, P., Martynow, J., DeAmicis, C. V., Gifford, J., 2008. Neural network-based QSAR and insecticide discovery: spinetoram. *J. Comput. Aided. Mol. Des.* 22, 393–401. doi:10.1007/s10822-008-9205-8
- Sparks, T.C., Dripps, J.E., Watson, G.B., Paroonagian, D., 2012. Resistance and cross-resistance to the spinosyns – A review and analysis. *Pestic. Biochem. Physiol.* 102, 1–10. doi:10.1016/j.pestbp.2011.11.004

- Specht, A., Sosa-Gómez, D.R., Paula-Moraes, S.V. de, Yano, S.A.C., 2013. Identificação morfológica e molecular de *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) e ampliação de seu registro de ocorrência no Brasil. *Pesqui. Agropecuária Bras.* 48, 689–692. doi:10.1590/S0100-204X2013000600015
- Tay, W.T., Soria, M.F., Walsh, T., Thomazoni, D., Silvie, P., Behere, G.T., Anderson, C., Downes, S., 2013. A brave new world for an old world pest: *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) in Brazil. *PLoS One* 8, e80134. doi:10.1371/journal.pone.0080134
- Tay, W.T., Walsh, T.K., Downes, S., Anderson, C., Jermini, L.S., Wong, T.K.F., Piper, M.C., Chang, E.S., Macedo, I.B., Czepak, C., Behere, G.T., Silvie, P., Soria, M.F., Frayssinet, M., Gordon, K.H.J., 2017. Mitochondrial DNA and trade data support multiple origins of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera, Noctuidae) in Brazil. *Sci. Rep.* 7, 45302. doi:10.1038/srep45302
- Thompson, G.D., Dutton, R., Sparks, T.C., 2000. Spinosad - a case study: an example from a natural products discovery programme. *Pest Manag. Sci.* 56, 696–702. doi:10.1002/1526-4998(200008)56:8<696::AID-PS182>3.0.CO;2-5
- Trocza, B., Zimmer, C.T., Elias, J., Schorn, C., Bass, C., Davies, T.G.E., Field, L.M., Williamson, M.S., Slater, R., Nauen, R., 2012. Resistance to diamide insecticides in diamondback moth, *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae) is associated with a mutation in the membrane-spanning domain of the ryanodine receptor. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 42, 873–880. doi:10.1016/j.ibmb.2012.09.001
- Uchiyama, T., Ozawa, A., 2014. Rapid development of resistance to diamide insecticides in the smaller tea tortrix, *Adoxophyes honmai* (Lepidoptera: Tortricidae), in the tea fields of Shizuoka Prefecture, Japan. *Appl. Entomol. Zool.* 49, 529–534. doi:10.1007/s13355-014-0283-x
- Wang, D., Qiu, X., Ren, X., Niu, F., Wang, K., 2009. Resistance selection and biochemical characterization of spinosad resistance in *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae). *Pestic. Biochem. Physiol.* 95, 90–94. doi:10.1016/j.pestbp.2009.07.003
- Wang, Y.H., Liu, X.G., Zhu, Y.C., Wu, S.G., Li, S.Y., Chen, W.M., Shen, J.L., 2009. Inheritance mode and realized heritability of resistance to imidacloprid in the brown planthopper, *Nilaparvata lugens* (Stål) (Homoptera: Delphacidae). *Pest Manag. Sci.* 65, 629–634. doi:10.1002/ps.1720

- Wu, M., Zhang, S., Yao, R., Wu, S., Su, J., Gao, C., 2014. Susceptibility of the rice stem borer, *Chilo suppressalis* (Lepidoptera: Crambidae), to flubendiamide in China. J. Econ. Entomol. 107, 1250–1255. doi:10.1603/EC14053
- Zalucki, M.P., Daglish, G., Firempong, S., Twine, P., 1986. The biology and ecology of *Heliothis armigera* (Hübner) and *H. punctigera* wallengren (Lepidoptera: Noctuidae) in Australia: What do we know? Aust. J. Zool. 34, 779–814. doi:10.1071/ZO9860779

2 CARACTERIZAÇÃO DA SUSCETIBILIDADE E ESTIMATIVA DA FREQUÊNCIA ALÉLICA DE RESISTÊNCIA A INSETICIDAS DIAMIDAS EM POPULAÇÕES DE *Helicoverpa armigera* (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE) DO BRASIL

Resumo

Os inseticidas do grupo das diamidas têm sido utilizados como uma das melhores opções para o manejo de *Helicoverpa armigera* (Hübner), desde a detecção oficial dessa praga no Brasil em 2013. O entendimento da suscetibilidade de populações de *H. armigera* a inseticidas é essencial para a implementação de um programa de manejo de resistência de insetos. Sendo assim, os objetivos desta pesquisa foram caracterizar a suscetibilidade e estimar a frequência alélica de resistência a inseticidas diamidas em populações de *H. armigera* coletadas em diferentes regiões agrícolas do Brasil. Inicialmente foram realizadas as caracterizações das linhas-básicas de suscetibilidade a chlorantraniliprole, cyantraniliprole e flubendiamide em sete populações de *H. armigera* coletadas em 2013 e 2014. A estimativa da frequência inicial do alelo que confere resistência foi realizada somente para chlorantraniliprole. Posteriormente, foram conduzidos o monitoramento da suscetibilidade com as doses diagnósticas (DL_{99}) de cada inseticida em populações de *H. armigera* coletadas no campo nas safras de 2013 a 2017. Foram observadas baixas variações iniciais na suscetibilidade a chlorantraniliprole, cyantraniliprole e flubendiamide entre as populações testadas, baseada na DL_{50} (< 4 vezes). A frequência do alelo de resistência de *H. armigera* a chlorantraniliprole, estimada pelo método F_2 screen, foi de 0,00694 (IC95%, 0,00018 – 0,02561) em 2014 a 0,04348 (IC95%, 0,01216 – 0,09347) em 2015. Foram observadas reduções significativas na suscetibilidade a esses inseticidas em populações de *H. armigera* no decorrer das safras agrícolas, com sobrevivências de 0% (em 2013) até 22% (em 2017) nos bioensaios com doses diagnósticas. As informações obtidas no presente trabalho evidenciaram o alto risco de evolução da resistência de *H. armigera* a inseticidas diamidas e a necessidade de implementação de estratégias de manejo de resistência para preservar a vida útil desses inseticidas no Brasil.

Palavras-chave: *Helicoverpa armigera*; Suscetibilidade; Chlorantraniliprole; Cyantraniliprole; Flubendiamide

Abstract

The insecticides of diamide group have been used as one of the best option for managing *Helicoverpa armigera* (Hübner) since its official detection in Brazil in 2013. Understanding the susceptibility to insecticides in *H. armigera* populations to insecticides is essential for implementing an insect resistance management program. Therefore, the objectives of this research were to characterize the susceptibility and to estimate the initial frequency of resistance alleles to diamide insecticides in *H. armigera* populations collected from different Brazilian agricultural regions. First, baseline susceptibility to chlorantraniliprole, cyantraniliprole and flubendiamide was characterized to seven *H. armigera* populations collected in 2013 and 2014. The estimate of initial frequency of resistance allele was performed only to

chlorantraniliprole. Then, the susceptibility monitoring with the use of diagnostic doses (LD_{99}) of each insecticide was conducted in field-populations of *H. armigera* collected from 2013 to 2017. Low variability in the susceptibility to diamide insecticides was detected among *H. armigera* populations, based on LD_{50} (< 4-fold). The initial frequency of resistance allele of *H. armigera* to chlorantraniliprole, estimated by F_2 screen method, was 0.00694 (CI95%, 0.00018 – 0.02561) in 2014 to 0.04348 (CI95%, 0.01216 – 0.09347) in 2015. A significant reduction in the susceptibility to diamide insecticides was detected throughout growing seasons, with larval survival from 0% (in 2013) up to 22% (in 2017) with diagnostic dose bioassays. The results obtained herein showed the high risk of resistance evolution of *H. armigera* to diamide insecticides and the need of implementation of insect resistance management strategies to preserve the lifetime of these insecticides in Brazil.

Keywords: *Helicoverpa armigera*; Susceptibility; Chlorantraniliprole; Cyantraniliprole; Flubendiamide

2.1 Introdução

Helicoverpa armigera (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) é uma praga importante em vários países da África, Ásia, Europa, Oceania e a partir do ano de 2013 em alguns países do continente americano (Czepak et al., 2013; Specht et al., 2013). Trata-se de uma espécie polífaga (Fitt, 1989; Zalucki et al., 1986). No Brasil, *H. armigera* ocorre e ocasiona danos nas principais culturas produzidas como algodão, feijão, milho e soja em algumas regiões do Brasil (Czepak et al., 2013; Leite et al., 2014).

Helicoverpa armigera é considerada uma praga de difícil controle. Além disso, casos de resistência a inseticidas já foram reportados a inseticidas piretroides (Gunning et al., 1984), carbamatos (Gunning et al., 1996), organofosforados (Gunning et al., 1998) e até mesmo a inseticidas mais recentes como spinosad (Wang et al., 2009) e a proteínas de *Bacillus thuringiensis* expressas em plantas transgênicas (Downes et al., 2016). Diante das dificuldades de controle desta praga com os inseticidas tradicionais, os inseticidas do grupo das diamidas se destacam como um dos mais promissores para o controle de *H. armigera* no Brasil.

Este grupo se divide em duas classes, as diamidas do ácido ftálico representadas pelo ingrediente ativo flubendiamide e as diamidas antranílicas com os ingredientes ativos chlorantraniliprole e cyantraniliprole (Jeanguenat, 2013; Sattelle et al., 2008; Teixeira and Andaloro, 2013). Estes inseticidas se ligam nos receptores de rianodina das células musculares dos insetos, fazem com que o canal se abra e promova uma saída descontrolada de Cálcio (Ca^{+2}) do estoque interno da

célula muscular, provocam letargia, cessação da alimentação e morte do inseto (Cordova et al., 2006; Lahm et al., 2009; Teixeira and Andaloro, 2013).

Apesar das diamidas serem um grupo de inseticidas recente no controle de muitas espécies de Lepidoptera (Lahm et al., 2009), já existem vários casos de resistência reportados, tais como em *Spodoptera exigua* a chlorantraniliprole na China (Lai et al., 2011); de *Plutella xylostella* (L.) a chlorantraniliprole e flubendiamide nas Filipinas, Tailândia (Trocza et al., 2012) e no Brasil (Ribeiro et al., 2014a); de *Adoxophyes honmai* a chlorantraniliprole no Japão (Uchiyama and Ozawa, 2014); *Chilo suppressalis* a flubendiamide na China (Wu et al., 2014); e *Tuta absoluta* a chlorantraniliprole e flubendiamide na Itália e na Grécia (Roditakis et al., 2015). Além destes, na China foram realizados estudos de seleção de linhagens resistentes de *P. xylostella* em laboratório a cyantraniliprole (Liu et al., 2015a). Ainda não existem relatos de resistência cruzada ou múltipla dos inseticidas diamidas com outros grupos inseticidas (Jeanguenat, 2013).

Diante disso, a caracterização da suscetibilidade de *H. armigera* a inseticidas diamidas com base nas linhas básicas de suscetibilidade de populações coletadas em diferentes regiões e culturas hospedeiras é importante para a estimativa das doses diagnósticas a serem utilizadas no monitoramento fenotípico ou genotípico da suscetibilidade ao longo do tempo e assim gerar subsídios necessários para a implementação de um programa efetivo de manejo de resistência desta praga a estes inseticidas (French-Constant and Roush, 1990). O monitoramento genotípico pode ser realizado mediante a técnica de F_2 screen e tem como finalidade estimar frequência alélica que confira resistência de uma população a uma determinada tática de controle (Andow and Alstad, 1998).

Para isso, os objetivos do presente trabalho foram: (i) caracterizar as linhas básicas de suscetibilidade de *H. armigera* aos inseticidas chlorantraniliprole, cyantraniliprole e flubendiamide; (ii) estimar a frequência do alelo que confira resistência a chlorantraniliprole; (iii) e monitorar a suscetibilidade de populações de *H. armigera* a inseticidas diamidas no período de 2013 a 2017.

2.2 Material e métodos

2.2.1 Coleta de populações de *H. armigera*

Para a caracterização da suscetibilidade de *H. armigera* aos inseticidas diamidas foram coletadas sete populações de *H. armigera* em quatro estados do Brasil nas safras do ano agrícola 2013/2014. No estado da Bahia foram coletadas quatro populações em culturas hospedeiras diferentes. As demais populações foram dos estados de Goiás, Mato Grosso e Mato Grosso do Sul (Tabela 2.1). Para a estimativa da frequência do alelo da resistência de *H. armigera* foram coletadas três populações do estado da Bahia no ano agrícola de 2013/2014 e uma população do estado de São Paulo no ano agrícola de 2014/2015 (Tabela 2.2). Para o monitoramento da suscetibilidade foram coletadas populações nos estados da Bahia, Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul e São Paulo nas safras dos anos agrícolas 2014/2015, 2015/2016 e 2016/2017 (Tabela 2.3). Foram amostradas aproximadamente 800-1000 lagartas no campo de cada população avaliada.

Tabela 2.1 Populações utilizadas para a caracterização da suscetibilidade de *Helicoverpa armigera* a inseticidas.

Código da população	Data de Coleta	Município/Estado	Hospedeiro	Latitude	Longitude
BA 33	20/09/2013	Luís Eduardo Magalhães/BA	Feijão	12° 05' 58" S	45° 47' 54" W
BA 43	31/01/2014	Luís Eduardo Magalhães/BA	Soja	12° 05' 58" S	45° 47' 54" W
BA 45	20/03/2014	São Desidério/BA	Algodão	12° 21' 48" S	44° 58' 24" W
BA 49	29/05/2014	Correntina/BA	Milho	13° 20' 36" S	44° 38' 12" W
GO 02	30/12/2013	Mineiros/GO	Soja	17° 34' 10" S	52° 33' 04" W
MS 05	19/10/2013	Costa Rica/MS	Algodão	18° 32' 38" S	53° 07' 45" W
MT 11	23/10/2014	Primavera do Leste/MT	Soja	15° 33' 32" S	54° 17' 46" W

Tabela 2.2 Populações de *Helicoverpa armigera* utilizadas para os ensaios de F₂ screen.

Código da População	Data de coleta	Município/Estado	Hospedeiro	Latitude	Longitude
BA 34	31/01/2014	Luís Eduardo Magalhães/BA	Soja	12° 21' 48" S	44° 58' 24" W
BA 45	26/02/2014	São Desidério/BA	Algodão	12° 21' 48" S	44° 58' 24" W
BA 48	20/02/2014	Luís Eduardo Magalhães/BA	Soja	12° 00'56.9"S	45°49'19.8"W
SP 15	15/01/2015	Viradouro/SP	Soja	20° 52' 23" S	48° 17' 49" W

Tabela 2.3 Populações utilizadas para o monitoramento da suscetibilidade de *Helicoverpa armigera* a inseticidas.

Código da População	Data de coleta	Município / Estado	Hospedeiro	Latitude	Longitude
BA 33	20/09/2013	Luis Eduardo Magalhães/BA	Feijão	12° 5' 58" S	45° 47' 54" W
BA 34	31/01/2014	Luís Eduardo Magalhães/BA	Soja	12° 21' 48" S	44° 58' 24" W
BA 43	31/01/2014	Luis Eduardo Magalhães/BA	Soja	12° 5' 58" S	45° 47' 54" W
BA 52	03/12/2014	São Desidério/BA	Soja	12° 21' 48" S	44° 58' 24" W
BA 55	07/11/2014	São Desidério/BA	Soja	12° 21' 48" S	44° 58' 24" W
MT 11	23/10/2014	Primavera do Leste/MT	Soja	15° 33' 32" S	54° 17' 46" W
SP 15	15/01/2015	Viradouro/SP	Soja	20° 52' 23" S	48° 17' 49" W
GO 05	25/02/2015	Santo Antônio do Rio Verde/GO	Soja	18° 09' 57" S	47° 56' 47" W
BA 61	01/04/2015	São Desidério/BA	Milheto	12° 21' 48" S	44° 58' 24" W
MT 15	13/05/2015	Campo Verde/MT	Algodão	15° 32' 48" S	55° 10' 08" W
BA 64	13/06/2015	Luis Eduardo Magalhães/BA	Algodão	12° 5' 58" S	45° 47' 54" W
BA 66	01/10/2015	Luis Eduardo Magalhães/BA	Feijão	12° 5' 58" S	45° 47' 54" W
BA 68	01/12/2015	Luis Eduardo Magalhães/BA	Soja	12° 5' 58" S	45° 47' 54" W
GO 06	03/01/2016	Mineiros/GO	Soja	17° 34' 10" S	52° 33' 04" W
BA 69	11/01/2016	Luis Eduardo Magalhães/BA	Soja	12° 5' 58" S	45° 47' 54" W
MT 17	18/01/2016	Sapezal/MT	Soja	15° 33' 32" S	54° 17' 46" W
MT 19	16/03/2016	Primavera do Leste/MT	Soja	13° 19' 29" S	58° 43' 52" W
MT 23	31/05/2016	Primavera do Leste/MT	Milheto	15° 24' 41" S	54° 23' 31" W
SP 19	08/04/2016	Limeira/SP	Feijão	22° 33' 53" S	47° 24' 06" W
MS 07	24/06/2016	Chapadão do Sul/MS	Sorgo	18° 45' 52" S	52° 38' 38" W
BA 74	13/10/2016	Barreiras/BA	Milheto	11° 46' 40" S	45° 48' 22" W
MT 26	24/10/2016	Campo Novo do Parecis/MT	Soja	13° 16' 49" S	57° 59' 05" W
SP 22	21/11/2016	Casa Branca/SP	Soja	12° 45' 09" S	47° 07' 10" W
MS 08	13/12/2016	Chapadão do Sul/GO	Soja	18° 43' 29" S	52° 36' 14" W
GO 08	20/12/2016	Rio Verde/GO	Soja	17° 29' 49" S	51° 04' 56" W

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

As lagartas provenientes do campo foram individualizadas no laboratório em copos plásticos contendo dieta artificial (Greene et al., 1976) e mantidas até a fase de pupa. As pupas obtidas das lagartas de campo foram retiradas da dieta com auxílio de uma pinça, desinfetadas com solução de sulfato de cobre a 0,65% e acondicionadas em gaiolas cilíndricas de tecido tipo “tule” (60 cm de altura × 40 cm de diâmetro) para a emergência dos adultos e posterior acasalamento. Após três dias, os adultos foram repassados para gaiolas cilíndricas de PVC (30 cm altura × 25 cm de diâmetro), revestidas internamente com papel sulfite branco e fechadas na parte superior com tecido tipo “tule” para realizarem as posturas. Em cada gaiola foram colocados aproximadamente 40 casais. Cada população foi constituída de no mínimo 80 casais por geração. O alimento fornecido aos adultos foi apenas solução aquosa de mel a 10%. As populações foram mantidas em sala de criação a temperatura de $25\pm 1^{\circ}\text{C}$, umidade relativa de $70\pm 10\%$ e fotofase de 14 horas. Os substratos (papel jornal e o tecido tipo “tule”) para postura e a solução de mel eram trocados a cada dois dias.

As posturas foram acondicionadas em copos plásticos transparentes de 500 ml e mantidas em câmaras climatizadas reguladas à temperatura de 25°C e fotofase 14h até a eclosão das lagartas. As lagartas recém-eclodidas foram transferidas com auxílio de um pincel esterilizado para copos plásticos transparentes de 100 mL contendo dieta artificial (Greene et al., 1976). Ao atingirem o 3º instar, parte das lagartas foram destinadas aos bioensaios toxicológicos propostos e a outra parte foram individualizadas em copos plásticos de 50 mL com dieta artificial para a manutenção da criação no laboratório.

2.2.3 Caracterização das linhas-básicas de suscetibilidade de *H. armigera* a diamidas

Para a caracterização das linhas-básicas de suscetibilidade de *H. armigera* foram utilizados os inseticidas chlorantraniliprole (Premio®, DuPont) (200 g a.i./l), cyantraniliprole (Cyazypyr®, DuPont) (100 g a.i./l) e flubendiamide (Belt®, Bayer CropSciences) (480 g a.i./l). Para cada inseticida foram testadas de oito a dez

concentrações distribuídas logaritmicamente e que proporcionaram uma mortalidade entre 5 e 95% em lagartas de terceiro instar. O método de bioensaio utilizado foi o bioensaio de ingestão conduzido em placas de acrílico de 24 células (Costar®), com 1,25 mL de dieta artificial por célula e a aplicação na superfície da célula de 30 µL da solução inseticida na concentração do inseticida a ser testada. O inseticida foi diluído em água destilada e surfactante Triton® na concentração de 0,1%. O tratamento controle foi realizado apenas com água destilada e o surfactante Triton® na concentração de 0,1%. Após a secagem da solução inseticida, no mínimo 48 lagartas de terceiro instar foram inoculadas individualmente em cada célula por concentração testada.

As placas de bioensaio foram fechadas e mantidas dentro de câmaras climatizadas a $25 \pm 2^\circ\text{C}$, fotofase de 14h por 96 horas. Após 96 horas, foram realizadas as avaliações da mortalidade. O critério de resposta foi considerar morto as lagartas que não apresentavam movimentos vigorosos após serem tocadas nos últimos segmentos abdominais com uma pinça. Os dados de mortalidade foram corrigidos pela fórmula de Abbott (Abbott, 1925) e submetidos à análise de Probit no programa Polo-Plus (LeOra-Software, 2002) e posteriormente calculados os valores das doses letais (DL_{50} e DL_{90}). Para a estimativa das doses diagnósticas (DL_{99}), os dados de mortalidade das populações em estudo foram agrupados, seguindo o método proposto por Sims et al. (1996), analisados conjuntamente e submetidos ao modelo binomial com função de ligação complemento log-log no software SAS® (gompertz; PROC PROBIT, SAS INSTITUTE 2002). Esta dose diagnóstica foi utilizada nos bioensaios de monitoramento da suscetibilidade das populações de campo nas safras de 2014/15, 2015/16 e 2016/17.

2.2.4 Estimativa da frequência do alelo de resistência de *H. armigera* a chlorantraniliprole

Para estimar a frequência de alelos que conferem resistência de *H. armigera* a chlorantraniliprole foi utilizado o método de F_2 screen descrito por Andow and Alstad (1998), com as populações da tabela 2.2. As lagartas de campo foram inoculadas individualmente em copos plásticos (de 50 ml) com dieta artificial (Greene et al., 1976) até a fase de pupa. As pupas foram retiradas da dieta, lavadas com solução de sulfato de cobre a 0,65% e individualizadas por um copo plástico transparente até

emergência dos adultos, momento em que se formou os casais. Cada isolinha (1 casal) foi mantida em um tubo de PVC (10 cm de diâmetro por 20 cm de altura), revestido com papel jornal e vedado com tecido tipo “tule” para acasalamento e oviposição. Dentro de cada tubo foi colocado um recipiente de plástico contendo solução de mel na concentração de 10% para alimentação de cada casal.

As isolinhas foram mantidas à temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$, umidade relativa de $70 \pm 10\%$ e fotofase de 14h. Os substratos (tule e papel jornal) para postura e a solução de mel foram trocados a cada 2 dias. As posturas contidas no papel jornal e no tule foram recortadas e colocadas em copos plásticos transparentes (500 mL) correspondente a isolinha. Estes copos foram mantidos em câmaras climatizadas reguladas à temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$ e fotofase 14h até a eclosão das lagartas. Após a eclosão, 128 lagartas de cada isolinha (corresponde a progênie F_1) foram mantidas no laboratório de acordo com as condições de criação e manutenção das populações normais de laboratório descritas anteriormente. As pupas obtidas de cada isolinha foram divididas em gaiolas de tubo de PVC (25×30 cm) com no máximo 60 casais por gaiola para a obtenção da progênie F_2 .

As lagartas recém eclodidas da progênie F_2 foram inoculadas e mantidas em copos com dieta artificial até atingirem terceiro instar, momento que foram destinadas ao bioensaio de monitoramento com a dose diagnóstica (DL_{99}) de chlorantraniliprole (Premio®, DuPont) (200 g a.i./l). Após isso, os dados foram tabulados e analisados pela inferência Bayesiana para estimar a frequência do alelo da resistência aos produtos chlorantraniliprole, com um intervalo de confiança de 95%. Para isso, considerou que p seria a frequência de alelos resistentes testados, n seria o número de isolinhas testadas e S o número de isolinhas positivas. O valor do alelo resistente foi estimado a partir da equação:

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

Para esses ensaios, conta se com possibilidade de que qualquer linhagem parental possua um alelo da resistência, pode se encontrar até quatro alelos da resistência nos casais, a frequência de alelos da resistência seja um quarto da frequência de linhagens resistentes. Nos casais que foram testados, de 120 lagartas espera se que pelo menos 16 sejam homozigotas para o alelo de resistência. Assumindo uma distribuição uniforme, acasalamento ao acaso e resistência monogênica. O intervalo de confiança foi estimado pela equação a seguir:

$$\int_p^1 g(p|S) dp = 0,05$$

2.2.5 Monitoramento da suscetibilidade em populações de *H. armigera* a diamidas

Nos bioensaios de monitoramento da suscetibilidade aos inseticidas chlorantraniliprole, cyantraniliprole e flubendiamide foi utilizado o método de bioensaio de ingestão com as doses diagnósticas (DL₉₉) de cada inseticida definidas anteriormente. Cada parcela foi constituída de 24 lagartas de terceiro instar para cada inseticida, com 10 repetições, seguindo o delineamento inteiramente casualizado.

O critério de mortalidade e o tempo de avaliação foram os mesmos utilizados nos ensaios de caracterização da suscetibilidade. Os dados de mortalidade (X) foram transformados para arcsen $\sqrt{x/100}$, submetidos a análise de variância e as médias foram comparadas pelo teste Dunnett ($P \leq 0,05$; PROC ANOVA, SAS INSTITUTE 2002), com nível de significância de $\alpha = 0,05$.

2.3 Resultados

2.3.1 Caracterização das linhas-básicas de suscetibilidade de *H. armigera* a diamidas

As populações de *H. armigera* se comportaram de forma homogênea com relação a suscetibilidade aos inseticidas chlorantraniliprole, cyantraniliprole e flubendiamide. Chlorantraniliprole foi o inseticida mais tóxico para as populações em estudo do que os demais. Os valores de DL₅₀ variaram de 0,06 a 0,21 µg i.a./cm² e os valores de DL₉₀ variaram 0,17 a 0,85 µg i.a./cm². Cyantraniliprole apresentou valores de DL₅₀ que variaram de 0,18 a 0,40 µg i.a./cm² e os valores de DL₉₀ variaram 0,89 a 1,81 µg i.a./cm². Flubendiamide apresentou valores de DL₅₀ que variaram de 0,12 a 0,22 µg i.a./cm² e valores de DL₉₀ que variaram de 0,56 a 2,16 µg i.a./cm² (Tabela 2.4). Vale destacar que o inseticida cyantraniliprole apresentou os maiores valores de DL₅₀ em relação aos outros inseticidas. Porém, os valores de

DL₉₀ foram próximos para os inseticidas cyantraniliprole e flubendiamide, indicando que ambos produtos possuem uma toxicidade similar nas doses maiores que a DL₅₀.

A sobreposição dos intervalos de confiança a 95% dos valores de DL₅₀ e DL₉₀ apresentados para cada população em estudo permitem afirmar que são semelhantes com relação a suscetibilidade a cada inseticida e que a variação da suscetibilidade por cultura hospedeira na região oeste da Bahia ou a variação entre as regiões de origem das populações são pequenas. Os demais parâmetros das curvas de suscetibilidade apresentados, como qui-quadrado e coeficientes angulares maiores de 1,56 indicam o ajuste dos dados ao modelo e a alta homogeneidade das populações na suscetibilidade a estes inseticidas. Devido a essas questões, foi obtido uma única dose diagnóstica (DL₉₉) para cada inseticida a ser utilizada nos ensaios de monitoramento fenotípico e genotípico. Para chlorantraniliprole a DL₉₉ foi 0,99 (IC 95% = 0,75 - 1,42) µg i.a./cm², cyantraniliprole foi 1,61 (IC 95% = 1,45 - 1,81) µg i.a./cm² e flubendiamide foi 2,64 (IC 95% = 2,19 - 3,29) µg i.a./cm² (Tabela 2.5).

Tabela 2.4 Mortalidade de lagartas (terceiro instar) de *Helicoverpa armigera* a inseticidas diamidas pelo método de bioensaio de ingestão em populações coletadas na safra de 2013/2014.

Ingrediente Ativo	População	n ¹	Coefficiente angular ($\pm$ EPM ⁴)	DL ₅₀ (IC 95%) ²	DL ₉₀ (IC 95%) ³	χ^2 (g.l.) ⁵
Chlorantraniliprole	BA 33	905	1,78 $\pm$ 0,15	0,08 (0,06 - 0,11)	0,44 (0,32 - 0,71)	6,17 (5)
	BA 43	478	2,69 $\pm$ 0,24	0,06 (0,05 - 0,07)	0,17 (0,14 - 0,23)	5,69 (7)
	BA 45	460	1,92 $\pm$ 0,17	0,08 (0,06 - 0,09)	0,36 (0,27 - 0,50)	1,89 (7)
	BA 49	416	2,37 $\pm$ 0,32	0,21 (0,16 - 0,26)	0,72 (0,55 - 1,10)	2,61 (6)
	GO 02	1606	1,83 $\pm$ 0,07	0,17 (0,13 - 0,22)	0,85 (0,62 - 1,24)	9,38 (4)
	MS 05	1330	1,42 $\pm$ 0,090	0,06 (0,05 - 0,07)	0,53 (0,44 - 0,68)	0,73 (5)
	MT 11	371	2,10 $\pm$ 0,22	0,08 (0,07 - 0,10)	0,34 (0,26 - 0,50)	2,42 (5)
Cyantraniliprole	BA 33	880	3,14 $\pm$ 0,25	0,36 (0,32 - 0,40)	0,93 (0,80 - 1,12)	3,46 (5)
	BA 43	420	1,96 $\pm$ 0,18	0,40 (0,32 - 0,49)	1,81 (1,33 - 2,74)	1,84 (6)
	BA 45	354	1,74 $\pm$ 0,16	0,18 (0,14 - 0,23)	0,97 (0,71 - 1,46)	3,55 (5)
	BA 49	439	2,50 $\pm$ 0,27	0,32 (0,27 - 0,39)	1,05 (0,83 - 1,47)	2,64 (7)
	GO 02	803	2,62 $\pm$ 0,18	0,29 (0,26 - 0,32)	0,89 (0,75 - 1,11)	1,55 (4)
	MS 05	879	3,15 $\pm$ 0,25	0,36 (0,32 - 0,40)	0,92 (0,80 - 1,12)	2,76 (5)
	MT 11	321	1,99 $\pm$ 0,18	0,29 (0,23 - 0,38)	1,29 (0,91 - 2,05)	2,25 (4)
Flubendiamide	BA 33	1046	2,28 $\pm$ 0,17	0,15 (0,13 - 0,17)	0,56 (0,47 - 0,70)	5,91 (6)
	BA 43	469	1,28 $\pm$ 0,10	0,22 (0,17 - 0,28)	2,16 (1,40 - 3,69)	2,28 (7)
	BA 45	412	1,56 $\pm$ 0,17	0,12 (0,08 - 0,17)	0,83 (0,59 - 1,28)	3,80 (6)
	BA 49	472	1,73 $\pm$ 0,14	0,18 (0,15 - 0,23)	1,01 (0,75 - 1,45)	1,42 (7)
	GO 02	973	1,28 $\pm$ 0,07	0,14 (0,12 - 0,17)	1,44 (1,09 - 2,00)	5,053 (6)
	MS 05	710	1,58 $\pm$ 0,13	0,20 (0,15 - 0,24)	1,26 (0,96 - 1,79)	1,80 (4)
	MT 11	427	1,57 $\pm$ 0,13	0,12 (0,09 - 0,15)	0,76 (0,54 - 1,20)	2,49 (6)

¹ número de insetos testados; ² Dose letal 50 ($\mu\text{g i.a./cm}^2$) e intervalo de confiança a 95%; ³ Dose letal 90 ($\mu\text{g i.a./cm}^2$) e intervalo de confiança a 95%; ⁴ Erro padrão da média; ⁵ valor do qui-quadrado calculado e grau de liberdade (g.l.).

Tabela 2.5 Doses diagnósticas estimadas pela análise conjunta dos dados de mortalidade ocasionada pelos inseticidas diamidas em populações de *Helicoverpa armigera* coletadas na safra 2013/2014.

Produto	n ¹	Coeficiente angular ($\pm$ EPM ⁴)	DL ₅₀ (IC 95%) ²	DL ₉₉ (IC 95%) ³	χ^2 (g.l.) ⁵
Cyantraniliprole	3608	2,96 $\pm$ 0,12	0,37 (0,35 - 0,39)	1,61 (1,45 - 1,81)	5,89 (4)
Chlorantraniliprole	4604	2,06 $\pm$ 0,11	0,12 (0,10 - 0,14)	0,99 (0,75 - 1,42)	11,42 (4)
Flubendiamide	3576	1,56 $\pm$ 0,07	0,16 (0,15 - 0,18)	2,64 (2,19 - 3,29)	6,72 (4)

¹ número de insetos testados; ² Dose letal 50 ($\mu\text{g i.a./cm}^2$) e intervalo de confiança a 95%; ³ Dose letal 99 ($\mu\text{g i.a./cm}^2$) e intervalo de confiança a 95%; ⁴ Erro padrão da média; ⁵ valor do qui-quadrado calculado e grau de liberdade (g.l.).

2.3.2 Estimativa da frequência do alelo de resistência de *H. armigera* a chlorantraniliprole

Para a estimativa da frequência alélica de resistência no ano de 2013/2014, com a técnica de $F_{2\text{screen}}$ para o inseticida chlorantraniliprole aplicado sobre a dieta artificial na dose diagnóstica (DL_{99}), foram montadas 415 isolinhas obtidas de três populações coletas no estado da Bahia. Deste total de isolinhas, testou-se apenas 100 isolinhas e um total de 8616 lagartas de terceiro instar testadas. Deste total de lagartas, apenas 135 estavam vivas no momento da avaliação e apenas 12 de três isolinhas chegaram a fase adulta. Estas isolinhas foram consideradas como positivas. A frequência do alelo de resistência variou de 0,0069 (IC 95%, 0,00018 - 0,02561) a 0,0182 (IC 95%, 0,00502 - 0,03957) (Tabela 2.6).

No ano de 2014/2015, 155 isolinhas foram montadas a partir de uma população coletada no estado de São Paulo. Desse total apenas 21 isolinhas tiveram a sua progênie testada na geração F_2 , totalizando-se 2149 lagartas de terceiro instar testadas, 184 lagartas estavam vivas durante a avaliação após 96 horas da montagem do experimento e 20 insetos de três isolinhas diferentes chegaram à fase adulta. A frequência do alelo da resistência dessa população foi de 0,0435 (IC 95%, 0,01216 - 0,09347). Dessa forma, o total nos dois anos com as quatro populações foram montadas um total de 570 isolinhas na geração F_0 , destas apenas 121 isolinhas tiveram progênie a F_2 testada, o que totalizou 10765 lagartas de terceiro instar testadas, 319 lagartas sobreviventes após 96 horas e apenas 32 de seis isolinhas chegaram a fase adulta. Assim a frequência do alelo da resistência desse total nos dois anos foi de 0,01423 (IC 95%, 0,00576 - 0,02643) (Tabela 2.6).

Tabela 2.6 Frequência do alelo que confere resistência em populações de *Helicoverpa armigera* a chlorantraniliprole coletadas na safra 2013/2014 e 2014/2015.

Código da população	Cidade/Estado	Nº testados						Isolinhas positivas ¹	Frequência alélica – R ²	IC (95%)
		Isolinhas montadas	Isolinhas testadas	Lagartas	Sobreviventes	Pupas	Adultos			
BA-34	Luis Eduardo Magalhães/BA	190	53	5012	104	30	10	3	0,01818	0,00502 - 0,03957
BA-48	Luis Eduardo Magalhães/BA	125	34	2696	24	8	2	0	0,00694	0,00018 - 0,02561
BA-45	Luis Eduardo Magalhães/BA	100	13	908	7	0	0	0	0,01667	0,00045 - 0,06093
SP -15	Viradouro/SP	155	21	2149	184	66	20	3	0,04348	0,01216 - 0,09347
Subtotal		570	121	10765	319	104	32	6	0,01423	0,00576 - 0,02643

^{1.} Foram consideradas isolinhas positivas apenas as que chegaram na fase adulta

^{2.} Frequência alélica de resistência para modelo de resistência de um único gene.

2.3.3 Monitoramento da suscetibilidade em populações de *H. armigera* a diamidas

As doses diagnósticas estimadas para cada inseticida e utilizadas no monitoramento da suscetibilidade de *H. armigera* ocasionaram mortalidade total ou quase total nas populações coletadas em 2013/14. Isto evidencia que são efetivas para serem utilizadas em monitoramentos da suscetibilidade de *H. armigera* a diamidas no Brasil e que as populações de 2013/2014 são o marco referencial de suscetibilidade a estes inseticidas no Brasil (Figura 2.1, 2.2 e 2.3).

Os ensaios de monitoramento realizados com o inseticida chlorantraniliprole permitem verificar que há diferenças significativas entre as populações em estudo ao longo do tempo quando comparadas a população de referência BA 33 ($F_{21, 373} = 6,74$; $P < 0,0001$). As populações do estado da Bahia apresentaram sobrevivências baixas chegando até 5% de sobrevivência para a população Ba 69 coletada no ano de 2015/2016 e não diferiu da população de referência BA 33. As populações dos outros estados apresentaram aumento de sobrevivência ao longo do tempo, destacando as populações GO 08 e MS 08, coletadas no ano de 2016/17, diferiram da população de referência BA 33 e apresentaram sobrevivências de 9,6% e 13,37%, respectivamente (Figura 2.1).

O monitoramento realizado com o inseticida cyantraniliprole permitiu verificar que houve diferenças na sobrevivência das populações monitoradas ao longo do tempo quando comparadas com a população de referência BA 33 ($F_{14, 285} = 7,77$; $P < 0,0001$). As populações BA 64, BA 69, BA 74, MS 08, GO 08, MT 15, e MT 26 diferiram em relação a população BA 33. As maiores sobrevivências ocorreram para a população BA 69 (12,82%) coletada no ano de 2015/16 e para as populações BA 74 (9,40%), MS 08 (9,32%), GO 08 (9,36%), e MT 26 (5,89%) coletadas no ano de 2016/17 e por fim BA 64 (6,87%) coletada no ano de 2014/15 (Figura 2.2).

Para o inseticida flubendiamide também foi observado diferenças na sobrevivência das populações monitoradas ao longo do tempo quando comparadas com a população de referência BA 33 ($F_{20, 381} = 23,24$; $P < 0,0001$). Todas populações do estado da Bahia coletadas do ano 2014/15 até 2016/17 foram diferentes da população de referência BA 33. As maiores sobrevivências foram observadas para as populações Ba 61 coletada no ano de 2014/15, BA 69 coletada no ano de 2015/16 e Ba 74 coletada no ano de 2016/17 com sobrevivências de 24,07%,

24,01% e 22,13%, respectivamente. Além do estado da Bahia, no ano de 2015/16 a população do estado de Goiás (GO 06) e a população do estado de São Paulo (SP 19) diferiram da população BA 33 e apresentaram sobrevivências de 9,17% e 8,75%, respectivamente. As populações GO 08, MS 08 e SP 22 coletadas no ano 2016/17 diferiram da população BA 33 e apresentaram sobrevivências de 12,54%, 11,96% e 6,86%, respectivamente. As demais populações apresentaram sobrevivências inferiores a 5% e não diferiram da população BA 33 (Figura 2.3).

Figura 2. 1 Monitoramento da suscetibilidade de populações de *Helicoverpa armigera* a chlorantraniliprole nos anos de 2013 até 2017.

Figura 2.2 Monitoramento da suscetibilidade de populações de *Helicoverpa armigera* a cyantraniliprole nos anos de 2013 até 2017.

Figura 2.3 Monitoramento da suscetibilidade de populações de *Helicoverpa armigera* a flubendiamide nos anos de 2013 até 2017.

2.4 Discussão

Neste estudo foram realizadas a caracterização das linhas-básicas de suscetibilidade a chlorantraniliprole, cyantraniliprole e flubendiamide em populações de *H. armigera* a partir de populações coletadas no ano de detecção oficial dessa praga no Brasil. Essas informações de referência de suscetibilidade a inseticidas são de extrema importância para subsidiar os programas de manejo de resistência desta praga a inseticidas no Brasil, visto que já existem casos de resistência de outras espécies de insetos a estes inseticidas, tais como *Plutella xylostella* (Liu et al., 2015b; Ribeiro et al., 2014b) e *Tuta absoluta* (Roditakis et al., 2015).

A baixa variabilidade na suscetibilidade a inseticidas do grupo diamidas em populações de *H. armigera* coletadas na safra de 2013/2014 permite afirmar que não há estruturação genética das populações com relação a cultura hospedeira ou por região geográfica de coleta. Isto é justificado ao se considerar alguns aspectos bioecológicos dessa praga como o hábito polífago, a grande capacidade de dispersão e de migração (Fitt, 1989; Zalucki et al., 1986) e os principais cenários de produção agrícola do Brasil, com cultivos o ano todo de plantas hospedeiras dessa praga. Estes fatores citados possibilitaram que esta espécie se espalhasse rapidamente para todas as regiões de importância agrícola em um curto período de tempo, nas populações brasileiras fosse identificado apenas diversidade genética e de ausência de estruturação genética das populações com relação a localidade e cultura hospedeira (Leite et al., 2014).

O perfil de toxicidade dos inseticidas em estudo para *H. armigera* é observado de forma semelhante aos perfis observados em outras espécies, considerando os valores de DL₅₀. Para *Tuta absoluta* no Brasil, o inseticida chlorantraniliprole apresentou os menores valores de CL₅₀, seguido de cyantraniliprole e flubemdiamide (Campos et al., 2015). Chlorantraniliprole foi mais tóxico do que flubendiamide para *Plutella xylostella* (Trocicka et al., 2012) e *Helicoverpa zea* (Adams et al., 2016).

As estimativas das frequências alélicas de resistência em populações de *H. armigera* a chlorantraniliprole no Brasil nos anos de 2014 e 2015 indicam a possibilidade de evolução da resistência a este inseticida no Brasil. Se o padrão de herança da resistência de *H. armigera* a chlorantraniliprole for recessivo, em um milhão de insetos ocorrerão 202 indivíduos resistentes. No entanto, se o padrão da resistência for dominante, em um milhão de insetos ocorrerão aproximadamente

28257 indivíduos resistentes. Indivíduos que apresentam resistência a chlorantraniliprole poderão exibir resistência cruzada a flubendiamide e cyantraniliprole conforme já verificado em outras espécies da ordem Lepidoptera (Liu et al., 2015a; Ribeiro et al., 2014b; Roditakis et al., 2015; Troczka et al., 2012).

Após a caracterização da suscetibilidade foi realizado o monitoramento da suscetibilidade das populações coletadas nos estados do Bahia, Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul e São Paulo entre os anos de 2013/2014 até 2016/2017 com a utilização da dose diagnóstica de cada produto. Esses ensaios permitem verificar que ao longo do tempo houve queda da suscetibilidade das populações de *H. armigera* aos inseticidas diamidas. Vale destacar que as populações coletadas nos anos 2013/2014 e 2014/2015 apresentaram alta mortalidade comprovando a eficiência das doses diagnósticas recomendadas para o monitoramento da suscetibilidade. Nos anos 2015/2016 e 2016/2017, verifica-se que está ocorrendo o aumento da sobrevivência das populações aos inseticidas do grupo diamidas, principalmente para o inseticida flubendiamide.

Este fato é justificado pela questão do inseticida flubendiamide ter sido a primeira diamida liberada pelo ministério da agricultura brasileiro para o controle de *H. armigera* no Brasil. Isto contribuiu para que houvesse o aumento da pressão da seleção no campo e estivesse ocorrendo a seleção de indivíduos resistentes ao longo do tempo. Além disso, os inseticidas chlorantraniliprole e flubendiamide foram os mais utilizados pelos agricultores para o controle dessa praga no Brasil após a constatação oficial dessa espécie no país por serem mais eficazes no controle dessa praga do que os outros inseticidas de grupos tradicionais, por apresentarem características químicas desejáveis como a baixa toxicidade a organismos não alvo e alta atividade inseticida para insetos da ordem Lepidoptera (Lahm et al., 2007; Selby et al., 2013; Teixeira and Andalaro, 2013).

Diante do problema que *H. armigera* pode ocasionar na agricultura brasileira nos próximos anos, é de extrema importância a continuação dos trabalhos que visem monitorar a suscetibilidade desta praga às principais táticas de controle e fornecer subsídios para programas de manejo de resistência no Brasil, visando assim o retardamento da evolução de resistência desta a estes inseticidas no Brasil. Vale destacar que os custos da resistência estão associados a perda de efetividade de inseticidas, o aumento das doses e da frequências de aplicação de produtos no campo (Roush and McKenzie, 1987). Além disso, as dificuldades e os custos de

descoberta, desenvolvimento e registro de produção de novos produtos são crescentes (McDougall, 2016; Metcalf, 1980; Sparks, 2013), o que torna essencial desenvolver estratégias que minimizem a probabilidade de evolução da resistência de insetos a inseticidas (Metcalf, 1980; Sparks, 2013).

As informações obtidas no presente trabalho evidenciaram o risco de evolução da resistência de *H. armigera* a inseticidas diamidas e a necessidade de implementação de estratégias de manejo de resistência para preservar a vida útil desses inseticidas no Brasil.

2.5 Conclusões

- As diferenças na suscetibilidade a inseticidas diamidas em populações de *H. armigera* coletadas no Brasil na safra 2013/2014 foram baixas (< 5 vezes)
- A frequência inicial do alelo de resistência a chlorantraniliprole em populações de *H. armigera* foi relativamente alta (0,01423)
- Houve uma redução na suscetibilidade a inseticidas diamidas em populações de *H. armigera* no Brasil de 2013 a 2017.

Referências

- Abbott, W.S., 1925. A method of computing the effectiveness of an insecticide. J. Econ. Entomol. 18, 265 – 267.
- Adams, A., Gore, J., Catchot, A., Musser, F., Cook, D., Krishnan, N., Irby, T., 2016. Susceptibility of *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae) Neonates to diamide insecticides in the Midsouthern and Southeastern United States. J. Econ. Entomol. 109, 2205–2209. doi:10.1093/jee/tow175
- Andow, D.A., Alstad, D.N., 1998. F2 Screen for rare resistance alleles. J. Econ. Entomol. 91, 572–578. doi:10.1093/jee/91.3.572
- Bird, L.J., 2015. Baseline Susceptibility of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) to indoxacarb, emamectin benzoate, and chlorantraniliprole in Australia. J. Econ. Entomol. 108, 294–300. doi:10.1093/jee/tou042

- Campos, M.R., Silva, T.B., Silva, W.M., Silva, J.E., Siqueira, H.A., 2015. Susceptibility of *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae) Brazilian populations to ryanodine receptor modulators. *Pest Manag. Sci.* 71, 537–544. doi:10.1002/ps.3835
- Cordova, D., Benner, E.A., Sacher, M.D., Rauh, J.J., Sopa, J.S., Lahm, G.P., Selby, T.P., Stevenson, T.M., Flexner, L., Gutteridge, S., Rhoades, D.F., Wu, L., Smith, R.M., Tao, Y., 2006. Anthranilic diamides: A new class of insecticides with a novel mode of action, ryanodine receptor activation. *Pestic. Biochem. Physiol.* 84, 196–214. doi:10.1016/j.pestbp.2005.07.005
- Czepak, C., Albernaz, K.C., Vivan, L.M., Guimarães, H.O., Carvalhais, T., 2013. Primeiro registro de ocorrência de *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) no Brasil. *Pesqui. Agropecuária Trop.* 43, 110–113. doi:10.1590/S1983-40632013000100015
- Downes, S., Walsh, T., Tay, W.T., 2016. Bt resistance in Australian insect pest species. *Curr. Opin. Insect Sci.* 15, 78–83. doi:10.1016/j.cois.2016.04.002
- French-Constant, R.H., Roush, R.T., 1990. Resistance Detection and documentation: the relative roles of pesticidal and biochemical assays, in: *Pesticide Resistance in Arthropods*. Springer US, Boston, MA, pp. 4–38. doi:10.1007/978-1-4684-6429-0_2
- Fitt, G.P., 1989. The Ecology of *Heliothis* species in relation to agroecosystems. *Annu. Rev. Entomol.* 34, 17–53. doi:10.1146/annurev.en.34.010189.000313
- Greene, G.L., Leppla, N.C., Dickerson, W.A., 1976. Velvetbean caterpillar: a rearing procedure and artificial medium. *J. Econ. Entomol.* 69, 487–488. doi:10.1093/jee/69.4.487
- Gunning, R. V., Easton, C.S., Greenup, L.R., Edge, V.E., 1984. Pyrethroid resistance in *Heliothis armigera* (Hubner) (Lepidoptera: Noctuidae) in Australia. *J. Econ. Entomol.* 77, 1283–1287. doi:10.1093/jee/77.5.1283
- Gunning, R. V., Moores, G.D., Devonshire, A.L., 1998. Insensitive acetylcholinesterase and resistance to organophosphates in Australian *Helicoverpa armigera*. *Pestic. Biochem. Physiol.* 62, 147–151. doi:10.1006/pest.1998.2380

- Gunning, R. V., Moores, G.D., Devonshire, A.L., 1996. Insensitive acetylcholinesterase and resistance to thiodicarb in Australian *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae). *Pestic. Biochem. Physiol.* 55, 21–28. doi:10.1006/pest.1996.0031
- Jeanguenat, A., 2013. The story of a new insecticidal chemistry class: the diamides. *Pest Manag. Sci.* 69, 7–14. doi:10.1002/ps.3406
- Lahm, G.P., Cordova, D., Barry, J.D., 2009. New and selective ryanodine receptor activators for insect control. *Bioorg. Med. Chem.* 17, 4127–4133. doi:10.1016/j.bmc.2009.01.018
- Lahm, G.P., Stevenson, T.M., Selby, T.P., Freudemberger, J.H., Cordova, D., Flexner, L., Bellin, C.A., Dubas, C.M., Smith, B.K., Hughes, K.A., Hollingshaus, J.G., Clark, C.E., Benner, E.A., 2007. Rynaxypyr™: A new insecticidal anthranilic diamide that acts as a potent and selective ryanodine receptor activator. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 17, 6274–6279. doi:10.1016/j.bmcl.2007.09.012
- Lai, T., Li, J., Su, J., 2011. Monitoring of beet armyworm *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae) resistance to chlorantraniliprole in China. *Pestic. Biochem. Physiol.* 101, 198–205. doi:10.1016/j.pestbp.2011.09.006
- Leite, N.A., Alves-Pereira, A., Corrêa, A.S., Zucchi, M.I., Omoto, C., 2014. Demographics and genetic variability of the new world bollworm (*Helicoverpa zea*) and the old world bollworm (*Helicoverpa armigera*) in Brazil. *PLoS One* 9, e113286. doi:10.1371/journal.pone.0113286
- LeOra-Software, 2002. Polo-PLus. POLO, for windows computer program.
- Liu, X., Ning, Y., Wang, H., Wang, K., 2015a. Cross-resistance, mode of inheritance, synergism, and fitness effects of cyantraniliprole resistance in *Plutella xylostella*. *Entomol. Exp. Appl.* 157, 271–278. doi:10.1111/eea.12361
- Liu, X., Ning, Y., Wang, H., Wang, K., 2015b. Cross-resistance, mode of inheritance, synergism, and fitness effects of cyantraniliprole resistance in *Plutella xylostella*. *Entomol. Exp. Appl.* 157, 271–278. doi:10.1111/eea.12361
- McDougall, P., 2016. The Cost of new agrochemical product discovery , development and registration in 1995 , 2000 and R & D expenditure in 2007 and expectations for 2012 final report a consultancy study for crop life America and the European Crop Protection Association Januar.

- Metcalf, R.L., 1980. Changing Role of insecticides in crop protection. *Annu. Rev. Entomol.* 25, 219–256. doi:10.1146/annurev.en.25.010180.001251
- Ribeiro, L.M.S., Wanderley-Teixeira, V., Ferreira, H.N., Teixeira, Á.A.C., Siqueira, H.A.A., 2014a. Fitness costs associated with field-evolved resistance to chlorantraniliprole in *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae). *Bull. Entomol. Res.* 104, 88–96. doi:10.1017/S0007485313000576
- Ribeiro, L.M.S., Wanderley-Teixeira, V., Ferreira, H.N., Teixeira, Á.A.C., Siqueira, H.A.A., 2014b. Fitness costs associated with field-evolved resistance to chlorantraniliprole in *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae). *Bull. Entomol. Res.* 104, 88–96. doi:10.1017/S0007485313000576
- Roditakis, E., Vasakis, E., Grispou, M., Stavrakaki, M., Nauen, R., Gravouil, M., Bassi, A., 2015. First report of *Tuta absoluta* resistance to diamide insecticides. *J. Pest Sci.* (2004). 88, 9–16. doi:10.1007/s10340-015-0643-5
- Roush, R.T., McKenzie, J.A., 1987. Ecological genetics of insecticide and acaricide resistance. *Annu. Rev. Entomol.* 361–380.
- SAS Institute, 2002. SAS user's guide statistics.
- Sattelle, D.B., Cordova, D., Cheek, T.R., 2008. Insect ryanodine receptors: molecular targets for novel pest control chemicals. *Invertebr. Neurosci.* 8, 107–119. doi:10.1007/s10158-008-0076-4
- Selby, T.P., Lahm, G.P., Stevenson, T.M., Hughes, K.A., Cordova, D., Annan, I.B., Barry, J.D., Benner, E.A., Currie, M.J., Pahutski, T.F., 2013. Discovery of cyantraniliprole, a potent and selective anthranilic diamide ryanodine receptor activator with cross-spectrum insecticidal activity. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 23, 6341–6345. doi:10.1016/j.bmcl.2013.09.076
- Sims, S.B., Greenplate, J.T., Stone, T.B., Caprio, M.A., Gould, F.L., 1996. Monitoring strategies for early detection of Lepidoptera resistance to *Bacillus thuringiensis* insecticidal proteins. pp. 229–242. doi:10.1021/bk-1996-0645.ch023
- Sparks, T.C., 2013. Insecticide discovery: an evaluation and analysis. *Pestic. Biochem. Physiol.* 107, 8–17. doi:10.1016/j.pestbp.2013.05.012
- Specht, A., Sosa-Gómez, D.R., Paula-Moraes, S.V. de, Yano, S.A.C., 2013. Identificação morfológica e molecular de *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) e ampliação de seu registro de ocorrência no Brasil. *Pesqui. Agropecuária Bras.* 48, 689–692. doi:10.1590/S0100-204X2013000600015

- Teixeira, L. a., Andaloro, J.T., 2013. Diamide insecticides: Global efforts to address insect resistance stewardship challenges. *Pestic. Biochem. Physiol.* 106, 76–78. doi:10.1016/j.pestbp.2013.01.010
- Trocza, B., Zimmer, C.T., Elias, J., Schorn, C., Bass, C., Davies, T.G.E., Field, L.M., Williamson, M.S., Slater, R., Nauen, R., 2012. Resistance to diamide insecticides in diamondback moth, *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae) is associated with a mutation in the membrane-spanning domain of the ryanodine receptor. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 42, 873–880. doi:10.1016/j.ibmb.2012.09.001
- Uchiyama, T., Ozawa, A., 2014. Rapid development of resistance to diamide insecticides in the smaller tea tortrix, *Adoxophyes honmai* (Lepidoptera: Tortricidae), in the tea fields of Shizuoka Prefecture, Japan. *Appl. Entomol. Zool.* 49, 529–534. doi:10.1007/s13355-014-0283-x
- Wang, D., Qiu, X., Ren, X., Niu, F., Wang, K., 2009. Resistance selection and biochemical characterization of spinosad resistance in *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae). *Pestic. Biochem. Physiol.* 95, 90–94. doi:10.1016/j.pestbp.2009.07.003
- Wu, M., Zhang, S., Yao, R., Wu, S., Su, J., Gao, C., 2014. Susceptibility of the rice stem borer, *Chilo suppressalis* (Lepidoptera: Crambidae), to flubendiamide in China. *J. Econ. Entomol.* 107, 1250–1255. doi:10.1603/EC14053
- Zalucki, M.P., Daglish, G., Firempong, S., Twine, P., 1986. The biology and ecology of *Heliothis armigera* (Hübner) and *H. punctigera* wallengren (Lepidoptera: Noctuidae) in Australia: What do we know? *Aust. J. Zool.* 34, 779–814. doi:10.1071/ZO9860779

3 CARACTERIZAÇÃO DA SUSCETIBILIDADE E ESTIMATIVA DA FREQUÊNCIA ALÉLICA DE RESISTÊNCIA A INSETICIDAS ESPINOSINAS EM POPULAÇÕES DE *Helicoverpa armigera* (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE) DO BRASIL

Resumo

A evolução de resistência de *Helicoverpa armigera* (Hübner) a inseticidas tem sido reportada em vários países. Com a invasão de *H. armigera* no Brasil, estudos para entender a suscetibilidade a inseticidas em populações de campo provenientes de diferentes sistemas de produção são de fundamental importância para a implementação de estratégias de manejo da resistência. Sendo assim, os objetivos desta pesquisa foram caracterizar a suscetibilidade e estimar a frequência alélica de resistência a inseticidas espinosinas em populações de *H. armigera* coletadas em diferentes Estados do Brasil. Inicialmente foram realizadas as caracterizações das linhas-básicas de suscetibilidade a spinosad e spinetoram em sete populações de *H. armigera* coletadas na safra 2013/2014. Posteriormente, foram conduzidos o monitoramento da suscetibilidade com as doses diagnósticas (DL_{99}) de cada inseticida em populações de *H. armigera* coletadas nos anos de 2014 a 2017. Foram observadas baixas variações iniciais na suscetibilidade a spinosad e spinetoram entre as populações testadas, baseada na DL_{50} (≈ 2 vezes). A frequência do alelo de resistência de *H. armigera* a spinosad, estimada pelo método F_2 screen, foi de 0,02632 (IC95% 0,01149 - 0,04706) em populações coletadas na safra 2014/2015. Não foram observadas alterações significativas na suscetibilidade a inseticidas espinosinas em populações de *H. armigera* no decorrer das safras agrícolas de 2013 a 2016. Contudo, foram verificadas reduções significativas na suscetibilidade das populações avaliadas na safra 2016/2017, com sobrevivência de lagartas de até 20% na dose diagnóstica de spinosad. As informações obtidas no presente estudo evidenciam o risco de evolução de resistência de *H. armigera* a espinosinas; necessitando assim de implementações efetivas de manejo da resistência em diferentes sistemas de produção de cultivos para preservar a vida útil desses inseticidas no Brasil.

Palavras-chave: *Helicoverpa armigera*; Suscetibilidade; Resistência; Spinosad; Spinetoram

Abstract

The evolution of insecticide resistance in *Helicoverpa armigera* (Hübner) has been reported in several countries. With the invasion of *H. armigera* into Brazil, studies to understand the susceptibility to insecticides in field-populations of this pest from different cropping systems are important to implement insect resistance management strategies. Therefore, the objectives of this research were to characterize the susceptibility and to estimate the initial frequency of resistance allele to spinosyn insecticides in *H. armigera* populations collected in different states of Brazil. Initially, baseline susceptibility to spinosad and spinetoram was characterized in seven *H. armigera* populations collected during 2013/2014 growing season. Then, the susceptibility monitoring with the use of diagnostic doses (LD_{99}) of each insecticide was conducted in field-populations of *H. armigera* collected from 2013 to 2017. Low variability in the susceptibility to spinosyn insecticides (≈ 2 -fold) was

detected among *H. armigera* populations, based on LD₅₀. The initial frequency of resistance allele of *H. armigera* to spinosad, estimated by F₂ screen method, was 0.02632 (CI95% 0.01149 – 0.04706) in *H. armigera* populations collected in 2014/2015 growing season. There were no significant differences in the susceptibility to spinosyn insecticides in *H. armigera* populations collected from 2013 to 2016. However, a significant reduction in the susceptibility was detected in populations from 2016/2017 growing season, with larval survival up to 20% at the diagnostic dose of spinosad. The results obtained herein showed the high risk of resistance evolution of *H. armigera* to spinosyns and the need of implementation of resistance management strategies in different cropping systems to preserve the lifetime of these insecticides in Brazil.

Keywords: *Helicoverpa armigera*; Susceptibility; Resistance; Spinosad; Spinetoram

3.1 Introdução

As espinosinas são lactonas macrocíclicas derivadas da fermentação de um actinomiceto de solo, *Saccharopolyspora spinosa*, e são representadas por dois inseticidas o spinosad e o spinetoram (Sparks et al., 2008). O spinosad possui como ingrediente ativo a espinosina A (componente primário) e spinosina D (componente secundário) e foi registrado em 1997 (Salgado, 1998). Já o spinetoram, é uma mistura de duas espinosinas derivadas semi-sintéticas (espinosina J e L), foi registrado em 2007 e possui maior potencial de ação inseticida do que spinosad (Sparks et al., 2008).

Estes inseticidas são importantes para o controle de várias ordens de insetos, com destaque a ordem Lepidoptera (Sparks et al., 2001). Devido a este fato, as espinosinas são grandes potenciais no controle de *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) no Brasil. Esta espécie foi constatada recentemente no Brasil (Czepak et al., 2013; Specht et al., 2013) e é considerada ser de difícil controle por possuir vários casos de resistência a inseticidas na literatura (Ahmad et al., 2001, 1999, 1997, 1995; Armes et al., 1992; Buès et al., 2005; Gunning et al., 1996, 1992, 1984; Kapoor et al., 2000; Martin et al., 2002).

Apesar da utilização recente desse grupo inseticida no controle de pragas, existem vários relatos de resistência de pragas a spinosad reportados na literatura, tais como *Leptinotarsa decemlineata* (Mota-Sanchez et al., 2006), *Musca domestica* (Markussen and Kristensen, 2012), *Chloridea virescens* (Roe et al., 2010), *Tuta absoluta* (Campos et al., 2015) e até mesmo de *H. armigera* (Ahmad et al., 2003; Wang et al., 2009). Além disso, linhagens de insetos resistentes a spinosad, como *C. virescens*, *Drosophila melanogaster* e *Plutella xylostella* resistentes a spinosad

podem exibir resistência cruzada a spinetoram. Entretanto, não há relatos de que exista resistência cruzada entre espinosinas e outros grupos de inseticidas (Sparks et al., 2012). Diante disso, é necessário o desenvolvimento estratégias de manejo de resistência que minimizem a probabilidade de evolução da resistência de *H. armigera* as espinosinas no Brasil.

Para isso, os estudos de caracterização da suscetibilidade e estimativa de frequências de alelos que conferem resistência de *H. armigera* as espinosinas são de extrema importância para programas de manejo de resistência desta espécie. Assim, os objetivos deste trabalho foram: **(i)** caracterizar as linhas básicas de suscetibilidade de *H. armigera* a spinosad e spinetoram; **(ii)** estimar a frequência do alelo que confira resistência ao inseticida spinosad; e **(iii)** monitorar a suscetibilidade de *H. armigera* aos inseticidas spinosad e spinetoram em populações coletadas em diferentes regiões agrícolas do Brasil nas safras agrícolas de 2013/14 a 2016/17.

3.2 Material e métodos

3.2.1 Coleta de populações de *H. armigera*

As populações utilizadas para a caracterização das linhas básicas de suscetibilidade, para a estimativa da frequência do alelo da resistência de *H. armigera* a spinosad e para o monitoramento da suscetibilidade no período de 2013 a 2017 neste capítulo foram as mesmas populações utilizadas no capítulo anterior (Tabelas 2.1; 2.2 e 2.3).

3.2.2 Criação e manutenção das populações de *H. armigera* em laboratório

As populações foram coletadas na fase de lagarta em lavouras comerciais, acondicionadas individualmente em recipientes plásticos com dieta artificial (Greene et al., 1976) e enviadas ao Laboratório de Resistência de Artrópodes e Táticas de Controle do departamento de Entomologia da Escola Superior Luiz de Queiroz (ESALQ-USP). No laboratório, as lagartas eram separadas por populações de acordo com o local, a cultura e a época do ano em que foram coletadas e mantidas

em dieta artificial (Greene et al., 1976), a $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo de 14:10 até a fase de pupa.

As pupas foram retiradas da dieta, lavadas com solução a base de sulfato de cobre a 0,65% e acondicionadas gaiolas cilíndricas de tecido tipo “tule” (60 cm de altura $\times$ 40 cm de diâmetro) para a emergência dos adultos e posterior acasalamento. Após três dias, 40 casais foram colocados em gaiolas de tubo PVC (25 cm de diâmetro por 30 cm de altura) revistos com papel sulfite e cobertos com tecido do tipo “tule” para a realização das posturas. O alimento fornecido aos adultos foi de uma solução aquosa de mel a 10%. Cada população foi constituída de no mínimo 80 casais por geração. Os substratos (papel jornal e o tecido tipo “tule”) para postura e a solução de mel foram trocados a cada dois dias.

As posturas foram acondicionadas em copos plásticos de 500 mL e mantidas em BODs a $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo de 14:10 até a eclosão das lagartas. As lagartas recém eclodidas foram acondicionadas em copos plásticos de 100 ml até atingirem terceiro instar. No terceiro instar, parte das lagartas foi destinada aos bioensaios com inseticidas e a outra parte destinada à manutenção da criação em laboratório. As lagartas da manutenção da população foram individualizadas em copos de 50 mL com dieta artificial (Greene et al., 1976) até a fase de pupa.

3.2.3 Caracterização das linhas-básicas suscetibilidade de *H. armigera* a espinosinas

Os ensaios de caracterização da suscetibilidade de *H. armigera* aos inseticidas spinosad (Tracer®, Dow AgroSciences) (480 g a.i./l) e spinetoram (Exalt®, Dow AgroSciences) (120 g a.i./l) foram conduzidos mediante a diluição de cada produto em oito a dez concentrações distribuídas logaritmicamente e que proporcionassem uma mortalidade entre 5 e 95%. Os inseticidas eram diluídos em água destilada e surfactante Triton® na concentração de 0,1%. O tratamento controle foi realizado apenas com água destilada e o surfactante Triton® na concentração de 0,1%.

O método de bioensaio utilizado foi o bionensaio de ingestão realizado em placas de acrílico de 24 células (Costar®), com 1,25 mL de dieta artificial (Greene et al., 1976) por célula e a aplicação de 30 μL da solução inseticida a ser testada sobre a dieta. O inseticida foi diluído em água destilada com a adição de surfactante

Triton® na concentração de 0,1%. O tratamento controle foi realizado apenas com água destilada e o surfactante Triton® na concentração de 0,1%. Após a secagem da solução inseticida, pelo menos 48 lagartas de terceiro instar foram inoculadas individualmente em cada célula por concentração testada. As placas foram mantidas dentro de câmaras climatizadas com temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$ e fotofase de 14h.

As avaliações da mortalidade de cada tratamento foram realizadas 48 horas após a montagem dos bioensaios. Para as avaliações considerou-se como critério de mortalidade os indivíduos que não tinham movimento aparente após serem tocados nos últimos segmentos abdominais com uma pinça. Os dados de mortalidade foram corrigidos pela fórmula de Abbott (Abbott, 1925) e submetidos à análise de Probit no programa Polo-Plus (LeOra-Software, 2002) e calculados os valores das doses letais (DL_{50} e DL_{90}). Baseados nas respostas de concentração-mortalidade das populações aos inseticidas, os dados de mortalidades de todas as populações foram agrupados e analisados conjuntamente para a obtenção da dose diagnóstica (DL_{99}) de cada produto, seguindo o método proposto por Sims et al. (1996), e submetidos ao modelo binomial com função de ligação complemento log-log (gompertz; PROC PROBIT, SAS INSTITUTE 2002).

3.2.4 Estimativa da frequência do alelo de resistência de *H. armigera* a spinosad

Para os ensaios de F_2 screen foram coletadas populações de *H. armigera* na fase de lagarta nos estados da Bahia e São Paulo e enviadas ao Laboratório de Resistência de Artrópodes e Táticas de Controle da ESALQ/USP. As lagartas de cada população foram inoculadas individualmente em copos plásticos contendo dieta artificial (Greene et al., 1976) até a fase de pupa. As pupas foram retiradas da dieta, lavadas com solução de sulfato de cobre a 0,65% e individualizadas em bandejas cobertas por copos plásticos de 50 mL transparente até emergência dos adultos para a posterior formação das isolinhas.

Cada isolinha (1 casal) foi mantida em um tubo de PVC (10 cm de diâmetro por 20 cm de altura), revestido com papel jornal e vedado com tecido tipo “tule” para acasalamento e oviposição. Em cada tubo foi colocado no fundo um recipiente plástico contendo solução de mel na concentração de 10% para alimentação das mariposas. As isolinhas foram mantidas à temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$, umidade relativa

de 70% e fotofase de 14h. As posturas de cada isolinha foram retiradas a cada dois dias, acondicionadas em copos plásticos transparentes (500 mL) e mantidos em câmaras climatizadas reguladas à temperatura de 25°C e fotofase 14h até a eclosão das lagartas.

Após a eclosão, 128 lagartas de cada isolinha (corresponde à progênie F₁) foram mantidas no laboratório de acordo com as condições de criação e manutenção das populações normais de laboratório descritas anteriormente. As pupas obtidas de cada isolinha foram divididas em duas gaiolas de tubo de PVC (25X30 cm) iguais as descritas anteriormente, totalizando se 30 casais por gaiola para a obtenção da progênie F₂.

As lagartas recém eclodidas da progênie F₂ foram inoculadas e mantidas em copos plásticos de 100 mL com dieta artificial até atingirem terceiro instar, momento em que foram destinadas ao bioensaio de monitoramento com a dose diagnóstica (DL₉₉) de spinosad (Tracer®, Dow AgroSciences) (480 g a.i./l), seguindo os mesmos procedimentos dos ensaios de monitoramento descrito anteriormente.

Os dados de mortalidade de cada isolinha foram tabulados e analisados pela inferência Bayesiana para estimar a frequência do alelo da resistência a este produto com o intervalo de confiança a 95%. Para isso, considerou que p seria a frequência de alelos resistentes testados, n seria o número de isolinhas testadas e S o número de isolinhas positivas. O valor do alelo resistente foi estimado a partir da equação:

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

Para esses ensaios, conta se com possibilidade de que qualquer da linhagem parental possua um alelo da resistência, pode se encontrar até quatro alelos da resistência nos casais, a frequência de alelos da resistência seja um quarto da frequência de linhagens resistentes. Assim nos casais que foram testados, de 120 lagartas espera se que pelo menos 16 sejam homozigotas para o alelo de resistência. Assumindo uma distribuição uniforme, acasalamento ao acaso e resistência monogênica. O intervalo de confiança foi estimado pela equação a seguir:

$$\int_p^1 g(p | S) dp = 0,05$$

3.2.5 Monitoramento da suscetibilidade em populações de *H. armigera* a espinosinas

Para os ensaios de monitoramento da suscetibilidade aos inseticidas spinosad e spinetoram utilizou-se o método de bioensaio de ingestão com as doses diagnósticas (DL₉₉) definida anteriormente para cada produto. O delineamento foi inteiramente casualizado, com 10 repetições e parcelas de 24 lagartas de terceiro instar para cada inseticida.

Os critérios de mortalidade e o tempo de avaliação foram os mesmos descritos nos métodos para linhas básicas de suscetibilidade. Os dados de mortalidade (X) foram transformados para $\arcsen \sqrt{x/100}$, submetidos a análise de variância e as médias foram comparadas pelo teste Dunnett ($P \leq 0,05$; PROC ANOVA, SAS INSTITUTE 2002).

3.3 Resultados

3.3.1 Caracterização das linhas-básicas de suscetibilidade de *H. armigera* a espinosinas

As populações de *H. armigera* se comportaram de forma homogênea com relação à suscetibilidade aos inseticidas spinosad e spinetoram. Este fato é evidente ao se analisar os valores de coeficientes angular, qui-quadrado, número de graus de liberdade, a proximidade dos valores e a sobreposição dos intervalos de confiança das DL₅₀ e DL₉₀ obtidos em cada linha básica. O inseticida spinosad apresentou coeficientes angulares que variaram de $1,75 \pm 0,09$ a $2,40 \pm 0,31$, qui quadrados variaram de 1,79 a 7,31, valores de DL₅₀ variaram de 0,36 a 0,69 µg i.a./cm² e DL₉₀ variaram de 1,39 a 2,38 µg i.a./cm². Já o inseticida spinetoram apresentou coeficientes angulares que variaram de $1,76 \pm 0,18$ a $2,66 \pm 0,25$, o qui quadrado variou de 1,06 a 6,99, os valores de DL₅₀ variaram de 0,08 a 0,15 µg i.a./cm² e DL₉₀ variaram de 0,28 a 0,51 µg i.a./cm². Os resultados obtidos revelam que o inseticida spinetoram é quatro vezes mais tóxico do que o inseticida spinosad (Tabela 3.1).

Devido à semelhança da suscetibilidade entre as populações de *H. armigera* a cada inseticida em estudo foi obtida uma única dose diagnóstica (DL₉₉) para cada

inseticida a qual foi utilizada nos ensaios de monitoramento fenotípico ou genotípico da suscetibilidade de populações brasileiras a estes inseticidas. Para spinosad a DL_{99} foi 3,03 (2,73 - 3,41) $\mu\text{g i.a./cm}^2$ e para spinetoram a DL_{99} foi 0,97 (0,87 - 1,09) $\mu\text{g i.a./cm}^2$ (Tabela 3.2).

Tabela 3.1 Mortalidade de lagartas (terceiro instar) de populações de *Helicoverpa armigera* a inseticidas espinosinas pelo método de bioensaio de ingestão na safra 2013/2014.

Ingrediente Ativo	População	n ¹	Coefficiente angular ($\pm$ EPM ⁴)	DL ₅₀ (IC 95%) ²	DL ₉₀ (IC 95%) ³	χ^2 (g.l.) ⁵
Spinosad	BA 33	1053	1,75 $\pm$ 0,09	0,38 (0,32 - 0,44)	2,02 (1,62 - 2,60)	4,28 (6)
	BA 43	382	2,40 $\pm$ 0,31	0,69 (0,57 - 0,84)	2,38 (1,82 - 3,58)	2,98 (5)
	BA 45	477	2,04 $\pm$ 0,17	0,45 (0,38 - 0,54)	1,92 (1,49 - 2,66)	5,12 (7)
	BA 49	379	2,12 $\pm$ 0,17	0,39 (0,31 - 0,49)	1,56 (1,18 - 2,25)	1,79 (5)
	GO 02	1197	2,19 $\pm$ 0,12	0,36 (0,32 - 0,41)	1,39 (1,17 - 1,70)	3,16 (6)
	MS 05	950	2,16 $\pm$ 0,12	0,40 (0,32 - 0,48)	1,55 (1,18 - 2,23)	7,31 (5)
	MT 11	477	1,87 $\pm$ 0,14	0,39 (0,32 - 0,47)	1,87 (1,44 - 2,61)	3,41 (7)
Spinetoram	BA 33	470	2,41 $\pm$ 0,315	0,14 (0,10 - 0,18)	0,49 (0,38 - 0,68)	3,84 (7)
	BA 43	383	2,17 $\pm$ 0,21	0,13 (0,11 - 0,16)	0,51 (0,38 - 0,77)	3,43 (5)
	BA 45	323	1,95 $\pm$ 0,21	0,094 (0,08 - 0,12)	0,43 (0,32 - 0,67)	3,82 (4)
	BA 49	379	2,66 $\pm$ 0,25	0,15 (0,13 - 0,18)	0,46 (0,37 - 0,61)	1,13 (5)
	GO 02	369	2,10 $\pm$ 0,23	0,10 (0,77 - 0,12)	0,41 (0,31 - 0,59)	1,06 (5)
	MS 05	375	1,76 $\pm$ 0,18	0,08 (0,06 - 0,09)	0,40 (0,29 - 0,63)	2,02 (5)
	MT 11	335	2,32 $\pm$ 0,27	0,08 (0,05 - 0,11)	0,28 (0,18 - 0,65)	6,99 (4)

¹ Número de insetos testados; ² Dose letal 50 ($\mu\text{g i.a./cm}^2$) e intervalo de confiança a 95%; ³ Dose letal 90 ($\mu\text{g i.a./cm}^2$) e intervalo de confiança a 95%; ⁴ Erro padrão da média; ⁵ Valor do qui-quadrado calculado e grau de liberdade (g.l.).

Tabela 3.2 Doses diagnósticas estimadas pela análise conjunta dos dados de mortalidade ocasionada pelos inseticidas espinosinas nas populações de *Helicoverpa armigera* coletadas na safra 2013/2014.

Produto	n ¹	Coefficiente angular ($\pm$ EPM ⁴)	DL ₅₀ (IC 95%) ³	DL ₉₉ (IC 95%) ³	χ^2 (g.l.) ⁵
Spinosad	3907	2,46 $\pm$ 0,08	0,52 (0,48 - 0,75)	3,03 (2,73 - 3,41)	2,75 (4)
Spinetoram	3698	2,19 $\pm$ 0,07	0,13 (0,12 - 0,14)	0,97 (0,87 - 1,09)	5,22 (6)

¹ Número de insetos testados; ² Dose letal 50 ($\mu\text{g i.a./cm}^2$) e intervalo de confiança a 95%; ³ Dose letal 99 ($\mu\text{g i.a./cm}^2$) e intervalo de confiança a 95%; ⁴ Erro padrão da média; ⁵ Valor do qui-quadrado calculado e grau de liberdade (g.l.).

3.3.2 Estimativa da frequência do alelo de resistência de *H. armigera* a spinosad

Para a estimativa da frequência do alelo de resistência a spinosad no ano de 2013/2014 formou-se 411 isolinhas de *H. armigera* provenientes de três populações de campo coletadas no estado da Bahia, duas coletadas na cultura da soja e uma na cultura de algodão. Desse total de isolinhas, apenas 41 isolinhas tiveram a progênie F_2 (as lagartas de segunda geração) testada, totalizando-se 3293 lagartas de terceiro instar as quais apenas 175 lagartas estavam vivas durante a avaliação. Desse total de isolinhas testadas apenas seis foram consideradas positivas, ou seja, seis isolinhas que tiveram as lagartas sobreviventes e chegaram a fase adulta. A frequência do alelo da resistência neste ano variou de 0,02500 (IC 95%, 0,0007 - 0,09071) a 0,0583 (0,0240 - 0,1066) (Tabela 3.3).

No ano de 2014/2015, formou-se 155 isolinhas de uma população do estado de São Paulo. Destas isolinhas formadas, 3746 lagartas de 33 isolinhas apenas tiveram a sua progênie F_2 testada. Desse total de lagartas, 199 lagartas estavam vivas no momento da avaliação e apenas os insetos de uma isolinha chegaram a fase adulta. Assim apenas uma isolinha foi considerada positiva. A frequência do alelo da resistência variou de 0,01429 (IC 95%, 0,0018 - 0,0396). Dessa forma, nos dois anos totalizou-se 566 isolinhas formadas. Desse número total de isolinhas foi possível testar 7039 lagartas de terceiro instar de 74 isolinhas. Desse número de lagartas apenas 374 estavam vivas no momento da avaliação e 18 chegaram a fase adulta o que representou o total de sete isolinhas positivas. A frequência alélica do total nos dois anos foi 0,02632 (IC 95%, 0,0115 - 0,0471) (Tabela 3.3).

Tabela 3.3 Frequência do alelo que confere resistência em populações de *Helicoverpa armigera* a spinosad nas safras 2013/2014 e 2014/2015.

Codigo da população	Cidade/Estado	Nº testados						Isolinhas positivas	Frequência alelica - R	IC (95%)
		Isolinhas montadas	Isolinhas testadas	Lagartas	Sobreviventes	Pupas	Adultos			
BA-34	Luis Eduardo Magalhães/BA	190	28	2384	141	35	10	6	0,05833	0,02402 - 0,10661
BA-48	Luis Eduardo Magalhães/BA	125	8	532	16	0	0	0	0,02500	0,00068 - 0,09071
BA-55	Luis Eduardo Magalhães/BA	96	5	377	18	1	0	0	0,03571	0,00098 - 0,12832
SP -15	Viradouro/SP	155	33	3746	199	25	8	1	0,01429	0,00177 - 0,03955
Subtotal		566	74	7039	374	61	18	7	0,02632	0,01149 - 0,04706

* Foram consideradas isolinhas positivas apenas as que chegaram na fase adulta

3.3.3 Monitoramento da suscetibilidade em populações de *H. armigera* a espinosinas

O monitoramento da suscetibilidade realizado com o inseticida spinosad no ano de 2014/15 permite verificar que as populações do estado da Bahia BA 52 e BA 64 foram diferentes da população BA 33. No ano de 2015/16 a sobrevivência no estado da Bahia diminuiu e as populações do Mato Grosso (MT 19) e de São Paulo (SP 19) foram diferentes em relação à população de referência BA 33. No ano 2016/17 a população BA 74 não diferiu da população BA 33 e as demais populações estudadas diferem em relação à população BA 33 (Figura 3.1).

O monitoramento com spinetoram permite verificar que há diferenças significativas na suscetibilidade entre as populações quando comparadas com a população de referência BA 33 ($F_{19, 329} = 14,50$; $P < 0,0001$) e houve um aumento da sobrevivência no último ano de monitoramento. Do total de 20 populações monitoradas com a dose diagnóstica apenas uma população da Bahia (BA 66) coletada no ano de 2015/16 e a população de São Paulo (SP 22) coletada no ano de 2016/17 diferiram da população de referência BA 33 (Figura 3.2).

Figura 3.1 Monitoramento da suscetibilidade de populações de *Helicoverpa armigera* a spinosad.

Figura 3.2 Monitoramento da suscetibilidade de populações de *Helicoverpa armigera* a spinetoram.

3.4 Discussão

A caracterização da suscetibilidade permitiu verificar que as populações de *H. armigera* são homogêneas com relação a suscetibilidade a espinosinas. Isto é verificado pelos altos coeficientes angulares obtidos, pequenas variações nos valores de DL_{50} e a sobreposição dos intervalos de confiança das DL_{50} das populações estudadas a cada inseticida no ano de 2013/2014. Este fato pode ser associado a questão das populações de *H. armigera* no Brasil não possuir estruturação genética por região e por cultura hospedeira (Leite et al., 2014), e não apresentarem diferenças na suscetibilidade a inseticidas entre as populações.

Apesar das doses diagnósticas determinadas para cada produto serem menores que as doses recomendadas no campo, elas ocasionaram alta mortalidade nas populações coletadas nos anos 2013/14 e 2014/15 e demonstraram ser adequadas para a utilização nos ensaios de monitoramento da suscetibilidade de *H. armigera* a espinosinas no Brasil. Ao longo dos quatro anos de monitoramento foi verificado pequenas alterações na suscetibilidade de *H. armigera* a estes inseticidas no Brasil, comprovando que os genes responsáveis pela resistência estão presentes.

As estimativas das frequências alélicas de resistência em populações de *H. armigera* a spinosad no Brasil nos anos de 2014 e 2015 são alta e indicam a possibilidade de evolução da resistência a este inseticida no Brasil. Se a resistência de *H. armigera* a spinosad for um padrão recessivo, em um milhão de insetos ocorrerão 692 indivíduos resistentes. No entanto, se o padrão da resistência for dominante, em um milhão de insetos ocorrerão aproximadamente 51947 indivíduos expressarão o fenótipo resistente. Vale destacar que o monitoramento pelo método de $F_{2screen}$ permite que seja estimada a frequência de resistência de alelos que confirmam resistência e consiga encontrar casos de resistência antes do monitoramento realizado com a dose diagnóstica (Andow and Alstad, 1998).

Diante destes resultados, a adoção de medidas proativas nos programas de manejo de resistência de *H. armigera* a estes inseticidas é recomendada, principalmente nas regiões que houve diferenças significativas no monitoramento da suscetibilidade ao longo do tempo, visando retardar o processo de evolução da resistência e prolongar a vida útil destes inseticidas para o controle de *H. armigera* no Brasil. Vale destacar que já existem casos de resistência de *H. armigera* a

spinosad em outros países como China (Wang et al., 2009) e de outras espécies a este inseticida no Brasil (Campos et al., 2014; Lima Neto et al., 2016) e em outros países (Herron et al., 2014; Markussen and Kristensen, 2012; Reyes et al., 2012; Wang et al., 2006; Zhao et al., 2006). Além disso, já existem relatos de resistência cruzada entre spinosad e spinetoram (Campos et al., 2014; Herron et al., 2014; Lima Neto et al., 2016; Sparks et al., 2012).

Os custos da resistência estão associados a perda de efetividade de inseticidas, o aumento das doses e da frequências de aplicação de produtos no campo (Roush and McKenzie, 1987). Além disso, as dificuldades e os custos de descoberta, desenvolvimento, registro e produção de novos produtos são crescentes (McDougall, 2016; Metcalf, 1980; Sparks, 2013), o que torna essencial desenvolver estratégias que minimizem a probabilidade de evolução da resistência de insetos a inseticidas (Metcalf, 1980; Sparks, 2013).

Trabalhos de caracterização e monitoramento da suscetibilidade a espinosinas conduzidos no Brasil com *Plutella xylostella* (Lima Neto et al., 2016) e *Tuta absoluta* (Campos et al., 2014) revelam o mesmo perfil de toxicidade observado para *H. armigera* neste trabalho, em que o inseticida spinetoram é mais tóxico que o inseticida spinosad considerado os valores de DL₅₀. Nos ensaios de monitoramento da suscetibilidade de *P. xylostella* foi verificado perda da suscetibilidade de populações ao longo do tempo a espinosinas, havendo assim evolução da resistência a spinosad com resistência cruzada a spinetoram (Lima Neto et al., 2016).

Em resumo, os dados deste trabalho fornecem informações importantes sobre a suscetibilidade de populações de *H. armigera* a espinosinas no Brasil, desde a constatação oficial desta praga até o momento atual. A coleta e análise contínua desses resultados são fundamentais para o desenvolvimento e avaliação contínua de estratégias de manejo da resistência *H. armigera* a inseticidas no Brasil.

3.5 Conclusões

- As diferenças na suscetibilidade a inseticidas espinosinas em populações de *H. armigera* coletadas no Brasil na safra 2013/2014 foram baixas (≈ 2 vezes).

- A frequência inicial do alelo de resistência a spinosad em populações de *H. armigera* foi relativamente alta (0,02632).
- Não foram observadas diferenças na suscetibilidade a inseticidas espinosinas em populações de *H. armigera* coletadas de 2013 a 2016.
- Houve uma redução na suscetibilidade a inseticidas espinosinas em populações de *H. armigera* no Brasil na safra 2016/2017.

Referências

- Abbott, W.S., 1925. A method of computing the effectiveness of an insecticide. J. Econ. Entomol. 18, 265 – 267.
- Ahmad, M., Arif, I.M., Ahmad, Z., 1995. Monitoring Insecticide Resistance of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) in Pakistan. J. Econ. Entomol. 88, 771–776. doi:10.1093/jee/88.4.771
- Ahmad, M., Arif, M.I., Ahmad, Z., 2003. Susceptibility of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) to new chemistries in Pakistan. Crop Prot. 22, 539–544. doi:10.1016/S0261-2194(02)00219-3
- Ahmad, M., Arif, M.I., Attique, M.R., 1997. Pyrethroid resistance of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) in Pakistan. Bull. Entomol. Res. 87, 343. doi:10.1017/S0007485300037366
- Ahmad, M., Iqbal Arif, M., Ahmad, Z., 2001. Resistance to carbamate insecticides in *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) in Pakistan. Crop Prot. 20, 427–432. doi:10.1016/S0261-2194(00)00168-X
- Ahmad, M., Iqbal Arif, M., Ahmad, Z., 1999. Patterns of resistance to organophosphate insecticides in field populations of *Helicoverpa armigera* in Pakistan. Pestic. Sci. 55, 626–632. doi:10.1002/(SICI)1096-9063(199906)55:6<626::AID-PS988>3.0.CO;2-L
- Andow, D.A., Alstad, D.N., 1998. F2 Screen for rare resistance alleles. J. Econ. Entomol. 91, 572–578. doi:10.1093/jee/91.3.572
- Armes, N.J., Jadhav, D.R., Bond, G.S., King, A.B.S., 1992. Insecticide resistance in *Helicoverpa armigera* in South India. Pestic. Sci. 34, 355–364. doi:10.1002/ps.2780340409

- Buès, R., Bouvier, J.C., Boudinhon, L., 2005. Insecticide resistance and mechanisms of resistance to selected strains of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) in the south of France. *Crop Prot.* 24, 814–820. doi:10.1016/j.cropro.2005.01.006
- Campos, M.R., Rodrigues, A.R.S., Silva, W.M., Silva, T.B.M., Silva, V.R.F., Guedes, R.N.C., Siqueira, H.A.A., 2014. Spinosad and the Tomato Borer *Tuta absoluta*: A bioinsecticide, an invasive pest threat, and high insecticide resistance. *PLoS One* 9, e103235. doi:10.1371/journal.pone.0103235
- Campos, M.R., Silva, T.B.M., Silva, W.M., Silva, J.E., Siqueira, H.A.A., 2015. Spinosyn resistance in the tomato borer *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae). *J. Pest Sci.* (2004). 88, 405–412. doi:10.1007/s10340-014-0618-y
- Czepak, C., Albernaz, K.C., Vivan, L.M., Guimarães, H.O., Carvalhais, T., 2013. Primeiro registro de ocorrência de *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) no Brasil. *Pesqui. Agropecuária Trop.* 43, 110–113. doi:10.1590/S1983-40632013000100015
- Greene, G.L., Leppla, N.C., Dickerson, W.A., 1976. Velvetbean caterpillar: a rearing procedure and artificial medium. *J. Econ. Entomol.* 69, 487–488. doi:10.1093/jee/69.4.487
- Gunning, R. V., Balfe, M.E., Easton, C.S., 1992. Carbamate resistance in *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) in Australia. *Aust. J. Entomol.* 31, 97–103. doi:10.1111/j.1440-6055.1992.tb00464.x
- Gunning, R. V., Easton, C.S., Greenup, L.R., Edge, V.E., 1984. Pyrethroid resistance in *Heliothis armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) in Australia. *J. Econ. Entomol.* 77, 1283–1287. doi:10.1093/jee/77.5.1283
- Gunning, R. V., Moores, G.D., Devonshire, A.L., 1996. Insensitive acetylcholinesterase and resistance to thiodicarb in Australian *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae). *Pestic. Biochem. Physiol.* 55, 21–28. doi:10.1006/pest.1996.0031
- Herron, G.A., Gunning, R. V., Cottage, E.L.A., Borzatta, V., Gobbi, C., 2014. Spinosad resistance, esterase isoenzymes and temporal synergism in *Frankliniella occidentalis* (Pergande) in Australia. *Pestic. Biochem. Physiol.* 114, 32–37. doi:10.1016/j.pestbp.2014.07.006

- Kapoor, S.K., Sohi, a S., Singh, J., Russell, D., Kalra, R.L., 2000. Insecticide resistance in *Helicoverpa armigera* (Hubner) in Punjab, India. Pestic. Res. J. 12, 30–35 ST – Insecticide resistance in *Helicoverpa*.
- Leite, N.A., Alves-Pereira, A., Corrêa, A.S., Zucchi, M.I., Omoto, C., 2014. Demographics and genetic variability of the New World Bollworm (*Helicoverpa zea*) and the Old World Bollworm (*Helicoverpa armigera*) in Brazil. PLoS One 9, e113286. doi:10.1371/journal.pone.0113286
- LeOra-Software, 2002. Polo-PLus. POLO, for windows computer program.
- Lima Neto, J.E., Amaral, M.H.P., Siqueira, H.A.A., Barros, R., Silva, P.A.F., 2016. Resistance monitoring of *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Plutellidae) to risk-reduced insecticides and cross resistance to spinetoram. Phytoparasitica 44, 631–640. doi:10.1007/s12600-016-0553-y
- Markussen, M.D., Kristensen, M., 2012. Spinosad resistance in female *Musca domestica* L. from a field-derived population. Pest Manag. Sci. 68, 75–82. doi:10.1002/ps.2223
- Martin, T., Chandre, F., Ochou, O., Vaissayre, M., Fournier, D., 2002. Pyrethroid resistance mechanisms in the cotton bollworm *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) from West Africa. Pestic. Biochem. Physiol. 74, 17–26. doi:10.1016/S0048-3575(02)00117-7
- McDougall, P., 2016. The Cost of new agrochemical product discovery , development and registration in 1995 , 2000 and R & D expenditure in 2007 and expectations for 2012 final report a consultancy study for crop life america and the european crop protection association januar.
- Metcalf, R.L., 1980. Changing role of insecticides in crop protection. Annu. Rev. Entomol. 25, 219–256. doi:10.1146/annurev.en.25.010180.001251
- Mota-Sanchez, D., Hollingworth, R.M., Grafius, E.J., Moyer, D.D., 2006. Resistance and cross-resistance to neonicotinoid insecticides and spinosad in the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata* (Say) (Coleoptera: Chrysomelidae). Pest Manag. Sci. 62, 30–37. doi:10.1002/ps.1120
- Reyes, M., Rocha, K., Alarcón, L., Siegwart, M., Sauphanor, B., 2012. Metabolic mechanisms involved in the resistance of field populations of *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) to spinosad. Pestic. Biochem. Physiol. 102, 45–50. doi:10.1016/j.pestbp.2011.10.008

- Roe, R.M., Young, H.P., Iwasa, T., Wyss, C.F., Stumpf, C.F., Sparks, T.C., Watson, G.B., Sheets, J.J., Thompson, G.D., 2010. Mechanism of resistance to spinosyn in the tobacco budworm, *Heliothis virescens*. *Pestic. Biochem. Physiol.* 96, 8–13. doi:10.1016/j.pestbp.2009.08.009
- Roush, R.T., McKenzie, J.A., 1987. Ecological genetics of insecticide and acaricide resistance. *Annu. Rev. Entomol.* 361–380.
- Salgado, V.L., 1998. Studies on the mode of action of spinosad: insect symptoms and physiological correlates. *Pestic. Biochem. Physiol.* 60, 91–102. doi:10.1006/pest.1998.2332
- SAS Institute, 2002. SAS user's guide statistics.
- Sims, S.B., Greenplate, J.T., Stone, T.B., Caprio, M.A., Gould, F.L., 1996. Monitoring strategies for early detection of Lepidoptera resistance to *Bacillus thuringiensis* insecticidal proteins. pp. 229–242. doi:10.1021/bk-1996-0645.ch023
- Sparks, T.C., 2013. Insecticide discovery: an evaluation and analysis. *Pestic. Biochem. Physiol.* 107, 8–17. doi:10.1016/j.pestbp.2013.05.012
- Sparks, T.C., Crouse, G.D., Dripps, J.E., Anzeveno, P., Martynow, J., DeAmicis, C. V., Gifford, J., 2008. Neural network-based QSAR and insecticide discovery: spinetoram. *J. Comput. Aided. Mol. Des.* 22, 393–401. doi:10.1007/s10822-008-9205-8
- Sparks, T.C., Crouse, G.D., Durst, G., 2001. Natural products as insecticides: the biology, biochemistry and quantitative structure-activity relationships of spinosyns and spinosoids. *Pest Manag. Sci.* 57, 896–905. doi:10.1002/ps.358
- Sparks, T.C., Dripps, J.E., Watson, G.B., Paroonagian, D., 2012. Resistance and cross-resistance to the spinosyns – A review and analysis. *Pestic. Biochem. Physiol.* 102, 1–10. doi:10.1016/j.pestbp.2011.11.004
- Specht, A., Sosa-Gómez, D.R., Paula-Moraes, S.V. de, Yano, S.A.C., 2013. Identificação morfológica e molecular de *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) e ampliação de seu registro de ocorrência no Brasil. *Pesqui. Agropecuária Bras.* 48, 689–692. doi:10.1590/S0100-204X2013000600015
- Wang, D., Qiu, X., Ren, X., Niu, F., Wang, K., 2009. Resistance selection and biochemical characterization of spinosad resistance in *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae). *Pestic. Biochem. Physiol.* 95, 90–94. doi:10.1016/j.pestbp.2009.07.003

- Wang, W., Mo, J., Cheng, J., Zhuang, P., Tang, Z., 2006. Selection and characterization of spinosad resistance in *Spodoptera exigua* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae). Pestic. Biochem. Physiol. 84, 180–187. doi:10.1016/j.pestbp.2005.07.002
- Zhao, J.-Z., Collins, H.L., Li, Y.-X., Mau, R.F.L., Thompson, G.D., Hertlein, M., Andaloro, J.T., Boykin, R., Shelton, a M., 2006. Monitoring of Diamondback Moth (Lepidoptera: Plutellidae) resistance to spinosad, indoxacarb, and emamectin benzoate. J. Econ. Entomol. 99, 176–181. doi:10.1603/0022-0493(2006)099[0176:MODMLP]2.0.CO;2

4 CARACTERIZAÇÃO DO PADRÃO DE HERANÇA DA RESISTÊNCIA *Helicoverpa armigera* (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE) A FLUBENDIAMIDE E DA RESISTÊNCIA CRUZADA A OUTRAS DIAMIDAS

Resumo

Informações sobre as bases genéticas da resistência de insetos a inseticidas e as relações de resistência cruzada entre inseticidas são importantes na implementação de programas de manejo da resistência de insetos. Nesse estudo, foram conduzidos estudos para avaliar o padrão de herança da resistência de *Helicoverpa armigera* (Hübner) ao flubendiamide e a relação de resistência cruzada com outros inseticidas diamidas. Os valores de DL_{50} (IC 95%) foram de 0,042 (0,037 - 0,050) μg de flubendiamide/ cm^2 para linhagem suscetível e de 75,14 (59,00 - 98,77) μg flubendiamide/ cm^2 para a linhagem resistente. A razão de resistência foi de aproximadamente 1770 vezes. Foram verificadas a presença de baixa resistência cruzada entre flubendiamide e as diamidas chlorantraniliprole e cyantraniliprole. Baseado nos cruzamentos recíprocos entre as linhagens suscetível e resistente a flubendiamide, o padrão de herança da resistência de *H. armigera* a flubendiamide é autossômico e incompletamente dominante. Retrocruzamentos da progênie dos cruzamentos recíprocos com o parental suscetível revelou que a resistência é monogênica. O padrão de herança da resistência incompletamente dominante e a presença de resistência cruzada entre os inseticidas diamidas são fatores que favorecem a evolução da resistência. Portanto, a implementação de programas de manejo da resistência de insetos é urgente para que inseticidas diamidas sejam consideradas como opções viáveis no manejo de *H. armigera* no Brasil.

Palavras-chave: *Helicoverpa armigera*; Herança; Diamidas; Flubendiamide; Manejo de resistência de insetos

Abstract

Understanding the genetic basis of insect resistance to insecticides and cross-resistance among insecticides is important to implement insect resistance management programs. In this study, we evaluated the inheritance of *Helicoverpa armigera* (Hübner) resistance to flubendiamide and cross-resistance to other diamide insecticides. The estimated DL_{50} (CI 95%) was 0.042 (0.037 – 0.050) μg of flubendiamide/ cm^2 for the susceptible strain and 75.14 (59.00 – 98.77) μg flubendiamide/ cm^2 for the flubendiamide-resistant strain. The resistance ratio was $\approx$ 1,770-fold. A low cross-resistance was detected between flubendiamide and other diamides (chlorantraniliprole and cyantraniliprole). Based on reciprocal crosses between susceptible and flubendiamide-resistant strains, the inheritance of *H. armigera* resistance to flubendiamide is autosomal and incompletely dominant. Backcrosses of the progenies from reciprocal crosses to the susceptible strain revealed that the resistance of *H. armigera* to flubendiamide is monogenic. The incomplete dominance of *H. armigera* resistance to flubendiamide and the presence of cross-resistance among diamide insecticides are factors favoring resistance evolution. Therefore, implementation of insect resistance management programs is urgent to preserve the lifetime of diamide insecticides as a viable option for managing *H. armigera* in Brazil.

Keywords: *Helicoverpa armigera*; Inheritance; Diamides; Flubendiamide; Insect resistance management

4.1 Introdução

O conhecimento do padrão de herança da resistência de pragas a inseticidas é de fundamental importância para programas de monitoramento da resistência e análise de risco de evolução de resistência em condições de campo (Georghiou and Taylor, 1977; Roush and McKenzie, 1987; Sayyed et al., 2000). O grau de dominância da resistência afeta profundamente as estratégias de manejo da resistência aos inseticidas utilizados no controle de uma determinada praga (Tabashnik et al., 1997).

Após vários relatos de *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) resistente a inseticidas convencionais (Bird, 2016; Gunning et al., 1992, 1984; Wang et al., 2010), uma alternativa para o controle desta praga tem sido a utilização de inseticidas do grupo das diamidas. No Brasil, os inseticidas diamidas têm sido muito utilizados no controle de *H. armigera*, devido a sua alta eficácia, a elevada margem de segurança a mamíferos e organismos não alvos (Ebbinghaus-Kintscher et al., 2006; Teixeira and Andalaro, 2013), e principalmente ao seu modo de ação distinto dos demais inseticidas, ou seja, atuando como moduladores de receptores de rianodina (Sattelle et al., 2008). A utilização intensa de inseticidas diamidas contribuiu para o relato de algumas falhas de controle de *H. armigera* no Brasil com o uso desses inseticidas.

Apesar de as diamidas serem um grupo de inseticidas recente no controle de muitas espécies de Lepidoptera (Lahm et al., 2009), já existem vários casos de resistência reportados, tais como em *Spodoptera exigua* a chlorantraniliprole na China (Lai et al., 2011); de *Plutella xylostella* (L.) a chlorantraniliprole e flubendiamide nas Filipinas, Tailândia (Trocza et al., 2012) e Brasil (Ribeiro et al., 2014); de *Adoxophyes honmai* no Japão (Uchiyama and Ozawa, 2014); *Chilo suppressalis* na China (Wu et al., 2014); e *Tuta absoluta* na Itália e na Grécia (Roditakis et al., 2015). Além destes, na China foram realizados estudos de seleção de linhagens resistentes de *P. xylostella* em laboratório a cyantraniliprole (Liu et al., 2015a). Ainda não existem relatos de resistência cruzada ou múltipla dos inseticidas diamidas com outros grupos inseticidas (Jeanguenat, 2013).

No presente estudo foi realizado a seleção de uma linhagem de *H. armigera* resistente ao inseticida flubendiamide para (i) caracterizar a resistência de *H. armigera* ao inseticida flubendiamide; (ii) verificar se há resistência cruzada com os outros inseticidas do grupo diamidas; e (iii) calcular o grau de dominância e o número de genes associados à resistência de *H. armigera* a flubendiamide.

4.2 Material e métodos

4.2.1 Linhagens de *H. armigera* suscetível e resistente a flubendiamide

A linhagem suscetível de referência (SUS) foi obtida a partir da população BA 33 (Tabela 2.1) coletada em áreas de produção de feijão do município de Luiz Eduardo Magalhães – Bahia em setembro de 2013, e mantida no Laboratório de Resistência de Artrópodes a Táticas de Controle (ESALQ-USP) na ausência da pressão de seleção com inseticidas por 28 gerações. A linhagem resistente a flubendiamide (FBD-R) foi obtida a partir da seleção de lagartas sobreviventes com a dose diagnóstica (DL_{99}) de 2,64 $\mu\text{g i.a./cm}^2$ de flubendiamide por cinco gerações, a partir de uma população BA 69 (Tabela 2.3) coletada em áreas comerciais de produção de soja do município de Luiz Eduardo Magalhães – Bahia em janeiro de 2016.

A manutenção das linhagens de *H. armigera* em laboratório na fase larval foi realizada com a utilização de dieta artificial (Greene et al. 1976). Ao atingirem a fase de pupa, estas eram retiradas da dieta, desinfetadas com solução de sulfato de cobre a 0,65% e acondicionadas em gaiolas cilíndricas de PVC (30 cm altura $\times$ 25 cm de diâmetro), revestidas internamente com papel sulfite branco e fechadas na parte superior com tecido tipo “tule” para a emergência de adultos e a realização das posturas. As posturas eram retiradas a cada dois dias, acondicionadas em copos plásticos transparentes de 500 mL e mantidas em câmaras climatizadas reguladas à temperatura de 25°C e fotofase 14h até a eclosão das lagartas.

As lagartas recém-eclodidas eram transferidas com auxílio de um pincel esterilizado para copos plásticos transparentes de 100 mL contendo dieta artificial (Greene et al. 1976), num total de 20 lagartas por copo. Ao atingirem terceiro instar, as lagartas da linhagem SUS eram individualizadas em copos plásticos de 50 mL com dieta artificial (Greene et al. 1976) até a fase de pupa. As lagartas de terceiro

instar da linhagem FBD-R eram submetidas aos bioensaios de ingestão com o inseticida flubendiamide (Belt®, Bayer CropSciences) (480 g a.i./l), utilizando-se a dose diagnóstica de 2,64 µg i.a./cm². Após 96 horas, as lagartas sobreviventes eram resgatadas e inoculadas individualmente em copos plásticos de 50 mL com dieta artificial até a fase de pupa.

4.2.2 Caracterização da resistência de *H. armigera* a flubendiamide

Para a caracterização da resistência de *H. armigera* a flubendiamide foram realizados bioensaios com o tratamento superficial da dieta para a obtenção de uma curva dose-resposta a flubendiamide para as linhagens SUS e FBD-R. Os bioensaios de foram conduzidos em placas de acrílico de 24 células (Costar®), com 1,25 mL de dieta artificial por célula e a aplicação de 30 µL da solução inseticida na concentração do inseticida a ser testada em cada placa com o auxílio de uma micropipeta automática. O inseticida foi diluído em água destilada e surfactante Triton® na concentração de 0,1%. O tratamento controle foi realizado apenas com água destilada e o surfactante Triton® na concentração de 0,1%. Para cada linhagem foram testadas de oito a dez concentrações distribuídas logaritmicamente, que proporcionaram uma mortalidade entre 5 e 95% em lagartas de terceiro instar e 48 lagartas por concentração. Após a secagem das placas, estas foram infestadas com lagartas de terceiro instar e mantidas em câmaras climatizadas com temperatura de 25± 2°C e fotofase de 14h.

Após 96 horas, foram realizadas as avaliações da mortalidade. O critério de resposta foi considerar morto as lagartas que não apresentavam movimentos vigorosos após serem tocados nos últimos segmentos abdominais com uma pinça. Os dados de mortalidade foram corrigidos pela formula de Abbott (Abbott, 1925) e submetidos à análise de Probit no programa Polo-Plus (LeOra-Software, 2002) para a estimativa das doses letais (DL₅₀ e DL₉₀). A razão de resistência foi calculada pela divisão da DL₅₀ da linhagem FBD-R pela DL₅₀ da linhagem SUS.

4.2.3 Resistencia cruzada de flubendiamide a outras diamidas

Para avaliar o potencial de *H. armigera* ter resistência cruzada de flubendiamide a chlorantraniliprole (Premio®, DuPont) (200 g a.i./l) e cyantraniliprole (Cyazypyr®, DuPont) (100 g a.i./l) foram realizadas bioensaios de caracterização da suscetibilidade das linhagens SUS e FBD-R a estes inseticidas conforme descrito anteriormente no item 4.2.2 As razões de resistência para cada inseticida foram calculadas pela divisão da DL₅₀ da linhagem FBD-R pela DL₅₀ da linhagem SUS.

4.2.4 Padrão de herança da resistência de *H. armigera* a flubendiamide

Para a determinação do padrão da herança da resistência de *H. armigera* a flubendiamide, as pupas das linhagens SUS e FBD-R foram separadas por sexo e mantidas em placas de Petri. Após a emergência dos adultos, foram realizados os cruzamentos recíprocos entre as linhagens SUS e FBD-R para a obtenção dos heterozigotos (H₁), ♀ FBD-R X ♂ SUS e ♀ SUS X ♂ FBD-R. Os cruzamentos foram realizados em gaiolas de PVC (30 cm altura por 25 cm de diâmetro), revestidas internamente com papel sulfite branco e fechadas na parte superior com tecido tipo “tule” para realizarem as posturas. As progênie dos cruzamentos recíprocos foram submetidas a bioensaios de caracterização das curvas de dose-resposta a flubendiamide para a estimativa da DL₅₀, seguindo a mesma metodologia apresentada no item 4.2.2. A possibilidade de a herança ser ou não autossômica foi verificada mediante a análise dos resultados dos cruzamentos recíprocos.

4.2.5 Grau de dominância (D) e dominância (D_{ML}) da resistência

O grau de dominância foi estimado com base nas curvas concentração-resposta da geração F₁ e linhagens parentais com base no método descrito por (Stone 1968).

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

Os coeficientes X_F , X_R e X_S são os logaritmos das DL_{50} estimadas a partir das linhagens híbrida, FBD-R e SUS. Valores de D próximos a -1 ($D = -1$) será admitido como herança completamente recessiva. Valores próximos a 1 ($D = 1$) será considerada como uma resistência completamente dominante.

Além do método proposto por Stone (1968) foi obtido o grau médio de dominância a partir da equação proposta por Bourguet et al. 2000:

$$D_{ML} = \frac{(ML_{RS} - ML_{SS})}{(ML_{RR} - ML_{SS})}$$

Sendo: ML_{RR} , ML_{SS} e ML_{RS} as mortalidades das linhagens FBD-R, SUS e heterozigoto. Para valores de D próximo a 0 ($D = 0$), considera a herança completamente recessiva e para valores de D próximo a 1 ($D = 1$) considera herança completamente dominante 1 (Bourguet et al. 2000).

4.2.6 Número de genes relacionados à resistência a flubendiamide

Para estimar o número de genes relacionados à resistência foram realizados retrocruzamentos da progênie F_1 com o parental que apresentou o fenótipo mais distinto de F_1 , neste caso com a linhagem SUS (Tsukamoto 1983, Roush and Daly 1990). A herança monogênica será avaliada a partir do teste qui-quadrado (Sokal and Rohlf 1995):

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

A variável Ni representa o número de mortos na concentração i , p a mortalidade esperada calculada a partir do modelo mendeliano [2] (Georghiou 1969), ni número de indivíduos testados e $q = 1 - p$.

$$p = \frac{a+b}{2}$$

Sendo, a porcentagem de mortalidade da linhagem heterozigota, b porcentagem de mortalidade da linhagem suscetível em determinada concentração.

A hipótese de herança monogênica será rejeitada quando o χ^2 calculado $\geq \chi^2$ tabelada a 1 grau de liberdade. Para se estimar o número de loci e o efeito aditivo de genes que contribui para a resistência de *H. armigera* a flubendiamide utilizou-se o método proposto por Lande 1981.

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

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

4.3 Resultados

4.3.1 Caracterização da resistência de *H. armigera* a flubendiamide

A linhagem resistente de *H. armigera* a flubendiamide apresentou razão de resistência de 1770,06 (1309,68 - 2392,28) vezes em relação a linhagem suscetível, rejeitou-se a hipótese de igualdade ($\chi^2 = 246,0$, g.l. = 2, $P < 0,05$) e a hipótese de paralelismo ($\chi^2 = 50,29$, g.l. = 1, $P < 0,05$). Os valores de DL_{50} foram de 0,042 (0,037 - 0,050) $\mu\text{g i.a./cm}^2$ para linhagem SUS e de 75,14 (59,00 - 98,77) $\mu\text{g i.a./cm}^2$ para a linhagem FBD-R. Os cruzamentos recíprocos não apresentaram diferenças significativas entre os valores de DL_{50} , variando de 10,16 (6,34 - 13,93) $\mu\text{g i.a./cm}^2$ para o cruzamento ♀ SUS X ♂ FBD-R a 13,08 (10,04 - 16,54) $\mu\text{g i.a./cm}^2$ para o cruzamento ♀ FBD-R X ♂ SUS. Os valores de DL_{50} dos heterozigotos foram significativamente superior ao valor de DL_{50} da linhagem SUS e obteve razões de resistência de 239,21 (159,27 - 359,27) vezes para ♀ SUS X ♂ FBD-R em relação a população SUS, rejeitou-se a hipótese de igualdade ($\chi^2 = 160,0$, g.l. = 2, $P < 0,05$) e a hipótese de paralelismo ($\chi^2 = 19,63$, g.l. = 1, $P < 0,05$) e 308,18 (230,08 - 412,79) vezes para ♀ FBD-R X ♂ SUS em relação a SUS, rejeitou-se a hipótese de igualdade ($\chi^2 = 230,0$, g.l. = 2, $P < 0,05$) e a hipótese de paralelismo ($\chi^2 = 25,64$, g.l. = 1, $P < 0,05$). Devido às sobreposições dos intervalos de confiança das DL_{50} dos

cruzamentos recíprocos não se rejeitou a hipótese de igualdade ($\chi^2 = 2,82$, g.l. = 2, $P = 0,24$) e a hipótese de paralelismo ($\chi^2 = 0,03$, g.l. = 1, $P = 0,856$) o que permite afirmar que os genes relacionados a resistência estão situados em regiões autossômicas e não em cromossomos determinantes do sexo ou herança maternal (Figura 4.1 e Tabela 4.1).

4.3.2 Resistencia cruzada de flubendiamide a outras diamidas

O inseticida chlorantraniliprole apresentou valores de DL_{50} igual a 0,022 (0,018 - 0,027) $\mu\text{g i.a./cm}^2$ para linhagem SUS e 0,29 (0,22 - 0,37) $\mu\text{g i.a./cm}^2$ para a linhagem FBD-R. A razão de resistência foi de 12,94 (9,41 - 17,80) vezes, rejeitou se a hipótese de igualdade ($\chi^2 = 135,0$, g.l. = 2, $P < 0,05$) e a hipótese de paralelismo ($\chi^2 = 32,62$, g.l. = 1, $P < 0,05$). O inseticida cyantraniliprole apresentou as DL_{50} de 0,067 (0,055 - 0,078) $\mu\text{g i.a./cm}^2$ para linhagem SUS e de 0,30 (0,23 - 0,38) $\mu\text{g i.a./cm}^2$ para a linhagem FBD-R. A razão de resistência foi de 4,45 (3,29 - 6,02) vezes, rejeitou se a hipótese de igualdade ($\chi^2 = 103,0$, g.l. = 2, $P < 0,05$) e a hipótese de paralelismo ($\chi^2 = 36,49$, g.l. = 1, $P < 0,05$). Os intervalos de confiança a 95% de ambas as linhagens não se sobrepõem para os dois inseticidas testados, isto evidencia são diferentes a estes inseticidas e comprova a possibilidade de que a linhagem FBD-R possui uma baixa resistência cruzada aos inseticidas chlorantraniliprole e cyantraniliprole (Tabela 4.2).

Figura 4.1 Dose-mortalidade das linhagens de *Helicoverpa armigera* suscetível (SUS), resistente a flubendiamide (FBD-R) e heterozigotos ao inseticida flubendiamide em bioensaio de aplicação na superfície da dieta artificial.

Tabela 4.1 Dose-mortalidade das linhagens de *Helicoverpa armigera* suscetível (SUS), resistente a flubendiamide (FBD-R) e heterozigotos ao inseticida flubendiamide em bioensaio de aplicação na superfície da dieta artificial.

População	n ¹	Coefficiente angular ($\pm$ EPM ⁴)	DL ₅₀ (IC 95%) ²	DL ₉₀ (IC 95%) ³	χ^2 (g.l.) ⁵	RR (IC 95%) ⁶
SUS	333	3,03 $\pm$ 0,31	0,042 (0,037 - 0,050)	0,113 (0,09 - 0,16)	1,90 (4)	-
♀ SUS X ♂ FBD-R	519	1,45 $\pm$ 0,22	10,16 (6,34 - 13,93)	78,16 (53,85 - 142,85)	2,74 (5)	239,21 (159,27 - 359,27)
♀ FBD-R X ♂ SUS	691	1,4 $\pm$ 0,15	13,08 (10,04 - 16,54)	107,37 (73,88 - 183,36)	3,68 (9)	308,18 (230,08 - 412,79)
FBD-R	742	0,98 $\pm$ 0,08	75,14 (59,00 - 98,77)	1516,58 (879,05 - 3170,39)	5,79 (7)	1770,06 (1309,68 - 2392,28)

¹ número de insetos testados; ² Dose letal 50 (μ g i.a./cm²) e intervalo de confiança a 95%; ³ Dose letal 90 (μ g i.a./cm²) e intervalo de confiança a 95%; ⁴ Erro padrão da média; ⁵ valor do qui-quadrado calculado e grau de liberdade (g.l.); ⁶ razão de resistência.

Tabela 4.2 Dose-mortalidade das linhagens de *Helicoverpa armigera* suscetível (SUS) e resistente a flubendiamide (FBD-R) aos inseticidas chlorantraniliprole e cyantraniliprole em bioensaio de aplicação na superfície da dieta artificial.

Ingrediente Ativo	População	n ¹	Coefficiente angular ($\pm$ EPM ⁴)	DL ₅₀ (IC 95%) ²	DL ₉₀ (IC 95%) ³	χ^2 (g.l.) ⁵	RR (IC 95%) ⁶
Cyantraniliprole	SUS	370	3,12 $\pm$ 0,39	0,067 (0,055 - 0,078)	0,17 (0,14 - 0,22)	0,59 (5)	-
	FBD-R	565	1,31 $\pm$ 0,11	0,30 (0,23 - 0,38)	2,83 (2,06 - 4,31)	4,00 (9)	4,45 (3,29 - 6,02)
Chlorantraniliprole	SUS	329	2,97 $\pm$ 0,35	0,022 (0,018 - 0,027)	0,06 (0,05 - 0,08)	2,50 (4)	-
	FBD-R	677	1,20 $\pm$ 0,09	0,29 (0,22 - 0,37)	3,34 (2,44 - 4,95)	3,74 (9)	12,94 (9,41 - 17,80)

¹ número de insetos testados; ² Dose letal 50 (μ g i.a./cm²) e intervalo de confiança a 95%; ³ Dose letal 90 (μ g i.a./cm²) e intervalo de confiança a 95%; ⁴ Erro padrão da média; ⁵ valor do qui-quadrado calculado e grau de liberdade (g.l.); ⁶ razão de resistência.

4.3.3 Grau de dominância (D) e dominância (D_{ML}) da resistência

O grau de dominância calculado pelo método proposto de Stone (1968) variou entre 0,47 e 0,53, e significa que a resistência de *H. armigera* a flubendiamide é incompletamente dominante. De acordo com a metodologia proposta por Bourguet et al. (2000) a herança pode ser considerada incompletamente dominante nas doses mais baixas até a dose de 15,71 µg i.a./cm², que corresponde a seis vezes da dose de campo de flubendiamide recomendada para o controle de *H. armigera* em cultivos de soja no Brasil (Tabela 4.3 e Figura 4.2).

Tabela 4.3 Efeito da dominância da resistência de *Helicoverpa armigera* a flubendiamide em função da dose testada.

Dose	SUS	FBD-R	♀ SUS X ♂ FBD-R	♀ FBD-R X ♂ SUS		
(µg i.a./cm ²)	Mortalidade (%)	Mortalidade (%)	Mortalidade (%)	Dominância (D)	Mortalidade (%)	Dominância (D)
0,05	56,25	0,00	4,17	0,93	6,67	0,88
0,09	82,95	0,00	18,80	0,77	6,63	0,92
0,16	100,00	0,00	22,92	0,77	6,82	0,93
0,28	100,00	0,00	13,21	0,87	6,82	0,93
0,50	100,00	0,00	35,21	0,65	15,83	0,84
0,88	100,00	0,00	28,75	0,71	19,91	0,80
1,57	100,00	4,78	37,55	0,66	25,88	0,78
2,83	100,00	10,76	41,54	0,66	24,89	0,84
5,03	100,00	11,53	47,82	0,59	36,25	0,72
8,80	100,00	25,83	53,50	0,63	41,67	0,79
15,71	100,00	27,36	63,59	0,50	52,44	0,65
28,27	100,00	35,33	72,08	0,43	69,48	0,47

Figura 4.2 Efeito da dominância da resistência de *Helicoverpa armigera* a flubendiamide em função da dose testada.

4.3.4 Número genes relacionados à resistência a flubendiamide

A partir da mortalidade observada e esperada de indivíduos provenientes dos retrocruzamentos das linhagens heterozigotas com o parental que apresentou o fenótipo mais distinto (SUS), rejeitou-se a hipótese da herança da resistência possuir efeito poligênico (Tabela 4.4). Os valores de qui-quadrado foram significativos na dose 1,57 µg de flubendiamide/cm² o que poderia se caracterizar como herança poligênica. Na dose de 2,67 µg de flubendiamide/cm², dose diagnóstica utilizada nos ensaios de monitoramento da resistência e corresponde a dose de campo de flubendiamide para o controle de *H. armigera* no Brasil, dois retrocruzamentos apresentam herança poligênica e os outros dois retrocruzamentos herança monogênica. Na dose 5,03 µg de flubendiamide/cm², todos os retrocruzamentos se caracterizam como herança monogênica. A estimativa do número mínimo de segregações independentes foi entre 1,16 a 3,44, sugerindo que o número de loci associado a resistência de *H. armigera* a flubendiamide é baixo.

Tabela 4.4 Análise de χ^2 da mortalidade de retrocruzamentos entre a linhagem SUS e a progênie F₁ (cruzamentos recíprocos entre as linhagens SUS e FBD-R) de *Helicoverpa armigera* para três doses de flubendiamide.

Dose ($\mu\text{g i.a./cm}^2$)	♂ SUS X ♀ (♀ SUS X ♂ FBD-R)				♀ SUS X ♂ (♀ SUS X ♂ FBD-R)				♀ SUS X ♂ (♀ FBD-R X ♂ SUS)				♂ SUS X ♀ (♀ FBD-R X ♂ SUS)			
	^a Obs.	^b Esp.	χ^2	^c p	^a Obs.	^b Esp.	χ^2	^c p	^a Obs.	^b Esp.	χ^2	^c p	^a Obs.	^b Esp.	χ^2	^c p
1,57	52,56	67,80	22,87*	0,00	51,63	67,80	25,74*	0,00	50,80	62,88	11,68*	0,00	53,29	62,88	11,98*	0,00
2,67	58,33	70,75	19,68*	0,00	64,84	70,75	8,33*	0,00	57,34	62,50	3,33	0,07	61,97	62,50	0,04	0,84
5,03	70,43	73,39	0,83	0,36	78,68	73,39	3,70	0,05	67,96	68,25	0,01	0,93	69,02	68,25	0,07	0,79

^a mortalidade observada; ^b mortalidade esperada baseada na herança Mendeliana; ^c Diferença significativa ($P < 0,05$, graus de liberdade = 1) entre a mortalidade observada e a esperada.

4.4 Discussão

Helicoverpa armigera apresentou uma alta razão de resistência a flubendiamide, ou seja, de 1770,06 vezes. Outras espécies também apresentaram altas razões de resistência ao inseticida flubendiamide como *P. xylostella* na China, com razão de resistência de 1779,24 vezes (Yan et al. 2014) e *T. absoluta* na Itália, com razão de resistência de 1742 vezes (Roditakis et al. 2015).

A linhagem FBD-R apresentou também baixa resistência cruzada aos inseticidas chlorantraniliprole e cyantraniliprole. O conhecimento deste fato fornece subsídios para a adoção de medidas proativas de manejo da resistência de *H. armigera* no campo com a finalidade de retardar a ocorrência desta no campo e assim prolongar a vida útil destes inseticidas no campo. Além de *H. armigera*, outras espécies como *P. xylostella* nas Filipinas (Trocza et al., 2012), na China (Liu et al., 2015b) e no Brasil (Ribeiro et al., 2017), *T. absoluta* na Itália e no Brasil (Roditakis et al., 2015; Silva et al., 2016) apresentaram resistência cruzada a inseticidas do grupo diamidas.

Os cruzamentos recíprocos confirmaram que o padrão de herança da resistência de *H. armigera* a flubendiamide é autossômico e dominante. A dominância pelo método proposto Bourguet et al. (2000) revela que a herança é dominante ou parcialmente dominante nas doses mais baixas até a dose de 15,71 $\mu\text{g i.a./cm}^2$, equivalente a seis vezes a dose de campo recomendada para o controle de *H. armigera* com o inseticida flubendiamide para a cultura da soja no Brasil. A dose diagnóstica, 2,67 $\mu\text{g i.a./cm}^2$, utilizada nos ensaios de monitoramento e para seleção da linhagem FBD-R é igual a dose de campo de flubendiamide recomendada para o controle de *H. armigera* no Brasil. Ambas as doses não são discriminatórias, permitem a sobrevivência de indivíduos heterozigotos os quais contribuem com maior rapidez do processo de evolução da resistência de *H. armigera* a flubendiamide.

Além de dominante, a resistência de *H. armigera* a flubendiamide foi caracterizada como monogênica nas doses maiores que 2,67 $\mu\text{g i.a./cm}^2$. Este fato é justificável por se tratar de um inseticida pertencente ao grupo mais novo de inseticidas disponíveis no mercado para o controle de várias espécies de pragas, em especial da ordem Lepidoptera, de modo que mudanças sutis no sítio de ação

possam conferir altos níveis de resistência e possam ser controlado por poucos loci (Roush and McKenzie 1987).

Padrões de herança semelhantes ao que foi encontrado para *H. armigera* no Brasil a flubendiamide já foram observados para outros inseticidas ou proteínas Bt. Na Índia, foi detectado *H. armigera* com resistência autossômica, herança semidominante e monogênica a proteína Cry1Ac expressa em algodão Bt (Kranthi et al. 2006). Na África, a caracterização da resistência a piretroides foi autossômica, dominante ou incompletamente dominante e conferida por um único gene (Achaleke and Brévault 2009). Na Austrália, uma linhagem de *H. armigera* apresentou uma razão de resistência a indoxacarb de 173 vezes em relação a linhagem suscetível, e a herança foi caracterizada como herança autossômica, incompletamente dominante e conferida por um ou poucos genes (Bird 2016).

O padrão de herança observado neste trabalho possui implicações significativas para estratégias de manejo da resistência, principalmente na taxa de desenvolvimento da resistência. A taxa de variação na frequência de alelos resistentes em populações de campo ao longo do tempo depende em grande parte da pressão de seleção pelo inseticida flubendiamide e é influenciada pelo padrão de herança.

Se a herança fosse recessiva, o controle de *H. armigera* seria eficaz com a utilização de doses elevadas de flubendiamide no campo, pois espera-se que os alelos resistentes sejam raros em populações de campo e estariam presentes predominantemente como genótipos heterozigotos no equilíbrio de Hardy-Weinberg. Mas, as alterações temporais que resultam numa redução da eficiência do produto podem ajudar os indivíduos heterozigóticos a superar o efeito inseticida e, assim, espalhar alelos resistentes. A natureza dominante do alelo resistente em *H. armigera* permite a sobrevivência de um número significativo de genótipos homozigotos resistentes e heterozigotos (Kranthi et al. 2006). Além disso, se os heterozigotos tiverem uma vantagem adaptativa no campo sobre insetos homozigotos para o alelo de suscetibilidade, o desenvolvimento de resistência será acelerado (Curtis 1981).

Em resumo, os resultados deste trabalho sugerem que os genes resistentes podem se espalhar rapidamente nas populações de campo pelo fato de que os fenótipos "RR" e "RS" sobrevivem na dose recomendada no campo, contribuindo para o rápido aumento da frequência de resistência de flubendiamide observada em populações de campo ao longo do tempo. A adoção de medidas inadequadas no

manejo da resistência de *H. armigera* no Brasil pode comprometer não apenas a utilização de flubendiamide mas, os inseticidas chlorantraniliprole e cyantraniliprole pela possibilidade de ocorrer resistência cruzada conforme verificado no presente estudo.

4.5 Conclusões

- A razão de resistência de *H. armigera* ao inseticida flubendiamide foi alta ($\approx$ 1700 vezes).
- A resistência de *H. armigera* a flubendiamide conferiu baixa resistência cruzada a chlorantraniliprole e cyantraniliprole.
- O padrão de herança da resistência de *H. armigera* a flubendiamide foi autossômica, monogênica e incompletamente dominante.

Referências

- Abbott, W.S., 1925. A method of computing the effectiveness of an insecticide. J. Econ. Entomol. 18, 265 – 267.
- Achaleke, J., Brévault, T., 2009. Inheritance and stability of pyrethroid resistance in the cotton bollworm *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) in Central Africa. Pest Manag. Sci. 66, n/a–n/a. doi:10.1002/ps.1843
- Bird, L.J., 2016. Genetics, cross-resistance and synergism of indoxacarb resistance in *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). Pest Manag. Sci. 73, 575–581. doi:10.1002/ps.4334
- Bourguet, D., Genissel, A., Raymond, M., 2000. Insecticide resistance and dominance levels. J. Econ. Entomol. 93, 1588–1595. doi:10.1603/0022-0493-93.6.1588
- Curtis, C.F., 1981. Possible methods of inhibiting or reversing the evolution of insecticide resistance in mosquitoes. Pestic. Sci. 12, 557–564. doi:10.1002/ps.2780120513

- Ebbinghaus-Kintscher, U., Luemmen, P., Lobitz, N., Schulte, T., Funke, C., Fischer, R., Masaki, T., Yasokawa, N., Tohnishi, M., 2006. Phthalic acid diamides activate ryanodine-sensitive Ca^{2+} release channels in insects. *Cell Calcium* 39, 21–33. doi:10.1016/j.ceca.2005.09.002
- Georghiou, G.P., 1969. Genetics of resistance to insecticides in houseflies and mosquitoes. *Exp. Parasitol.* 26, 224–255.
- Georghiou, G.P., Taylor, C.E., 1977. Genetic and biological influences in the evolution of insecticide resistance. *J. Econ. Entomol.* 70, 319–323. doi:10.1093/jee/70.3.319
- Greene, G.L., Leppla, N.C., Dickerson, W.A., 1976. Velvetbean Caterpillar: A rearing procedure and artificial medium. *J. Econ. Entomol.* 69, 487–488. doi:10.1093/jee/69.4.487
- Gunning, R. V., Balfe, M.E., Easton, C.S., 1992. Carbamate resistance in *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) in Australia. *Aust. J. Entomol.* 31, 97–103. doi:10.1111/j.1440-6055.1992.tb00464.x
- Gunning, R. V., Easton, C.S., Greenup, L.R., Edge, V.E., 1984. Pyrethroid resistance in *Heliothis armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) in Australia. *J. Econ. Entomol.* 77, 1283–1287. doi:10.1093/jee/77.5.1283
- Jeanguenat, A., 2013. The story of a new insecticidal chemistry class: the diamides. *Pest Manag. Sci.* 69, 7–14. doi:10.1002/ps.3406
- Kranthi, K.R., Dhawad, C.S., Naidu, S.R., Mate, K., Behere, G.T., Wadaskar, R.M., Kranthi, S., 2006. Inheritance of resistance in Indian *Helicoverpa armigera* (Hübner) to Cry1Ac toxin of *Bacillus thuringiensis*. *Crop Prot.* 25, 119–124. doi:10.1016/j.cropro.2005.03.011
- Lahm, G.P., Cordova, D., Barry, J.D., 2009. New and selective ryanodine receptor activators for insect control. *Bioorg. Med. Chem.* 17, 4127–4133. doi:10.1016/j.bmc.2009.01.018
- Lai, T., Li, J., Su, J., 2011. Monitoring of beet armyworm *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae) resistance to chlorantraniliprole in China. *Pestic. Biochem. Physiol.* 101, 198–205. doi:10.1016/j.pestbp.2011.09.006
- Lande, R., 1981. The minimum number of genes contributing to quantitative variation between and within populations. *Genetics* 99, 541–553.
- LeOra-Software, 2002. Polo-PLus. POLO, for windows computer program.

- Liu, X., Ning, Y., Wang, H., Wang, K., 2015a. Cross-resistance, mode of inheritance, synergism, and fitness effects of cyantraniliprole resistance in *Plutella xylostella*. Entomol. Exp. Appl. 157, 271–278. doi:10.1111/eea.12361
- Ribeiro, L.M.S., Siqueira, H.A.A., Wanderley-Teixeira, V., Ferreira, H.N., Silva, W.M., Silva, J.E., Teixeira, Á.A.C., 2017. Field resistance of Brazilian *Plutella xylostella* to diamides is not metabolism-mediated. Crop Prot. 93, 82–88. doi:10.1016/j.cropro.2016.11.027
- Ribeiro, L.M.S., Wanderley-Teixeira, V., Ferreira, H.N., Teixeira, Á.A.C., Siqueira, H.A.A., 2014. Fitness costs associated with field-evolved resistance to chlorantraniliprole in *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae). Bull. Entomol. Res. 104, 88–96. doi:10.1017/S0007485313000576
- Roditakis, E., Vasakis, E., Grispou, M., Stavrakaki, M., Nauen, R., Gravouil, M., Bassi, A., 2015. First report of *Tuta absoluta* resistance to diamide insecticides. J. Pest Sci. (2004). 88, 9–16. doi:10.1007/s10340-015-0643-5
- Roush, R.T., Daly, J.C., 1990. The role of population genetics in resistance research and management, in: Roush, R.T., Tabashnik, B.E. (Eds.), Pesticide resistance in arthropods. Springer US, Boston, MA, pp. 97–152. doi:10.1007/978-1-4684-6429-0_5
- Roush, R.T., McKenzie, J.A., 1987. Ecological genetics of insecticide and acaricide resistance. Annu. Rev. Entomol. 361–380.
- Sattelle, D.B., Cordova, D., Cheek, T.R., 2008. Insect ryanodine receptors: molecular targets for novel pest control chemicals. Invertebr. Neurosci. 8, 107–119. doi:10.1007/s10158-008-0076-4
- Sayyed, A.H., Haward, R., Herrero, S., Ferre, J., Wright, D.J., 2000. Genetic and biochemical approach for characterization of resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Ac in a field population of the diamondback moth, *Plutella xylostella*. Appl. Environ. Microbiol. 66, 1509–1516. doi:10.1128/AEM.66.4.1509-1516.2000
- Silva, J.E., Assis, C.P.O., Ribeiro, L.M.S., Siqueira, H.A.A., 2016. Field-Evolved Resistance and Cross-Resistance of Brazilian *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae) Populations to Diamide Insecticides. J. Econ. Entomol. 109, 2190–2195. doi:10.1093/jee/tow161
- Sokal, R.R., Rohlf, F., 1995. Biometry: the principles and practice of statistics in biological research.

- Stone, B.F., 1968. A formula for determining degree of dominance in cases of monofactorial inheritance of resistance to chemicals. *Bull. World Health Organ.* 38, 325–326.
- Tabashnik, B.E., Liu, Y.B., Finson, N., Masson, L., Heckel, D.G., 1997. One gene in diamondback moth confers resistance to four *Bacillus thuringiensis* toxins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 1640–4. doi:10.1038/sj.hdy.6801092
- Teixeira, L. a., Andalaro, J.T., 2013. Diamide insecticides: Global efforts to address insect resistance stewardship challenges. *Pestic. Biochem. Physiol.* 106, 76–78. doi:10.1016/j.pestbp.2013.01.010
- Trocza, B., Zimmer, C.T., Elias, J., Schorn, C., Bass, C., Davies, T.G.E., Field, L.M., Williamson, M.S., Slater, R., Nauen, R., 2012. Resistance to diamide insecticides in diamondback moth, *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae) is associated with a mutation in the membrane-spanning domain of the ryanodine receptor. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 42, 873–880. doi:10.1016/j.ibmb.2012.09.001
- Tsukamoto, M., 1983. Methods of genetic analysis of insecticide resistance, in: Georgiou, G.P., Saito, T. (Eds.), *Pest resistance to pesticides*. Springer US, Boston, MA, pp. 71–98. doi:10.1007/978-1-4684-4466-7_3
- Uchiyama, T., Ozawa, A., 2014. Rapid development of resistance to diamide insecticides in the smaller tea tortrix, *Adoxophyes honmai* (Lepidoptera: Tortricidae), in the tea fields of Shizuoka Prefecture, Japan. *Appl. Entomol. Zool.* 49, 529–534. doi:10.1007/s13355-014-0283-x
- Wang, D., Qiu, X., Wang, H., Qiao, K., Wang, K., 2010. Reduced fitness associated with spinosad resistance in *Helicoverpa armigera*. *Phytoparasitica* 38, 103–110. doi:10.1007/s12600-009-0077-9
- Wu, M., Zhang, S., Yao, R., Wu, S., Su, J., Gao, C., 2014. Susceptibility of the Rice Stem Borer, *Chilo suppressalis* (Lepidoptera: Crambidae), to flubendiamide in China. *J. Econ. Entomol.* 107, 1250–1255. doi:10.1603/EC14053
- Yan, H.-H., Xue, C.-B., Li, G.-Y., Zhao, X.-L., Che, X.-Z., Wang, L.-L., 2014. Flubendiamide resistance and Bi-PASA detection of ryanodine receptor G4946E mutation in the diamondback moth (*Plutella xylostella* L.). *Pestic. Biochem. Physiol.* 115, 73–77. doi:10.1016/j.pestbp.2014.09.003